

ВЛИЯНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ БЛОКАДЫ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ НА СПОНТАННУЮ ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА НОВОРОЖДЕННЫХ И ПЛОДОВ КРЫС IN VITRO

В исследовании *in vitro* на бульбоспинальных препаратах мозга плодов (20-дневных) и новорожденных крыс (0-3-суточных) установлено, что механизмы электротонического взаимодействия между респираторными нейронами продолговатого мозга играют существенную роль в процессе дыхательного ритмогенеза, а спинного мозга – в процессе генерации инспираторного паттерна.

Ключевые слова: дыхательный центр, спектральный анализ, перинатальный период, бульбоспинальные препараты, плоды, новорожденные крысы

У млекопитающих щелевые контакты существуют между разными видами клеток, в том числе и нейронами. Через каналы, сформированные конексонами, клетки обмениваются не только ионами, но и более крупными молекулами, осуществляется синхронизация электрической и метаболической активности. У плодов и новорожденных млекопитающих щелевых контактов между нейронами значительно больше, чем у взрослых [1]. Иммунохимическими и электрофизиологическими методами у новорожденных в респираторных нейронных сетях как на уровне продолговатого, так и спинного мозга обнаружены нейроны, связанные щелевыми контактами [2]. Экспериментальные и модельные данные дают основание предположить, что выраженность электротонического взаимодействия в сети ритмгенерирующих нейронов определяет частоту генерации в них разрядов [3]. В то же время остается неясным, какую роль играют электротонически связанные нейроны в паттернгенерирующих нейронных сетях. Целью данной работы было изучение роли электротонического взаимодействия респираторных нейронов продолговатого и спинного мозга новорожденных крыс в процессе генерации инспираторного паттерна.

Методика

Исследование выполнено на 44 изолированных бульбоспинальных препаратах мозга плодов и новорожденных белых беспородных крыс в условиях *in vitro*. Препараты были получены из мозга 14 плодов 3-х крыс, находящихся на 20 дне беременности (общая продолжительность беременности 21 день), и 30 новорожденных крысят в возрасте от 1 до 3 суток. Срок беременности определялся методом вагинальных мазков. Извлечение плодов производилось под наркозом (этаминал натрия

30мг/кг, в/б). После удаления оболочек и плаценты плод помещался в препаровальную установку, где непрерывно орошался оксигенированной искусственной цереброспинальной жидкостью (ЦСЖ).

Для приготовления бульбоспинального препарата у плодов или наркотизированных эфиром новорожденных крысят путем кранио- и ламинэктомии обнажался головной мозг и шейный отдел спинного мозга. Ствол мозга пересекался на межколликкулярном уровне. Затем препарировались и пересекались черепно- и спинномозговые нервы до уровня C_6 . Во время препаровки мозг орошали искусственной цереброспинальной жидкостью (ммоль/л: NaCl – 124,0, KCl – 5,0; CaCl₂ – 2,4; MgSO₄ – 1,3; NaHCO₃ – 26,0; KH₂PO₄ – 1,2; d-глюкоза – 30,0 [4]), насыщенной смесью 5% CO₂ и 95% O₂. pH раствора составлял 7,3-7,4. По окончании препаровки температура перфузата постепенно повышалась до 25°С, после чего спинной мозг пересекался на уровне сегмента C_6 , и препарат помещался в регистрационную камеру объемом 3 мл. Перфузию препарата в камере проводили со скоростью 3 мл/мин. Электрическая активность вентральных корешков сегментов C_3 – C_5 отводилась с помощью всасывающего электрода (внутренний диаметр 100 мкм) и через усилитель переменного тока подавалась на входной канал персонального компьютера, где записывалась на жесткий диск в файлы формата wav.

Блокада щелевых контактов осуществлялась с помощью галотана (10 ммоль/л), который растворялся в искусственной ЦСЖ перед началом перфузии препарата. Изолированное воздействие галотана на структуры продолговатого или спинного мозга осуществлялось путем отдельной их перфузии. Для этого попеременно устанавливалась герметичная пере-

городка, в вырез которой помещался препарат таким образом, что перегородка находилась на границе между продолговатым и спинным мозгом. Щель между препаратом и перегородкой заполнялась вазелином. Герметичность проверялась до и после эксперимента с помощью раствора метиленового синего.

При обработке нейрограмм измерялись продолжительность цикла респираторной активности, время и амплитуда респираторных разрядов. Спектральный анализ электрических разрядов производился с использованием алгоритма быстрого преобразования Фурье. Для построения спектрограмм использовался 1024-точечный формат при частоте дискретизации 500 Гц. Показатели спектрограммы рассчитывались на основании данных, полученных от 10 последовательных респираторных разрядов.

Полученные данные были представлены в виде средних величин и их стандартной ошибки. Анализ статистических различий производился с помощью *t*-теста Стьюдента для средних величин. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Влияние галотана на респираторную активность бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных крыс

Проведенное исследование показало, что как при общей перфузии бульбоспинального препарата мозга новорожденных крыс, так и при изолированной перфузии продолговатого мозга искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), в среднем через 5 мин. ($317,7 \pm 32,0$ и $295,5 \pm 36,6$ с. соответственно, $p > 0,05$) наступало обратимое торможение респираторной активности (рис. 1, А, Б). В то же время при изолированной перфузии спинного мозга искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), респираторная активность сохранялась на протяжении всего периода, в течение которого осуществлялось воздействие (40 мин.) (рис 1, В). Это свидетельствует о том, что возникающее под действием галотана торможение респираторной активности у бульбоспинальных препаратов новорожденных крыс обусловлено его влиянием на респираторную нейронную сеть продолговатого мозга.

Анализ изменений параметров инспираторного паттерна показал, что в середине временного интервала (TS), в течение которого галотан вызывал полное торможение респиратор-

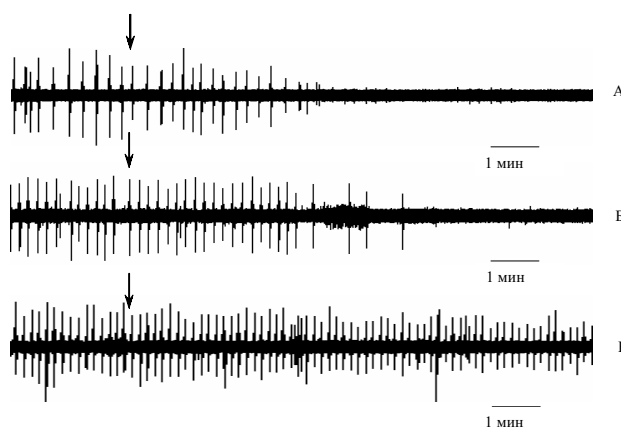


Рисунок 1. Респираторная активность бульбоспинальных препаратов новорожденных крыс при: А – общей перфузии, Б – изолированной перфузии продолговатого мозга, В – изолированной перфузии спинного мозга искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л). Стрелкой отмечено начало перфузии.

ной активности бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных крыс, значительно снижается амплитуда и продолжительность респираторных разрядов (20,1% и 25,1% соответственно). Под действием галотана уменьшается амплитуда пиков спектральной плотности мощности в низкочастотном (0-10 Гц) и среднечастотном (11-50 Гц) диапазонах (рис. 2). Снижение их амплитуды происходит не пропорционально, в большей степени оно выражено у низкочастотного пика, о чем свидетельствует уменьшение среднего значения отношения амплитуд низко- и среднечастотного пиков (табл. №1, 2).

В бульбоспинальных препаратах, у которых проводилась изолированная перфузия продолговатого мозга искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), в TS возникали достоверные изменения только амплитуды пиков спектральной плотности мощности в низкочастотном (0-10 Гц) и среднечастотном (11-50 Гц) диапазонах.

В течение первых 10 минут изолированной перфузии спинного мозга искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), происходило выраженное снижение амплитуды респираторных разрядов. В середине этого временного интервала (TS) на фоне снижения амплитуды респираторных разрядов уменьшается их продолжительность (рис. 3). Снижается амплитуда пиков спектральной плотности мощности в низкочастотном (0-10 Гц) и среднечастотном (11-50 Гц) диапазонах спектрограмм респираторных разрядов. Средняя величина отношения амплитуд низко- и среднечастотного пиков зна-

Таблица 1. Параметры респираторной активности С3-С4 бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных крыс на фоне действия галотана 10 ммоль/л

Параметр	Общая перфузия	
	фон	галотан
Мощность низкочастотного пика, о.е	0,03±0,006	0,01±0,001**
Частота низкочастотного пика, Гц	4,8±0,5	4,5±0,6
Мощность среднечастотного пика, о.е,	0,02±0,004	0,01±0,001**
Частота среднечастотного пика, Гц	16,4±1,7	17,6±1,5
Соотношение МНЧ/МСЧ	2,29±0,35	1,84±0,40*
Продолжительность разряда, с	0,86±0,06	0,64±0,05**
Амплитуда разряда, мкВ	77,3±9,8	61,7±5,8*
Продолжительность респираторного цикла, с	14,1±1,3	15,2±1,8

* – p ≤ 0,05
 ** – p ≤ 0,01
 *** – p ≤ 0,001

Таблица 2. Параметры респираторной активности С3-С4 бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных крыс на фоне действия галотана 10 ммоль/л

Параметр	Изолированная перфузия продолговатого мозга		Изолированная перфузия спинного мозга	
	фон	галотан	фон	галотан
Мощность низкочастотного пика, о.е	0,03±0,007	0,01±0,004**	0,20±0,054	0,11±0,031**
Частота низкочастотного пика, Гц	3,8±0,8	4,0±1,1	5,1±0,4	4,7±0,5
Мощность среднечастотного пика, о.е,	0,02±0,002	0,01±0,001***	0,08±0,023	0,05±0,01*
Частота среднечастотного пика, Гц	19,4±2,3	17,3±1,7	17,0±1,8	17,8±2,1
Соотношение МНЧ/МСЧ	1,72±0,40	1,26±0,31	3,23±0,57	2,15±0,29*
Продолжительность разряда, с	0,86±0,15	0,78±0,09	0,77±0,04	0,60±0,05***
Амплитуда разряда, мкВ	83,9±4,6	78,9±5,7	119,2±17,6	96,9±14,3**
Продолжительность респираторного цикла, с	13,4±1,1	13,0±1,5	16,4±3,8	19,6±3,1

Обозначения те же, что и в таб. 1

чительно уменьшалась, что свидетельствует о более выраженном снижении мощности низкочастотного пика. Эти данные демонстрируют большое значение механизмов электротонического взаимодействия диафрагмальных мотонейронов в процессе формирования паттерна инспираторной активности (рис. 2).

Влияние галотана на респираторную активность бульбоспинальных препаратов мозга плодов крыс

При изолированной перфузии структур продолговатого мозга бульбоспинального препарата мозга плодов крыс искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), через 223,2±15с. после начала развивалось торможение генерации респираторной активности. В TS происходило достоверное уменьшение продолжительности респираторных разрядов. На спектрограммах респираторных разрядов отмечено значительное снижение амплитуды пиков спектральной плотности мощности низко- и среднечастотного диапазонов. При этом достоверных изменений отношения амплитуд низко- и

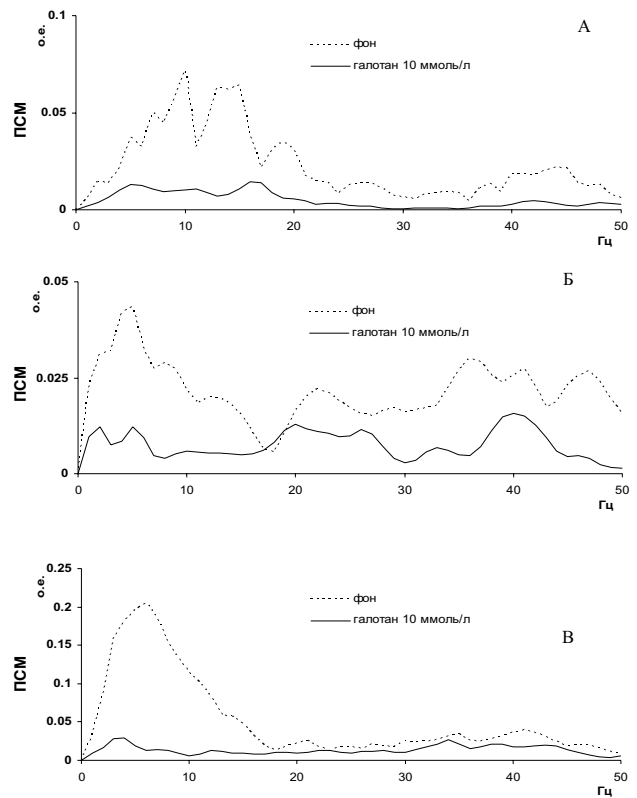


Рисунок 2. Влияние галотана на частотные характеристики респираторных разрядов у новорожденных крыс

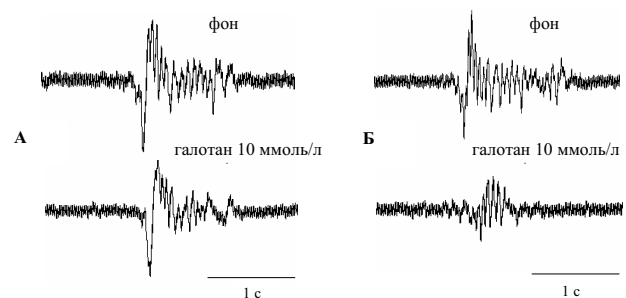


Рисунок 3. Изменение параметров респираторных разрядов при изолированной перфузии: А – продолговатого мозга, Б – спинного мозга ИЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л)

среднечастотного пиков не происходило.

В экспериментах, в которых осуществлялась изолированная перфузия структур спинного мозга бульбоспинального препарата мозга плодов крыс искусственной ЦСЖ, содержащей галотан (10 ммоль/л), так же, как и в подобных исследованиях, выполненных на препаратах мозга новорожденных крыс, торможения респираторной активности не происходило. Однако на всем протяжении действия галотана не возникало снижения амплитуды респираторных разрядов, как это было у препаратов мозга новорожденных крыс. К 5 минуте изолированной перфузии спинного мозга бульбоспинального препарата мозга плодов крыс досто-

верно уменьшалась только продолжительность респираторных разрядов. Остальные параметры инспираторной активности значительных изменений не претерпевали.

Обсуждение результатов

Начиная с 70-х годов, когда впервые были получены данные о наличии электротонического взаимодействия между нейронами стволовых ядер у млекопитающих, и до настоящего времени с помощью морфологических методов (электронная микроскопия [2], внутриклеточное введение красителей [5]), иммунологических (моноклональные антитела на конексины [6]) и электрофизиологических (парная внутриклеточная регистрация электрической активности [7]) получен достаточно обширный экспериментальный материал, доказывающий широкое распространение в ЦНС млекопитающих щелевидных контактов.

В респираторной сети нейронов наряду с химическими синаптическими связями существуют и электрические [3]. В предшествующих исследованиях с использованием целых бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных мышей и коронарных срезов было установлено, что фармакологическая блокада щелевидных контактов приводит к торможению генерации респираторного ритма [7]. Полученные нами данные показали, что торможение генерации респираторного ритма происходит при блокаде щелевых контактов в структурах продолговатого мозга. Это свидетельствует о том, что электротоническое взаимодействие нейронов ритмгенерирующей сети продолговатого мозга играет существенную роль в ее функцио-

нировании в период перинатального развития.

На фоне блокады щелевых контактов в структурах спинного мозга респираторная активность в вентральных корешках C₃-C₅ сохраняется. В препаратах мозга новорожденных крыс при этом происходит значительное уменьшение амплитуды и продолжительности респираторных разрядов. В частотном спектре респираторных разрядов на фоне действия галотана при изолированной перфузии спинного мозга происходит значительное снижение амплитуды низкочастотного и среднечастотного пика. По всей видимости, имеющиеся между диафрагмальными нейронами щелевые контакты, обеспечивающие синхронизацию их активности, важны для формирования амплитудных и временных характеристик разряда, что в свою очередь будет определять эффективность сокращения диафрагмальной мышцы. Этот феномен свидетельствует о том, что пул диафрагмальных нейронов выполняет не только функцию релейной станции, передающей инспираторный драйв из бульбарного дыхательного центра к диафрагмальной мышце, а является важным компонентом генератора паттерна инспираторной активности.

В то же время у препаратов мозга плодов блокада щелевых контактов в структурах спинного мозга не вызывает такого широкого спектра изменений инспираторной активности, как у препаратов мозга новорожденных крыс. При блокаде щелевых контактов в структурах спинного мозга плодов достоверно уменьшается только продолжительность респираторных разрядов.

Инспираторная активность у плодов имеет ряд существенных отличий от таковой у новорожденных [8]. Респираторные разряды, регистрируемые у бульбоспинальных препаратов мозга плодов крыс, имеют меньшую продолжительность и формируются преимущественно осцилляциями низкой частоты (1-10 Гц).

Динамика изменений параметров инспираторной активности в перинатальном онтогенезе свидетельствует об интенсивном процессе становления и развития механизмов генерации инспираторного паттерна в дыхательном центре в постнатальном периоде [8]. Этому могут способствовать усиление функциональной активности рецепторного аппарата системы дыхания, а также развитие синаптических связей дыхательного центра с отделами ЦНС. Обращает на себя внимание тот факт, что в пренатальном периоде развития дыхательного цент-

Таблица 3. Параметры респираторной активности С3-С4 бульбоспинальных препаратов мозга плодов крыс 20 суток гестации на фоне действия галотана (10 ммоль/л)

Параметр	Изолированная перфузия продолговатого мозга		Изолированная перфузия спинного мозга	
	фон	галотан	фон	галотан
Мощность низкочастотного пика, о.е	3,76±0,391	2,30±0,443*	3,66±0,632	3,25±0,391
Частота низкочастотного пика, Гц	3,2±0,6	2,7±0,4	2,9±0,2	2,7±0,2
Мощность среднечастотного пика, о.е.	0,80±0,091	0,54±0,082*	0,75±0,124	0,82±0,080
Частота среднечастотного пика, Гц	11,6±0,6	11,0±0,6	12,2±1,2	13,2±1,4
Соотношение МНЧ/МСЧ	4,90±0,49	4,70±0,87	4,95±0,45	4,15±0,46
Продолжительность разряда, с	0,78±0,07	0,67±0,08*	0,74±0,05	0,64±0,06*
Амплитуда разряда, мкВ	68,2±5,4	68,7±5,4	83,8±12,2	74,9±12,3
Продолжительность респираторного цикла, с	20,6±4,5	23,0±1,6	23,8±6,2	18,2±4,1

Обозначения те же, что в таб. 1

ра первоначально формируется низкочастотный пик в спектре респираторных разрядов. Формирование среднечастотного «пика» начинается в постнатальном периоде и наиболее интенсивно продолжается в постнатальном периоде. Присутствие в спектрограмме респираторного разряда одновременно двух пиков и своеобразная динамика изменения их мощности свидетельствует о том, что в перинатальном периоде существуют два разных нейронных механизма генерации инспираторного паттерна [9]. В перинатальном периоде онтогенеза происходит увеличение длительности инспираторных разрядов параллельно с нарастанием мощности осцилляций среднечастотного диапазона. Причем в бульбоспинальных препаратах новорожденных крысят вторая половина респираторных разрядов сформирована толь-

ко среднечастотными осцилляциями. В постнатальном периоде основным индикатором развития генератора инспираторного паттерна дыхательного центра является его способность генерировать среднечастотные осцилляции респираторных разрядов [8]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что по мере развития механизмов генерации инспираторного паттерна значительно меняется роль в них электротонического взаимодействия диафрагмальных мотонейронов.

Таким образом, представленные данные дают основание предположить, что электротоническое взаимодействие между нейронами респираторной сети у плодов и новорожденных крыс играет важную роль в механизмах генерации дыхательного ритма и паттерна инспираторной активности.

Список использованной литературы:

1. *Llinas R.* Electronic transmission in the mammalian central nervous system. In: *Gap junctions* (Bennett MVL, ed), 337–353. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
2. *R. Dermietzel, D.C. Spray,* Gap junctions in the brain: where, what, type, how many and why?, *TINS* 16 1993 186–192
3. *Rekling JC, Shao XM, and Feldman JL.* Electrical coupling and excitatory synaptic transmission between rhythmogenic respiratory neurons in the PreBEotzinger complex. *J Neurosci* 20: RC113, 2000.
4. *Suzue T.* Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol. (Lond.)* 354: 173–183, 1984
5. *Peinado, A., Yuste, R. & Katz, L. C.* (1993). Extensive dye coupling between rat neocortical neurons during the period of circuit formation. *Neuron* 10, 103–114.
6. *Qiang Chang, Michael Gonzalez, I Martin J. Pinter, and Rita J. Balice-Gordon* Gap Junctional Coupling and Patterns of Connexin Expression among Neonatal Rat Lumbar Spinal Motor Neurons *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19(24):10813–10828
7. *Bou-Flores C and Berger AJ.* Gap junctions and inhibitory synapses modulate inspiratory motoneuron synchronization. *J Neurophysiol* 85: 1543–1551, 2001.
8. *Мирошниченко И.В., Пятин В.Ф., Алексеева А.С., Тюрин Н.Л.* Особенности спектральных характеристик электрической активности дыхательного центра в процессах мозга плодов и новорожденных крыс in vitro. // *Рос. Физиол. Журн. Им. И.М. Сеченова.* Т. 88. №2. с. 248-256. 2002.
9. *James Duffin* Functional organization of respiratory neurones: a brief review of current questions and speculations. *Exp Physiol* 89.5 pp 517-529. 2004