

УДК 612.822+598.34+615.21+591.18

## ЦЕНТРАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УПРАВЛЕНИЯ ДЫХАНИЕМ У ЛЕГОЧНОГО МОЛЛЮСКА *Lymnaea stagnalis*: ФАЗОВАЯ СИНХРОНИЗАЦИЯ ДЫХАНИЯ И ЦИКЛИЧЕСКОЙ ЛОКОМОЦИИ

© 2003 г. Д. Д. Воронцов, В. В. Цыганов, Д. А. Сахаров

Представлено академиком Т.М. Турпаевым 05.03.2003 г.

Поступило 06.03.2003 г.

Пресноводный моллюск прудовик *Lymnaea stagnalis* осуществляет воздушное дыхание посредством периодических открываний и закрываний пневмостома (ПН) – отверстия, ведущего в полость легкого. Центральный генератор дыхательных движений считается хорошо изученным на уровне индивидуальных идентифицированных нейронов [1, 2]. Результаты экспериментов свидетельствовали в пользу доминирования дыхательной поведенческой программы над локомоторной [2].

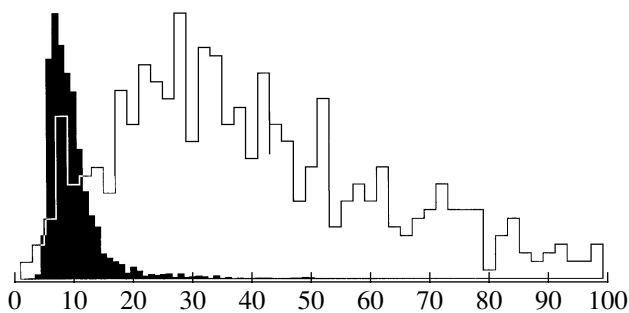
Последнее положение было поставлено под вопрос нашими исследованиями, посвященными интенсивной (циклической мышечной) локомоции прудовика. Мы нашли, что при фиктивной циклической локомоции, вызванной в препарате изолированной ЦНС серотонином (5-НТ) или его предшественником (5-НТР), один из ключевых нейронов центрального генератора дыхательных движений, клетка RPeD1, подчиняется локомоторному ритму [3]. Наши последующие эксперименты на интактных улитках и на полуинтактном препарате, содержащем помимо ЦНС дыхательную периферию, показали, что при фармакологически вызванной реальной или фиктивной локомоции дыхательные движения ПН могут стать синхронными с движениями ноги; при этом локомоторный ритм является ведущим, а респираторный – ведомым [4, 5]. Полученные результаты позволили сформулировать нетривиальную точку зрения на управление дыхательной моторикой у прудовика. Согласно предложенной рабочей гипотезе, в pedalном отделе ЦНС на фоне фармакологически вызванного изменения нейротрансмиттерной ситуации “развиваются нейрональные события, лежащие в основе интенсивной локомоции и ассоциированного с ней дыхательного ритмогенеза” [4, с. 194], при этом “происходит подчи-

нение дыхания локомоции и изменение места генерации респираторного ритма” [5, с. 556].

Тёмным местом этой гипотезы и, вообще, полученных результатов оставалось их отношение к нормальному поведению. Не является ли наблюдавшаяся координация дыхания с локомоцией фармакологическим артефактом? Для ответа на этот вопрос были проведены сообщаемые здесь поведенческие эксперименты, целью которых было выяснить, как ведут себя дыхательные движения при выполнении моллюском интенсивной циклической локомоции. Анализ полученных в ходе настоящего исследования результатов потребовал дополнительного привлечения компьютерного моделирования, о чем мы также сообщаем в этой статье.

Опыты проводили на взрослых особях прудовика *L. stagnalis* массой 2–2.7 г. Чтобы вызвать интенсивную мышечную локомоцию, моллюска помещали вне воды на твердую горизонтальную поверхность. В качестве таковой использовали зеркало, что облегчало визуальную регистрацию дыхательных движений (моменты открывания и закрывания ПН) и локомоции. Чтобы минимизировать механическое влияние эффекторов локомоции на ПН при движениях раковины, в дополнительной экспериментальной серии раковина перемещающегося по стеклу моллюска была вертикально приподнята за прикрепленную к ней эластичную нить. Другой конец нити был неподвижно закреплен на высоте 40 см над зеркалом. Натяжение нити регулировали вручную по мере перемещения моллюска. В экспериментах было использовано 35 моллюсков, из них 21 в серии с приподнятой раковиной.

За начало локомоторного цикла (ЛЦ) мы условно принимаем фазу, на которой начинается сокращение колумеллярных мышц, вызывающее подтягивание раковины к голове моллюска. Фазы ЛЦ мы обозначаем в процентах от общего времени нормализованного цикла, так что, к примеру, ЛЦ50 означает фазу, на которой пройдено



**Рис. 1.** Распределение периодов ЛЦ и РЦ при циклической локомоции. Контурной линией показано суммарное распределение периода открывания ПН. Черной гистограммой показано суммарное распределение ЛЦ. По горизонтальной оси – значение периода, с. При построении гистограмм распределений ширина канала накопления была равна 1 с для ЛЦ и 2 с для РЦ. Амплитуда гистограмм нормирована.

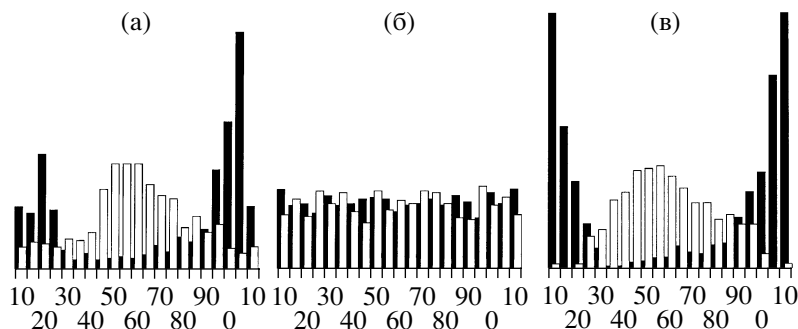
50% общего времени ЛЦ. Регистрацию подтягивания раковины производили в момент ее наибольшего ускорения, что соответствует фазе ЛЦ10. Обработка полученных данных состояла в построении распределений указанных событий друг относительно друга на оси времени либо по отношению к ЛЦ. Проверку гипотез о принадлежности экспериментальных данных логнормальному распределению проводили при помощи критерия соответствия  $\chi$ -квадрат.

На рис. 1 суммированы результаты одновременной регистрации локомоции и дыхания. Видно, что эти моторные ритмы существенно различаются как по среднему значению периода, так и по стабильности ритмической программы. Локомоторный ритм, как правило, стабильнее и чаще респираторного. Формально эти различия подтверждаются расчетом  $U$ -критерия Манна–Уитни (при  $p < 0.01$ ).

Количество ЛЦ за время регистрации (20 мин) было достаточно большим, чтобы проводить оценку индивидуальных данных, которые в нескольких случаях соответствовали логнормальному распределению. Хорошая выраженность максимума в индивидуальных распределениях говорит об относительной стабильности локомоторного генератора, но вместе с тем мы наблюдали значительные индивидуальные различия по этому показателю: максимум распределений варьировал в пределах от 6 до 13 с. Среднее геометрическое для суммарного распределения равно 9.2 с, среднее арифметическое 10.2 с, стандартное отклонение 7.1 с.

В функционировании ПН можно было выделить как относительно ритмичные участки (5–6 периодов), так и нерегулярные открывания и закрывания. Суммарные данные о респираторном цикле (РЦ) принадлежат логнормальному распределению; среднее геометрическое равно 36.8 с, среднее арифметическое 46.9 с, стандартное отклонение 33 с.

На первый взгляд, наши данные говорят об отсутствии устойчивой взаимосвязи между исследуемыми моторными программами. Так, эпизоды равнопериодической синхронизации двух ритмов (не менее трех последовательных периодов) имели место всего у 7 из 36 моллюсков. На нескольких отрезках записи также присутствовала кратнопериодическая синхронизация (она частично отражена на рис.1 в виде кратных периоду ЛЦ локальных максимумов на гистограмме распределения РЦ). В течение остального времени регистрации (более 80% от суммарного) мы вообще не смогли выделить сколько-нибудь устойчивого соотношения периодов ЛЦ и РЦ. Однако, анализ показал, что циклические моторные программы дыхания и локомоции всегда демонстрируют устойчивую фазовую синхронизацию. На рис. 2а показано распределение обоих синхронизованных с локомоцией дыхательных событий (открывания и закрывания ПН) относительно нормированного ЛЦ. Видно,



**Рис. 2.** Распределение моментов открывания и закрывания ПН относительно нормированного локомоторного цикла. Открывание ПН представлено белыми столбиками, закрывание черными. По горизонтальной оси – фаза локомоторного цикла, %. Шаг дискретизации при построении распределений – 5%. а – результаты поведенческих опытов; б – результаты моделирования независимых генераторов дыхания и локомоции; в – результаты моделирования с включением проекционной тормозной связи.

что привязка к локомоции по фазе является менее жесткой для открывания ПН (максимум распределения в области ЛЦ50–60), чем для закрывания (ЛЦ5). Провал в распределении закрываний ПН на ЛЦ10–15 является артефактом субъективной регистрации поведения и связан с трудностью точной оценки времени двух одновременных событий – закрывания ПН и подтягивания раковины.

Таким образом, наши результаты отрицают гипотезу о едином источнике обеих моторных программ, что очевидно из различий в распределении периодов локомоции и дыхания. Вместе с тем результаты свидетельствуют о том, что в отсутствие синхронности, даже при редких и нерегулярных движениях ПН, наблюдается привязка дыхательных движений к ЛЦ. Иными словами, координация носит универсальный характер и проявляется не только при равнопериодической синхронизации ритмов. Это позволяет сделать вывод о том, что существует координирующая связь между моторными системами, ответственными за каждую из поведенческих программ.

Теоретически можно представить два возможных механизма такой связи – с участием сенсорного звена и без такового, то есть механизм, ограниченный взаимодействием на центральном уровне. Стабильность привязки дыхательного интернейрона RPeD1 и движений ПН к локомоторному циклу, демонстрируемая редуцированными препаратами, включая изолированную ЦНС [3, 5], практически дискредитирует предположение о сколько-нибудь значительном вкладе сенсорного звена в координацию. Это также подтверждается результатами опытов настоящей работы, в которых мы минимизировали механическое взаимодействие эффекторов, что, однако, не привело к существенному изменению фазовых соотношений между дыханием и локомоцией.

Поэтому разумно исходить из предположения, что в нашем случае координация между моторными программами дыхания и локомоции происходит благодаря взаимодействиям в пределах ЦНС.

Для исследования такого типа взаимодействия мы разработали простую компьютерную модель, которая имитировала одновременную работу двух циклических генераторов, взаимодействующих посредством единственной односторонней проекционной связи. Количественные параметры модели были подобраны, исходя из результатов поведенческой регистрации. Каждый из модельных генераторов обладал средним значением периода и псевдослучайным разбросом вокруг среднего, который подчинялся нормальному или логнормальному закону. Данные, получаемые на выходе модели, идентичны по структуре нашим поведенческим записям, что позволяет обрабатывать их аналогично обработке результатов поведенческих опытов.

Как и ожидалось, модель, состоящая из двух независимых генераторов с различными периодами, показала равномерность распределения дыхательных событий относительно локомоторного цикла (рис. 2б). Дальнейший перебор простейших вариантов взаимодействия модельных генераторов позволил выделить связь, начало действия которой приходится на фазу ЛЦ90. Влияние было смоделировано как торможение дыхательного генератора: сигнал с локомоторного генератора смещал его фазу таким образом, что открывание ПН, если он в момент получения сигнала был закрыт, отсрочивалось, а закрывание ускорялось.

Такая связь обеспечивает относительно хорошую сходимость поведенческого и модельного распределений дыхательных событий относительно локомоторного цикла (рис. 2в). Вместе с тем видны различия в распределении открывания ПН между поведением и моделью, которые можно объяснить большей детерминированностью модели по сравнению с реальной нейронной сетью.

Предложенная модель проста и не исключает других возможных механизмов фазовой синхронизации дыхания и локомоции. Вместе с тем модель продемонстрировала, что единственная тормозная связь может достаточно долго обеспечивать стабильную синхронизацию дыхательного ритма с локомоторным в условиях, когда ритмы не идентичны, но достаточно близки.

Суммируя проведенную работу, мы можем заключить, что ее результаты подтвердили адекватность фармакологического способа синхронизовать дыхание с локомоцией. Это открывает хорошие перспективы для изучения нейрональных механизмов привязки дыхательных движений к локомоторному ритму у прудовика и – шире – для изучения общефизиологических механизмов координации ритмических моторик. Последней цели служит также разработанная нами компьютерная модель, которая, очевидно, выходит за рамки отношений между дыханием и локомоцией у прудовика.

Проведенные эксперименты явились также проверкой предположения, что у прудовика “под влиянием 5-НТР происходит подчинение дыхания локомоции и изменение места генерации респираторного ритма” [5, с. 556]. В свете полученных результатов рабочую гипотезу можно скорректировать так: для подчинения дыхания локомоции необходимо и достаточно выполнение двух условий: 1) наличие проекционной связи, обеспечивающей привязку дыхания к определенной фазе локомоторного цикла, и 2) сближение частот дыхательных движений и циклической локомоции. Наши эксперименты показали, что первое условие выполняется циклической локомоцией всегда, независимо от частоты и даже от регулярности дыхательных движений. Выполнение второго

условия в нормальном поведении, по-видимому, достигается благодаря тому, что интенсификация локомоции сопровождается у прудовика, как вообще у всех животных, усилением активности дыхательной системы.

Наиболее трудным местом остается локализация и клеточное устройство центрального генератора дыхания. Наши данные в пользу pedalной зависимости дыхательного ритма вступают в противоречие с принятыми представлениями. На недостаточность последних указывают также последствия внутрицентральных перерезок [5] и некоторые результаты внутриклеточных отведений из нейронов декларированного респираторного генератора [6]. Эти вопросы будут освещены отдельно.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты 02-04-48091 и 02-04-63074К).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Syed N.I., Harrison D., Winlow W. // J. Comp. Physiol. A. 1991. V. 169. P. 541–555.
2. Syed N.I., Winlow W. // J. Comp. Physiol. A. 1991. V. 169. P. 557–568.
3. Сахаров Д.А., Цыганов В.В. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1998. Т. 84. № 10. С. 1029–1037.
4. Tsyganov V.V., Sakharov D.A. // Acta biol. hung. 2000. V. 51. № 2/4. P. 189–195.
5. Цыганов В.В., Сахаров Д.А. // ДАН. 2002. Т. 382. № 4. С. 554–556.
6. Воронцов Д.Д. // ДАН. 2002. Т. 386. № 6. С. 835–838.