

**В.О. Майський, О.І. Пілявський, А.В. Мазниченко,
В.В. Даценко, В.Б. Павлюченко, О.І. Костюков, О.О. Мойбенко**

Центральні нейронні ланцюги рефлексу Бецоляда – Яріша у щурів

Исследовалось распределение Фос-иммунореактивных (Фос-ир) и НАДФН-диафоразо-реактивных содержащих синтазу оксида азота (NOS) нейронов в продолговатом и спинном мозгу (T1–T5) после инъекций вератрина в v. jugularis ext., которые приводили к развитию рефлекса Бецоляда – Яриша у крыс. Фос-ир-нейроны были обнаружены в ядре одиночного тракта (Sol), каудовентролатеральной (CVL) и ростровентролатеральной (RVL) областях, интермедиальном ретикулярном ядре (IRt) и латеральном парагигантоклеточном ядре (LPGi) продолговатого мозга. Интенсивность экспрессии раннего гена c-fos в различных структурах соотносилась в следующем порядке: Sol > CVL > LPGi. Интенсивность НАДФН-диафоразной реактивности проявлялась как: Sol > IRt > LPGi > RVL. После инъекций вератрина обнаружено статистически достоверное увеличение ($P < 0,01$) среднего числа Фос-ир-нейронов в CVL, но не RVL. Двойное окрашивание было обнаружено в небольшом количестве ($\sim 2\%$) нейронов, зарегистрированных в Sol, IRt и LPGi. В спинном мозгу Фос-ир-нейроны были обнаружены преимущественно в поверхностных слоях дорсального рога, зоне вокруг центрального канала и в симпатических интермедиолатеральных медиальных ядрах (IML, IMM). NOS-содержащие нейроны в спинном мозгу были сконцентрированы в IML и IMM сегментов T1–T5. Полученные данные показывают, что сигналы, поступающие от вератрин-активируемых кардиопульмонарных афферентов, отчетливо активируют нейроны Sol и CVL, которые совместно с RVL входят в состав нейронных цепей, необходимых для генерации рефлекса Бецоляда – Яриша. Активация NOS-содержащих нейронов Sol и CVL влияниями кардиопульмонарных рецепторов может способствовать усилению кардиопротекторных депрессорных рефлексов у крыс.

ВСТУП

Рефлекс Бецоляда – Яріша є гальмівним серцево-судинним рефлексом, який ініціюється подразненням хемочутливих серцево-легеневих рецепторів, пов'язаних із аферентними волокнами групи С, що входять до складу блукаючого нерва [3, 16]. Подразнення таких рецепторів вератрином або іншими хімічними сполуками (брадикінін, серотонін, капсаїцин) призводять до збільшення парасимпатичної та зменшення симпатичної аферентної активності [7, 25]. Найбільш характерним проявом указанного рефлексу є тріада, яку складають зниження частоти серцевих ско-

рочень і кров'яного тиску та пригнічення дихання [2, 3, 16]. Слід зазначити, що зниження інтенсивності імпульсації серцевих парасимпатичних аферентів або їх кількості, розглядається як одна з причин, що може призводити до патофізіологічних проявів, пов'язаних із посиленням функції симпатичної системи, в тому числі і розвитку гіпертонії [28].

Встановлено, що периферичні аференти блукаючого нерва, які починаються в серці або легенях, закінчуються в ядрі поодинокого тракту (Sol) довгастого мозку [14, 27]. Руйнування цього ядра призводить до зниження як гіпотензивного, так і брадикардичного впливів, викликаних активацією

серцевих рецепторів [19]. Але добре відомо, що згадане ядро є першою центральною структурою в ланцюгах передачі не тільки сигналів від парасимпатичних, але і симпатичних аферентів [10], а порушення передачі в нейронних ланцюгах рефлексу Бецоляда – Яріша завжди супроводжується депресією барорецепторного рефлексу [26]. Крім того, Sol анатомічно та функціонально об'єднане з іншими важливими серцево-судинними центрами як довгастого, так і спинного мозку, які входять до складу симпато- та парасимпатозбуджувальних рефлекторних шляхів. На основі електрофізіологічних досліджень зроблено припущення, що центральні ланцюги рефлексу Бецоляда – Яріша, подібно до барорефлексу, крім нейронів Sol вміщують також нейрони каудального вентролатерального ретикулярного ядра (CVL) та рострального вентролатерального ретикулярного ядра (RVL) довгастого мозку [25].

Останнім часом за допомогою методу виявлення експресії раннього протоонкогена *c-fos* як маркера нейрональної активності було показано, які медулярні структури активуються при подразненні артеріальних барорецепторів [6], а також серцевих [9] або м'язових ноцицепторів [21]. Нейрони, що містять синтазу оксиду азоту (NOS) широко розповсюджені в довгастому мозку, особливо в центрах регуляції функції серцево-судинної системи [20, 21, 29]. Однак мало ще відомо про медулярні нейрональні ланцюги, які активуються сигналами від серцево-легеневих хеморецепторів, та про можливе залучення NOS-вмісних нейронів (NO-генеруючих клітин) на рівні спинного та довгастого мозку в генерацію рефлексу Бецоляда – Яріша.

Мета нашого дослідження – з'ясувати характер розподілу Fos-імунореактивних (Fos-ir) та NOS-вмісних нейронів у різних структурах спинного та довгастого мозку щура після тривалого подразнення серцево-легеневих хеморецепторів і розвитку

рефлексу Бецоляда – Яріша, викликаного ін'єкцією вератрину. Одержані результати допоможуть окреслити ті центральні анатомічні субстрати, які локалізуються в довгастому та спинному мозку і забезпечують розвиток цього рефлексу.

МЕТОДИКА

Експериментальні групи та стимуляційний протокол. В експерименті було використано чотири групи щурів-самців лінії Вістар масою 350–450 г: I (контрольна інтактна) група тварин, яким не проводили хірургічне втручання (n=3); II (контрольна) група оперованих щурів для визначення серцевого тиску та частоти серцевих скорочень після ін'єкцій вератрину або фізіологічного розчину (n=5); III (контрольна) група оперованих щурів, яким були зроблені послідовні ін'єкції фізіологічного ізотонічного розчину (n=4); IV (дослідна) група оперованих щурів, яким були зроблені послідовні ін'єкції вератрину (n=4). Усі експериментальні процедури виконано згідно з Європейською Директивою Ради Громад від 24 листопада 1986 р. (86/609/ЕЕС). Перед операцією тварин анестезували уретаном („Sigma”, 1500 мг/кг, внутрішньоочеревинно). Щурам II групи під час операційного втручання було введено катетери у сонну артерію та яремну вену. Електрокардіограму реєстрували за допомогою голчастих електродів та використовуючи електроманометр вимірювали системний артеріальний тиск через катетер. Зміни показників гемодинамічних реакцій виводили на багатоканальний монітор та реєстрували за допомогою приладу “Поліграф”. Тваринам III та IV груп під час операційного втручання була введена канюля у зовнішню яремну вену (v. jugularis ext.), через яку щурам III групи вводили забуферений ізотонічний сольовий розчин, а щурам IV – подразник рецепторів серця вератрин („Merck”, 5 мкг), розчи-

нений у 50 мкл забуференого сольового розчину (рН 7,3). Ін'єкції проводили з інтервалом 10 хв протягом 2 год.

Перфузія. Щурів I групи (інтактної) і тварин III та IV груп через 2 год після початку серії ін'єкцій під глибоким наркозом (пентобарбітал натрію 90 мг/кг „Sigma”, США; внутрішньоочеревинно) перфузували інтракардіально через висхідну аорту спочатку сольовим фосфатним буфером (СФБ), який містив 0,2 % нітриту натрію та 25000 од/л гепарину. Далі перфузію продовжували 4%-м параформальдегідом, розчиненим у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3). Довгастий мозок та грудні (торакальні) сегменти (Т1–Т5) спинного мозку кожної тварини швидко виділяли і додатково фіксували протягом 12 год, а потім з метою кріопротекції, витримували 48 год при 4°C у 30%-му розчині сахарози, який готувався на ФБ. На заморожувальному мікромомі було зроблено зрізи (50 мкм завтовшки), які збирали у кількості 30–40 від довгастого мозку та кожного грудного сегмента (Т1–Т5) спинного мозку кожної тварини I, III та IV груп. Зрізи збирали у сім лунок, заповнених холодним СФБ, для подальшого імуногістохімічного та гістохімічного зафарбування.

Фос-імуногістохімія. Імуногістохімічне виявлення Фос-ір-ядер (мічених нейронів) проводили за допомогою стандартної авідин-біотин-пероксидазної методики з використанням поліклональних кролячих антитіл, спрямованих проти ядерного білка ц-Фос („Oncogene Research”, Ab-5, США) [11, 23] і комерційного набору (ABC; „Vector”, РК 4001, США). Підрахунок Фос-ір-ядер нейронів у структурах довгастого мозку і шарах спинного мозку проводили під мікроскопом, а їх локалізацію визначали за атласом [22]. Мічені нейрони ідентифікували за темно-коричневим забарвленням їх ядер.

НАДФН-діафоразна гістохімія. Для гістохімічного виявлення NOS-вмісних або НАДФН(+)-нейронів (вторинне пофарбу-

вання) зафарбовані на ц-Фос зрізи витримували 1 год при 37 °С у 0,1 моль/л ФБ (рН 7,3), який містив 0,3 % детергента Triton X-100, 0,2 мг/мл нітроблакитного тетразолію та 0,5 мг/мл редукованого β -НАДФН („Sigma”, США). Для підсилення гістохімічної реакції у розчин додавали 1,2 мг/мл двонатрієвої солі яблучної кислоти („Sigma”, США). Потім зрізи промивали у СФБ, розміщували на покритих желатиною предметних скельцях, висушували на відкритому повітрі, просвітлювали у ксилолі, занурювали у бальзам і накривали покривними скельцями. НАДФН(+)-нейрони легко виявлялися у зрізах мозку, особливо при великому збільшенні ($\times 400$), за блакитним забарвленням їх цитоплазми та відростків.

Статистика. Кількість Фос-ір- та НАДФН(+)-нейронів підраховували у окремих ядрах на іпси- та контралатеральних боках зрізів довгастого мозку (фронти: -14,3; -13,8; -13,2; -12,3) та у шарах 1–10 і інтермедіолатеральному ядрі сегментів (Т1–Т5) спинного мозку за атласом [22]. Щоб отримати середню кількість \pm стандартна похибка середнього (\pm СПС) мічених ядер (позитивних нейронів) використовували близько 8–12 зафарбованих зрізів від досліджуваних рівнів довгастого та спинного мозку кожної тварини (групи I, III, IV). Порівнювали середні кількості мічених на ц-Фос-імунореактивність та НАДФН-реактивність нейронів за допомогою двопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA). Варіаційні фактори були такими: іпси- та контралатеральний бік і 4 рівні довгастого та 5 сегментів спинного мозку. Різниця вважалася достовірною при $P < 0,05$, $P < 0,01$. Для порівняння змін середнього артеріального тиску (САТ) та частоти серцевих скорочень (ЧСС) використовували метод однопараметричного статистичного дисперсійного аналізу (ANOVA), достовірність різниці визначалася при $P < 0,02$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Кардіогенні рефлекс на ін'єкції вератрину.

Гемодинамічні відповіді на ін'єкції вератрину або фізіологічного розчину вивчали у щурів II групи, котрих потім не використовували для імуногістохімічних досліджень. Повторні подразнення рецепторів серця вератрином у всіх дослідах викликали у тварин стандартний депресорний рефлекс Бецоляда – Яріша (протягом 2 год) зі зниженням САТ, зменшенням ЧСС та короткочасним пригніченням дихання. Однак послідовні введення фізіологічного розчину не впливали на ці гемодинамічні показники. Початковий рівень САТ до введення вератрину становив (114 ± 3) мм рт. ст., а середня ЧСС – 327 ± 5 . Введення вератрину викликало зниження артеріального тиску до ($86 \pm 2,3$) мм рт. ст. (близько 25 %; $n=20$; $P < 0,02$). При цьому ЧСС зменшувалася (на 39 %; $n=40$; $P < 0,02$). У всіх випадках введення тваринам алкалоїду призводило до короткочасної зупинки дихання. Таким чином, реакція мала всі характерні риси депресорного рефлексу Бецоляда – Яріша (брадикардія, гіпотензія та апное). Латентний період виникнення цієї тріади ефектів у всіх випадках був 3–5 с, а максимальне вираження реакції відмічалось через 10–12 с після введення алкалоїду. Депресорні відповіді практично не змінювалися при 12 послідовних введеннях вератрину.

Викликана вератрином експресія *c-fos* у торакальному відділі спинного мозку.

Кількість Фос-ір-нейронів та патерни ламінарного розподілу суттєво змінювалися після введення вератрину щурам IV групи в порівнянні з введенням фізіологічного розчину тваринам III групи. Найбільш істотне збільшення середнього значення (\pm СПС) числа позитивних нейронів на зріз на боці серця виявлено на рівні Т3/4 ($P < 0,05$). Основні фокуси локалізації позитивних нейронів включають шари 1 і 2, зону навколо

центрального каналу та інтермедіолатеральне ядро (IML), де локалізуються прегангліонарні симпатичні нейрони спинного мозку (рис. 1, а, 2). Слід зазначити, що у щурів I контрольної групи тільки поодинокі Фос-ір-нейрони реєструвалися в торакальних сегментах поверхневих шарів і проміжній сірій речовині спинного мозку. У попередніх досліджах [13, 23] ми також відмічали дуже низький базовий рівень експресії *c-fos* у спинному мозку щурів та кішок.

Підкреслимо, що в нашій роботі була необхідність попереднього хірургічного втручання для введення канюлі у яремну вену тваринам (під наркозом). Таким чином, у нашому випадку, базовий рівень експресії *c-fos* був високий, а співвідношення “сигнал – шум” майже нульове у сегментах Т1/2 і Т5, та невисоке на рівні Т3/4 (див. рис. 1 б, в, г). Протилежно до сегментів Т3 та Т4 у сегментах Т1/2 та Т5 середнє число Фос-ір-нейронів у поверхневих шарах 1 і 2 та шарах 7 і 10 різко зменшувалось. Розподіл мічених нейронів у зрізах спинного мозку щурів експериментальної групи на рівні їх максимального скупчення (Т3/4) був нерівномірний як у дорсовентральному, так медіолатеральному напрямках. По-перше, максимальна щільність Фос-ір-нейронів була у шарі 1 та зовнішній частині шару 2. По-друге, великі та малі Фос-ір-ядра (мічені нейрони) локалізувалися білатерально головним чином у латеральній частині маргінальної зони, крайовій зоні медіальної частини дорсального рога (шар 4) та зоні навколо центрального каналу. Поодинокі мічені нейрони спостерігались також у шийці дорсального рога (шар 5), проміжній сірій речовині (шар 7), вентральному розі (шар 8) та латеральному спінальному ядрі (див. рис. 1, а). Власне ядро (шари 3 та 4) дорсального рога верхніх торакальних сегментів, яке отримує проєкції від аферентів великого діаметра (груп А α та А β), утримувало дуже малу кількість зафарбованих

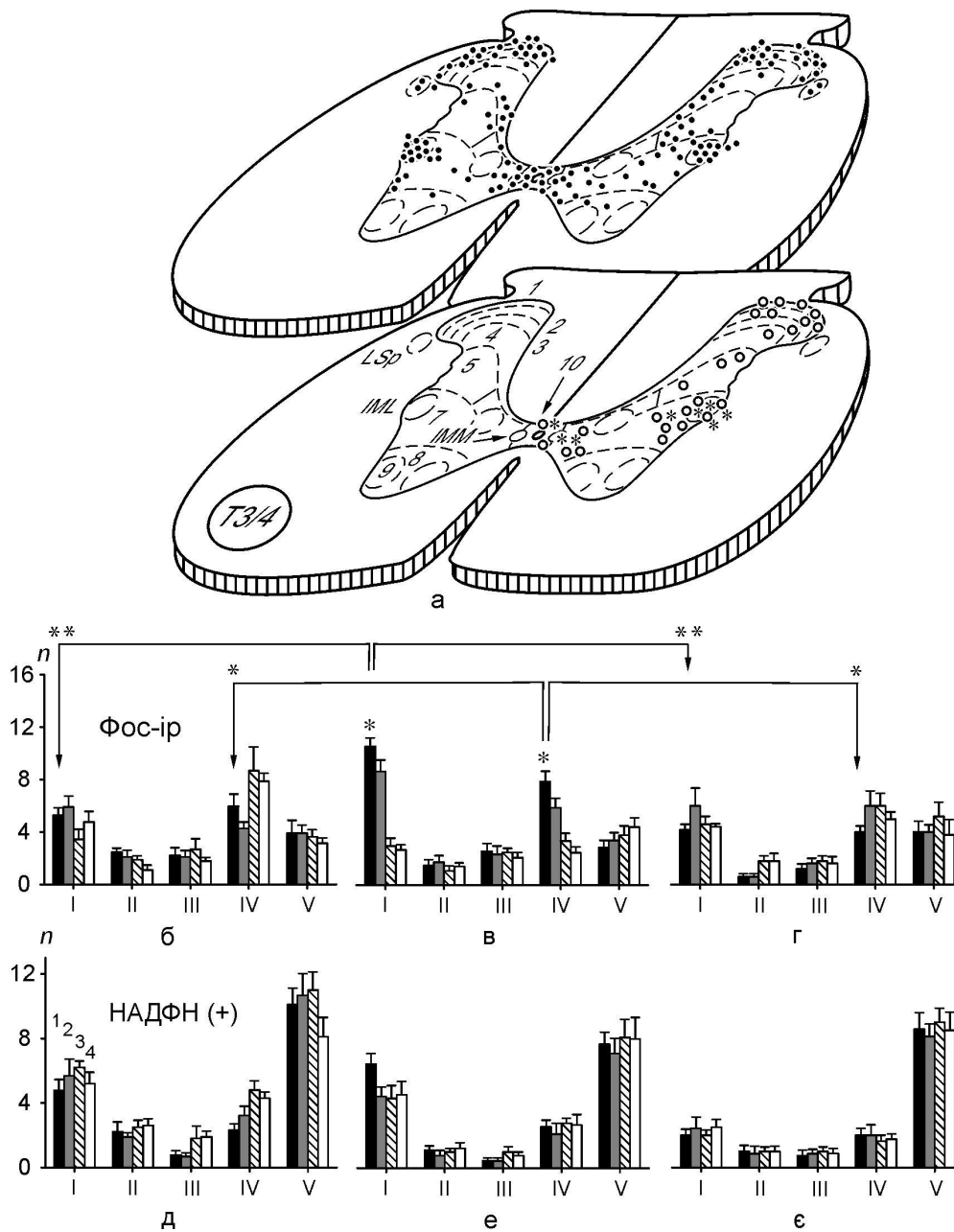


Рис. 1. Патерни розподілу мічених нейронів у шарах 1–10 сірої речовини торакальних сегментів спинного мозку та їх кількісний аналіз: а – Фос-імунореактивні (Фос-ір)-нейрони (крапки), НАДФН-позитивні клітини (кружечки) та нейрони з подвійним зафарбуванням (зірочки) у сегментах Т3/4 (IML – інтермедіолатеральне ядро, IMM – інтермедіомедіальне ядро, LSp – латеральне спінальне ядро); б–є – середня кількість (n) Фос-ір- та НАДФН(+)-нейронів на зріз у шарах та IML сегментів Т1/2, Т3/4, Т5 відповідно, після послідовних ін'єкцій вератрину та фізіологічного розчину на іпси- та контралатеральному боці (1, 2 – іпсилатеральні та контралатеральні боки сегментів після внутрішньовенних ін'єкцій вератрину відповідно, 3, 4 – після внутрішньовенних ін'єкцій фізіологічного розчину; I, II, III, IV, V – шари 1–2, 3–4, 5–6, 7–10 та IML відповідно). Зірочки, розташовані над стрілочками, означають достовірність різниці числа реактивних нейронів у поверхневих шарах (1, 2) та центральній сірій речовині (7–10) між різними рівнями торакального відділу спинного мозку тварин IV групи. Знак # над колонками означає достовірність різниці середнього числа реактивних нейронів між однаковими шарами сірої речовини тварин IV та III груп. *P < 0,05, **P < 0,01

нейронів на обох боках спинного мозку. Слід зазначити, що тільки на рівні сегментів Т3/4 різниця між середніми значеннями кількості мічених нейронів при порівнянні тварин III та IV груп була статистично достовірною у поверхневих шарах 1 і 2 ($P < 0,05$) і проміжній сірій речовині, а також у зоні навколо центрального каналу ($P < 0,05$).

Округлі та довгасті за формою Фос-ір-ядра мічених нейронів (> 10 мкм) спостерігались головним чином у поверхневих шарах, а гігантські ядра (> 20 мкм) округлої форми виявлялись у великій кількості в межах інтермедіолатерального та інтермедіомедіального симпатичних ядер. Поодинокі гігантські зафарбовані ядра реєструвались також у вентральному розі та у шийці дорсального рога. Ми не виявили Фос-імунореактивності у клітинах глії в торакальних сегментах спинного мозку (див. рис. 2).

Подвійне зафарбування спінальних нейронів. У всіх тварин (III контрольної та IV дослідної груп) максимальна щільність НАДФН(+)-нейронів зареєстрована у сегментах Т1 і Т2 (див. рис. 1, д, е, є). Позитивні клітини локалізувалися головним чином у поверхневих шарах 1 і 2 дорсального рога та у зоні навколо центрального каналу (білатерально). Менша кількість таких нейронів спостерігалась у власному ядрі (шари 3 та 4), шийці дорсального рога (шар 5) та латеральній частині проміжної сірої речовини (шар 7). Хоча Фос-ір- та NO-генеруючі нейрони були перемішані в основних фокусах їх локалізації у різних шарах сірої речовини (див. рис. 1, а), але нервові клітини з подвійним зафарбуванням (Фос + НАДФН) зареєстровані не були. Однак нейрони з подвійним міченням ($> 50\%$) постійно виявлялись у симпатичних ядрах (IML та IMM) сегментів Т1–Т5 як у щурів III контрольної, так і IV дослідної груп (див. рис. 2). Слід також зазначити, що середня кількість (\pm СПС) НАДФН(+)-нейронів (унілатерально) в межах поверхневих шарів дорсального рога на рівні сегментів Т3/4 становила $4,3 \pm 0,79$ і $6,4 \pm 0,64$ та на зрізі $9,1 \pm 0,7$ і $10,5 \pm 1,1$ у

тварин III та IV груп відповідно ($P > 0,05$).

Експресія *c-fos* у нейронах довгастого мозку. Базовий рівень експресії *c-fos* на зрізах у дорсомедіальних та вентролатеральних ділянках довгастого мозку оперованих тварин (група III), по всій його довжині був значно більший, ніж у грудних сегментах. Фос-ір-нейрони реєструвались в межах ядер Sol (30–90 клітин на зріз) і CVL (20–35 клітин), ростровентролатеральному ретикулярному ядрі (RVL) (31–47 клітин) та інтермедіатному ретикулярному ядрі (IRt) (5–19 клітин). Незначна кількість (< 10) позитивних нейронів на зріз реєструвалася також у желатинозній субстанції (Ge5) каудального спінального ядра тригемінального нерва (Sp5), ядрах шва (ROb, RPa) та латеральному парагігантоцелюлярному ядрі (LPGi).

Після стимуляції рецепторів серцевого м'яза вератрином (щури IV групи), інтенсивне ядерне Фос-ір-зафарбування спостерігалось в дорсомедіальних та вентролатеральних ділянках довгастого мозку по всій його довжині. Мічені нейрони локалізувалися білатерально з невеликим іпсилатеральним домінуванням (рис. 3, 4). Фос-ір-нейрони виявлено білатерально у великій кількості по всій довжині Sol від комісурального до рострального рівня 4-го шлуночка. Їх максимальне середнє число у цьому ядрі зареєстровано на рівні заднього поля (AP) в порівнянні з комісуральним ($P < 0,05$) та ростральним рівнем ($P < 0,01$). У вентролатеральній ділянці довгастого мозку в межах CVL/RVL на рівні AP реєструвалася максимальна середня кількість мічених нейронів (75 ± 4). Середня кількість Фос-ір-нейронів у цьому центрі різко знижувалася на каудальному рівні четвертого шлуночка (4VC) до $50 \pm 3,5$ ($P < 0,05$) і особливо в межах RVL (пресорному центрі довгастого мозку) на ростральному рівні четвертого шлуночка (4VR) становила 40 ± 3 ($P < 0,05$). Мічені клітини у цих центрах були скупчені головним чином вентролатерально відносно обопільного

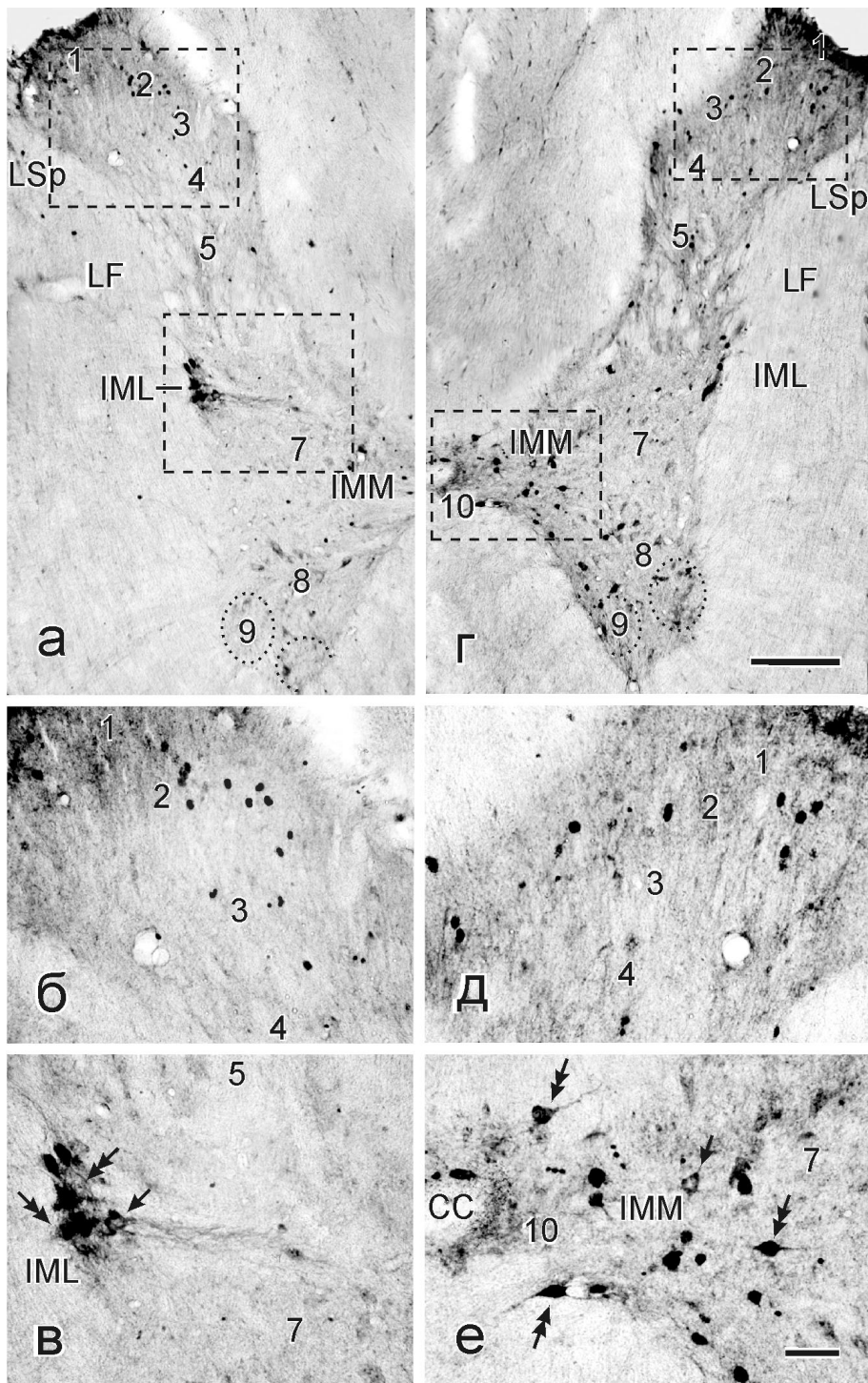


Рис. 2. Фос-імунореактивні та НАДФН(+)-нейрони на зрізах спинного мозку шура: а – розподіл позитивних клітин у шарах (1–9); б, в – позитивні нейрони у шарах 1–4 та 5 і 7 сірої речовини 3-го торакального сегмента при великому збільшенні (зони локалізації нейронів позначені пунктирними лініями на а); г – розподіл позитивних нейронів у шарах 1–10 сірої речовини 4-го торакального сегмента; д, е – такі нейрони у шарах 1–4 та 7 і 10 при великому збільшенні. Одинарні стрілки вказують на НАДФН(+)-нейрони, подвійні стрілки – на подвійно зафарбовані нервові клітини. Інші позначення, як на рис. 1. Масштабна лінія на а та г – 200 мкм, на б, в, д, е – 50 мкм

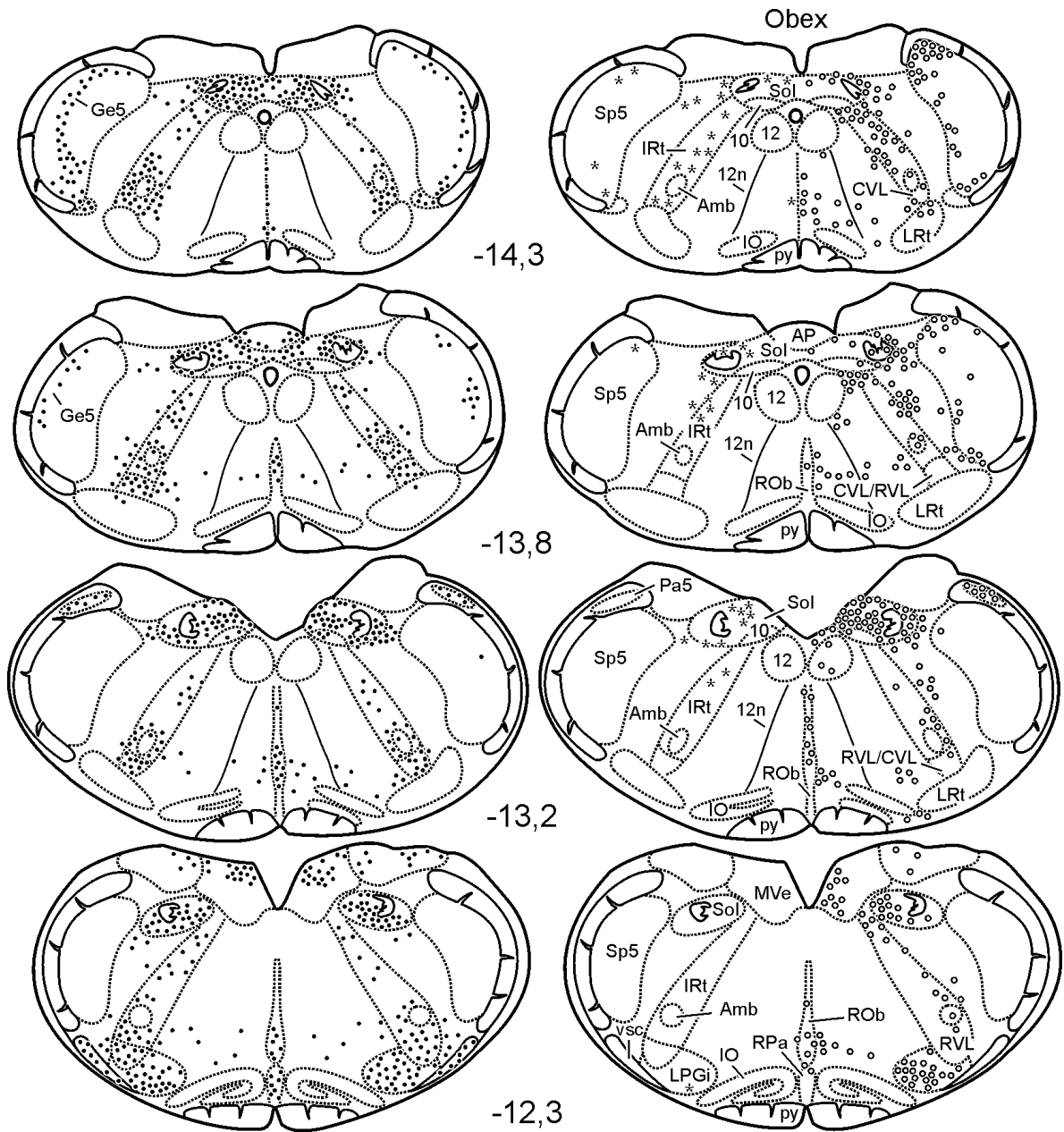


Рис. 3. Плани зрізів довгастого мозку відповідно до чотирьох рівнів від засувки у ростральному напрямку: (-14,3; -13,8; -13,2; -12,3 мм від брегми) з розподілом мічених нейронів у різних ділянок після послідовних ін'єкцій вератрину протягом 2-х год у щура. Чорні крапки представляють Фос-імунореактивні нейрони (ліва колонка); кружечки – НАДФН(+)-нейрони, а зірочки – мічені нервові клітини з подвійним зафарбуванням (права колонка). Amb – обоїльне ядро; AP – заднє поле (area postrema); CVL – каудальне вентролатеральне ретикулярне ядро; Ge5 – желатинозна субстанція спінального ядра трійчастого нерва; IO – нижня олива; IRT – інтермедіатне ретикулярне ядро; LPGi – латеральне парагігантоцелюлярне ядро; LRT – латеральне ретикулярне ядро; MVe – медіальне вестибулярне ядро; Sol – ядро поодинокого тракту; Sp5 – спінальне ядро трійчастого нерва; Obex – засувка мозку; Pa5 – притрійчаста ділянка; py – пірамідний тракт; ROb – темне ядро шва; RPa – бліде ядро шва; RVL – ростральне вентролатеральне ретикулярне ядро; 10 – дорсальне моторне ядро блукаючого нерва; 12 n – під'язичний нерв. Тут і на рис. 4–6 скорочення ядер наведено за атласом [22]

ядра (Amb), де локалізуються парасимпатичні нейрони (рис. 5). Необхідно відзначити, що рееструвалися тільки поодинокі мічені прегангліонарні мотонейрони у дорсальному моторному ядрі вагуса (10) та Amb (рис. 3, 6). Ціла група Фос-ір-нейронів була зареєстрована у вигляді смужки, яка простягалася у дорсальному напрямку від Amb до Sol у межах IRt. Необхідно відзначити факт наявності Фос-імунореактивності у притрійчастому ядрі (Pa5) та у желатинозній субстанції (Ge5) ядра спінального тракту трійчастого нерва (див. рис. 3). Саме ростральне ядро довгастого мозку, в якому спостерігали велику групу мічених нейронів – латеральне парагігантоцелюлярне ядро (LPGi), є також важливим центром регуляції симпатичного тону. Зазначимо, що Фос-ір-нейрони були виявлені і в таких структурах довгастого мозку, як медіальне вестибулярне ядро (MVe), гі-

гантоклітинне ретикулярне ядро (Gi) та латеральні ретикулярні під'ядра (субтригемінальне – LRtS5 та парвіцелюлярне – LRtPC) (див. рис. 3). Послідовність інтенсивності Фос-імунореактивності у різних структурах довгастого мозку була наступною: Sol > CVL/RVL > RVL > LPGi > Ge5 > Pa5 > 10. По всій довжині довгастого мозку середня кількість (\pm СПС) Фос-ір-нейронів у більшості структур, які забезпечують функцію серцево-судинної регуляції та активуються при розвитку рефлексу Бецоляда – Яріша у стимульованих вератрином щурів, була достовірно більшою у порівнянні з середньою кількістю мічених нейронів у тварин контрольних груп з введенням фізіологічного розчину ($P < 0,01$) (див. рис. 4).

Колокалізація Фос-імунореактивності та НАДФН-діафоразної реактивності. Багато НАДФН(+)-нейронів рееструвалися у різних ділянках довгастого мозку. Послі-

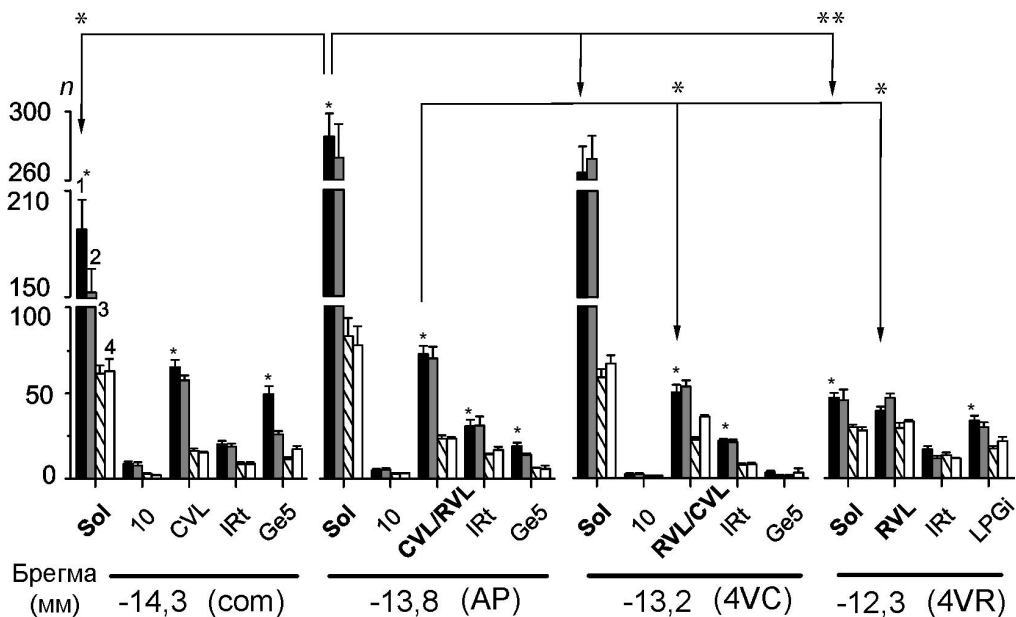


Рис. 4. Гістограми розподілу середнього числа (\pm СПС) Фос-імунореактивних нейронів на зріз у серцево-судинних центрах на різних рівнях довгастого мозку у щурів різних груп. 1, 2 – іпсилатеральні та контралатеральні боки довгастого мозку після послідовних (2 год) внутрішньовених ін'єкцій вератрину (щури IV групи), відповідно, 3, 4 – іпсилатеральні та контралатеральні боки – після ін'єкцій фізіологічного розчину (щури III групи). Sol – ядро поодинокого тракту; 10 – дорсальне моторне ядро блукаючого нерва; CVL – каудальне вентролатеральне ретикулярне ядро; IRt – проміжне інтермедіатне ретикулярне ядро; Ge5 – желатинозна субстанція спінального ядра трійчастого нерва; RVL – ростральне вентролатеральне ретикулярне ядро; LPGi – латеральне парагігантоцелюлярне ядро; com – комісуральний рівень; AP – задне поле (area postrema); 4VC – каудальний рівень 4-го шлуночка; 4VR – ростральний рівень 4-го шлуночка. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

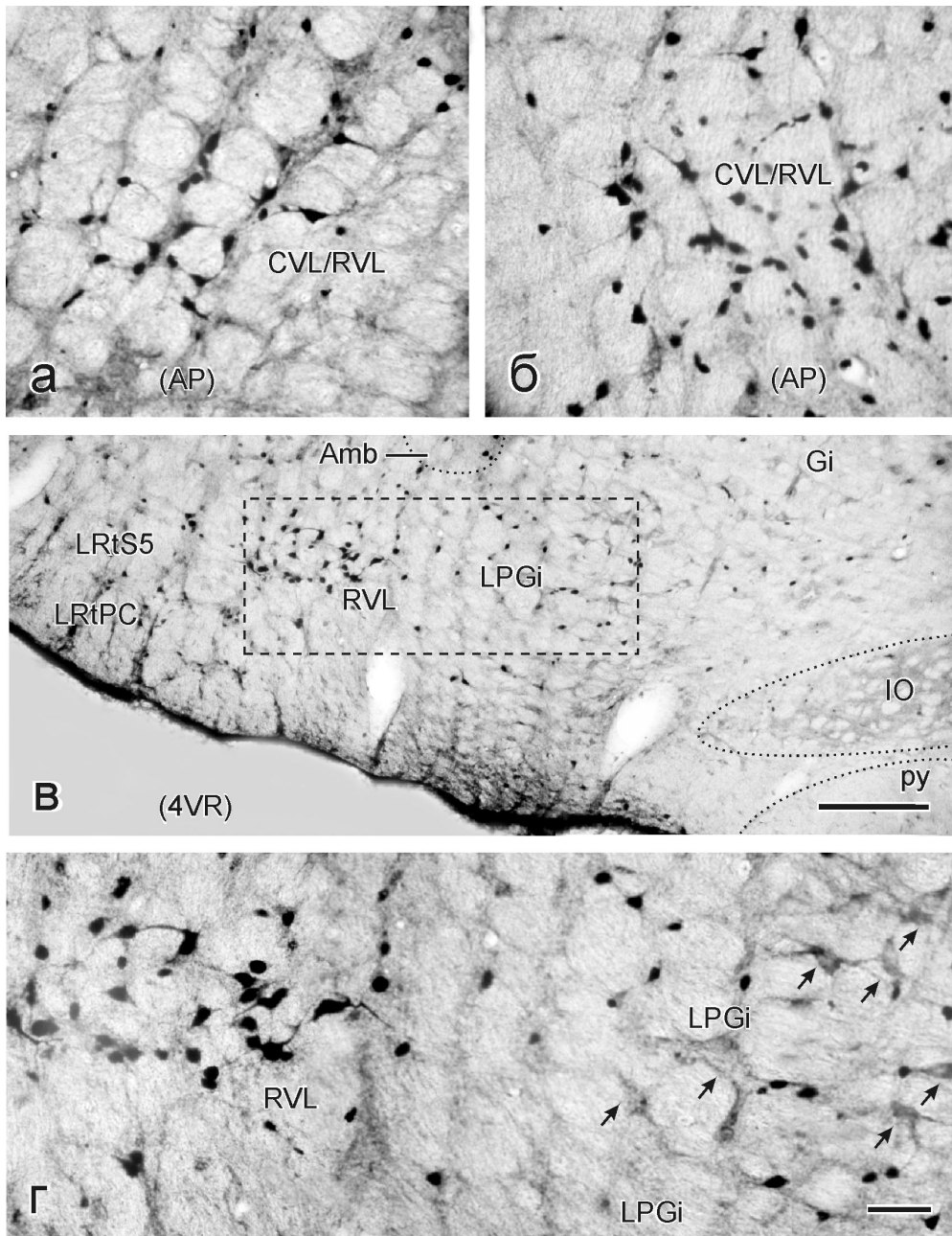


Рис. 5. Фос-імунореактивні та НАДФН(+)-нейрони у вентромедіальних структурах довгастого мозку щура після повторних внутрішньовенних ін'єкцій фізіологічного розчину (а) та вератрину (б – е): а, б – розподіл Фос-ір-нейронів у межах каудального та рострального вентролатерального ретикулярного ядер (CVL/RVL) заднього поля (AP), відмічається помітне підвищення кількості мічених нейронів у ретикулярних ядрах після ін'єкцій вератрину (б) у порівнянні з кількістю мічених клітин у цих ядрах після ін'єкцій фізіологічного розчину (а); в – Фос-ір- та НАДФН(+)-нейрони у RVL та латеральному парагігантоцелюлярному ядрі LPGi; у рамці показано мічені нейрони вентролатеральної ділянки довгастого мозку на ростральному рівні 4-го шлуночка (4VR); г – велике збільшення RVL та LPGi ядер (рамка на в), де видно два фенотипи мічених нейронів, перемішаних у LPGi без подвійного зафарбування. Стрілками показані НАДФН(+)-нейрони. Gi – гігантоцелюлярне ядро; IO – нижня олива; LRtPC – латеральне ретикулярне ядро (мілкоклітинна частина); LRtS5 – латеральне ретикулярне ядро, підчастина ядра трійчастого нерва. Масштабна лінія на а, б та г – 50 мкм, на в – 200 мкм

довність інтенсивності НАДФН-діафоразної реактивності була наступною: Sol > LPGi > IRt > Ge5 > Pa5 > CVL/RVL (див. рис. 3). Невелика кількість мічених нейронів спостерігалася в межах парасимпатичних ядер (10 та Amb). По всій довжині довгастого мозку, як і в верхніх торакальних сегментах спинного мозку, середня кількість (\pm СПС) НАДФН(+)-нейронів на зріз у контрольних щурів III групи і стимульованих вератрином тварин IV групи достовірно не відрізнялись ($P > 0,2$). Рис. 3 і 6 показують ділянки, в яких у щурів IV групи Фос-ір-нейрони перемішані з НАДФН(+)-нейронами. Тільки близько 2% Фос-ір-нейронів, локалізованих у дорсолатеральних та інтермедіатних суб'ядрах Sol, виявляли НАДФН-діафоразну реактивність. Ми також спостерігали, що основні фокуси локалізації Фос-ір-нейронів у зрізах довгастого мозку дослідних тварин IV групи збігалися з зонами локалізації NO-генеруючих нейронів. Подвійно мічені нейрони були також зареєстровані в межах IRt (< 2%) та LPGi (< 1%) і в межах медіального під'ядра Sol (> 2%) (див. рис. 3 і 6). Колокалізація Фос-ір- та НАДФН(+)-нейронів спостерігалась у парасимпатичних ядрах (Amb та 10) після стимуляції серця вератрином. Однак Фос-ір-нейрони у цих ядрах скоріш були інтернейронами, а не вагальними прегангліонарами (див. рис. 6).

ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показують, що послідовна активація серцево-легеневих хеморецепторів призводить до більш помітних змін Фос-імунореактивності, ніж НАДФ-д реактивності в центрах серцево-судинної регуляції довгастого та спинного мозку.

Найбільша кількість Фос-ір-нейронів на досліджуваних рівнях довгастого мозку була знайдена в Sol, куди проежуються серцеві аференти [27]. Як відомо, в Sol містяться вторинні нейрони, які активуються впливами від серцевих [28], баро- і хе-

морецепторів [6] і навіть м'язових ноцицепторів [21]. Серцеві (головним чином немієлінізовані) та барорецепторні (мієлінізовані) аференти утворюють проєкції до одних і тих самих під'ядер Sol [15], але локалізація Фос-імунореактивності при стимуляції відповідних аферентів різниться. Якщо максимальна інтенсивність вератрин-залежної Фос-імунореактивності виявлялася переважно в ростральних відділах Sol на рівні AP та каудальної частини 4-го шлуночка, то селективне подразнення барорецепторів викликало помітну Фос-імунореактивність в більш широкій ділянці Sol як рострально, так і каудально від засувки [5]. Виявлені розбіжності в представництві барорецепторних та серцевих аферентів в Sol можуть вказувати на те, що інтенсивність змін гемодинамічних показників при барорефлексах може бути більшою, ніж при рефлексі Бецоляда – Яріша, хоча функціональне спрямування обох рефлексів лишається однаковим – зниження кров'яного тиску [8].

Досить помітна, хоч і менш виражена, ніж у Sol, Фос-імунореактивність була відмічена в вентролатеральних ділянках довгастого мозку (CVL, RVL) при генерації рефлексу Бецоляда – Яріша. Як відомо, нейрони Sol беруть участь не тільки в інтеграції вагальних аферентних входів але і в подальшій передачі їх впливів до інших ядер центральної нервової системи, включаючи ростральну та каудальну вентролатеральні ділянки довгастого мозку. Раніше встановлено, що бульбо-спінальні нейрони RVL і LPGi одержують входи від шийного підрозділу блукаючого нерва [24]. Активація цих входів призводить до вираженого гальмування симптоактивуючих нейронів RVL/LPGi, яке може реалізуватися через прямі Sol – RVL зв'язки, причому, подразнення серцевих аферентів посилює інтенсивність такої реакції [28]. Характерно, що гальмівні впливи на нейрони RVL з Sol є ГАМК- залежні, оскільки ін'єкція в Sol блокаторів ГАМК зменшує не

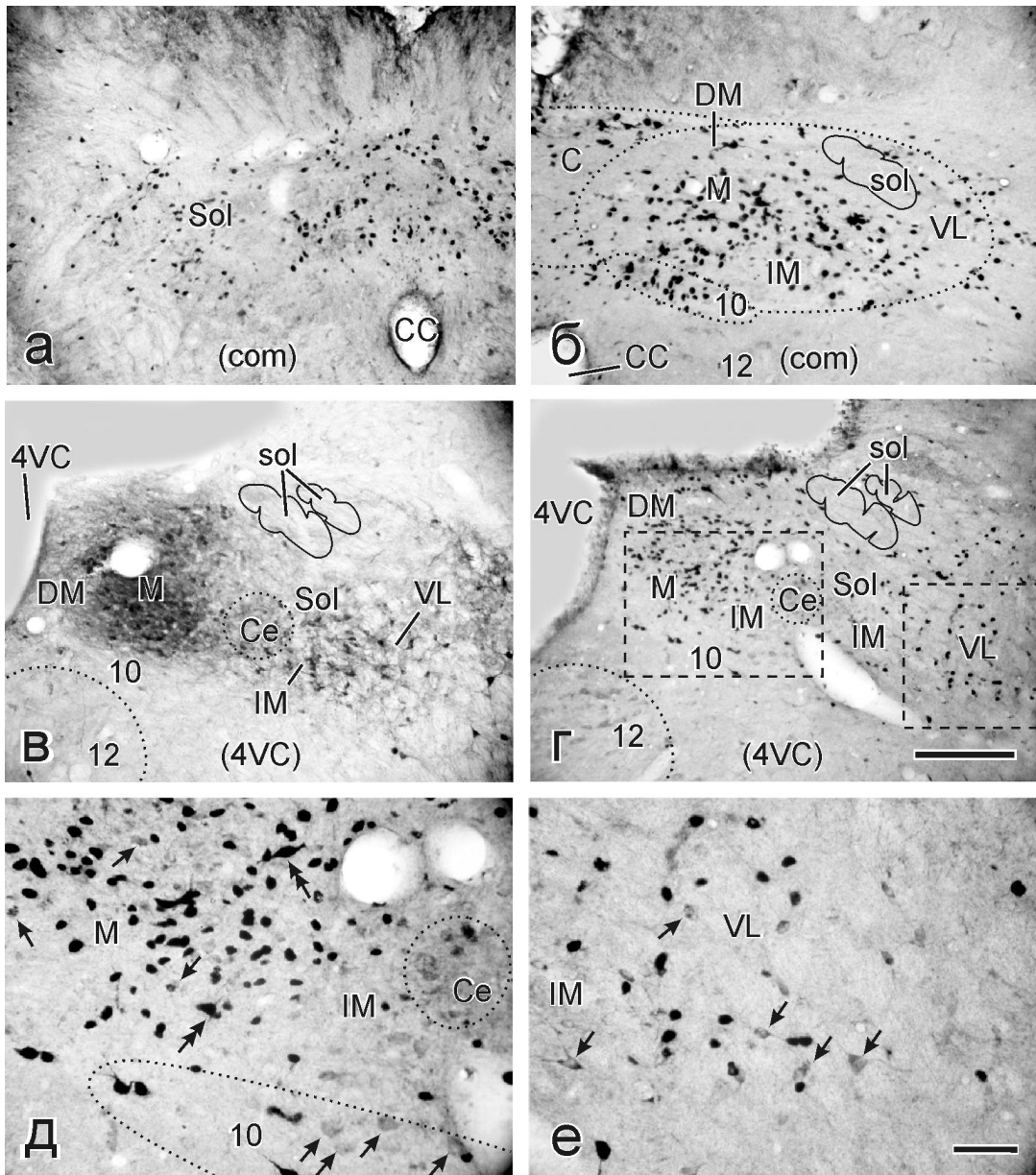


Рис. 6. Фос-імунореактивні та NO-генеруючі нейрони у дорсомедіальних структурах довгастого мозку щура після повторних внутрішньовенних ін'єкцій фізіологічного розчину (а) та вератрину (б-е): а – розподіл Фос-ір-нейронів у різних під'ядрах ядра поодинокого тракту на комісуральному рівні (com), відмічається невелике скупчення мічених клітин у межах медіальної частини ядра поодинокого тракту Sol; б – великі скупчення Фос-ір-нейронів у межах комісурального (C), медіального (M), інтермедіального (IM) та вентролатерального (VL) під'ядер Sol, відмічаються поодинокі парасимпатичні Фос-ір-нейрони у медіодорсальній частині моторного ядра вагуса, а також поодинокі мічені нейрони навколо поодинокого тракту (sol) і в межах дорсомедіального під'ядра; в – НАДФН(+)-нейрони у різних під'ядрах Sol на каудальному рівні 4-го шлуночка (4VC), відмічається інтенсивне гістохімічне зафарбування медіального (M) та центрального (Ce) під'ядер Sol за рахунок проєкцій НАДФН(+)-аферентів; г – Фос-ір та НАДФН(+)-нейрони у різних під'ядрах Sol на рівні 4VC, у рамках показані такі нейрони у під'ядрах M, IM, Ce, VL і моторному ядрі вагуса (10); на д і е – ці самі під'ядра при великому збільшенні. Стрілками показані НАДФН(+)-нейрони, а подвійними стрілками – нервові клітини з подвійним зафарбуванням. 12 – ядро під'язичного нерва. Масштабна лінія на а, б, в та г – 200 мкм, на д, е – 50 мкм

тільки депресорні ефекти барорефлексів, але і рефлекс Бецоляда – Яріша [25]. Одержані нами дані про наявність викликаного вератрином Фос-імунореактивності в RVL підтверджує можливість залучення імпульсації серцевих аферентів до ініціації цієї реакції. Функціональне значення такої реакції, яка є компонентом рефлексу Бецоляда – Яріша, полягає в тому, що в період її генерації послаблюється ефективність інших синаптичних входів до нейронів RVL, в тому числі і симпатозбуджувальних.

Однак вагусна модуляція симпатичних входів відбувається не тільки за рахунок прямих Sol – RVL зв'язків. Результати проведених досліджень збігаються з даними, які показують, що в CVL також реєструється велика кількість Фос-ір-нейронів при генерації рефлексу Бецоляда–Яріша [9, 25]. Ці вентролатеральні ділянки довгастого мозку одержують прямі входи від Sol, через які передаються сигнали від серцевих та барорецепторних аферентів, шкірних і м'язових ноцицепторів. Фос-ір-нейрони CVL розташовані вентрально та вентролатерально від Amb, в місцях локалізації також катехоламінергічних клітин (група A1) та ГАМКергічних симпатодепресорних нейронів [4]. Перша група нейронів утворює шляхи до гіпоталамуса, а друга – до симпатозбуджувальних бульбо-спінальних нейронів RVL. Важливо відмітити, що при розвитку рефлексу Бецоляда – Яріша в нейронах CVL генеруються лише збуджувальні реакції. Натомість в RVL реєструється переважно пригнічення симптоактивуючих нейронів. Причому блокада або руйнування CVL призводять до значного зниження інтенсивності симптопригнічувальних впливів, викликаних рефлексом Бецоляда – Яріша [25]. Однак слід зазначити, що в наших дослідках різниця середньої кількості Фос-ір-нейронів у RVL після ін'єкції вератрину або фізіологічного розчину не була статистично достовірною. Це, можливо, пов'язано з тим, що при розвитку депресорного

рефлексу Бецоляда – Яріша деякі нейрони RVL після пригнічення їх активності генерують збудливі реакції по типу "віддачі" та можуть реєструватися як Фос-ір-нейрони. Таким чином, симпатодепресорні реакції, які є характерними для рефлексу Бецоляда – Яріша, відбуваються через залучення як прямого гальмівного Sol – RVL, так і/або паралельного Sol – CVL – RVL гальмівного шляхів довгастого мозку.

Численні NOS-вмісні нейрони у щурів були описані в багатьох серцево-судинних структурах дорсомедіальної та вентролатеральної ділянок довгастого мозку [20, 21, 29]. Принциповою дією NO в стовбурі мозку є рефлекторне пригнічення симпатичної нервової активності у RVL у відповідь на подразнення барорецепторних аферентів. Причому симпатодепресорна дія NO в довгастому мозку, є дуже важливою тому, що в CVL NO викликає збільшення вивільнення глутамату і зменшення концентрації ГАМК, а в RVL – її збільшення [17].

Активація серцевих аферентів вератрином у проведених дослідках не призводила до суттєвих змін патернів розподілу NOS-вмісних клітин в довгастому мозку. Тільки в незначній кількості NO-генеруючих нейронів (~ 2%), розташованих в Sol та IRT, вдалося продемонструвати експресію *c-fos* при розвитку рефлексу Бецоляда – Яріша. Навпаки, кількість нейронів Sol з подвійним зафарбуванням була значно більшою і сягала 20% при розвитку м'язового пресорного рефлексу [21]. Як відомо, у щурів, на відміну від собак, у відповідь на запровадження блокаторів нейронної NOS настає виражене пригнічення рефлексу Бецоляда – Яріша, що підкріплює значення NO-генерації цього рефлексу [1, 2]. Відсутність вираженої Фос-імунореактивності в NOS-вмісних нейронах довгастого мозку, можливо, пов'язана з особливим характером їх електричної активності. Наприклад, мотонейрони спинного мозку, для яких є характерним порівняно низькочастотна імпульсна активність, майже не

проявляють Фос-імунореактивності під впливом інтенсивної аферентної імпульсації.

Результати проведеного дослідження свідчать, що подразнення серцевих рецепторів призводять до появи Фос-імунореактивності не тільки в довгастому, але і в спинному мозку (див. рис. 2). Значну кількість Фос-ір-нейронів знайдено в грудних сегментах (Т3 і Т4) спинного мозку. Як відомо, на верхні шийні сегменти С1–С3 та грудні сегменти Т2–Т6 проеуються серцеві симпатичні аференти, які надходять у складі зірчастих гангліїв та дорсальних корінців у спинний мозок [12]. Статистично достовірне збільшення середньої кількості Фос-ір-нейронів ($P < 0,05$) у сегментах Т3/4 було виявлене у поверхневих шарах дорсального рогу та зоні навколо центрального каналу. Як відомо, у цих регіонах спинного мозку локалізується велика кількість нейропептидвмісних нейронів, які є джерелами прямих висхідних проєкцій на Sol [18]. Крім того, такі нейрони можуть трансинаптично передавати впливи від серцевих аферентів до інших важливих центрів серцево-судинної регуляції в довгастому мозку: CVL, RVL, LPGi та ядер шва (ROb, RPa) [12]. Необхідно відмітити, що при подразненні серцевих рецепторів вератрином ми не зареєстрували експресії *c-fos* у NO-генеруючих нейронах, розташованих в місцях локалізації нейронів, які дають проєкції до дорсомедіальної та вентролатеральної ділянок довгастого мозку. Характерно, що досить інтенсивне подвійне зафарбування (Фос + НАДФН) відмічено лише у прегангліонарних нейронах латеральних та медіальних симпатичних ядер (IML, IMM) спинного мозку (див. рис. 1, а). Причому воно виявлялось у більш ніж 50 % нейронів цих ядер. Це вказує на те, що при розвитку депресорних реакцій, викликаних вератрином, можлива їх модуляція під симпатозактивуючими впливами спинного мозку. Результати проведеного дослідження свідчать про те, що внутрішньовенні ін'єкції вератрину

призводять до виразних депресорних змін гемодинамічних реакцій, характерних для розвитку кардіопротекторного рефлексу Бецоляда – Яріша. Виявлені зміни супроводжуються посиленням Фос-імунореактивності у важливих центрах довгастого мозку (Sol, CVL, LPGi, Ge5), які входять до центральних ланцюгів цього рефлексу, що і відображає підвищення нейрональної активації у цих центрах.

Робота виконана за підтримки грантів INTAS 01-2130, ДФФД № 05.07/00065 Міністерства освіти та науки, а також „Молекулярні основи функціонування геному” НАН України (2002-2005).

V.A. Maisky, A.I. Pilyavskii, A.V. Maznychenko, V.V. Datsenko, V.B. Pavlyuchenko, A.I. Kostyukov, A.A. Moibenko

CENTRAL NEURONAL CIRCUITS OF THE BEZOLD-JARISH REFLEX IN THE RATS

The distribution of the Fos-immunoreactive (Fos-ir) and NADPH-diaphorase-positive/NOS-containing neurons in the medulla and thoracic spinal cord in rats was studied after the veratrine injection into v. jugularis ext. followed by reproduction of the Bezold-Jarisch reflex. Fos-ir neurons were found in the nucleus tractus solitarius (Sol), coudoventrolateral (CVL) and rostroventrolateral (RVL) areas, intermediate reticular nucleus (IRt), and lateral paragigancocellular nucleus (LPGi) of the medulla. The intensity of *c-fos* expression was as follows: Sol > CVL > RVL > LPGi. The intensity of NADPH-diaphorase reactivity was manifested in the following sequence: Sol > IRt > LPGi > RVL. In comparison to sham-operated animals, application of veratrine is associated with a statistically significant increase ($P < 0.01$) of the mean number of Fos-ir neurons in the Sol and CVL, but not in the RVL. Double-labelling (Fos + NADPH) was found in a small number (about 2%) of neurones in the Sol, IRt and LPGi. In the thoracic spinal cord Fos-ir neurons were predominantly detected in the superficial layers of the dorsal horn, area around the central canal and the intermediate lateral or medial nuclei (IMl and IMM), where NOS-containing neurons in the thoracic spinal cord were accumulated. Received data show that signals arising from the veratrine-activated cardiopulmonary afferents activate neurons of the Sol and CVL that together with the RVL are incorporated into neuronal circuits for generation of the Bezold-Jarisch reflex. In the medulla NOS-containing neurons activated by input from cardiopulmonary receptors can contribute to the enhancement of cardioprotective depressor reflexes in the rats.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Даценко В.В., Павлюченко В.Б., Мойбенко О.О. та ін. Особливості розподілу нейронів, що містять синтазу оксиду азоту в медулярних серцево-судинних центрах собак та шурів // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, №5. – С. 13–24.
2. Мойбенко О.О., Павлюченко В.Б., Даценко В.В. та ін. Дослідження ролі ендотелійзалежних факторів у реалізації кардіогенних рефлексів за нормальних і патологічних умов // Там само. – 2000. – **46**, №2. – С. 19–32.
3. Aviado D.M., Guavera-Aviado, D. The Bezold-Jarisch reflex. A historical perspective of cardiopulmonary reflexes // Ann. New York Acad. Sci. – 2001. – **940**. – P. 48–58.
4. Blessing W.W., Li Y.W. Inhibitory vasomotor neurons in the caudal ventrolateral region of the medulla // Brain Res. Rev. – 1989. – **81**. – P. – 83–97.
5. Chan R.K.W., Jarvina E.V., Sawchenko P.E. Effects of selective sinoaortic denervations on phenylephrine-induced activational responses in the nucleus of the solitary tract // Neuroscience. – 2000. – **101**, №1. – P. 165–178.
6. Dean C., Seegard J.L. Mapping of carotid baroreceptor subtype projections to the nucleus tractus solitarius using c-fos immunohistochemistry // Brain Res. – 1997. – **758**. – P. 201–208.
7. Evans C., Baxi S., Neff R. et al. Synaptic activation of cardiac vagal neurons by capsaicin sensitive and insensitive sensory neurons // Ibid. – 2003. – **979**. – P. 210–215.
8. Evans C., Baxi S., Neff R. et al. Central integrating mechanism of the Bezold-Jarisch and baroreceptor reflexes // Amer. J. Physiol. – 1972. – **222**. – P. 713–720.
9. Gieroba Z.J., MacKenzie L., Willoughby J.O., Blessing W.W. Fos-determined distribution of neurons activated during the Bezold-Jarisch reflex in the medulla oblongata in conscious rabbits and rats // Brain Res. – 1995. – **683**. – P. 43–50.
10. Guo, Z.L., Lai H.C., Longhurst J.C. Medullary pathways involved in cardiac sympathoexcitatory reflexes in the cat // Ibid. – 2002. – **925**. – P. 55–66.
11. Hsu S.-M., Raine L., Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures // J. Histochem. Cytochem. – 1981. – **29**. – P. 577–580.
12. Jang I., Cho K., Moon S. et al. A study on the central neural pathway of the heart, Nei-Kuan (EH – 6) and Shen – Men (He – 7) with neural tracer in rats // Amer. J. Chin. Med. – 2003. – **31**, №4. – P. 591–609.
13. Kalezic I., Pilyavskii A.I., Maisky V.A. et al. Distinctive pattern of c-fos expression in the feline cervicolumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles // Neurosci. Lett. – 2004. – **364**. – P. 94–97.
14. Kalia M., Mesulam M. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat // J. Comp. Neurol. – 1980. – **193**. – P. 435–508.
15. Kalia M., Sullivan J.M. Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat // J. Comp. Neurol. – 1982. – 211. – P. 248–264.
16. Krayer O. The history of the Bezold-Jarisch effect // Naunyn-Schmiedeb. Arch. Pharmacol. – 1961. – **240**. – P. – 361–368.
17. Krukoff T.L., Central actions of nitric oxide in regulation of autonomic functions // Brain Res. Rev. – 1999. – **30**. – P. 52–65.
18. Leah J., Menetrey D., de Pommery J. Neuropeptides in long ascending spinal tract cells in the rat: evidence for parallel processing of ascending information // Neuroscience. – 1988. – **24**, №1. – P. 195–207.
19. Lee T.M., Kuo J.S., Chai C.Y. Central integrating mechanism of the Bezold-Jarisch and baroreceptor reflexes // Amer. J. Physiol. – 1972. – **222**. – P. 713–720.
20. Maisky V.A., Datsenko V.V., Moibenko A.A. et al. NO-generating neurons in the medullary cardiovascular centers of rodents and carnivores // Comp. Biochem. Physiol. – 2003. – **136**. – P. 605–612.
21. Maisky V.A., Pilyavskii A.I., Kalesic I. et al. NADPH-diaphorase activity and c-fos expression in medullary neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // Auton. Neurosci. – 2002. – **101**. – P. 1–13.
22. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. – San Diego: Acad. Press, 1997.
23. Pilyavskii A.I., Maisky V.A., Kalezic I. et al. c-fos expression and NADPH-diaphorase reactivity in spinal neurons after fatiguing stimulation of hindlimb muscles in the rat // Brain Res. – 2001. – **923**. – P. 91–102.
24. Sun M.K., Guyenet P.G. Arterial baroreceptor and vagus inputs to sympathoexcitatory neurons in rat medulla // Amer. J. Physiol. – 1987. – **252**. – R699–R709.
25. Vayssettes-Courchay Ch., Bouysset F., Laubie M., Verbeuren T.J. Central integration of the Bezold-Jarisch reflex in the cat // Brain Res. – 1997. – **744**. – P. 272–278.
26. Verberne A.J.M., Guyenet P.G., Medullary pathway of the Bezold-Jarisch reflex in the rat // Amer. J. Physiol. – 1992. – **263**. – R1195–R1202.
27. Xie Q., Itoh M., Miyamoto K. et al. Cardiac afferents to the nucleus of the tractus solitarius: A WGA-HRP study in the rat // Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1999. – **5**, №6. – P. 370–375.
28. Zagon A. Activation of cardiac vagal afferents facilitates late vagal inhibition in neurons of the rostral ventrolateral medulla oblongata bilaterally // Brain Res. – 2000. – **854**. – P. 172–177.
29. Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function // Cardiovasc. Res. – 1999. – **43**. – P. 639–649.