

На правах рукописи.

Буй Тхи Хыонг

**ГЛУТАМАТЭРГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ РЕФЛЕКТОРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ КАРДИОРЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ**

03.03.01 – Физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2013

Работа выполнена на кафедре анатомии и физиологии человека и животных
Российского государственного педагогического университета им. А.И.Герцена

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Александров Вячеслав Георгиевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Клименко Виктор Матвеевич
Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины СЗО РАМН,
руководитель Отдела физиологии им. И.П.Павлова

доктор биологических наук
Федин Анатолий Николаевич
Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М.Сеченова РАН, главный научный
сотрудник

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт общей
патологии и патофизиологии РАМН

Защита диссертации состоится 22 апреля 2013 г. в 13 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.020.01 по защите докторских и кандидатских
диссертаций при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034,
Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии
им. И.П. Павлова РАН

Автореферат разослан " ____ " марта 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного
совета доктор биологических наук

Н.Э. Ордян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Изучение роли различных медиаторных систем в регуляции деятельности кардиореспираторной системы, является одной из фундаментальных проблем современной нейрофизиологии и физиологии висцеральных систем. Установлено, что важную роль в регуляции висцеральных функций играют глутаматэргические механизмы (Vardhan et al, 1993; Tsuchihashi et al, 1993, 1994; Bongianini et al, 2002.). Глутаматные рецепторы различных типов обнаружены во многих областях центральной нервной системы (Fagg et al, 1983; Young et al, 1991; Сергеев и др., 1999). Высокая плотность глутаматных рецепторов отмечается в тех структурах продолговатого мозга, которые участвуют в рефлекторном контроле кардиореспираторной функции. К ним относится ядро солитарного тракта, в котором заканчиваются первичные афференты от механо- и хеморецепторов кардиореспираторной системы (Chiang, Hwang, 1990; Vardhan et al, 1993; Mizusawa et al, 1994; Braga et al, 2006), а также вентролатеральная область продолговатого мозга (Gatti et al., 1986; Lawing et al., 1987; Chiang et al, 1990; Vardhan et al, 1993; Tsuchihashi et al, 1994; Mizusawa et al, 1994; Bongianini et al, 2002; Braga et al, 2006). Изменение уровня глутамата в этих структурах, введение в них антагонистов и агонистов глутаматных рецепторов, приводит к изменениям параметров дыхания и кровообращения (Talman, 1989; Bonham, McCrimmon, 1990; Kazemi, Hoop, 1991; Gören et al, 2000; Resstel, Correa, 2006; Nehre et al, 2008). Эти данные позволяют полагать, что глутаматэргические механизмы могут участвовать в модуляции таких базовых рефлекторных реакций кардиореспираторной системы, как рефлекс Геринга-Брейера, барорефлекс, а также хеморефлекторные реакции. Установлено, что повышение уровня глутамата в нервной ткани и цереброспинальной жидкости наблюдается при гипоксии, выраженной ишемии и травмах головного мозга. В этих условиях происходит изменение дыхательного ритма и формирование патологических паттернов дыхания (Сафонов, 2006), а также нарушение функций системы кровообращения (Сухова, Ноздрачёв, 2008). Можно предположить, что активация различных групп глутаматных рецепторов, которая происходит при повышении церебрального уровня глутамата, оказывает

модулирующее влияние на рефлекторные механизмы, осуществляющие контроль кардиореспираторной функции и вызывает функциональные изменения в работе кардиореспираторной системы.

Однако до настоящего времени отсутствуют прямые экспериментальные данные относительно влияния повышенного церебрального уровня глутамата на основные рефлекторные механизмы, участвующие в регуляции частоты и глубины дыхания, а также в поддержании стабильного уровня системного артериального давления. Между тем, изменение силы этих рефлексов под влиянием глутамата, содержащегося в ликворе, может быть важным фактором, определяющим состояние систем дыхания и кровообращения как в норме, так и при развитии патологических изменений, которые сопровождаются повышением церебрального уровня глутамата. Отсутствуют экспериментальные данные о том, какие именно группы глутаматных рецепторов вовлечены в процессы, реализующие влияние церебрального глутамата на функции кардиореспираторной системы.

Цель и задачи исследования

Цель настоящего исследования состояла в экспериментальной проверке гипотезы, согласно которой уровень церебрального глутамата является фактором, определяющим состояние рефлекторных механизмов, контролирующей деятельность кардиореспираторной системы. Предполагалось, что это влияние реализуется путём активации разных групп глутаматных рецепторов.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

- характеризовать базовые паттерны активности и состояние рефлекторных механизмов регуляции кардиореспираторной системы анестезированной крысы;
- изучить влияние церебровентрикулярных микроинъекций глутамата и его миметика N-метил-D-аспартата на систему кровообращения и величину барорефлекторной чувствительности;
- изучить влияние глутамата и N-метил-D-аспартата на паттерн дыхания и состояние объёмно-зависимой обратной связи в системе дыхания;
- исследовать процесс глутаматэргической модуляции кардиореспираторных эффектов гипоксической гипоксии.

Научная новизна работы.

Впервые получены систематические экспериментальные данные, характеризующие динамику активности кардиореспираторной системы анестезированной крысы при повышении церебрального уровня глутамата. Установлено, что ответ кардиореспираторной системы на кратковременное повышение церебрального уровня глутамата является развивающимся во времени, двухфазным процессом. Впервые установлено, что церебровентрикулярные введения глутамата и его миметика N-метил-D-аспартата приводят к изменению параметров, характеризующих силу рефлексов Геринга-Брейера, величину барорефлекторной и хеморефлекторной чувствительности. Определена роль рецепторов NMDA-типа в этом процессе. Таким образом, гипотеза, согласно которой повышение церебрального уровня глутамата оказывает влияние на состояние кардиореспираторной системы путём модуляции её рефлекторных механизмов, впервые получила прямое экспериментальное подтверждение.

Теоретическая и практическая значимость.

Результаты, полученные при выполнении настоящей работы, расширяют и дополняют существующие представления о роли глутаматэргических механизмов в управлении функциями внутренних органов. Они представляют интерес для физиологов, работающих в области нейрофизиологии и физиологии висцеральных систем. Их следует учитывать в клинической практике при анализе механизмов нарушений происходящих в висцеральной сфере при гипоксии, ишемии головного мозга и черепно-мозговых травмах. Результаты исследования могут быть использованы в лекционных курсах по нейрофизиологии и физиологии висцеральных систем.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Церебральный уровень глутамата является фактором, оказывающим регулирующее влияние на состояние кардиореспираторной системы.
2. Одним из механизмов, реализующих это влияние является модуляция ряда рефлексов, что проявляется в изменении силы объёмно-зависимой обратной связи в системе дыхания, барорефлекторной и хеморефлекторной чувствительности.

3. Глутаматэргическая модуляции рефлекторных механизмов кардиореспираторной системы является сложным, развивающимся во времени процессом, в который вовлечены разные группы глутаматных рецепторов, в том числе рецепторы NMDA-типа.

Апробация работы.

Результаты исследования прошли апробацию на VIII Межвузовской конференции молодых учёных «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 13 -16 апреля 2008 г.); XXI Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (Калуга, 19-25 сентября 2010 г.); Конференции молодых учёных, посвященной 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (Санкт-Петербург, 21-22 декабря 2010 г.); XI Межвузовской конференции молодых учёных «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 29 – 31 марта 2011 г.); XII Межвузовской конференции молодых учёных «Герценовские чтения» (Санкт-Петербург, 2 - 6 апреля 2012 г.); VIII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Украина, 2–12 июня 2012 г.); VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рождения академика К.М.Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 25-28 сентября, 2012 г.); XII Всероссийской школе-семинаре с международным участием «Экспериментальная и клиническая физиология дыхания» (Санкт-Петербург, 25 февраля – 1 марта 2013 г.).

Публикации

Основное содержание диссертации отражено в 11 публикациях, 4 статьи опубликованы в ведущих рецензируемых журналах РФ рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, описания основных экспериментальных методик, четырёх глав, содержащих результаты собственных экспериментальных исследований и их обсуждение, общего заключения и списка использованной литературы. Объём диссертации составляет 125 страниц печатного текста, включая 4 таблицы и 29 рисунков. Список использованной литературы содержит описание 154 источников, в том числе 131 зарубежной работы.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Все экспериментальные данные были получены в острых опытах, выполненных на лабораторных крысах Wistar (самцы, вес 230-350 г, возраст 2-3 месяца, n=98) в условиях общей анестезии (уретан, 1350 мг/кг, внутривенно). Глубина наркоза контролировалась по степени выраженности корнеального и болевого рефлексов. Температура тела животного поддерживалась на уровне 36,8-37,0 °С.

Подготовка животного к эксперименту.

Хирургическая подготовка животного к эксперименту обеспечивала регистрацию параметров внешнего дыхания, электрической активности диафрагмы, артериального давления, а также условия для введения веществ в кровь и ликвор. Для этого, после достижения необходимой глубины наркоза производилась трахеостомия, устанавливались катетеры в бедренную артерию и вену. Выполнялась лапаротомия и на правой полусфере диафрагмы в ее реберной части устанавливались крючкообразные стальные миографические электроды, в прямую кишку вводился термодатчик. Голова животного фиксировалась в стереотаксическом аппарате, на черепе размечались и рассверливались отверстия для стереотаксического введения микроинъектора.

Регистрация активности кардиореспираторной системы.

К трахеостоме присоединялась пневмометрическая трубка, подключенная к пневмотахометру ML141 (ADInstruments, Австралия). Артериальный катетер соединялся с датчиком давления сигнал с которого поступал на вход мостового усилителя ML224,. Электромиографические электроды подключались к входу усилителя биопотенциалов ML135. Периферийные устройства формировали сигналы пневмотахограммы, артериального давления и электромиограммы диафрагмы, которые обрабатывались *on line* при помощи аппаратно-программного комплекса PL3508 PowerLab8/35 (ADInstruments, Австралия.) Рассчитывалось среднее артериальное давление (АД_{ср}), частота сердечных сокращений (ЧСС), объёмно-временные параметры дыхания, в том числе частота дыхания (ЧД), длительность вдоха (Т_I) и выдоха (Т_E), дыхательный объём (ДО) и вентиляция

(VE); производилась интеграция электромиограммы диафрагмы (ЭМГ) и определялась пиковая величина интегрированной ЭМГ ($E_{Di\ max}$).

Тестирование рефлекторных реакций.

Барорефлекторная чувствительность тестировалась путём внутривенного введения синтетического адреномиметика фенилэфрина (Мезатон, 0,001-0,1 мг/кг), который вызывал доза-зависимый подъём АД_{ср} и рефлекторное снижение ЧСС. Результаты каждого эксперимента наносились на график в виде отдельных точек, по которым проводилась прямая, аппроксимирующая зависимость между изменениями АД_{ср} и ЧСС. Величина угла между этой прямой и осью абсцисс тем больше, чем больше величина барорефлекторной чувствительности. Поэтому изменения барорефлекторной чувствительности оценивались по изменению коэффициента *a* в уравнении аппроксимирующей прямой $y = ax - k$.

Рефлексы Геринга-Брейера тестировались путем окклюзии верхних дыхательных путей в разные моменты дыхательного цикла. Окклюзия в конце выдоха фиксировала объём лёгких на уровне ФОЕ и отключала инспираторно-тормозящий рефлекс (ИТР). Это проявлялось в удлинении очередного вдоха и увеличении $E_{Di\ max}$. Окклюзия в конце вдоха приводила к активации экспираторно-облегчающего рефлекса (ЭОР), что вызывало удлинение очередного выдоха. Длительность окклюзионного вдоха (или выдоха) нормировалась по отношению к предокклюзионному вдоху (выдоху) и служила количественной характеристикой силы соответствующего рефлекса ($T_{Юоккл}$ и $T_{Еоккл}$). Инспираторно-тормозящий рефлекс характеризовался, кроме того, нормированной амплитудой интегрированной миограммы в первом окклюзионном вдохе ($E_{Di\ max\ оккл}$)

Хеморефлекторная реакция кардиореспираторной системы тестировалась путём кратковременного (в течение 2,5 минут) предъявления гипоксической смеси (10% O₂ в N₂). Через 1.5-2.5 минуты дыхание гипоксической смесью приводило к стабильному снижению АД_{ср}, увеличению ЧСС, возрастала ЧД и увеличивался ДО.

Тестирование рефлексов производилось многократно в течение эксперимента, до и после микроинъекций растворов глутамата (Glu) и N-метил-D-аспартата (NMDA).

Введение растворов в мозг.

Микроинъекции растворов Glu и NMDA в боковые желудочки головного мозга производились при помощи шприца Гамильтона, соединённого с микроинъектором. Микроинъектор представлял собой стальную трубку с наружным диаметром 150 мкм, который погружался в правый боковой желудочек при помощи стереотаксического аппарата. Координаты кончика микроинъектора после погружения составляли 0,5 мм роstralнее уровня *bregma*, 1,5 мм латеральнее средней линии, 3,5-4 мм от поверхности черепа. Через микроинъектор вводилось 5 мкл раствора, содержащего различные дозы Glu и NMDA, скорость введения раствора составляла 1 мкл/мин.

Экспериментальный протокол.

Общая длительность эксперимента составляла 80-90 минут. В течение первых 40 минут производилась регистрация фоновой активности кардиореспираторной системы и тестирование рефлекторных реакций. На 41-й минуте приступали к введению раствора Glu или NMDA, регистрация всех параметров и тестирование рефлексов продолжалось до конца эксперимента. В конце эксперимента животное усыплялось передозировкой анестетика.

Статистическая обработка данных.

Статистическая обработка полученных данных проводилась средствами пакета MS Excel. Вычислялась средняя величина регистрируемых параметров и ошибка среднего. Для оценки достоверности выявленных различий использовался однофакторный дисперсионный анализ. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Характеристика базовых паттернов активности и состояния рефлекторных механизмов кардиореспираторной системы.

Артериальное давление, частота сердечных сокращений и барорефлекс.

Эксперименты с регистрацией системного артериального давления анестезированной крысы показали, что в течение всего времени регистрации средняя величина АД_{ср} составляла 92 ± 3 мм. рт. ст., ЧСС равнялась 384 ± 7 уд/мин.

Таблица 1

Параметры, характеризующие состояние системы внешнего дыхания анестезированной крысы при дыхании атмосферным воздухом и тестирующей гипоксической газовой смесью.

Газовая смесь	T_I (с)	T_E (с)	T_{TOT} (с)	ЧД (ц/мин)	ДО (мл)	VE (мл/мин)	$E_{D_{i\max}}$ (мкВ·с)	$T_{I_{оккл}}$ (%)	$E_{D_{i\max_{оккл}}}$ (%)	$T_{E_{оккл}}$ (%)
Воздух	0,18±0,01	0,24±0,02	0,43±0,02	143±7	2,27±0,08	326±18	6,5±0,3	180±20	151±34	427±56
10% O ₂ в N ₂	0,17±0,01	0,21±0,02	0,38±0,04	167±13*	2,68±0,1*	448±40*	7,3±0,3*	170±30	166±31	518±21

Примечание: * - отличия от величины зарегистрированной при дыхании воздухом достоверны ($P < 0,05$).

Статистическая обработка установила отсутствие достоверных изменений этих показателей в течение эксперимента. Сохранялась на стабильном уровне и величина барорефлекторной чувствительности, величина коэффициента a равнялась в среднем $2,4 \pm 0,27$.

Паттерн внешнего дыхания и рефлекс Геринга-Брейера.

В наших экспериментах паттерн внешнего дыхания характеризовался рядом объёмно-временных параметров дыхания, а также $E_{D_{i\max}}$. Числовые значения этих параметров приведены в Табл. 1. В течение эксперимента производилось периодическое тестирование обоих рефлексов Геринга-Брейера. Было установлено, что показатели, характеризующие паттерн дыхания и силу рефлексов оставались стабильными в течение всего времени регистрации.

Реакция кардиореспираторной системы на гипоксическую стимуляцию.

При предъявлении гипоксической смеси развивались характерные изменения в состоянии кардиореспираторной системы. В течение 2-2,5 минут происходило снижение АД_{ср} до 59 ± 5 мм. рт. ст., что составляло в среднем $64 \pm 7\%$, ЧСС возрастала до 441 ± 13 уд/мин, составляя в среднем $114 \pm 5\%$. Изменения параметров дыхания происходили быстрее и достигали максимальных значений уже на 30-й секунде дыхания гипоксической смесью. Частота дыхания возрастала до 167 ± 13 ц/мин составляя $115 \pm 7\%$ за счёт укорочения, главным образом, выдоха. Увеличивались $E_{D_{i\max}}$ и ДО и соответственно возрастала VE (Табл. 1).

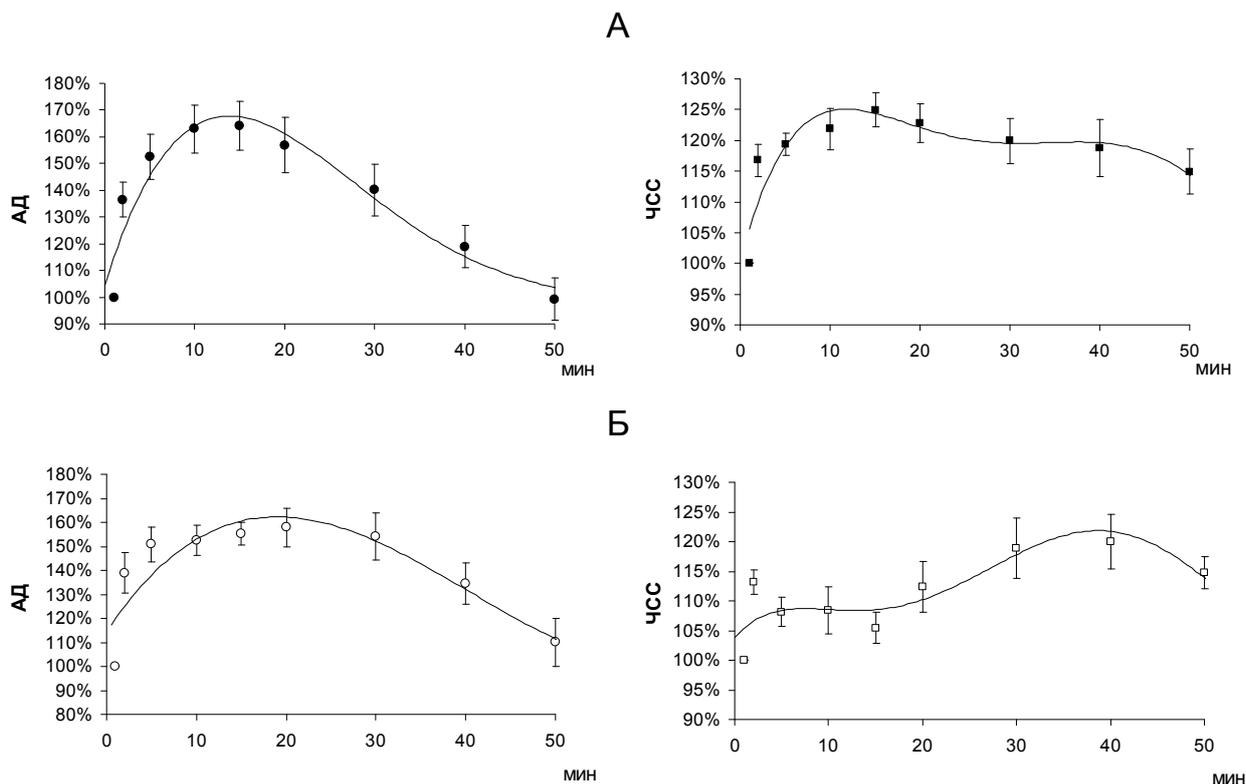


Рисунок 1. Влияние церебровентрикулярного введения 12 мкМ Glu (А) и 6 нМ NMDA на показатели активности сердечно-сосудистой системы.

Величина АД_{ср} и ЧСС нормирована по отношению к их значениям перед введением веществ.

По осям ординат абсцисс – время после начала введения

После возвращения к дыханию воздухом параметры кровообращения и дыхания восстанавливались до исходных значений за 1-1,5 мин. Эффект гипоксического воздействия устойчиво воспроизводился в течение всего времени эксперимента.

Таким образом, в результате первого этапа экспериментального исследования были определены числовые значения параметров, характеризующих фоновый паттерн активности и состояние рефлекторных механизмов кардиореспираторной системы. Эксперименты показали, что эти значения поддерживаются на стабильном уровне в течение 80-90 минут.

2. Кардиоваскулярные эффекты активации глутаматэргических механизмов.

Влияние церебровентрикулярных микроинъекций Glu и NMDA на АД_{ср} и ЧСС.

Было установлено, что введение Glu (в дозировке от 1,2 мкМ до 24мкМ) вызывало рост АД_{ср} и ЧСС, но динамика этих показателей отличалась. Так, под действием 12 мкМ Glu АД_{ср} достигало максимальной величины на 10-15 минуте

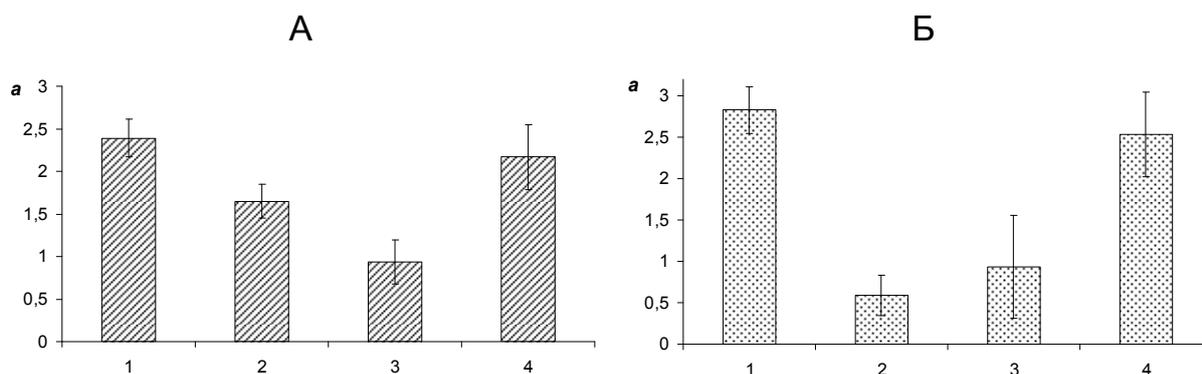


Рисунок 2. Влияние церебровентрикулярного введения 6 мкМ Glu (А) и 0,2 нМ NMDA (Б) на барорефлекторную чувствительность.

По оси абсцисс 1- фоновые значения, 2, 3, 4, - соответственно время начала тестирования 5, 25 и 45 минута после начала введения вещества.

после начала введения вещества, а затем снижалось, достигая исходных величин величин через 50 минут после начала введения (Рис. 1,А). Что касается ЧСС, то первоначально этот показатель также резко возрастал, достигая максимальной величины на 10-15 минуте, но к исходным величинам он возвращался гораздо медленнее (Рис. 1,Б). NMDA (в дозировке от 0,03 нМ до 3 нМ) также вызывал увеличение АД_{ср} и ЧСС. При введении NMDA происходил быстрый рост АД_{ср}, которое достигало максимальной величины уже на 5-10 минуте, стабилизировалось, а затем медленно уменьшалось достигая исходных величин к концу эксперимента. Действие NMDA на ЧСС существенно отличалось от его действия на АД_{ср}. Увеличение этого показателя под действием NMDA происходило гораздо медленнее, чем рост АД_{ср}. Максимальные значения ЧСС достигались только на 30-40 минуте после начала введения NMDA, затем начиналось уменьшение ЧСС, но обычно она оставалась несколько повышенной вплоть до конца эксперимента.

Изменение барорефлекторной чувствительности.

В ходе эксперимента тестирование барорефлекса производилось четыре раза. Первый тест проводили до введения веществ, второй тест начинали сразу после введения вещества, третий на 25 минуте, четвертый на 45-й. Тестирование барорефлекса показало, что при повышении церебрального уровня Glu происходит достоверное уменьшение барорефлекторной чувствительности, которое является

обратимым (Рис. 2, А). Барорефлекторная чувствительность уменьшалась и после введения NMDA, и это уменьшение также было обратимым (Рис. 2, Б). Таким образом, было установлено, что Glu вызывает увеличение как АД_{ср} так и ЧСС, то есть повышенный церебральный уровень Glu является фактором, который оказывает возбуждающее действие на систему кровообращения. По-видимому, повышение АД и увеличение ЧСС является следствием активации рецепторов Glu, которые обнаружены во многих структурах, участвующих в управлении автономными функциями. Кроме того, было показано, что повышение церебрального уровня Glu ослабляет барорефлекторную чувствительность. Возможно, что глутаматэргическая модуляция петли отрицательной обратной связи в системе управления кровообращением является одним из факторов, способствующих однонаправленному изменению АД_{ср} и ЧСС при повышении церебрального уровня Glu. Сходство эффектов Glu и NMDA на барорефлекс позволяет предположить, что в реализации модулирующих влияний церебрального Glu на барорефлекторный механизм принимают участие глутаматные рецепторы NMDA-типа.

3. Респираторные эффекты активации глутаматэргических механизмов.

Влияние Glu и NMDA на паттерн дыхания.

Очередная серия экспериментов показала, что церебровентрикулярное введение различных доз Glu приводит к характерным перестройкам паттерна дыхания, оказывая возбуждающее действие на систему дыхания. Это проявлялось, в частности в увеличении ДО, укорочении T_I и T_E, учащении дыхания, росте электрической активности диафрагмы и ряда других показателей (Рис. 3, А). Эти показатели достигали максимальных значений в течение 2-10 минут после начала введения, причём величина реакции зависела от дозы вещества. Кроме того, от дозы зависела и динамика изменений учитываемых показателей. Так, при введении минимальной эффективной дозы Glu (1,2 мкМ) после достижения максимальных значений E_{Dimax} и ЧД постепенно уменьшались и возвращались к исходным величинам в течение 15-20 минут. При введении более высоких доз Glu (от 6 до 12 мкМ) величина ЧД и E_{Dimax} не уменьшалась после достижения максимальных значений, а стабилизировалась на достигнутом уровне до конца

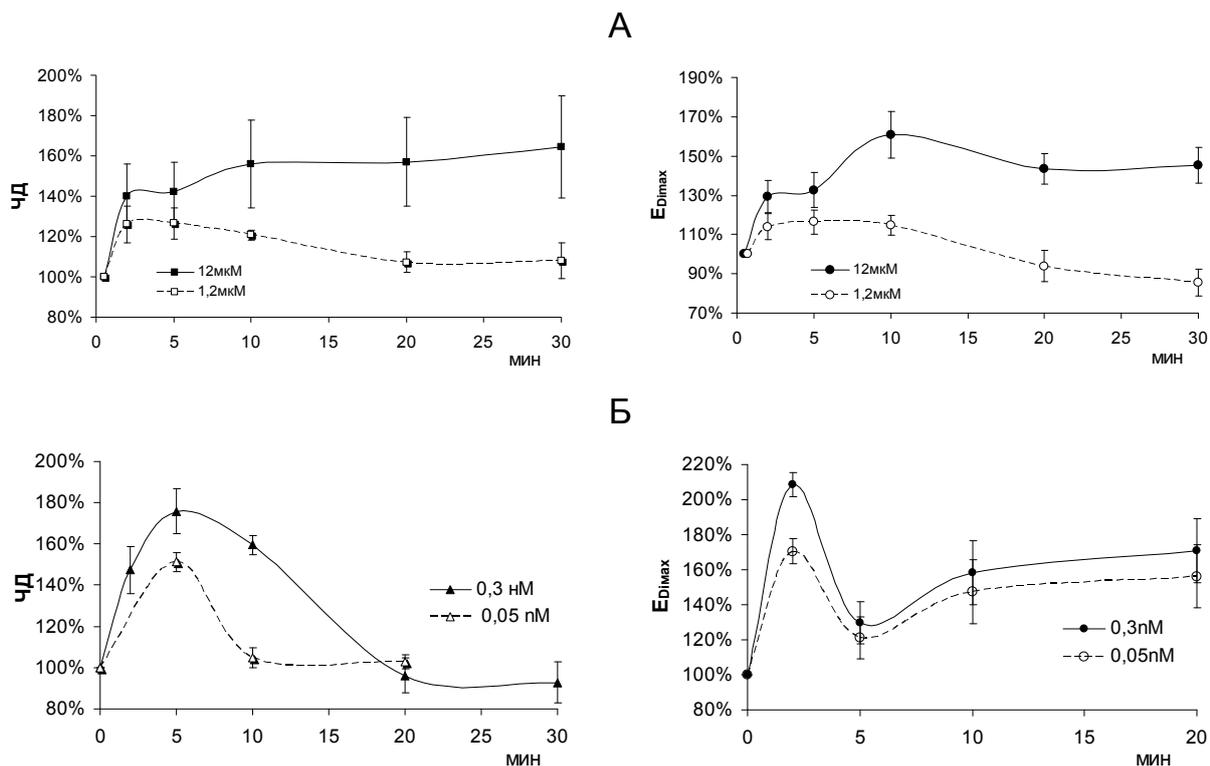


Рисунок 3. Влияние церебровентрикулярного введения Glu (А) и NMDA (Б) на частоту дыхания, и величину пиковой электрической активности диафрагмы.

Величина учитываемых показателей выражена в % к их фоновым значениям.

эксперимента (Рис. 3,А). Кроме того, увеличение $E_{D_{\max}}$ при действии высоких концентраций Glu происходило в две фазы. После первоначального подъёма и стабилизации, наблюдался второй подъём, с последующей стабилизацией на новом уровне. Новый уровень был достоверно выше, чем тот который был достигнут на 2-5 минуте. Так, если на 5-й минуте $E_{D_{\max}}$ составляла в среднем $132 \pm 9\%$ от фоновых величин, то на 10-й минуте она увеличивалась уже до $161 \pm 12\%$. Последняя величина достоверно превышала как фоновые значения параметра $E_{D_{\max}}$, так и его уровень достигнутый в первые 2-5 минут. На 20-й минуте этот показатель стабилизировался на уровне $143 \pm 8\%$ по отношению к фоновым значениям. Динамика изменений параметров дыхания под влиянием NMDA существенно отличалась от той, которая наблюдалась при действии Glu. В ответ на введение высоких и низких доз NMDA происходило быстрое, течение 5 минут повышение ЧД, затем этот параметр возвращался к фоновым величинам и сохранялся на этом уровне до конца эксперимента (Рис. 3, Б). Резко возрастала и $E_{D_{\max}}$, достигая максимума на 2-й минуте после начала введения вещества, а уже на 5-й минуте так же резко падала. Затем этот показатель вновь начинал расти, но

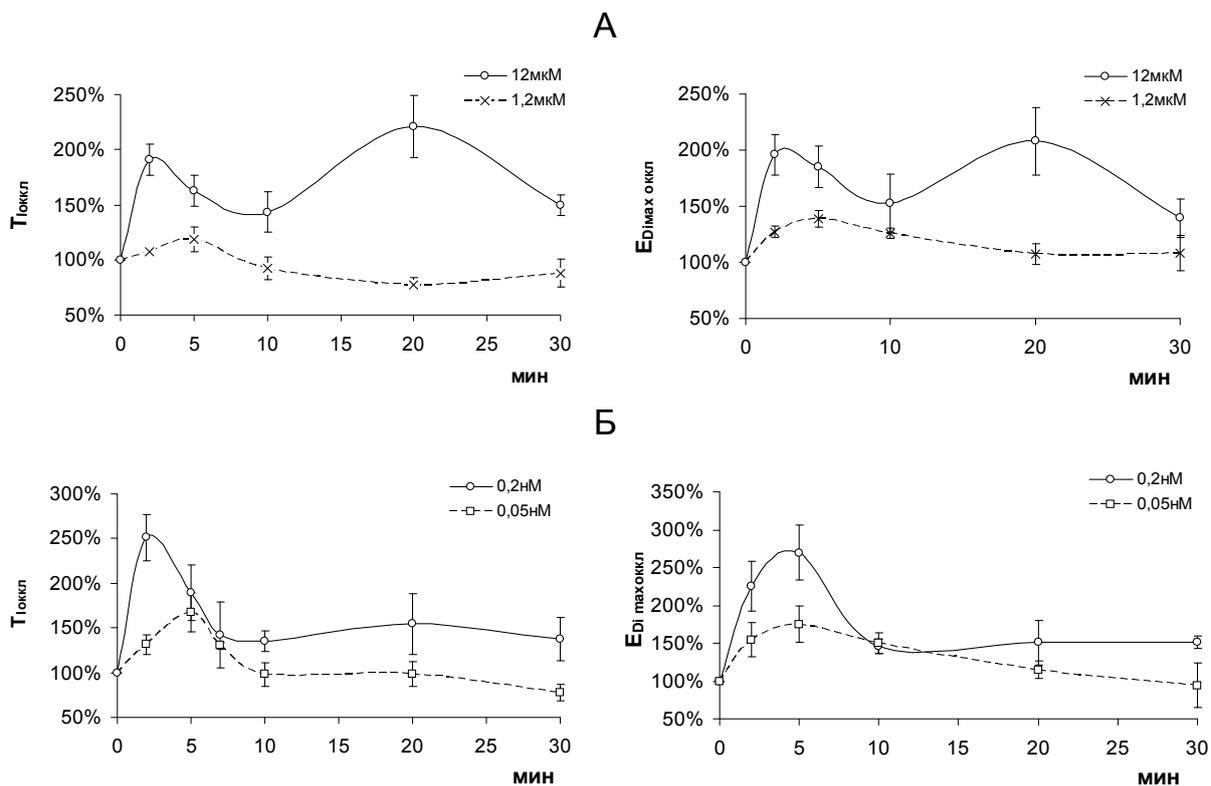


Рисунок 4. Влияние церебровентрикулярного введения Glu (А) NMDA (Б) на силу инспираторно-тормозящего рефлекс Геринга-Брейера.

Величина учитываемых показателей выражена в % к их фоновым значениям.

до конца эксперимента его величина не превышала значений, достигнутых на 2-й минуте.

Влияние Glu и NMDA на состояние рефлексов Геринга-Брейера.

Церебровентрикулярное введение Glu и NMDA приводило к усилению эффектов конечно-экспираторной окклюзии. Тестирование силы ИТР в течение 30 минут после введения 1,2 мкМ глутамата показало, что максимальный эффект наблюдался на 5-й минуте (Рис. 4,А). Затем сила ИТР постепенно уменьшалась и на 20-й минуте достигала исходных значений. При действии Glu в концентрации 12 мкМ усиление ИТР было более значительным, а на кривых, отражающих изменение силы рефлекса во времени, появлялся ещё один максимум. При этом сила рефлекса оставалась достоверно выше фоновых значений и на 30-й минуте после начала введения вещества. Очевидно, что при действии более высокой дозы Glu вновь проявляются две фазы: ранняя, которая развивается на фоне введения вещества и отставленная, гораздо более длительная. Следует отметить, что одни и те же закономерности изменения силы ИТР под действием Glu проявлялись и в

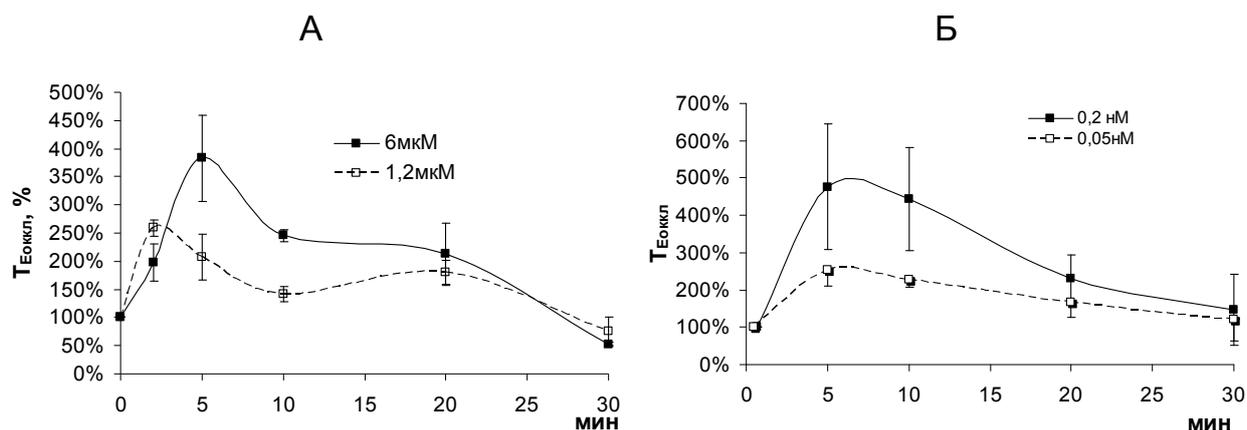


Рисунок 5. Влияние церебровентрикулярного введения Glu (А) и NMDA (Б) на силу экспираторно-облегчающего рефлекса.

Величина учитываемого показателя выражена в % к его фоновому значению.

изменении нормированной величины электрической активности диафрагмы и в изменении нормированной длительности первого нагруженного вдоха. Потенцирующее действие на ИТР оказывал и NMDA, причём этот эффект, как и эффект Glu, развивался быстро (Рис. 4,Б). В течение 2-5 минут показатели, характеризующие силу ИТР ($E_{D_{\text{max}} \text{ оккл}}$ и $T_{I \text{ оккл}}$) достигали максимальных значений, а затем уменьшались, стабилизируясь на уровне, который приблизительно на 50% превышал исходный. По сравнению с Glu существенной особенностью действия NMDA на ИТР было отсутствие ярко выраженного максимума во второй фазе.

Сходные эффекты были обнаружены при исследовании действия Glu и NMDA на ЭОР (Рис. 5). При церебровентрикулярном введении Glu и его миметик вызывали резкое усиление эффекта конечно-инспираторной окклюзии. Длительность первого окклюзионного выдоха достигала максимума через 5 минут после начала введения, затем этот показатель начинал снижаться и через 30 минут возвращался к исходным значениям. Следует отметить, что и в случае ЭОР на кривых, отражающих зависимость величины эффекта Glu от времени, также можно выделить две фазы: быструю, с ярко выраженным максимумом и более отставленную во время которой сила ЭОР поддерживается на уровне, превышающем фоновый (Рис. 5,А).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что повышение церебрального уровня Glu может быть фактором, который оказывает

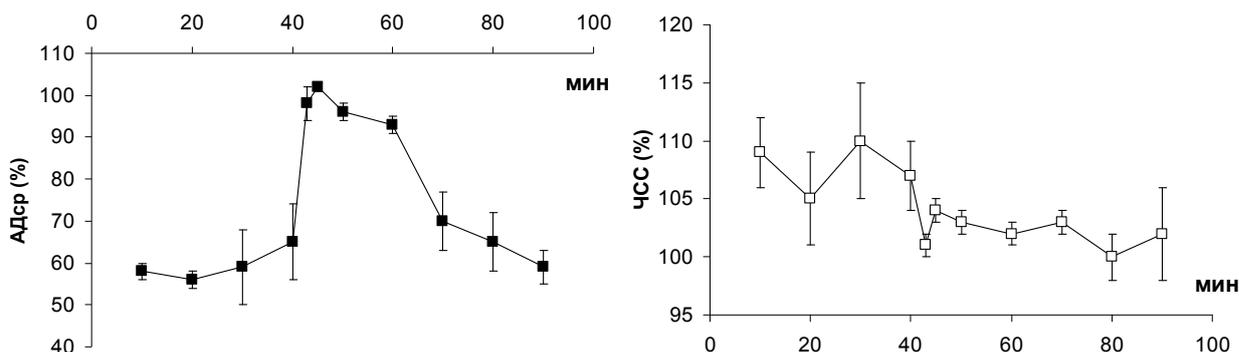


Рисунок 6. Динамика величины реакции сердечно-сосудистой системы на предъявление тестирующего гипоксического стимула после церебровентрикулярного введения Glu 6мкМ).

По осям ординат – изменения АД_{ср} и ЧСС. Величина изменений этих параметров выражена в %, за 100% принята величина соответствующего параметра непосредственно перед предъявлением стимула

По оси абсцисс – время после начала опыта, начало введения Glu – 41-ая минута. Каждая точка отражает реакцию на очередное предъявление гипоксической смеси.

возбуждающее влияние на респираторную систему и усиливает объёмно-зависимую связь в системе дыхания. При действии более высоких доз Glu эти эффектыприобретают сложный, двухфазный характер. Сопоставление кривых, полученных при исследовании действия Glu и NMDA на разные показатели активности респираторной системы показывает совпадение во времени первой фазы ответа на Glu и ответа на NMDA. По-видимому в реализации эффектов церебрального Glu на систему дыхания, принимают участие прежде всего рецепторы NMDA-типа. Можно предполагать, что вторая, более медленная фаза является результатом активации метаботропных рецепторов Glu.

4. Глутаматэргическая модуляция кардиореспираторных эффектов гипоксии.

Эксперименты с периодическим предъявлением гипоксической смеси до и после микроинъекций Glu показали, что повышение церебрального уровня Glu приводит к характерным изменениям величины ответов кардиореспираторной системы на гипоксический стимул. Уже в первые 3-5 минут после начала введения Glu происходит резкое уменьшение всех компонентов кардиореспираторного ответа на гипоксический стимул. В частности, резко ослабевают депрессорные ответы АД, уменьшается прирост ЧСС (Рис. 6). Так, если до введения Glu гипоксия вызывала снижение АД в среднем на 40%, то после введения Glu реакция

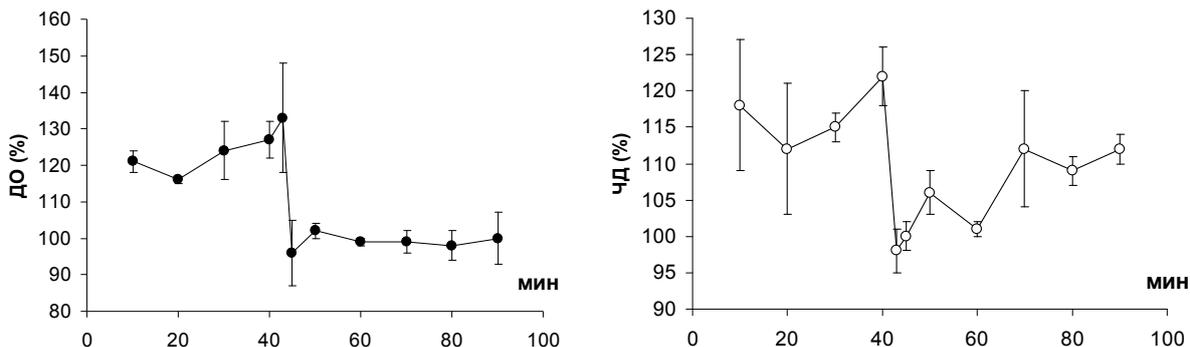


Рисунок 7. Динамика величины реакции респираторной системы на предъявление тестирующего гипоксического стимула после церебровентрикулярного введения Glu бмкМ).

По осям ординат изменения ДО и ЧД, прочие обозначения как на Рис. 6.

АД на гипоксический стимул либо вовсе отсутствовала, либо не превышала 10%. Через 30 минут после введения Glu ответ АД на гипоксию начал восстанавливаться: постепенно появлялись и усиливались депрессорные ответы АД, которые к концу эксперимента достигали исходных величин. Ослабление реакции ЧСС на предъявление гипоксического стимула оставалась достоверным вплоть до конца эксперимента (Рис. 6). Действие Glu вызывало не ослабление не только циркуляторного, но и вентиляторного ответа на гипоксию. Предъявление гипоксической смеси переставало вызывать изменения ДО и ЧД (Рис. 7). Объёмный компонент вентиляторной реакции на гипоксию, в виде увеличения ДО не восстанавливался до конца эксперимента, а реакция со стороны ЧД постепенно восстанавливалась, но и к концу эксперимента не достигала исходной величины.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение церебрального уровня Glu оказывает выраженное модулирующее влияние на хеморецепторную чувствительность кардиореспираторной системы анестезированной крысы. Этот эффект развивается в два этапа: на первом, раннем, этапе наблюдается резкое падение хеморецепторной чувствительности. Затем ответ кардиореспираторной системы на гипоксический стимул постепенно восстанавливается, но сохраняет качественные отличия от исходного ответа. Можно предположить, что описанные эффекты церебрального Glu реализуются путём активации различных типов глутаматных рецепторов, часть из которых опосредует длительные изменения активности рефлекторных механизмов, осуществляющих хеморецепторный контроль функций

кардиореспираторной системы. Возможно, что подобные реакции развиваются при повышении уровня эндогенного Glu и носят отчасти адаптивный характер, поскольку препятствуют снижению АД в условиях острой гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперименты показали, что значения параметров, характеризующих активность кардиореспираторной системы анестезированной крысы и функциональное состояние её рефлекторных механизмов являются достаточно стабильными, не проявляя статистически значимых изменений в течение 80-90 минут регистрации. На этом фоне регистрируются характерные, хорошо воспроизводимые реакции на церебровентрикулярное введение Glu и его миметика NMDA. Стабильность основных параметров дыхания и кровообращения дала возможность протестировать состояние рефлекторных механизмов, регулирующих дыхание и кровообращение. Исследование влияния церебровентрикулярных микроинъекций Glu и NMDA на состояние кардиореспираторной системы показало, что оба вещества оказывают выраженное возбуждающее действие на эту систему, повышая АД_{ср} и ЧСС, увеличивая ЧД, E_{Dimax} и ДО. Эти эффекты совпадают с известными эффектами, которые наблюдаются при эндогенном повышении церебрального уровня Glu. Вместе с тем, было обнаружено, что под влиянием Glu и NMDA происходят определённые изменения в состоянии рефлекторных механизмов, осуществляющих регуляцию функций кардиореспираторной системы. Наблюдалось усиление рефлексов Геринга-Брейера, ослабевала барорефлекторная и хеморефлекторная чувствительность. Тем самым была экспериментально доказана возможность того, что и эндогенный Glu может оказывать модулирующее влияние на рефлекторные механизмы регуляции кардиореспираторной системы.

Эффекты Glu и NMDA всегда были однонаправленными, однако было обнаружено, что динамика этих эффектов имеет существенные отличия. Так, в процессе изменения силы рефлексов Геринга-Брейера под действием Glu отчётливо выделяются две фазы, одна из которых развивается непосредственно на фоне введения вещества и приблизительно соответствует по продолжительности начальной реакции на введение NMDA. Затем развивается вторая фаза,

значительно большая по амплитуде и продолжительности, чем первая. При изучении действия NMDA на инспираторно-тормозящий рефлекс также была обнаружена вторая фаза, меньшая по величине, но большая по длительности. На наличие двух, разных по продолжительности, фаз в модулирующем действии Glu указывают и результаты изучения изменений хеморецепторной чувствительности.

Полученные данные указывают на то, что модулирующее действие Glu на центральные рефлекторные механизмы, контролирующие кардиореспираторную функцию, может осуществляться разными путями, которые опосредуются разными типами рецепторов. Вероятно, реакция на повышение церебрального уровня Glu реализуется, прежде всего, в результате его взаимодействия с ионотропными глутаматными рецепторами NMDA-типа. Этот механизм включается при умеренном эндогенном повышении уровня Glu. По-видимому, он же лежит и в основе первой фазы реакции на более высокие дозы Glu и реакции на NMDA, которые наблюдались в наших экспериментах.

Таким образом, результаты экспериментального исследования подтверждают выдвинутую гипотезу и доказывают, что уровень церебрального Glu является фактором, который определяет состояние рефлекторных механизмов, осуществляющих регуляцию деятельности кардиореспираторной системы. Это влияние реализуется путём активации разных групп глутаматных рецепторов. Важную роль в процессах модуляции рефлекторных механизмов играют рецепторы NMDA-типа.

ВЫВОДЫ

1. Повышение церебрального уровня глутамата оказывает активирующее влияние на кардиореспираторную систему, вызывая увеличение AD_{cp} , ЧСС, ДО, ЧД и E_{Dimax} . Это доказывает, что церебральный уровень эндогенного глутамата является фактором, оказывающим влияние на механизмы кардиореспираторной регуляции.
2. Снижение барорефлекторной чувствительности, которая наблюдается при церебровентрикулярном введении глутамата и его миметика NMDA, сопровождается одновременным повышением ЧСС и AD_{cp} . Следовательно, одним из механизмов усиления активности кардиореспираторной системы при

повышении церебрального уровня эндогенного глутамата является ослабление отрицательной обратной связи в системе регуляции артериального давления.

3. Церебровентрикулярное введение глутамата и NMDA приводит к усилению рефлексов Геринга-Брейера, а также росту ЧД и $E_{D_{\text{imax}}}$. Поэтому повышение церебрального уровня эндогенного Glu должно усиливать объёмно-зависимую обратную связь в системе дыхания, что способствует, в частности, укорочению вдоха и увеличению частоты дыхания

4. Сходство эффектов, которые оказывает введение Glu и NMDA на барорефлекс и рефлексы Геринга-Брейера указывает на то, что в реализации модулирующих влияний церебрального Glu на рефлекторные механизмы регуляции кардиореспираторной системы принимают участие глутаматные рецепторы NMDA-типа.

5. Активация глутаматэргических механизмов при повышении церебрального уровня глутамата приводит к ослаблению реакции кардиореспираторной системы на гипоксическую гипоксию, оказывая модулирующее влияние на рефлекторные механизмы хеморецепторной регуляции кардиореспираторной системы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах РФ, рекомендованных ВАК

1. Александров В.Г., Буй Тхи Хыонг, Александрова Н.П. // Влияние N-метил-D-аспартата на паттерн дыхания и состояние объёмно-зависимой обратной связи в системе дыхания анестезированной крысы // Известия РГПУ им. А. И. Герцена. – 2012. - № 147. - С. 103-112.

2. Александров В.Г., Буй Тхи Хыонг, Александрова Н.П. // Влияние повышенного церебрального уровня глутамата на состояние респираторной системы анестезированной крысы // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2012, Т.98, №7.- С. 845-853.

3. Буй Тхи Хыонг Влияние глутамата на состояние сердечно-сосудистой системы анестезированной крысы // Известия РГПУ им. А. И. Герцена. - СПб., 2012. - N 153 (2). - С. 151-156.

4. Буй Тхи Хыонг, В.Г. Александров, Н.П. Александрова. Глутаматэргическая модуляция кардиореспираторных эффектов гипоксии // Вестник ТвГУ. – 2013. - Серия «Биология и экология», вып. 29, №2. - С. 286-292.

Материалы конференций

5. Буй Тхи Хыонг Влияние хеморецепторной стимуляции на состояние механорецепторного контура регуляции дыхания // Герценовские чтения. Материалы межвузовской конференции молодых учёных. С.-Петербург, 13 - 16 апреля 2008 г., С.72-73.
6. Буй Тхи Хыонг, Тарасевич А.А., Александров В.Г. Действие церебровентрикулярного введения глутамата на висцеральные рефлексы // XXI Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова. Материалы съезда.- Москва–Калуга, 19-25 сентября 2010 г., С.760.
7. Буй Тхи Хыонг, Акинчева А.А. Исследование действия церебровентрикулярного введения глутамата на экспираторно-облегчающий рефлекс // Конференция молодых ученых, посвященная 85-летию со дня основания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. - Санкт-Петербург–Колтуши, 21-22 декабря 2010 г., С.20-21.
8. Буй Тхи Хыонг Действие глутамата на рефлекторные механизмы висцеральных систем // Герценовские чтения. Материалы межвузовской конференции молодых учёных. – С.-Петербург, 29 – 31 марта 2011 г., С.46.
9. Буй Тхи Хыонг Исследование действия церебровентрикулярной микроинъекции глутамата на барорефлекс // Герценовские чтения. Материалы межвузовской конференции молодых учёных. – С.-Петербург, 2 - 6 апреля 2012 г., С.16.
10. Буй Тхи Хыонг, Александров В.Г. Влияние глутамата и N-метил-D-аспартата на рефлекторные механизмы кардиореспираторной системы // VIII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии».- Судак, Крым, Украина, 2-12 июня 2012 г., С.97-98.
11. Буй Тхи Хыонг, Александров В.Г. Влияние глутамата и N-метил-D-аспартата на паттерн дыхания и состояние объёмно-зависимой обратной связи в системе дыхания // Материалы VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 220-летию со дня рождения академика К.М. Бэра «Механизмы функционирования висцеральных систем». – С.-Петербург, 2012.- С.46.

Подписано в печать 24.12.12	Формат 60x84 ¹ / ₁₆	Цифровая	Печ. л. 1.0
Тираж 100	Заказ 11/03	печать	

Отпечатано в типографии «Фалкон Принт»
(197101, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Пушкарская, д. 54, офис 2)

