

УДК 612.751.3

РЕСПИРАТОРНЫЕ РЕАКЦИИ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ L-ГЛУТАМАТА В ОБЛАСТЬ ГОЛУБОГО ПЯТНА

© 2007 Д.Н. Толкушкина, Е.Л. Морозова, Н.А. Меркулова¹

В данной работе проведен анализ роли и значения голубого пятна, как основного норадренергического ядра, в регуляции деятельности дыхательного центра. В целях решения данного вопроса был использован глутамат, который является основным возбуждающим медиатором центральной нервной системы. В условиях микроинъекции глутамата в голубое пятно удалось выявить многообразное изменение паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц. Предполагается участие голубого пятна в формировании дыхательного ритма и объемных функций дыхательного центра.

Введение

Изучение центральных механизмов респираторного контроля является одним из актуальных направлений современной физиологии, при этом существенно важным представляется вопрос о супрабульбарной регуляции дыхания.

В настоящее время одной из перспективных является проблема участия супрабульбарных структур в регуляции деятельности дыхательного центра. Важность решения этой проблемы позволяет не только изучить механизмы функциональных перестроек деятельности дыхательного центра к изменяющимся условиям жизнедеятельности организма, но и решить такие фундаментальные вопросы, как механизмы интеграции одного из важнейших центров – дыхательного центра с различными структурами головного мозга. В частности, недостаточно изучены конкретные механизмы влияния голубого пятна на функции дыхательного центра.

¹ Толкушкина Дина Николаевна (dinani@rambler.ru), Морозова Екатерина Леонидовна, Меркулова Нина Андреевна, кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

В настоящее время известно, что голубое пятно имеет сложную структурно-функциональную и нейрохимическую архитектуру [1-3]. У крыс оно состоит из дорсолатеральной и вентролатеральной частей. Первая часть представлена плотно расположенными мелкими клетками, вторая – разреженными, но более крупными нейронами, в которых, наряду с высоким содержанием норадреналина, присутствуют серотонин, вещество Р, аскорбиновая кислота и др.

Голубое пятно, как основная норадренергическая структура, имеет широкие связи со многими отделами головного мозга. Это обуславливает участие голубого пятна в регуляции разнообразных функций организма: цикл сон-бодрствование, контроль мышечной активности, формирование многих вегетативных реакций, поддерживающих жизнедеятельность организма, и что особенно важно, – регуляция газового гомеостаза. Есть основания считать, что исследуемая структура является одним из основных центральных компонентов функциональной системы газового анализа [1-4].

В этом плане особый интерес представляют связи данного ядра с областью дыхательного центра. В частности, ряд авторов установил, что аксоны голубого пятна прослеживаются до уровня ядра солитарного тракта, который является одной из структур дыхательного центра [1-3, 5]. Наряду с этим в последние годы выявлены проекции голубого пятна к комплексу пре-Бетцингера [6]. Данный комплекс является одним из основных ритмогенерирующих отделов дыхательного центра. К настоящему времени установлены многообразные, как угнетающие, так и возбуждающие, влияния голубого пятна на структуры дыхательного центра [1-3, 5, 7]. Это позволяет предполагать существование норадренергических механизмов динамического объединения области голубого пятна и дыхательного центра в единую регуляторную систему, обеспечивающую адекватное приспособление функций дыхания к различным условиям жизнедеятельности организма.

Однако следует подчеркнуть, что в вопросах значимости голубого пятна в регуляции дыхания, его интеграции со структурами дыхательного центра остается много неясного, дискуссионного, спорного. Это определило постановку задачи представляемого исследования.

В работе анализируется значение голубого пятна в регуляции деятельности дыхательного центра в условиях микроинъекции в его структуры глутамата. Одним из основных факторов механизма действия глутамата является его непосредственное воздействие на глутаматные рецепторы, в особенности на NMDA-рецепторы [8]. Этот вид рецепторов широко распространен в центральной нервной системе, в том числе и в голубом пятне [9]. Поэтому имеются основания предполагать участие глутаматэргических структур голубого пятна в реализации механизма его респираторных влияний.

Методика

Эксперименты проводились на 30 взрослых нелинейных крысах обоего пола массой 210-280 грамм. Животных наркотизировали уретаном (1,5-1,7 г/кг внутривенно). Паттерн дыхания регистрировали при помощи спирографической методики. Для регистрации спирограммы использовали электронный спирограф с монотриггерным датчиком давления. Выходной сигнал через аналого-цифровой преобразователь поступал на USB – порт компьютера и визуально отображался программой “rats”. Оцифрованные сигналы обрабатывались в программе “Microsoft Excel”. Во всех экспериментах животные дышали атмосферным воздухом. На полученных спирограммах оценивались 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 рассчитывались частота дыхания ($f = 60 / T_T$, мин⁻¹) и минутный объем дыхания ($V = f * V_T$, мл/мин). Калибровку дыхательного объема производили в конце каждого опыта. Параллельно с регистрацией паттерна дыхания регистрировалась биоэлектрическая активность диафрагмы и наружных межреберных мышц (VI-VIII межреберье) с правой стороны тела животных с помощью стальных игольчатых электродов биполярным способом. Сигнал с электродов поступал на двухканальный усилитель биопотенциалов, преобразовывался аналого-цифровым преобразователем и визуально отображался на экране компьютера с помощью программы “mio 2”. Оцифрованные сигналы с вышеуказанного прибора обрабатывались в программе “Microsoft Excel”. На получаемых миограммах рассчитывались длительность залпов активности (с), длительность межзалповых интервалов (с) и максимальная амплитуда осцилляций (отн. ед.) в залпах активности инспираторных мышц. Растворы вводили в мозг с помощью микрошприца МШ-1 через стеклянную микропипетку с диаметром кончика 20-30 мкм, укрепленную на игле шприца. Вещества растворяли *ex tempore* в искусственной цереброспинальной жидкости и вводили в объеме 0,2 мкл со скоростью 0,01 нл/с. Для установления зависимости «доза-эффект» применяли растворы данного вещества в концентрациях 10^{-10} М, 10^{-7} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М, 10^{-2} М и 10^{-1} М. Характер респираторных эффектов определялся концентрацией действующего химического агента и временем его экспозиции. В контрольных опытах аналогичным образом инъецировали искусственную цереброспинальную жидкость в том же объеме.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с помощью пакетов анализа данных программ Excel 7.0, SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, USA) с использованием теста ANOVA для повторных измерений, тестов Dunnett's-, Tukey и непарного и парного t-теста Стьюдента. Для построения графиков пользовались программным пакетом Sigma Plot (Jandel Scientific, USA)

и Microsoft Excel. Статистически значимыми считались изменения со значениями $p < 0,05$. Все эксперименты на животных проводили в строгом соответствии с требованиями Женевской конвенции “International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals” (Geneva, 1990).

Результаты исследования

Результаты проведенных экспериментов показали следующие характерные особенности реакций респираторного паттерна и биоэлектрической активности мышц вдоха на локальное введение 10^{-1} М раствора глутамата в голубое пятно. Стимулирующее действие медиатора на дыхание нашло отражение, в частности, в увеличении дыхательного объема. При этом максимальный эффект составил 32% ($p < 0,05$; парный t-тест) относительно исходного уровня через 7 мин после введения глутамата. Вместе с тем, статистически значимых изменений легочной вентиляции выявить не удалось. Динамика реакций минутного объема дыхания носила волнообразный характер. При этом 1-2 мин после введения глутамата в голубое пятно наблюдали резкое снижение данного показателя (максимально на 30,5%), с 3 по 9 мин – постепенное нарастание, после чего его величина восстанавливалась до исходного значения. Углубление дыхания нарастало при этом уже с 1 по 9 мин, после чего восстанавливалось до первоначального уровня (рис. 1, 3). Частотно-временные характеристики паттерна дыхания (длительность выдоха, дыхательного цикла, частота дыхания) и биоэлектрической активности дыхательных мышц (продолжительность залпа и межзалпового интервала активности) при воздействии глутамата в голубое пятно также претерпевали значительные изменения. Наблюдали увеличение длительности выдоха (максимально на 39%; $p < 0,05$; tukey-тест) и дыхательного цикла (максимально на 17,3%; $p < 0,01$; tukey-тест), что приводило к урежению частоты дыхания на 16,7% ($p < 0,01$; tukey-тест;). Описанные респираторные реакции развивались уже на первой минуте после микроинъекции глутамата в голубое пятно. К 40 мин анализирующие показатели дыхательного паттерна возвращались к исходному уровню (рис. 1).

Продолжительность инспираторной фазы, также как и доля вдоха в дыхательном цикле изменялись не значительно.

Параллельно с этим происходило усиление биоэлектрической активности инспираторных мышц. Об этом свидетельствовало увеличение амплитуды осцилляций в залпах на электромиограмме диафрагмы, которое составило на пике реакции 12,3% ($p < 0,05$; парный t-тест). Динамика изменений амплитуды осцилляций в залпах активности диафрагмы показана на рисунке 2 (I). Максимальное изменение амплитуды осцилляций в залпах активности на электромиограмме наружных межреберных мышц характеризовалось его уменьшением, хотя данные

изменения не были статистически значимы. Временное течение данной реакции представлено на рисунке 2 (II).

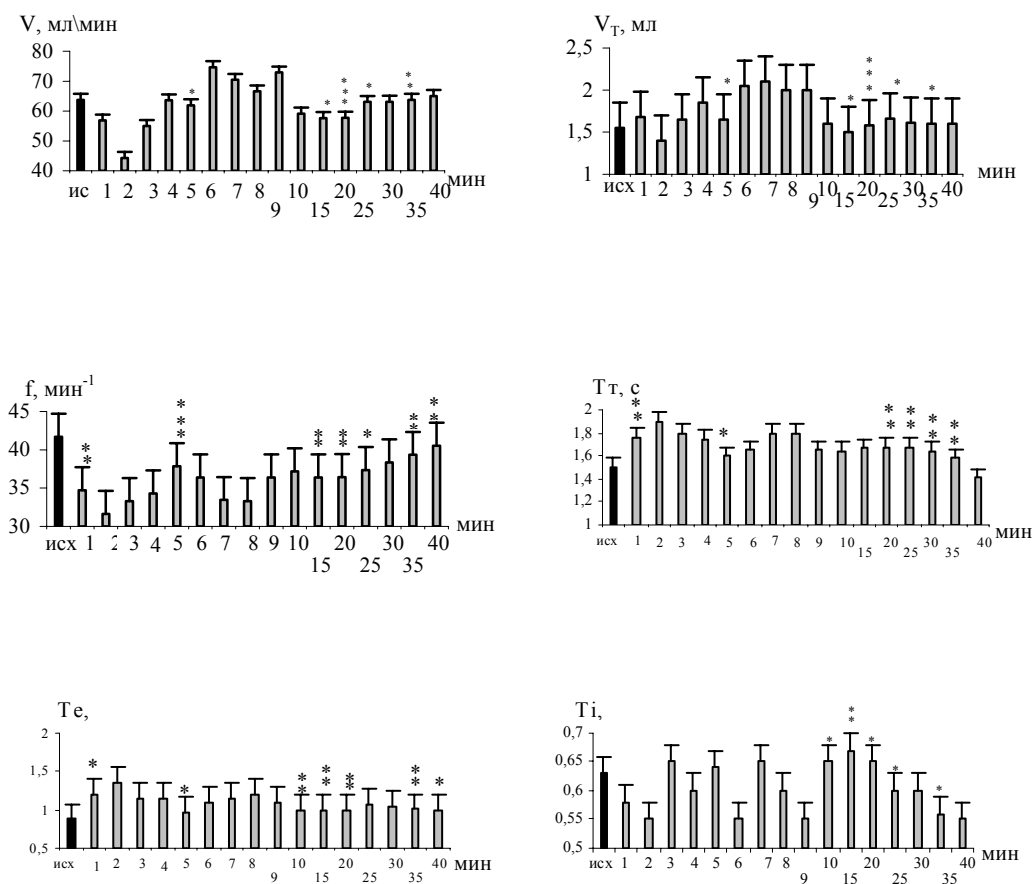


Рис. 1. Изменение минутного объема дыхания (V , мл/мин), дыхательного объема (V_T , мл), частоты дыхания (f , мин⁻¹) длительности дыхательного цикла (T_T , с), длительности выдоха (T_e , с) и вдоха (T_i , с) до и на фоне микроинъекции глутамата 10^{-1} М в структуры голубого пятна. Здесь и на рисунках ниже звездочками обозначены статистически значимые изменения показателей относительно исходного уровня: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$. По оси абсцисс: время экспозиции глутамата в голубое пятно (черные столбики – исходные данные; серые столбики – изменение показателей на фоне действия L-глутамата с 1 по 40 мин).

Однако изменения продолжительности залпа активности на электромиограмме диафрагмы и наружных межреберных мышц были более выраженными. Временное течение данных реакций представлено на рисунке 2(Б). Как следует из графика, увеличение этих показателей проявлялось уже в первые минуты наблю-

дения, однако статистически значимых различий с начальными параметрами отклонения данных показателей достигли для диафрагмы через 5 мин после микроинъекции глутамата, а для наружных межреберных мышц – лишь через 10 мин. Максимально выраженный эффект зарегистрирован на 2-ой мин эксперимента.

Параллельно с увеличением экспираторной фазы отмечали увеличение продолжительности межзатопового интервала активности инспираторных мышц. Максимальный эффект развивался уже на первой минуте и составил 85% ($p < 0,01$; tukey-тест) для диафрагмы и 107,9% ($p < 0,05$; tukey-тест) для наружных межреберных мышц. Динамика изменений данных показателей проиллюстрирована на рисунке 2(В).

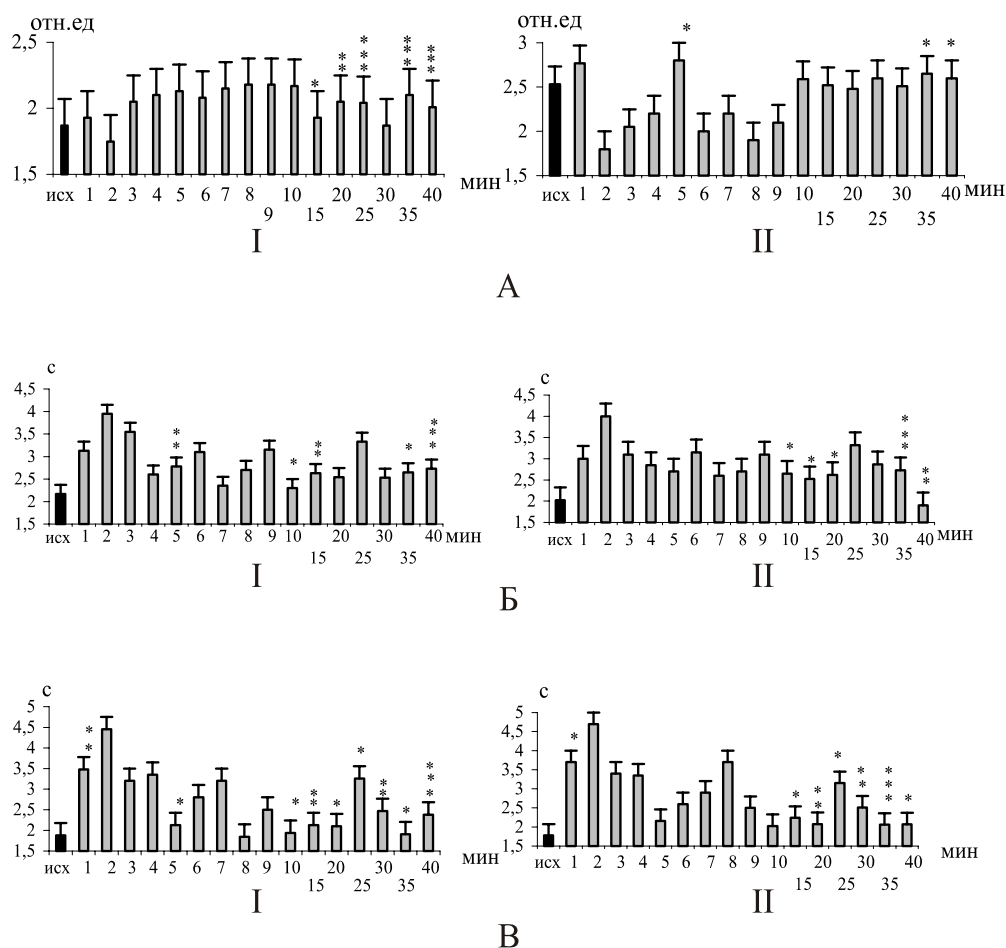


Рис. 2. Изменение амплитуды осцилляций (отн. ед., А), длительности залпа (с, Б) и межзатопового интервала (с, В) активности диафрагмы (I) и наружных межреберных мышц (II) до и на фоне микроинъекции глутамата 10^{-1} М в структуры голубого пятна

Обозначения те же, что на рис. 1.

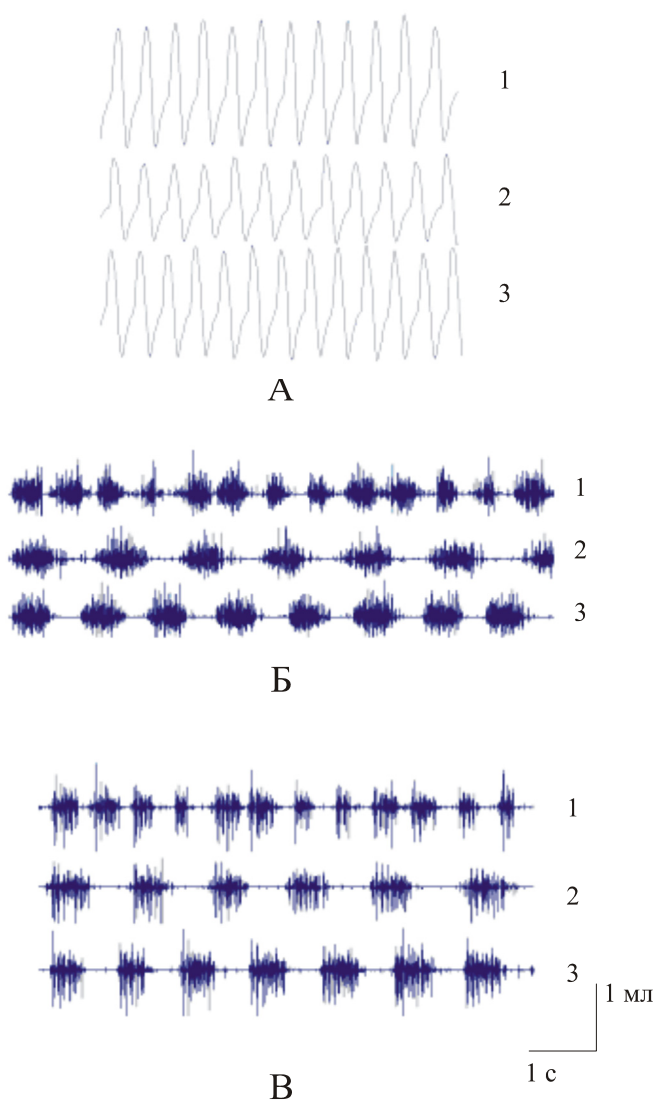


Рис. 3. Спирограммы (А) и биоэлектрическая активность диафрагмы (Б) и наружных межрёберных мышц (В) до (1), через 2 (2) и 10 мин (3) после микроинъекции 10^{-1} М глутамата в голубое пятно. Справа внизу калибровка 1 мл (для спирограммы) или 100 отн. ед. (для ЭМГ) и 1 с.

Глутамат в концентрациях 10^{-10} М, 10^{-7} М, 10^{-4} М, 10^{-3} М и 10^{-2} М не вызывал статистически значимых изменений внешнего дыхания.

В контрольной группе отклонения показателей дыхания от исходных величин не превышали 3-5% и не были статистически значимыми.

Обсуждение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что изучаемые параметры дыхания после экспозиции глутамата в голубое пятно с 1 по 40 минуты изменяются многообразно. Вначале происходит угнетение дыхания, о чем свидетельствует уменьшение вентиляции легких, главным образом за счет урежения дыхания, а затем эффект сменяется на противоположный. Изменения соответствующих амплитудных характеристик биоэлектрической активности инспираторных мышц были аналогичными. При этом действие глутамата направлено не только на объемные характеристики дыхания, но и на частотно-временные. Отмечали значительное увеличение экспираторной фазы, а также продолжительности залпа и межзалповых интервалов активности дыхательных мышц, что приводило к увеличению длительности дыхательного цикла. Все наблюдаемые нами изменения носили дозозависимый характер, что находит подтверждение в данных литературы [10].

Глутамат является основным возбуждающим медиатором в центральной нервной системе [11], а глутаматэргическая передача играет ключевую роль в регуляции и синхронизации активности нейронов дыхательного центра, как у взрослых, так и у новорожденных животных [12, 13].

Анализируя возможные механизмы влияния глутамата можно предположить, как было отмечено выше, его непосредственное действие на глутаматные рецепторы голубого пятна, некоторые из которых расположены в соме норадренергических нейронов. Разнообразие данных рецепторов чрезвычайно велико [13-16]. Глутамат, воздействуя на рецепторы, оказывает возбуждающее влияние на нейроны голубого пятна, вследствие чего увеличивается «выброс» норадреналина. Разнообразный характер изменений деятельности дыхательного центра в условиях микроинъекции глутамата в структуры исследуемого ядра предположительно можно объяснить свойствами, особенностями и сложными взаимоотношениями $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -адренорецепторов, которые имеются как в голубом пятне, так и в дыхательном центре. Большое количество норадреналина, вызванного возбуждающим действием глутамата на голубое пятно, прежде всего, повышает активность $\alpha 2$ -адренорецепторов дыхательных нейронов [17-19]. Это вызывает угнетение дыхания. Однако в формировании респираторных эффектов голубого пятна в условиях микроинъекции глутамата в его структуры нельзя полностью исключить участие $\alpha 1$ -адренорецепторов. Можно допустить, что в зависимости от количества, степени активности и других свойств, данный тип рецепторов проявляет свое возбуждающее действие на нейроны дыхательного центра позднее по сравнению с $\alpha 2$ -адренорецепторами. Нельзя, однако, исключить и совместного действия $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -адренорецепторов на дыхательные нейроны.

Таким образом, голубое пятно, как сложная хеморецептивная структура, и, прежде всего, как один из основных источников норадренергических влияний на дыхательный центр, участвует в формировании его объемных функций и дыхательного ритма.

Литература

- [1] Голубева, Е.Л. Формирование центральных механизмов регуляции дыхания в онтогенезе / Е.Л. Голубева. – М., 1971. – 222 с.
- [2] Белова, Т.И. Гомеостатические функции locus coeruleus (синего пятна) / Т.И. Белова, Е.Л. Голубева, К.В. Судаков. – М.: Наука, 1980. – 120 с.
- [3] Смирнов, В.М. Физиология центральной нервной системы / В.М. Смирнов, В.Н. Яковлев. – М., 2002. – 347 с.
- [4] Глазкова Е.Н. Значение бомбезина в бульбарных механизмах регуляции дыхания: автореф. дис. канд. ... биол. наук. / Е.Н. Глазкова. – Самара, 2005. – 18 с.
- [5] Фоновая импульсная активность нейронов голубого пятна крысы после разрушения некоторых ядер продолговатого мозга / М.В. Ханбабян [и др.] // Журн. ВНД. – 2003. – Т. 53. – № 2. – С. 222-227.
- [6] Effects of inactivation and stimulation of locus coeruleus on respiratory activity of neonatal rat / H. Hakuno [et. al.] // Resp. Physiol. and Neur. – 2004. – 140. – P. 9-18.
- [7] Role of l-glutamate in the locus coeruleus of rats in hypoxia-induced hyperventilation and anapnoea / Ferreira Caroline M. [et. al.] // Respiratory Physiology & Neurobiology. – 2004. – V. 139. – P. 157-166.
- [8] Регуляторные системы организма человека / В.А. Дубынин [и др.]. – М., 2003. – 365 с.
- [9] Glial all line-derived neurotrophic factor (GDNF) is required for differentiation of pontine noradrenergic neurons and patterning of central respiratory output / Z. Huang [et. al.] // Neurosci. – 2005. – V. 130. – № 1. – P. 95-105.
- [10] In vivo noradrenaline release evoked in the anteroventral thalamic nucleus by locus coeruleus activation: an electrochemical study / P. Brun [et. al.] // Neuroscience. – 1993. – V. 52 (4). – P. 961-972.
- [11] Glutamate efflux from rat brain slices and cultures: a comparison of the depolarizing agents potassium, 4-aminopyridine, and veratrine / M.J. Meldrum [et. al.] // Neurochem. Res. – 1995. – V. 20 (2). – 225-232.
- [12] Morgado-Valle, C. Depletion of substance P and glutamate by capsaicin blocks respiratory rhythm in neonatal rat in vitro / C. Morgado-Valle, J.L. Feldman // J. Physiol. – 2004. – V. 555. – P. 783-792.
- [13] Sakai, K. Afferent projection to the locus coeruleus as visualized by the horseradish peroxidase technique / K. Sakai, M. Touret, D. Salvert // Brain Res. – 1977. – V. 118. – P. 21-41.
- [14] Huang, W. Involvement of brain glutamate release in pyrogenic fever / W. Huang, S. Tsai, M. Lin // Neuropharmacology. – 2001. – V. 41. – P. 811-818.
- [15] Perez, H. Medullary responses to chemoreceptor activation are inhibited by locus coeruleus and nucleus raphe magnus / H. Perez, S. Ruiz // Neuroreport. – 1995. – V. 6 (10). – P. 1373-1376.
- [16] Pineda, J. Carbon dioxide regulates the tonic activity of locus coeruleus neurons by modulating a proton and polyamine-sensitive inward rectifier potassium current / J. Pineda // Neuroscience. – 1997. – V. 77. – P. 723-743.

- [17] Arata, A. The adrenergic modulation of firings of respiratory rhythm-generetig neurons in medulla-spinal cord preparation from newborn rat / A. Arata, H. Onimaru, I. Homma // *Exp. Brain Res.* – 1998. – Vol. 119. – P. 399-408.
- [18] Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents / G. Hilair // *Respir. Phisiol. Neurobiol.* – 2004. – V. 143. – № 2-3. – P. 187-197.
- [19] Esteban S. α_2 -autoreceptors and α_2 -heteroreceptors modulating tyrosine and tryptophan hydroxylase activity in the rat brain in vivo: an investigation in to the α_2 -adrenoreceptors subtypes / S. Esteban, J. Ilado, S.A. Garcia- Sevilla // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1996. – V. 353. – P. 391-399.

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

RESPIRATORY RESPONSES TO MICROINJECTICUS OF L-GLUTAMATE INTO THE LOCUS COERULEUS AREA

© 2007 D.N. Tolkushkina, E.L. Morozova, N.A. Merkulova²

In the paper the role and importance of locus coeruleus as the basic noradrenergic nucleus in regulation of activity of the respiratory center is and used. To solve the problem we used L-glutamat, which is the basic excitatory neurotransmitter of the central nervous system. After the micro-injection of L-glutamat in to locus coeruleus it was possible to reveal diverse change of breathing pattern and electric activity of respiratory muscles. We suppose the participation of locus coeruleus in control of respiratory rhythm and depth of breathing.

Paper received 25/IX/2006.
Paper accepted 26/XII/2006.

² Tolkushkina Dina Nickolaevna (dinani@rambler.ru), Morozova Ekaterina Leonidovna, Merkulova Nina Andreevna, Dept. of Human and Animal Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.