

Влияние болевого воздействия на временные взаимосвязи активности нейронов в дорсо-медиальных отделах продолговатого мозга

Белорусский государственный медицинский университет

В ходе работы продемонстрировано, что, несмотря на значительную морфо-функциональную гетерогенность нейронов дорсо-медиальных отделов продолговатого мозга, имеются некоторые униформные механизмы вовлечения этих нейронов и их небольших популяций в реализацию реакций при болевом воздействии на соматические ноцицепторы, проявляющиеся в увеличении степени интеграции информационного процессинга в дорсо-медиальных отделах продолговатого мозга за счет большего, чем при функциональном покое, преобладания синхронных тормозных и отсроченных возбуждающих временных взаимосвязей и увеличения частоты встречаемости их сочетаний.

Ключевые слова: продолговатый мозг, нейроны, временные взаимосвязи, боль.

Дорсо-медиальные отделы продолговатого мозга являются важнейшей областью мозга, опосредующей развитие адаптивных кардио-васкулярных реакций индуцированных болевым воздействием [4, 6, 8]. Болевое воздействие может приводить не просто к изменениям, но и к серьезным нарушениям деятельности сердца, что зачастую проявляется возникновением опасных для жизни аритмий или даже внезапной сердечной смерти.

В настоящее время, по-прежнему отсутствует информация о центральных механизмах нейрогенно-индуцированных изменений электрофизиологических свойств миокарда. Исходя из выраженной морфо-функциональной и нейрохимической гетерогенности нейронов [5, 6] в дорсо-медиальных отделах продолговатого мозга и интеграции на данных нейронах огромного количества информации от рецепторов различной модальности, одним из важных аспектов совместного осуществления дорсо-медиальными медуллярными нейронами регуляции функций сердечно-сосудистой системы может заключаться в особом характере межнейронных взаимодействий, основанных на наличии преобладающих типов временных нейро-нейрональных взаимосвязей.

Важно отметить, что биологически значимые поведенческие и вегетативные реакции организма на болевое воздействие имеют достаточно стереотипный эволюционно закрепленный характер. Поэтому, вероятно, вовлечение нейронных групп области ядер солитарного тракта в реализацию сердечных реакций при болевом влиянии может сопровождаться или даже быть основанным на особом типе реорганизации не только активности отдельного нейрона, но и временных межнейронных связей.

Целью данной работы явилось изучение изменений временных межнейронных связей в дорсо-медиальных отделах продолговатого мозга при болевом воздействии на соматические ноцицепторы.

Материалы и методы

Опыты проводились на 11 беспородных крысах (самцы, масса 290-350 г, возраст 6-7 месяцев), анестезированных внутрибрюшинным введением уретана (1.0 г/кг). С с помощью портативного $^{\circ}0.5 \pm$ Температура тела поддерживалась в пределах 37 электрообогревателя и теплоизоляции животного. Эвтаназия животных после опыта осуществлялась декапитацией под наркозом. Все хирургические и экспериментальные процедуры над животными проводились в соответствии с требованиями комиссии БГМУ по использованию животных в учебном процессе и экспериментах.

Координаты регистрируемых областей продолговатого мозга выбирались по стереотаксическому атласу - 12.0 мм каудальнее от Брега, 1.5 мм латеральнее

сагитального шва и 5.7-6.1 мм от поверхности мозга, что соответствует расположению ядер солитарного тракта.

Мультинейронная активность записывалась с помощью остеклованных вольфрамовых микроэлектродов с сопротивлением 8-9 МОм (которые были изготовлены по технологии описанной Азевым О. А. [1]).

Активный электрод подводился к месту регистрации стереотаксическим аппаратом. Индифферентный электрод в виде стальной пункционной иглы помещался в мышцы головы животного.

Далее сигнал от микроэлектродов фильтровался (диапазон 200 - 10000 Гц), усиливался в 1000 раз усилителем нейронной активности (УУ-2М ЭПМ НИИЭМ, Ст. Петербург), контролировался на осциллографе (С 1-68), оцифровывался с частотой дискретизации 22050 Гц и хранился на винчестере персонального компьютера. Автоматическая детекция и сортировка спайков осуществлялась авторской программой. За спайк принималась его высокочастотная часть, как наименее подверженная искажениям. Далее выделялись следующие показатели формы спайков: амплитуда, длительность, площадь восходящей и нисходящей части, суммарная длительность и площадь спайка, время его появления.

Сортировка потенциалов проводилась по трем параметрам: амплитуда восходящей и нисходящей части, суммарная длительность [9].

В конце опыта, для идентификации места локализации микроэлектрода через него пропускался ток 1 мА в течение 10 секунд. Далее проводилась декапитация животного, череп вскрывался и помещался в 10% раствор формалина на 48 часов. Затем изготавливались серийные парафиновые срезы продолговатого мозга, толщиной 5 мкм, которые окрашивались по Нисслю. Место локализации микроэлектрода определялось под микроскопом по наличию области некроза, вызванного электролизом тканей.

Механическое болевое воздействие осуществлялось в виде щипкового (pinch) воздействия надпороговой постоянной интенсивности на подошву задней контрлатеральной конечности животного. Для болевого воздействия использовалась небольшая прищепка с приклеенным внутри тупым шипиком. Интенсивность болевого воздействия была такова, что возникала тестовая вокализация без повреждения кожи, если прищепка накладывалась на лапу не анестезированного животного [3], при этом развиваемое давление на ткани составляло 2Н/мм².

Временные взаимосвязи между активностью нейронов выявлялись с помощью кросскоррелограмм. Принцип построения кросскоррелограмм как известно состоит в том, что экспериментатор использует для построения одной кросскоррелограммы два спайковых ряда разных нейронов. На кросскоррелограмме откладывается по оси абсцисс с положительным знаком время появления каждого спайка второго ряда после ближайшего спайка первого ряда. С отрицательным знаком по оси абсцисс откладываются интервалы времени появления спайков первого ряда после ближайшего спайка второго ряда. По оси ординат число выявленных перекрестных интервалов данной длительности. Таким образом, одна кросскоррелограмма отражает две временные взаимосвязи – справа от нуля вероятность возникновения разрядов второго нейрона после появления разряда первого нейрона в определенном временном диапазоне, а слева от нуля вероятность возникновения разрядов первого нейрона после появления разряда второго нейрона [2].

Ширина бина в кросскоррелограммах принималась за 1мс, а временной диапазон - 60мс. За достоверные принимались пики и минимумы на кросскоррелограммах, выходящие за пределы двух стандартных отклонений от среднего значения амплитуд бинов.

Экстремумы гистограмм, локализованные в одном из интервалов (0-2 мс, 3-9 мс, 10-25 мс) принимались за наличие отдельного вида временных взаимосвязей.

Результаты и обсуждение

Было подсчитано общее число выявленных временных межнейронных связей в условиях функционального покоя, при ложно-болевым и истинно-болевым влиянии.

Активность 24 нейронов (11 нейронных групп, 15 нейронных пар) была зарегистрирована. При этом выявилось 36, 34 и 44 достоверных положительных и отрицательных экстремумов на гистограммах во временном диапазоне 0-20мс относительно центра гистограмм для функционального покоя, ложно- и истинно-болевого воздействия, соответственно. Парный коэффициент Вилкоксона изменения числа выявленных временных межнейронных связей составил 0.05 при истинно-болевым воздействии по отношению к ложно-болевому воздействию.

Двенадцать ($33.3 \pm 7.8\%$), двенадцать ($37.5 \pm 8.5\%$) и девятнадцать ($45.0 \pm 7.7\%$) взаимосвязей, проявляющихся существенными минимумами во временном интервале 0-2мс обнаруживалось в 6 ($54.5 \pm 15.0\%$), 7 ($63.6 \pm 14.5\%$) и 11 (100.0%) нейронных группах при функциональном покое, ложно- и истинно-болевым воздействием, соответственно (синхронные тормозные взаимосвязи).

7.3%) $\pm 7.9\%$) и четырнадцать ($33.3 \pm$ Десять ($27.8 \pm 7.5\%$), девять (28.1 взаимосвязей, для которых было свойственно наличие на гистограммах существенных пиков в интервале 10-25мс, обнаруживалось в 5 ($45.5 \pm 15.0\%$), 6 ($54.4 \pm 15.0\%$) и 7 ($63.6 \pm 14.5\%$) нейронных группах при функциональном покое, ложно- и истинно-болевым воздействием, соответственно (отсроченные возбуждающие взаимосвязи).

10.1%) нейронов $\pm 8.5\%$) и девять ($37.5 \pm 8.5\%$), пять ($20.8 \pm$ При этом пять (20.8 имело оба типа временных взаимосвязей с соседними нейронными единицами.

11.7% синхронных тормозных $\pm 14.8\%$ и $47.4 \pm 14.8\%$, $41.7 \pm$ Другими словами 41.7 13.7% отсроченных $\pm 17.6\%$ и $57.1 \pm$ взаимосвязей комбинировалось с $50.0 \pm 15.8\%$, 55.5 возбуждающих взаимосвязей при функциональном покое, ложно- и истинно-болевым воздействием, соответственно.

9.8%) нейронов имело $\pm 7.8\%$) и восемь ($33.3 \pm 7.8\%$), четыре ($16.7 \pm$ Четыре (16.7 оба типа вышеописанных временных взаимосвязей афферентного характера по 14.2% , \pm отношению к одной и той же соседней нервной клетке. Другими словами, 33.3 11.6% временных синхронных тормозных взаимосвязей $\pm 14.2\%$ и 42.1 ± 33.3 13.7% временных отсроченных $\pm 17.6\%$ и $57.1 \pm$ комбинировалось с $40.0 \pm 15.5\%$, 44.4 возбуждающих взаимосвязей афферентного типа с одним и тем же соседним нейроном.

10.1%) нейронов имело $\pm 7.8\%$) и девять ($37.5 \pm 7.8\%$), четыре ($16.7 \pm$ Четыре (16.7 11.8%) и $\pm 14.2\%$ и $47.4 \pm 14.2\%$, $33.3 \pm$ сочетание синхронных тормозных (33.3 14.2% и \pm отсроченных возбуждающих временных взаимосвязей ($40.0 \pm 15.5\%$, 33.3 13.3%) эфферентного характера с соседней, но не всегда только с одной ± 64.3 нейронной клеткой.

Таким образом, число временных взаимосвязей в локальных нейронных сетях дорсо-медиальных отделов продолговатого мозга значительно возрастает в условии болевого воздействия на соматические ноцицепторы, с большим превалированием особых типов временных взаимосвязей. К таким типам взаимосвязей относятся, во-первых, наблюдаемые нами взаимосвязи характеризующиеся наличием локальных минимумов на гистограммах во временном интервале 0-2мс, что может быть интерпретировано как синхронное торможение. Во-вторых, возрастает также число отсроченных возбуждающих временных взаимосвязей, которые проявлялись наличием пиков на гистограммах во временном

интервале 9-20мс. Важно, что при болевом воздействии возрастала также частота совместной встречаемости данных видов взаимосвязей причем, зачастую это проявлялось как быстрое уменьшение с последующим отсроченным возрастанием возбудимости отдельного нейрона после разрядов определенной соседней нейронной клетки.

Известно, что болевое воздействие приводит к выраженным изменениям активности вегетативной нервной системы. Многие исследования свидетельствуют о том, что ядра солитарного тракта являются важнейшей областью интеграции ноцицептивной и гомеостатической кардиоваскулярной афферентной информации [4, 10]. Выявлено значительное ноцицептивно-индуцированное угнетение активности 15% нейронов ядер солитарного тракта, получающих афферентацию от периферических хеморецепторов, что вело к угнетению брадикардических рефлекторных реакций в ответ на стимуляцию периферических хеморецепторов.

При этом ослабление хеморецепторно-индуцированных брадикардических ответов опосредуется действием ГАМК на ГАМКА-ергические рецепторы в ядрах солитарного тракта и предотвращается предварительной микроинъекцией бикуккуллина.

Однако активность значительной части (48%) нейронов, получающих хеморецептивную афферентацию, значительно возрастала при болевом воздействии, что позволяет предполагать, что данные нейроны могут быть ГАМК-ергическими нейронами тормозной нейронной сети в ядрах солитарного тракта [6].

Активация соматических ноцицепторов ведет также к уменьшению выраженности вагус-опосредованной брадикардии, возникающей при стимуляции барорецепторов. При этом угнетение брадикардической реакции опосредуется через нейрокинин-1 рецепторы в пределах ядер солитарного тракта. Микроинъекция субстанции Р в ядра солитарного тракта приводит также к уменьшению выраженности вагус-опосредованной брадикардии посредством активации ГАМК-ергических нейронов с последующим действием ГАМК на ГАМКА рецепторы [5]. При этом ноцицептивные афференты могут быть непосредственными источниками субстанции Р или активировать находящиеся в пределах ядер солитарного тракта нейроны, содержащие субстанцию Р и активирующие ГАМК-ергические интернейроны. Активация ГАМК-ергических интернейронов приводит, посредством ГАМКА рецепторов, к торможению нейронов второго порядка, получающих барорецептивную афферентацию и взаимодействующих с нейронами вагуса, посылающих проекции к сердцу.

Таким, образом, в настоящее время считается, что болевое воздействие на соматические ноцицепторы ведет к увеличению активности ГАМК-ергических нейронов тормозной нейронной сети в ядрах солитарного тракта. В свою очередь данные нейроны угнетают активность нейронов второго порядка, которые взаимодействуют с мотонейронами вагуса и получают афферентную импульсацию от барорецепторов или хеморецепторов. Следствием этого является модуляция гомеостатических кардиоваскулярных рефлексов, приводящая к увеличению частоты и силы сердечных сокращений при болевом воздействии.

В свете приведенных данных, наблюдаемое в данном исследовании увеличение активности у преобладающего большинства нейронов при болевом воздействии может быть связано с тем, что эти нейроны являлись компонентом тормозной нейронной сети, т.е. были ГАМК-ергическими нейронами. Также они могли являться возбуждающими интернейронами, например, содержащими субстанцию Р, получающими ноцицептивную афферентацию и взаимодействующими с тормозными нейронами.

На прямую или косвенную причастность изученных нейронов к функции тормозной ГАМК-ергической нейронной сети может свидетельствовать выявленное в настоящей работе увеличение синхронных тормозных взаимосвязей и более частая встречаемость сочетания синхронных тормозных и отсроченных возбуждающих временных взаимосвязей. Известно, например, что увеличение частоты разрядов ГАМК-ергических нейронов сопровождается увеличением амплитуды гиперполяризации при развитии ТПСП, а также появлением бифазных ответов, связанных со сложной динамикой протекания процессов торможения и возбуждения на нейроне [7].

Выводы

Таким образом, несмотря на значительную морфо-функциональную гетерогенность нейронов дорсо-медиальных отделов продолговатого мозга имеются некоторые униформные механизмы вовлечения этих нейронов и их небольших популяций в реализацию реакций при болевом воздействии на соматические ноцицепторы, проявляющиеся в увеличении степени интеграции информационного процессинга в дорсо-медиальных отделах продолговатого мозга за счет большего, чем при функциональном покое, преобладания синхронных тормозных и отсроченных возбуждающих временных взаимосвязей и увеличения частоты встречаемости их сочетаний.

Литература

1. Азев, О. А. Метод изоляции стеклом вольфрамовых микро-электродов / О. А. Азев // Весці Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі. 2003. № 1. С. 42–44.
2. Мещерский, Р. М. Анализ нейронной активности / Р. М. Мещерский. 1972. 222 с.
3. Le Bars, D. Animal Models of Nociception / D. Le Bars, M. Gozariu, S. W. Cadden // Pharmacological Reviews. 2001. Vol. 53, № 4. P. 597–652.
4. Boscan, P. Role of the solitary tract nucleus in mediating nociceptive evoked cardiorespiratory responses / P. Boscan, A. E. Pickering, J. F. R. Paton // Autonomic Neuroscience – Basic and Clinical. 2001. Vol. 86. P. 170–182.
5. Boscan, P. Somatic nociception activates NK1 receptors in the nucleus tractus solitarii to attenuate the baroreceptor cardiac reflex / P. Boscan, S. Kasparov, J. F. R. Paton // European Journal of Neuroscience. 2002. Vol. 16. P. 907–920.
6. Boscan, P. The nucleus of the solitary tract: an integrating station for nociceptive and cardiorespiratory afferents / P. Boscan, A. E. Pickering, J. F. R. Paton // Experimental Physiology. 2002. Vol. 87, № 2. P. 259–266.
7. Heinemann, U. Ceiling of stimulus induced rises in extra-cellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat U. / Heinemann, H. D. Lux // Brain Research. 1977. Vol. 120. P. 231–249.
8. Pickering, A. E. Nociception attenuates parasympathetic but not sympathetic baroreflex via NK1 receptors in the rat nucleus tractus solitarii / A. E. Pickering., P. Boscan, J. F. R. Paton // Journal of Physiology. 2003. Vol. 551, № 2. P. 589–599.
9. Prudnikau, H. A. Registration of multiunit activity and analysis of neuro-neuronal, cardio-neuronal and respiratory-neuronal relationships / H. A. Prudnikau // The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology. 2006. Vol. 14, № 4. S. 217.
10. Toney, G. M. Sensory modalities conveyed in the hindlimb somatic afferent input to nucleus tractus solitarius / G. M. Toney, S. W. Mifflin // Journal of Applied Physiology. 2000. Vol. 88. P. 2062–2073