

© В.Г. Лукашин, В.В. Вишивцева, 2009  
УДК 611.018.866:597.82

*В.Г. Лукашин и В.В. Вишивцева*

## МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЛЯГУШКИ ПОД ВЛИЯНИЕМ БАРБИТУРАТОВ

Лаборатория функциональной морфологии и физиологии нейрона (зав. — проф. О.С. Сотников) Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

Исследовано влияние гексенала и нембутала на тканевые кустиковидные рецепторы живого изолированного мочевого пузыря лягушки, витально окрашенные метиленовым синим. Показано влияние этих препаратов на импульсную активность рецепторов, имеющее трехфазный характер: первичное резкое возрастание, резкое падение, продолжительное низкое плато. Реакции на гексенал и нембутал при наличии общих черт имеют свои особенности. Синхронно регистрировали динамику окраски метиленовым синим элементов рецептора для контроля за интенсивностью окислительно-восстановительных процессов в нейроплазме рецептора, т.е. за динамикой редокс-систем. Отмечено, что фазы этой динамики во многом совпадают с фазами изменения электрической активности рецептора. Ультраструктурных изменений, связанных с возможным повреждающим влиянием на рецепторы барбитуратов (экспозиция от 1 до 30 мин), не отмечено. Наиболее существенным признаком, свидетельствующим о преобладании процессов депонирования энергетического субстрата над его расходом, является накопление в нейроплазме элементов рецептора гранул гликогена. Угнетение импульсной активности рецепторов дает право предположить, что барбитураты, помимо снотворного и наркотического действия, обладают, по-видимому, некоторым анестезирующим свойством.

**Ключевые слова:** кустиковидные рецепторы, мочевой пузырь, барбитураты, анестезия, лягушка.

Боль — очень сложный психофизиологический феномен [6, 11], включающий такие реакции организма, как активация афферентных путей, эндокринные и иммунные изменения [5]. Многочисленные данные литературы свидетельствуют, что в формировании болевого ощущения участвуют как периферические (ноцицептивные), так и центральные механизмы [3, 8, 12, 13].

Барбитураты не обладают анальгезирующими свойствами. Они лишь усиливают анальгезирующий эффект других препаратов [1].

Таким образом, если барбитураты при своем резорбтивном действии оказывают влияние и на тканевые рецепторы (например, снижая их возбудимость), то механизм анальгезии при барбитуровом наркозе может включать и периферические рецепторы.

Поиск фактического подтверждения этого предположения и явился целью настоящей работы.

**Материал и методы.** Исследование проведено на травяных лягушках ( $n=25$ ). Объектом изучения были кустиковидные рецепторы мочевого пузыря, расположенные в его рефлексогенной зоне, т.е. в «шейке», в непосредственной близости от устья клоаки. У лягушки с разрушенным спинным мозгом из организма выделяли мочевой пузырь, разрезали и растягивали в специальной экспериментальной кювете с тонким прозрачным дном, предназначенной для работы с инвертированным микроскопом. Рецепторы прижизненно окрашивали раствором метиленового синего ( $6,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ ), а затем точечным механическим раздражением идентифицировали одиночную рецепторную единицу (отдельный кустик-

видный рецептор), от которой при помощи всасывающего электрода отводили и записывали электрическую активность. Регистрация активности производилась с использованием усилителя биопотенциалов ИФ (СССР) и осциллографа цифрового (GDS-806S, Россия).

Затем после удаления окрашивающего раствора в экспериментальную кювету нагнетали при помощи перистальтического насоса раствор Рингера–Локка, содержащий 0,005% гексенала или нембутала.

Далее при помощи цитофотометра ФМЭЛ-1А (ЛОМО, Россия), сочлененного с инвертированным микроскопом, проводили фотометрирование первых площадок дихотомического деления рецептора. Эту часть исследования проводили для контроля за интенсивностью окислительно-восстановительных процессов в нейроплазме рецептора, поскольку изменение цветонасыщенности живой структуры (при витальной окраске метиленовым синим) отражает динамику восстановительных эквивалентов (ВЭ), известных как редокс-система. За исходный принимали уровень ВЭ, замеренный сразу после замены красителя на раствор, содержащий барбитурат. Синхронно контролировали частоту импульсации идентифицированного рецептора, отводимую от периферического конца сенсорных волокон пузырного нерва. Кроме того, производили визуальную оценку тинкториальных, геометрических и временных показателей окраски элементов рецептора.

Общую морфологическую картину и динамику окрашивания — обесцвечивания рецепторов оценивали следующим образом. Препарат помещали в раствор метиленового синего до момента наиболее полного окрашивания рецепторов. Затем окрашивающий раствор заменяли на раствор Рингера — Локка, содержащий барбитурат. Контролем служили опыты, в которых окрашивающий раствор заменяли на чистый раствор Рингера — Локка без барбитурата.

Для оценки состояния ультраструктуры рецепторов проведены электронно-микроскопические исследования. Изучали не окрашенный метиленовым синим материал, подвергавшийся влиянию 0,005% раствора барбитуратов в течение 1 мин (что соответствует максимуму первичной электрофизиологической реакции) и в течение 30 мин (соответствует максимальному угнетению биоэлектрической активности). Обработку материала проводили по стандартной методике. Кусочки ткани фиксировали в 2,5% глutarовом альдегиде на фосфатном буфере, 0,1 моль/л, дополнительно фиксировали в 1,3% растворе  $\text{OsO}_4$  на фосфатном буфере, 0,1 моль/л, pH 7,4, в течение 1 ч. Затем материал вновь промывали в фосфатном буфере, 0,1 моль/л, обезжизивали в этаноле и заливали в аралдит (Sigma). Серийные срезы изготавливали на ультратоме LKB-III и контрастировали спиртовым раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Статистическую оценку количественных показателей осуществляли при помощи парного критерия Вилкоксона и критерия Фишера — Стьюдента.

**Результаты исследования.** Под влиянием гексенала и нембутала импульсная активность рецепторов претерпевает изменения, которые имеют много общих черт при применении обоих указанных веществ. Реакция имеет трехфазный характер (рис. 1). 1-я фаза: довольно резкий прирост частоты импульсации в первые 1–2 мин после начала воздействия. 2-я фаза: падение частоты в течение 10–15 мин до уровня значительно более низкого, чем исходный. 3-я фаза: относительно ровное плато на весьма низком уровне активности, вплоть до конца наблюдения, т.е. до 30-й минуты после нанесения вещества.

Так выглядит общая характеристика электрофизиологической реакции на оба препарата. Однако она имеет свои особенности при воздействии каждым из них, а именно: 1) первичная реакция на нембутал значительно более активна. При воздействии нембуталом прирост по сравнению с исходным уровнем составляет 44%, а при воздействии гексеналом — только 13%; 2) падение частоты при воздействии нембуталом более стремительное, чем при воздействии гексеналом; 3) уровень плато при воздействии нембуталом значительно ниже, чем при воздействии гексеналом.

После начала отмыывания препарата чистым раствором Рингера — Локка уже через 30–45 с регистрируется учащение импульсации, и к концу 5-й минуты частота достигает в опытах с нембуталом 30%, а с гексеналом — 70% от исходной. В дальнейшем частота импульсации продолжает медленно расти. К моменту прекращения наблюдения (к 45-й минуте) она составляет соответственно 67 и 80%.

Описанные электрофизиологические сдвиги происходят на фоне отчетливо выраженных фаз-

ных колебаний уровня ВЭ в зоне первой площадки деления рецептора (рис. 2), 1-я фаза заключается в довольно резком подъеме уровня и достижении максимума к концу 4-й минуты воздействия. Начальное звено этой фазы совпадает с резким возрастанием импульсации, а вторая половина приходится на начало падения частоты; 2-я фаза заключается в уменьшении уровня ВЭ, начиная с 4-й минуты и кончая 5–6-й минутой. Эта фаза целиком приходится на период продолжающегося падения частоты импульсации; 3-я фаза заключается во вторичном подъеме уровня ВЭ. Эта фаза наблюдается только при воздействии нембуталом. Она также целиком совпадает с продолжающимся падением частоты. Таким образом, изменение уровня ВЭ при воздействии нембуталом имеет 3-фазный характер, а при воздействии гексеналом — 2-фазный.

Скорость обесцвечивания элементов рецептора под воздействием барбитуратов возрастает по сравнению с контролем. При этом отмечают следующие особенности. Всегда значительно раньше обесцвечивается безмиелиновая часть рецептора: концевые бляшки, веточки и площадки деления. Этот процесс заканчивается через  $5,0 \pm 1,3$  (гексенал) и через  $6,0 \pm 1,0$  (нембутал) мин после начала воздействия барбитуратом (в контроле —

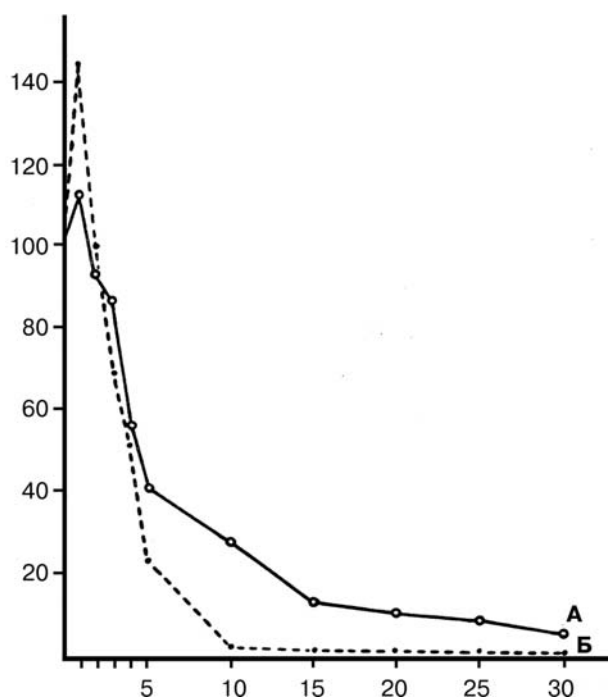


Рис. 1. Изменение импульсной активности рецепторов мочевого пузыря лягушки под влиянием 0,005% растворов гексенала (А) и нембутала (Б).

По оси абсцисс — время от момента введения анальгетиков (мин); по оси ординат — относительная частота импульсации (%); исходная частота принята за 100%.

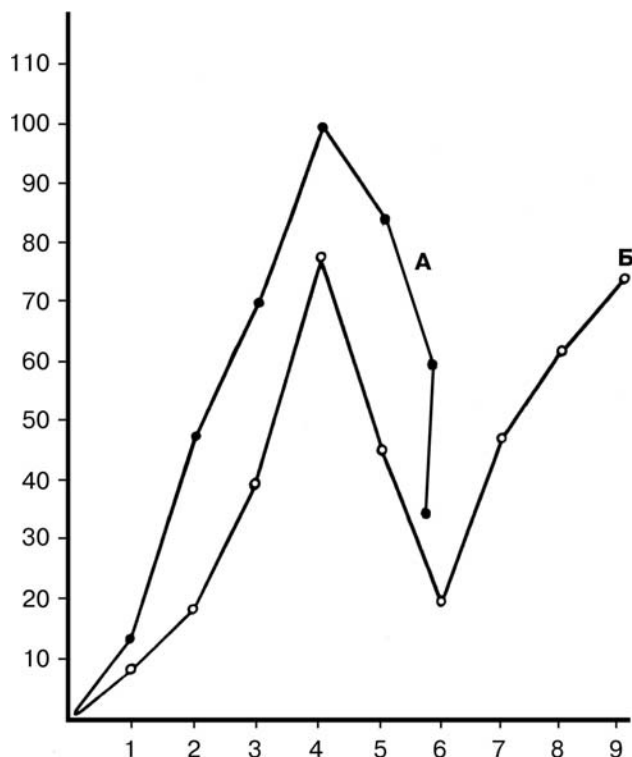


Рис. 2. Изменения уровня восстановительных эквивалентов первых площадок деления кустиковидных рецепторов мочевого пузыря лягушки под влиянием 0,005% растворов гексенала (А) и нембутала (Б).

По оси абсцисс — время от начала введения красителя (мин); по оси ординат — уровень восстановительных эквивалентов (усл. ед.).

через  $8,0 \pm 0,9$  мин). Осевые цилиндры миелиновых волокон сохраняют окраску значительно дольше. Их обесцвечивание заканчивается через  $24 \pm 3$  мин (в контроле — через  $36 \pm 4$ ).

В некоторых случаях при воздействии нембуталом появляются варикозности осевых цилиндров (рис. 3). Запаздывание обесцвечивания последних, возможно, связано с наличием диффузионного барьера в виде миелина, препятствующего проникновению действующего вещества (барбитурата). Динамика обесцвечивания безмиелиновой части рецептора также имеет свои особенности. При воздействии нембуталом все элементы безмиелинового окончания обесцвечиваются одновременно. При воздействии гексеналом вначале обесцвечиваются концевые бляшки, а затем веточки и площадки деления. В конце периода обесцвечивания возрастает интенсивность гранулообразования, причем при воздействии нембуталом оно более выражено, чем при воздействии гексеналом. Изменений геометрии элементов рецептора при воздействии двух испытуемых барбитуратов наблюдать не удалось: бляшки и пло-

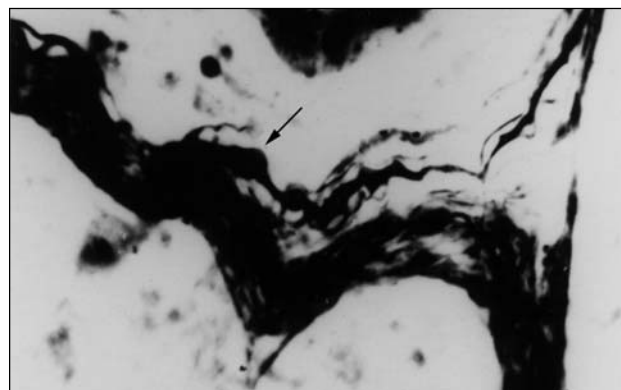


Рис. 3. Реактивные изменения осевого цилиндра миелинового волокна (стрелка) под влиянием 0,005% раствора нембутала (экспозиция 25 мин).

Прижизненная окраска метиленовым синим. Об. 40, ок. 10.

щадки деления сохраняют свою обычную форму. То же можно сказать и о размерах этих структур: они не изменяются, составляя соответственно в контроле  $4,8 \pm 0,5$  и  $3,2 \pm 0,4$ , а при воздействии гексеналом —  $5,2 \pm 0,3$  и  $3,4 \pm 0,3$ , нембуталом —  $5,1 \pm 0,4$  и  $3,0 \pm 0,20$  мкм по длинной оси.

Под влиянием нембутала и гексенала при экспозициях 1 и 30 мин не происходит существенных изменений ультраструктуры рецепторных элементов, которые могли бы указывать на повреждающее действие барбитуратов. Определенная реактивная перестройка все же, по-видимому, происходит, о чем свидетельствует возрастание по сравнению с контролем морфологической неоднородности концевых бляшек. Также через 1 мин после воздействия нембуталом различаются 3 типа бляшек: 1) богатые пузырьками с наличием единичных митохондрий; 2) бедные пузырьками с наличием гранулярно-хлопьевидного материала и некоторого количества митохондрий; 3) богатые пузырьками, митохондриями и содержащие гранулярно-хлопьевидный материал.

Постоянным признаком при воздействии обоими веществами является существенное увеличение количества гранул гликогена в матриксе бляшек и нейроплазме миелиновых волокон (рис. 4), которое отмечается уже на 1-й минуте воздействия. В более поздние сроки (до 40 мин) их количество не возрастает, а порой даже уменьшается. Другим важным признаком является полная сохранность ультраструктуры органелл, в том числе митохондрий, нейролеммы и миелина даже через 30 мин воздействия.

Обсуждение полученных данных. Описанные морфофизиологические и метаболические изменения свидетельствуют о том, что барбитураты оказывают на тканевые рецепторы

модифицирующее действие. Прежде всего бросается в глаза их способность угнетать импульсную активность, иными словами, действовать аналогично местным анестетикам [4]. Однако динамика при этом существенно отличается: под влиянием барбитуратов возникает первичная активация, и лишь затем начинается угнетение, а под влиянием местных анестетиков угасание начинается сразу. Кроме того, местные анестетики подавляют импульсации быстро (секунды и десятки секунд) и полностью, а барбитураты — медленно (десятки минут) и неполностью. Тем не менее, судя по этой реакции, они, по-видимому, все же дают некоторый анестезирующий эффект именно в результате глубокого снижения частоты импульсной активности периферических рецепторов (ноцицепторов) [2].

Этот эффект обратим, что с очевидностью следует из наблюдения над восстановлением импульсной активности сразу после начала отмывания препарата. Обратимость обусловлена прежде всего тем, что, как показывают наши электронно-микроскопические наблюдения, ультраструктура различных отделов рецептора не страдает. Возможно, наблюдаемые функциональные перестройки вызваны влиянием барбитуратов непосредственно на ионные каналы рецепторной мембраны и их липидное окружения [9, 10], а не изменением ультраструктуры.

Наблюдаемые нами феномены, в том числе падение биоэлектрической активности и «стабилизация» мембран, мы склонны объяснить снижением уровня окислительного метаболизма рецептора. По некоторым данным, полученным на нейронах мозга, препараты барбитуровой кислоты снижают этот уровень на 30% [7]. Возрастание количества гранул гликогена в матриксе рецепторных бляшек и нейроплазме волокна, указывающее на преобладание процессов депонирования энергетического субстрата над его расходом, убедительно свидетельствует об этом.

В заключение следует обратить внимание на то, что угнетающее действие барбитуратов на рецепторы сопровождается довольно сложным комплексом, к которому относятся изменения уровня ВЭ, особенности витального окрашивания, некоторые реактивные перестройки рецепторных элементов. По-видимому, эти проявления — неспецифическая реакция нейроплазмы, поскольку они во многом напоминают таковые в ответ на иные воздействия (местные анестетики, аноксию и др.). Это сходство, разумеется, не полное, и в реакции на барбитураты отчетливо просматриваются особенности, присущие только ей.

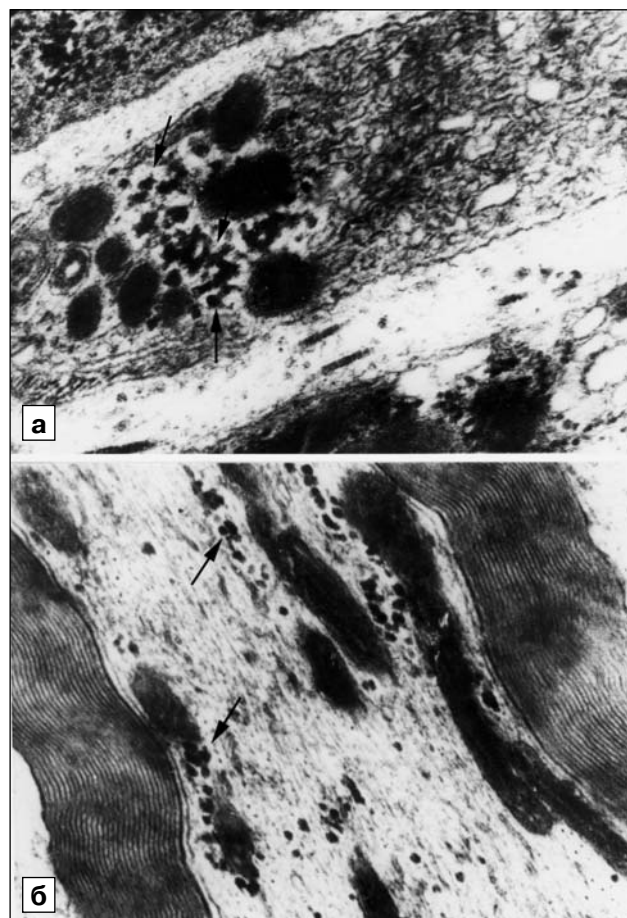


Рис. 4. Гранулы гликогена (стрелки) в нейроплазме концевой бляшки рецептора (а) и миелинового волокна (б) в мочевом пузыре лягушки.  
Ув. 2500.

Более того, как было показано выше, имеется разница в реакциях на нембутал и гексенал, что, конечно, отражает особенности их фармакологического действия: первый — обладает средней продолжительностью действия, второй — кратковременной.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков С.В. Нейрофармакология. Л., Медицина, 1982.
2. Крымова Е.А., Катина И.Е., Плахова В.Б. и др. Возможный механизм кодирования ноцицептивных сигналов: роль медленных натриевых каналов. Сенсорные системы, 2008, т. 22, № 3, с. 257–270.
3. Крыжановский Г.Н. Центральные механизмы патологической боли. Журн. невропатол. и психиатр., 1999, т. 99, № 12, с. 4–7.
4. Лукашин В.Г., Вшивцева В.В. и Замураев И.Н. Метаболические, электрофизиологические и структурные эффекты влияния дикаина и тримекаина на тканевые кустиковидные рецепторы. Арх. анат., 1988, т. 94, вып. 3, с. 28–36.

5. Прощаев И.И., Ильницкий А.Н., Князькин И.В. и Кветной И.М. Боль. Молекулярная нейроиммуноэндокринология и клиническая патофизиология. СПб., Наука, 2006.
6. Ревенко С.В., Ермишкин В.В., Селектор Л.Я. Периферические механизмы ноцицепции. Сенсорные системы, 1988, т. 2, № 2, с. 198–210.
7. Astrup J., Sorensen M. and Sorensen H. Oxygen and glucose consumption related to  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  transport in canine brain. *Stroke*, 1981, v. 12, № 6, p. 726–730.
8. Elbert T., Rockstroh B., Lutzenberger W. et al. Baroreceptor stimulation alters pain sensation depending on tonic blood pressure. *Psychophysiology*, 1988, v. 25, № 1, p. 25–29.
9. Hamilton D., Orchard C. and Winlow W. The effect of barbiturate anaesthetics on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the brain of the pond snail *Limnaea stagnalis*. *J. Physiol. (Lond.)*, 1988, v. 399, p. 88–96.
10. Haydon D. and Urban B. The actions of some general anaesthetics on the potassium current of the squid giant axon. *J. Physiol. (Lond.)*, 1986, v. 373, p. 311–327.
11. Melzack R. and Wall P.D. *The Challenge of Pain*. London, Penguin Books, 1996.
12. Raja S.N., Meyer R. and Campbell J. Peripheral mechanisms of somatic pain. *Anesthesiology*, 1988, v. 68, № 4, p. 571–590.
13. Willis W. and Chung J.M. Central mechanisms of pain. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 1987, v. 191, № 10, p. 1200–1202.

Поступила в редакцию 13.04.09

Получена после доработки 07.06.09

## MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES OF FROG URINARY BLADDER RECEPTORS UNDER THE INFLUENCE OF BARBITURATES

*V.G. Lukashin and V.V. Vshyvtsseva*

The effect of hexenal and nembutal on the tissue bushy receptors was studied the living isolated frog urinary bladder using methylene blue staining. These drugs were shown to induce the changes in the receptor pulse activity which included three phases: an initial sharp increase, an abrupt decline and a low protracted plateau. Reactions to hexenal and nembutal, while possessing some common features, had their own peculiarities. Synchronously, the dynamics of methylene blue staining of the receptor elements was registered for the control of the intensity of oxidation-reduction processes in the receptor neuroplasm, that is for redox-system dynamics. It was found that the phases of this dynamics coincided in many respects with the phases of the receptor electric activity changes. No ultrastructural changes associated with the putative damaging effect of barbiturates on the receptors were recorded (during the exposure of 1–30 min). The most significant characteristic was an accumulation glycogen granules in the neuroplasm of the receptor elements, suggesting the prevalence of energy substrate deposition over its expenditure. Depression of the receptor pulse activity supports the assumption that barbiturates, besides their soporific and narcotic actions, apparently possess some anesthetic property.

**Key words:** *bushy receptors, urinary bladder, barbiturates, anesthesia, frog.*

Laboratory of Neuron Functional Morphology and Physiology, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg.