

DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-137-142

Серотонинэргическая регуляция пищевода

Пузиков А. М.

ГБУЗ Московский клинический научный центр им. А. С. Логинова, ДЗМ (111123, Москва, Россия)

Esophagus: serotoninergic regulation

A. M. Puzikov

GBUZ Moscow Clinical Research Center. named after A. S. Loginov, DZM (111123, Moscow, Russia)

Для цитирования: Пузиков А. М. Серотонинэргическая регуляция пищевода. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2020;179(7): 137–142. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-137-142

For citation: Puzikov A. M. Esophagus: serotoninergic regulation. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2020;179(7): 137–142. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-137-142

Пузиков Александр Михайлович, сотрудник отдела

Alexander M. Puzikov, department employee

Резюме

Введение. Серотонин (5-гидрокситриптамиин, 5-НТ) является регуляторным нейротрансмиттером и гормоном в ЦНС и полых органах, включая пищевод. Известно, что серотонин, активируя собственные рецепторы, стимулирует сократительную активность мышц пищевода. Однако роль различных рецепторов в серотонинэргической регуляции сократительной активности пищевода изучена недостаточно.

Цель: — определить, какого типа рецепторы опосредуют серотонин обусловленную сократительную активность пищевода.

Материал и методы: Проведено электромиографическое исследование сократительной активности пищевода крыс, вызванной стимуляцией серотином рецепторов 5-НТ_{3,4} и 5-НТ_{2,1}. Роль различных серотониновых рецепторов в 5-НТ индуцированной сократительной активности пищевода оценивали, измеряя амплитуду и частоту электромиограммы медленных волн (ЭМГ) неинвазивными микроэлектродами, наложенными на адвентициальный слой пищевода.

Результаты: Введение ингибиторов рецепторов 5-НТ_{3,4} исключало серотонин обусловленный прирост активности сократительной активности пищевода. Блокада 5-НТ_{1,2}-рецепторов исключила индуцированное серотином увеличение активности ЭМГ пищевода.

Выводы: Показано, что серотонин является важным регулятором сократительной активности пищевода. Серотонин усиливает сокращение гладких мышц пищевода посредством активации эффекторных рецепторов 5-НТ_{1,2}, экспрессируемых на гладкомышечных клетках, и путем активации рецепторов 5-НТ_{3,4}, экспрессируемых ганглионарными нейронами.

Ключевые слова: пищевод, сокращение, серотонин, рецепторы серотонина

✉ *Corresponding author:*

Пузиков Александр Михайлович
Alexander M. Puzikov
puzikov37@mail.ru

Summary

Introduction: Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a regulatory neurotransmitter and a hormone in the CNS and hollow organs, the esophagus including. It is known that serotonin, activating its own receptors, stimulates contractile activity of the esophageal muscles. However, role of different type receptors in the 5-HT induced contractile activity of the esophagus is insufficiently known.

The aim: — to determine which type of 5-HT receptors mediate serotonin dependent contractile activity of the esophagus.

Material and methods: This is a electromyography study of rat esophagus contractile activity under serotonin stimulation of 5-HT_{3,4} and 5-HT_{2,1} receptors separately modulated. The role of different serotonin receptors in the 5-HT induced contractile activity of the esophagus was evaluated by measuring the amplitude and frequency of the slow wave electromyogram (EMG) by the noninvasive microelectrodes imposed on the adventitial layer of the esophagus.

Results: Administration of the 5-HT_{3,4} receptors inhibitors excluded caused by serotonin the increment of EMG activity of the contractile activity of the esophagus. Administration of the 5-HT_{1,2} receptors inhibitors blocked the serotonin enhanced EMG activity of the esophagus

Conclusion: Our results indicate that serotonin is the important player in the regulation of the rat's esophagus contractility; 5-HT enhancing effect on contraction of the esophageal smooth muscles is mediated through the activation of 5-HT_{1,2} receptors expressed on the smooth muscle cells, and by activation of 5-HT_{3,4} receptors expressed on the ganglion neurons.

Keywords: Esophagus, Contraction, Serotonin, Serotonin Receptors

Введение

Пищевод представляет собой сплюснутую мышечную трубку длиной 22–25 см, через которую проходит пища с помощью перистальтических сокращений от глотки к желудку, простираясь от уровня шестого шейного до 11-го грудного позвонка. Пищевод имеет две зоны высокого давления, называемые верхним пищеводным сфинктером

(ВПС) и нижним пищеводным сфинктером (НПС), которые предотвращают заброс пищи из пищевода в глотку и из желудка в пищевод, соответственно. Существует ряд желез, выстилающих внутреннюю стенку пищевода, которые помогают сохранить влажность и облегчают проглатывание пищи [1].

Мышцы

Основная функция пищевода заключается в транспортировке пищи из ротовой полости в желудок. Передвижение химуса по пищеводу происходит в основном за счет перистальтических движений мышечной оболочки его стенки при участии сфинктерного аппарата. Мышечный слой пищевода образован двумя типами мышц. Верхняя треть пищевода сложена поперечно-полосатыми мышцами, нижняя треть – гладкими мышцами, а средняя треть содержит мышцы обоих типов. Мышцы пищевода расположены в двух направлениях – продольно и циркулярно по отношению

к пищеводу – и разделены миентеральным сплетением, сетью нервных волокон, участвующих в секретиции слизи и в перистальтике гладких мышц пищевода. В пищеводе имеется адвентициальный, но нет серозного слоя. В этом его отличие от других отделов желудочно-кишечного тракта [2].

Важной характеристикой пищевода является его сократительная активность. Доминирующей клеточной популяцией пищевода с этой точки зрения являются гладкомышечные клетки, которые содержат сократительный аппарат, ответственный за генерацию сократительной силы.

Иннервация пищевода

Строгая регуляция сократимости пищевода имеет важное значение для предотвращения гастроэзофагеального рефлюкса и других дисфункций верхнего пищеварительного тракта. На мышцы пищевода оказывают влияние различные нейронные, метаболические, механические и гормональные факторы, в том числе, интрамуральный

ацетилхолин и серотонин. Пищевод иннервируется блуждающим нервом, шейным и грудным симпатическими стволами и сплетением Ауэрбаха в мышечных слоях. Симпатический ствол может усилить функцию блуждающего нерва, увеличивая перистальтику и выделение слизи пищеварительного тракта [3, 4].

Серотонинергическая система

Серотонинергическую систему образует сам биоамин, его рецепторы, транспортер SERT (двенадцатидоменный белок, осуществляющий

натрий-калий-сопряженный транспорт), фермент синтеза 5-триптофангидроксилаза и катаболизма – моноаминоксидаза А (МАО-А).

Серотонин

Серотонин является моноаминовым нейротрансмисмитером. Метаболизируемый из триптофана [5], преобразуемый в печени в 5-HIAA. 90% серотонина человека синтезируют и содержат энтерохромаффинные клетки тонкой кишки и пищевода, откуда

5-HT захватывают и депонируют тромбоциты [6]. Серотонин был одним из первых биологически активных веществ, появляющихся на 12-й день в шейном и грудном отделах пищевода эмбриона цыпленка [7].

Источники серотонина в пищеводе

Серотонин содержится в энтерохромаффинных ЕС-клетках; интрамуральные ганглии пищевода также содержат серотонинергические нейроны, выделяющие в постганглионарных окончаниях серотонин.

Он также содержится в тучных клетках и макрофагах. Известно, что симпатический ствол содержит серотонинергические волокна, активация которых приводит к сокращению мышечной стенки [3, 4].

Рецепторы

Семь типов (от 5-HT1 до 5-HT7) и несколько десятков подтипов серотониновых рецепторов классифицируются Международным Советом фундаментальной и клинической фармакологии Комитета по номенклатуре рецепторов и классификации препаратов, исходя из их структурных и сигнальных характеристик. За исключением

5-HT3 рецепторов, представляющих собой ионный канал экспрессированный исключительно нейронами, рецепторы серотонина принадлежат к G-протеин сопряженному типу.

Пищевод человека и/или грызунов экспрессирует следующие функциональные серотониновые рецепторы.

Эффекторные рецепторы

5-HT1A подтип рецептор найден в пищеводе человека [8], 5-HT2 рецептор имеется в нижнем пищеводном сфинктере собаки [9]. 5-HT2A рецептор

найден у кошки и крысы [9]. 5-HT2 рецептор установлен в пищеводе кошки [10]. 5-HT2B рецептор имеется в пищеводе крысы [11].

Рецепторы ганглионарных нейронов

Присутствие 5-HT3 рецепторов установлено в пищеводе человека [8], кошки [10] и морской свинки [12]. 5-HT4 рецепторы располагаются на пищеводе кошки [10] и крысы [13].

Известно, что серотонин в дозе 50–100 мкг/кг усиливает сокращения пищевода и, активируя 5-HT3,4 рецепторы, вызывает релаксацию препарата пищевода крысы [14, 15].

Несмотря на значительную работу, выполненную исследователями серотониновых рецепторов пищеварительного тракта, механизмы серотонинэргической регуляции сократительной активности пищевода изучены недостаточно, и тип функциональных рецепторов, опосредующих влияние серотонина на сокращение пищевода не вполне выяснен.

Цель – исследовать роль ганглионарных и эффекторных серотониновых рецепторов в регуляции моторной функции пищевода.

Материалы и методы

Эксперименты на животных

Эксперименты выполнены на 9 крысах линии Вистар обоего пола в возрасте 5–6 мес массой 215–230 г. Группа контроля включала 5 животных. Все эксперименты проводили в щадящих условиях в соответствии национальными

этическими требованиями и были одобрены комитетом по использованию и содержанию животных Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова.

Хирургия

Крысам выполняли инфериорально-медиальную лапаротомию. В операционную рану выводили нижнюю треть пищевода, и кардиальный отдел желудка изолировали. Животных фиксировали на операционном столе, удаляли шерсть на шее и передней брюшной стенке. Тупым способом разделяли фасции шеи, отпрепаровывая правый и левый сосудисто-нервный пучки, под которые подводили лигатуры. На протяжении 10–15 мм выделяли правую общую сонную артерию. Дистальную часть артерии перевязывали максимально близко к нижней челюсти для предотвращения ретроградного кровотечения, а затем, отступив ниже на 8–10 мм, на артерию накладывали атравматический серфин. Глазными ножницами сосуд пересекали поперечно на 1/3 ширины. В разрез, по направлению к серфину вводили тefлоновый катетер, диаметром 0,3 мм, который предварительно в течение 24 ч замачивали в растворе гепарина для предотвращения тромбообразования. Катетер, предназначенный для введения препаратов, герметично закрепляли с помощью лигатур, его ответную часть подсоединяли к дозирующей системе и снимали серфин. В катетер вводили 0,05 мл физиологического раствора, убеждаясь в проходимости канала. В ходе эксперимента через катетер осуществляли введение 0,9% NaCl, растворов серотонина

и антагонистов серотониновых рецепторов. Объем однократного введения не превышал 0,25 мл, что соответствовало систолическому объему желудочка крысы [16]. Инфузию препаратов осуществляли в течение 10–15 с, что соответствовало 60–80 сокращениям сердца животного. Такие параметры введения уменьшали риск развития повреждений полулунных клапанов и нарушений гемодинамики, связанных с нагрузкой объемом, обеспечивая доставку препарата в область дуги аорты.

Далее рана передней брюшной стенки укрывалась окклюзионным покровом для сохранения тканей в естественном функциональном состоянии. Через 45 мин. после закрытия раны брюшной полости начинали исследование моторики кишки.

Длительность экспериментов составляла от 2 до 9 часов. Во время опытов проводился обогрев животного для предупреждения гипотермии. На конечности животного накладывали электроды для регистрации ЭКГ в первом стандартном отведении, контролируя витальные функции. Для поддержания деятельности сердечно-сосудистой системы производилось внутривенное капельное введение раствора Рингера-Локка, реополиглюкина и лазекса.

Введение блокаторов и серотонина осуществлялось внутриартериально с использованием

контрольных инъекций аналогичного количества физиологического раствора, который вводили за 2–3 минуты до инъекции препаратов. Ни в одном из случаев, введение физиологического раствора не изменяло амплитудно-частотных показателей медленных волн и спайковой активности.

Измерения ЭМГ

Неинвазивные электроды накладывали на адвентициальную оболочку пищевода для регистрации электромиограммы (ЭМГ) гладких мышц нижней трети пищевода. ЭМГ измеряли с использованием биполярных серебряных электродов (расстояние между электродами 1,5 мм) для внеклеточных

записей. Запись электромиограммы проводилась с использованием 21-канального электроэнцефалографа (Neurofax EEG 4400 series, Nihon Kohden, Токио, Япония), регистрировали амплитуду и частоту медленных волн.

Статистика

Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакета программ Statistica-17. Все количественные данные, подчиняющиеся нормальному распределению, представлены в виде $M \pm m$. Для обработки полученных

данных применялся критерий Стьюдента (t) с последующим определением уровня достоверности различий (p) и критерия χ^2 . Различия между средними значениями считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Введение серотонина приводило к увеличению частотно-амплитудных характеристик медленных волн пищевода: частота увеличивалась с $6,2 \pm 0,4$ до $7,5 \pm 0,5$ /мин (20,9%, $p < 0,05$), амплитуда – с $0,25 \pm 0,012$ до $0,3 \pm 0,015$ мВ (20%, $p < 0,05$) (табл. 1). То есть, серотонин в применяемой дозе оказывает стимулирующее влияние на медленноволновую активность гладких мышц пищевода. Введение серотонина оказывает стимулирующее влияние на сократительную функцию гладких мышц пищевода.

Блокада 5-HT3 рецепторов приводила к снижению медленноволновой активности пищевода: частоты до $5,8 \pm 0,2$ /мин (6,4%, $p < 0,05$), амплитуды – до $0,22 \pm 0,0012$ мВ (12%, $p < 0,05$) (табл. 1). Введение серотонина в дозе 50 мкг/кг на фоне действия блокатора 5-HT3 рецепторов незначительно увеличивало частотно-амплитудную характеристику медленных волн ЭМГ: частоты до $6,6 \pm 0,3$ /мин (6,4%, $p < 0,05$), амплитуды – до $0,26 \pm 0,013$ мВ (4%, $p < 0,05$). Результаты исследования показали, что блокада 5-HT3 рецепторов приводит к частичному уменьшению выраженности стимуляторного влияния серотонина на гладкие мышцы пищевода. Следовательно эти рецепторы являются ганглионарными.

Введение блокатора 5-HT4 рецепторов сопровождается незначительным изменением тоновой ЭМГ: частоты с $6,2 \pm 0,4$ до $6,3 \pm 0,35$ /мин (16,1%, $p > 0,05$), амплитуды – с $0,25 \pm 0,012$ до $0,20 \pm 0,018$ мВ (20%, $p < 0,05$). Введение серотонина на фоне действия блокатора 5-HT4 рецепторов сопровождается увеличением частотно-амплитудных параметров медленных волн

ЭМГ: частоты – до $6,6 \pm 0,43$ /мин (6,4%, $p > 0,05$), амплитуды – до $0,23 \pm 0,02$ мВ (15%, $p < 0,05$). То есть, блокада 5-HT4 рецепторов не полностью предотвращает стимуляторное влияние серотонина, что свидетельствует о расположении 5-HT3,4 рецепторов на мембранах эфферентных интрамуральных нейронов

Введение блокатора 5-HT2 рецепторов приводит к незначительному изменению частоты медленных волн ЭМГ: частота уменьшается с $6,0 \pm 0,33$ до $5,5 \pm 0,23$ /мин (8,3%, $p > 0,05$), амплитуда остается стабильной (табл. 1). Введение серотонина в дозе 50 мкг/кг на фоне действия блокатора 5-HT2 рецепторов приводит к уменьшению частотного показателя с $5,5 \pm 0,23$ до $5,0 \pm 0,2$ /мин (–10%, $p > 0,05$) при стабильной амплитуде. В результате исследования показано, что блокада 5-HT2 рецепторов полностью исключает исследуемый эффект – увеличение моторной функции пищевода введением серотонина.

Выключение 5-HT1 рецепторов серотонина уменьшает частоту медленных волн ЭМГ с $5,0 \pm 0,2$ до $4,8 \pm 0,14$ /мин (–4%, $p > 0,05$), амплитуда остается неизменной. Введение серотонина на фоне действия блокатора 5-HT1 рецепторов исключает выявление исследуемого феномена: частота медленных волн ЭМГ уменьшается с $4,8 \pm 0,14$ до $4,5 \pm 0,11$ /мин (–4,2%, $p > 0,05$), амплитуда остается неизменной. Блокада 5-HT1 рецепторов полностью исключает исследуемый эффект.

Учитывая полное исключение исследуемых феноменов блокадой 5-HT2 и 5-HT1 рецепторов, полагаем, что 5-HT1 и 5-HT2 рецепторы являются рецепторами эффекторных тканей.

Таблица 1
Влияние 5-HT1,2,3,4 рецепторов на медленноволновую активность ЭМГ пищевода крысы Частота, /мин, амплитуда – мВ

Table 1
Effect of 5-HT1,2,3,4 receptors on the slow-wave activity of EMG of the rat esophagus Frequency, / min, amplitude – mV

блокаторы	до введения блокаторов		после введения блокаторов	
	частота	амплитуда	частота	амплитуда
5-HT2 рецепторов	$6,0 \pm 0,33$	$0,20 \pm 0,018$	$5,5 \pm 0,23$	$0,20 \pm 0,02$
5-HT1 рецепторов	$5,0 \pm 0,22$	$0,20 \pm 0,016$	$4,8 \pm 0,14$	$0,2 \pm 0,021$
5-HT3 рецепторов	$6,2 \pm 0,2$	$0,25 \pm 0,03$	$5,8 \pm 0,2$	$0,22 \pm 0,0012$
5-HT4 рецепторов	$6,2 \pm 0,4$	$0,25 \pm 0,02$	$6,3 \pm 0,35$	$0,2 \pm 0,18$

Обсуждение

В настоящее время в гастроэнтерологии все большее внимание уделяется изучению двигательной функции пищеварительного тракта и, в том числе, пищевода. Это связано с тем, что, как показали исследования последних лет, те или иные расстройства моторики пищевода могут выступать ведущим патогенетическим фактором, способствующим развитию многих распространенных гастроэнтерологических заболеваний. К этой группе заболеваний с первичным нарушением моторики пищевода относятся гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь и различные дискинезии пищевода (диффузный и сегментарный эзофагоспазм, кардиоспазм).

Выводы

Таким образом, регуляция гладких мышц пищевода серотонином включает ганглионарные серотонинергические нейроны, которые экспрессируют рецепторы 5-HT_{3,4}, передающие возбуждение на 5-HT_{1,2} рецепторы, экспрессируемые эффекторными тканями.

Клиническая ценность исследования дисфункции пищевода двигательного аппарата все более очевидна, и умение диагностировать нарушения сократительной активности в соответствии с симптомами можно и должно дополнять современными

Результаты, полученные в результате этого исследования, показывают, что:

1. 5-HT является важным регулятором сократительной способности пищевода пищевода;
2. Серотонин усиливает гладкие мышцы пищевода;
3. Усиливающий эффект 5-HT при сокращении гладких мышц пищевода опосредуется посредством активации рецепторов 5-HT_{1,2}, экспрессируемых на гладкомышечных клетках, и путем активации рецепторов 5-HT_{3,4}, экспрессируемых на ганглиозных нейронах.

методами регистрации двигательной активности пищевода.

Полученные характеристики рецепторного механизма усиления сокращений пищевода, возникающих при введении экзогенного серотонина, объясняют механизм лечебного эффекта серотонина, успешно применяемого в клинической практике и могут быть использованы в разработке серотонин активных фармакологических препаратов для коррекции нарушений моторики эзофагокардиальной зоны.

Сокращения:

5-HT – серотонин

5-HT₁-, 5-HT₂-, 5-HT₃- и 5-HT₄- серотониновые рецепторы

ЭМГ – электромиограмма

Литература | References

1. Di Leo A., Zannoni A., Giacomuzzi S., Ricci F., & de Manzoni G. Surgical Anatomy of the Esophagus and Esophagogastric Junction. In Adenocarcinoma of the Esophagogastric Junction. Springer Int Publ., 2017, pp.245–259.
2. Kuo B, Urma D. Esophagus – Anatomy and Development. In: Goyal and Shaker's GI Motility Online; Edited by Goyal, R K and Shaker, R. Nature Publ Group: New York, 2006. doi:10.1038/gimo.6.
3. Смирнов В. М., Свешников Д. С., Лычкова А. Е. и др. Серотонергическая регуляция дуоденальных сокращений. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015; (10): 55–60. Обзор. PubMed PMID: 27249867.
Smirnov V. M., Sveshnikov D. S., Lychkova A. E. et al. Serotonergic regulation of duodenal contraction. [Serotonergic regulation of duodenal contraction]. Experimental & Clinical Gastroenterology. 2015;(10):55–60. Review. PubMed PMID: 27249867.
4. Лычкова А. Е. Координация миоэлектрической активности большого и тонкого кишечника. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012; (3): 59–61. PubMed PMID: 22830225.
Lychkova A. E. Koordinatsiya mioelektricheskoy aktivnosti bol'shogo i tonkogo kishchnika. [Coordination of the myoelectric activity of the colon and small intestines].
- Experimental & Clinical Gastroenterology. 2012; (3): 59–61. PubMed PMID: 22830225
5. González-Flores D, Velardo B, Garrido M, González-Gómez D. et al. Ingestion of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl. cv. Crimson Globe) increases the urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity levels in young, middle-aged and elderly humans: Nutritional and functional characterization of their content. J Food Nutr Res. 2011; 50 (4): 229–236.
6. Berger M, Gray JA, Roth BL; Gray; Roth The expanded biology of serotonin. Annu. Rev. Med. 2009; 60:355–66.
7. Salapatek A. M. F., Diamant N. E. Assessment of neural inhibition of the lower esophageal sphincter in cats with esophagitis. Gastroenterology. 1993; 104:810–818.
8. Di Stefano M, Papathanasopoulos A, Blondeau K. et al. Effect of buspirone, a 5-HT_{1A} receptor agonist, on esophageal motility in healthy volunteers. Dis Esophagus. 2012; 25(5):470–6.
9. Barnette MS, Grous M, Manning CD. et al. 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and SK&F 103829 contract canine lower esophageal sphincter smooth muscle by stimulating 5-HT₂ receptors. Receptor. 1992 Fall; 2(3):155–67. PubMed PMID: 1472950.
10. Oh K. H., Nam Y., Jeong J. H., Kim I. K., Sohn U. D. The effect of DA-9701 on 5-hydroxytryptamine induced contraction of feline esophageal smooth muscle

- cells. *Molecules*. 2014;19(4):5135–49. doi: 10.3390/molecules19045135. PubMed PMID: 24759073.
11. McLean PG, Coupar IM, Molenaar P. Changes in sensitivity of 5-HT receptor mediated functional responses in the rat oesophagus, fundus and jejunum following chronic infusion with 5-hydroxytryptamine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996 Oct;354(4):513–9. PubMed PMID: 8897456.
12. Lasheras B., Berjón A., Montañés R. et al. Pharmacological properties of quinoxaline derivatives as a new class of 5-HT₃ receptor antagonists. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(4):401–6. PubMed PMID: 8740088.
13. Takeda M., Tsukamoto K., Mizutani Y. et al. Identification of SK-951, a novel benzofuran derivative, as an agonist to 5-HT₄ receptors. *Jpn J Pharmacol*. 1999;79(2):203–12. PubMed PMID: 10202856.
14. Ohia S. E., Cheung Y. D., Bieger D., Triggle C. R. Pharmacological profile of the 5-hydroxytryptamine receptor that mediates relaxation of rat oesophageal smooth muscle. *Gen. Pharmacol*. 1992;23 (4):649–658.
15. Moumami C., Yang D. C., Gullikson G. W. 5-HT₄ receptor activation induces relaxation and associated cAMP generation in rat esophagus. *Eur. J. Pharmacol*. 1992;216 (1):47–52.
16. Cerutti C., Gustin M. P., Paultre C. Z. et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. *Am J Physiol*. 1991; 261 (4.Pt 2):1292–9.