

УДК 612.282:612.285

## ИЗМЕНЕНИЯ ПАТТЕРНА ДЫХАНИЯ ПРИ МИКРОИНЪЕКЦИЯХ БИКУКУЛЛИНА В КОМПЛЕКС БЕТЦИНГЕРА И КОМПЛЕКС ПРЕ-БЕТЦИНГЕРА У КРЫС

Н.Г. Маньшина, О.А. Ведясова, Д.С. Татаринцева

Самарский государственный университет

Микроинъекции селективного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикукуллина ( $10^{-6}$ М) в комплекс Бетцингера (КБ) и комплекс пре-Бетцингера (КПБ) у половозрелых крыс вызвали уменьшение частоты дыхания, причем в первом случае за счет пролонгирования вдоха и выдоха, а во втором – только выдоха. Дыхательный объем при введении антагониста в КПБ увеличивался, а в КБ – менялся несущественно. Наблюдаемые респираторные эффекты свидетельствуют о разном вкладе ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов области КБ и КПБ в регуляцию частотных и объемных параметров паттерна дыхания.

**Ключевые слова:** ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, комплекс Бетцингера, комплекс пре-Бетцингера, дыхание, бикукуллин.

**Введение.** Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) участвует в деятельности дыхательного центра, модулируя активность его нейронных сетей в норме и патологии [1; 4; 23]. Своё физиологическое действие в мозге ГАМК реализует через две основные группы мембранных рецепторов – ионотропные рецепторы класса ГАМК<sub>A</sub> и метаботропные рецепторы класса ГАМК<sub>B</sub> [8; 9]. В отличие от рецепторов других нейромедиаторов, например, дофамина и серотонина, ГАМК-рецепторы состоят из нескольких молекулярных комплексов, которые образуют сайты связывания ряда лекарственных препаратов и эндогенных биологически активных веществ [3; 5; 11; 16]. Стимуляция и блокада этих сайтов на уровне бульбо-понтинных отделов мозгового ствола вносят свой вклад в развитие реакций со стороны дыхательной системы [2; 6; 19], причем роль ГАМК в регуляции дыхания у млекопитающих возрастает в процессе онтогенеза. Предполагается, что особое значение ГАМК-опосредованное синаптическое торможение имеет у взрослых животных в деятельности ритмогенерирующих структур дыхательного центра [7; 15; 20], локализованных в ростровентральной медуллярной области, в том числе в комплексе Бетцингера и комплексе пре-Бетцингера [13; 14; 22]. Результаты анализа действия ГАМК, её агонистов и антагонистов на указанные отделы дыхательного центра у новорожденных животных в условиях "in vitro" с достаточной долей определенности говорят о тормозном влиянии данного медиатора на активность респираторных нейронов и ритмику дыхания через ГАМК<sub>A</sub>- и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы [18; 20 ; 23]. В свою очередь, некоторые авторы на

основании данных, полученных в опытах на половозрелых животных (кроликах) «in vivo», полагают, что более важную роль в регуляции центральной инспираторной активности играют ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы [10]. Данное утверждение требует дальнейшего и всестороннего изучения реакций системы дыхания на блокаду и активацию ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов у взрослых млекопитающих животных разных видов.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном анализе роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов комплекса Бетцингера (КБ) и комплексе пре-Бетцингера (КПБ) в регуляции частотных и объемных параметров паттерна дыхания у взрослых крыс.

**Материал и методика.** Эксперименты поставлены на 14 беспородных крысах, массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1,5 мг/кг массы; внутривенно), с соблюдением норм биоэтики. В ходе операционной подготовки проводили трахеотомию, после чего животное фиксировали в стереотаксическом приборе, закрепляя голову в положении вентрального сгибания, и через атлanto-окципитальное отверстие осуществляли доступ к дорсальной поверхности продолговатого мозга. В первой серии экспериментов на 7 животных изучали изменения паттерна внешнего дыхания при микроинъекциях раствора селективного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикакуллина в КБ, во второй серии также у 7 животных регистрировали реакции дыхания при введении бикакуллина в КПБ. Раствор готовили ex tempore в концентрации  $10^{-6}$  М методом разведения в искусственной спинномозговой жидкости и вводили в исследуемые ядра по стереотаксическим координатам [12] в объёме 0,2 мкл через стеклянную микропипетку с наружным диаметром кончика 25-30 мкм, укрепленную на игле микрошприца МШ-1. Координаты для микроинъекций в КБ: 1,6–2,6 мм роstralнее обех; 1,7–2,7 мм латеральнее срединного шва; 2,3–2,8 мм вглубь от поверхности продолговатого мозга. Координаты для микроинъекций в КПБ: 1,4–1,6 мм роstralнее; 1,8–2,5 мм латеральнее и 2,3–2,9 мм вглубь относительно указанных выше ориентиров. Для гистологического контроля места микроинъекции после экспериментов у животных извлекали продолговатый мозг и помещали его в 20% раствор формалина на 3 суток. Затем с помощью замораживающего микротомы приготавливали поперечные срезы, на которых определяли локализацию инъекции. Для сравнения использовали фотографии поперечных срезов мозга и атлас мозга крысы.

В процессе эксперимента тепловое состояние животного контролировалось по ректальной температуре, которую поддерживали на постоянном уровне ( $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Реакции внешнего дыхания оценивали по изменениям спирограммы. Для регистрации спирограммы соединяли пластиковую канюлю, введенную в трахею животного, с манометрическим датчиком спирографа, выходные сигналы от которого

подавались на аналогово-цифровой преобразователь и отображались на экране монитора компьютера. Запись спирограммы осуществляли в программе PowerGraph 3.2 Professional (ООО «Интероптика-С») в исходном состоянии, через 1 минуту, а затем через каждые 5 минут в течение одного часа после микроинъекции. На спирограммах анализировали длительность вдоха и выдоха (с), общую продолжительность дыхательного цикла (с) и дыхательный объём (мл). Расчётным путём определяли частоту дыхания ( $\text{мин}^{-1}$ ) и минутный объём дыхания (мл/мин). Статистическую обработку результатов проводили в программе SigmaStat 3.5 при помощи однофакторного парного t-теста, достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Анализ изменений внешнего дыхания при микроинъекциях селективного блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикакуллина в КБ и КПБ у крыс выявил определённые особенности, которые проявлялись различной выраженностью и направленностью отклонений параметров спирограмм. Так, блокада ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов области КБ раствором бикакуллина приводила к заметному увеличению длительности фазы вдоха, причем достоверный эффект (прирост на 18,5 %;  $p < 0,05$ ) наблюдался уже на 1-й минуте после инъекции (рис. 1А). Такая картина без существенной динамики во времени сохранялась до конца наблюдений. Продолжительность выдоха в этих условиях также увеличивалась, но менее существенно, чем продолжительность вдоха. Отклонения данного параметра наступали с задержкой в 5 минут и не превышали 12 % от исходного фона (рис. 1А).

На наш взгляд, среди описанных выше реакций заслуживает внимания одновременное увеличение продолжительности вдоха и выдоха при селективной блокаде бикакуллином ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КБ. Исходя из особенностей связей между различными отделами дыхательного центра, можно предположить, что такая картина является результатом ограничения ГАМК-опосредованного торможения и, как следствие, изменения временной динамики залповой активности экспираторных нейронов в области КБ [7; 21; 22] на фоне усиления разрядов инспираторных нейронов в других респираторных ядрах.

Микроинъекции бикакуллина в КПБ (рис. 1Б), напротив, начиная уже с 1-й минуты воздействия, вызывали существенное уменьшение продолжительности вдоха. Эффект нарастал во времени, достигая максимальной выраженности на 40-й минуте экспозиции (34,6%;  $p < 0,05$ ). Столь значительное укорочение длительности вдоха при воздействии бикакуллина на КПБ допустимо связывать с подавлением активности имеющихся здесь разных типов инспираторных нейронов, в том числе преинспираторных клеток, которые считаются важнейшим компонентом ритмогенерирующего механизма дыхательного центра [7; 13; 14]. Что касается фазы выдоха, то её длительность при действии ГАМК<sub>A</sub>-блокатора на КПБ, как и на КБ, увеличивалась. Однако

реакция, вызываемая инъекциями бикикуллина в КПБ, более заметно усиливалась во времени, достигая максимума на 60-й минуте после введения вещества (рис. 1Б). В это время выдох удлинялся от исходного значения  $0,646 \pm 59,80$  мс до  $907,2 \pm 85,39$  мс, что составляло 40,3% ( $p < 0,05$ ; парный t-test).

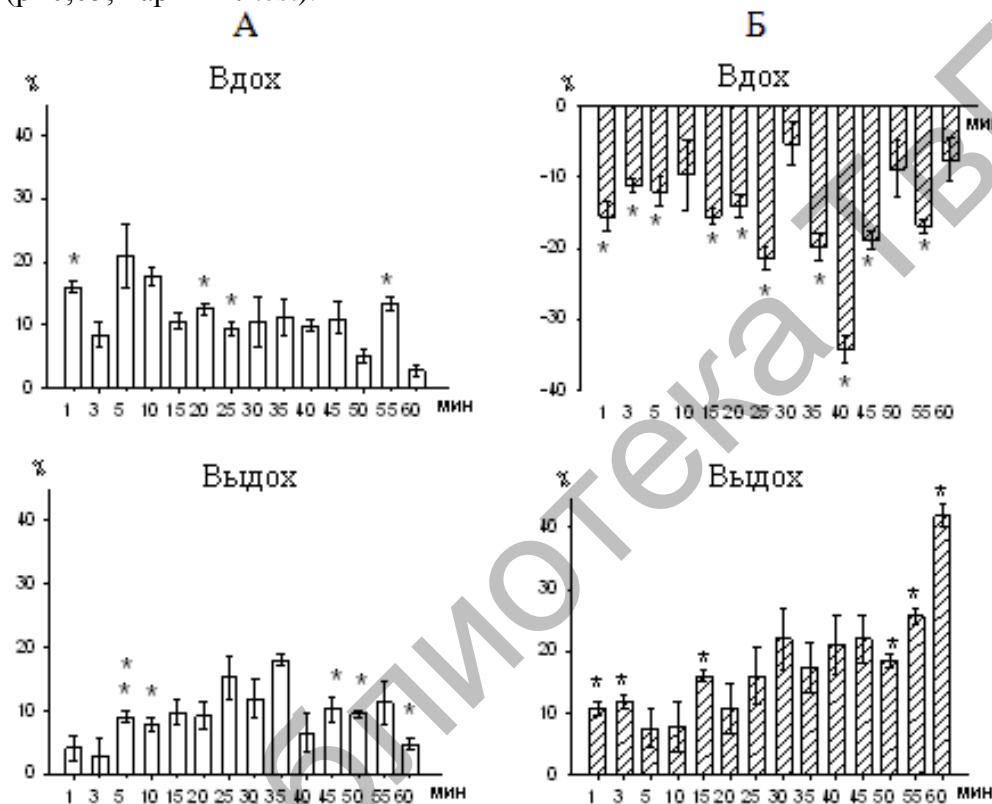


Рис. 1. Изменение (в % от исходного уровня) длительности вдоха и выдоха после микроинъекции  $10^{-6}$  М раствора бикикуллина в комплекс Бетцингера (А) и комплекс пре-Бетцингера (Б) у крыс:  
\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Интегральным эффектом изменений отдельных фаз дыхательного цикла явилось увеличение его общей продолжительности (рис. 2А, Б). Причем, при инъекции бикикуллина в КБ данная реакция обуславливалась пролонгированием как вдоха, так и выдоха, тогда как при инъекции в КПБ – только выдоха. В результате этих изменений частота дыхания при действии бикикуллина на обе изучаемые области дыхательного центра уменьшалась, в том числе на 12,9 % (от  $78,49 \pm 10,47$  мин<sup>-1</sup> до  $68,34 \pm 7,57$  мин<sup>-1</sup>) в случае КБ (рис. 2А) и несколько сильнее – на 15,2% (от  $83,42 \pm 11,42$  мин<sup>-1</sup> до  $70,20 \pm 9,59$  мин<sup>-1</sup>) в случае КПБ (рис. 2Б). Опираясь на литературные данные о характере респираторных реакций в условиях нарушения тормозной синаптической передачи в продолговатом мозге у кошек «in vivo» [19],

снижение частоты дыхания при блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КБ и КПБ у крыс в наших экспериментах следует рассматривать как результат угнетения дыхательного ритма.

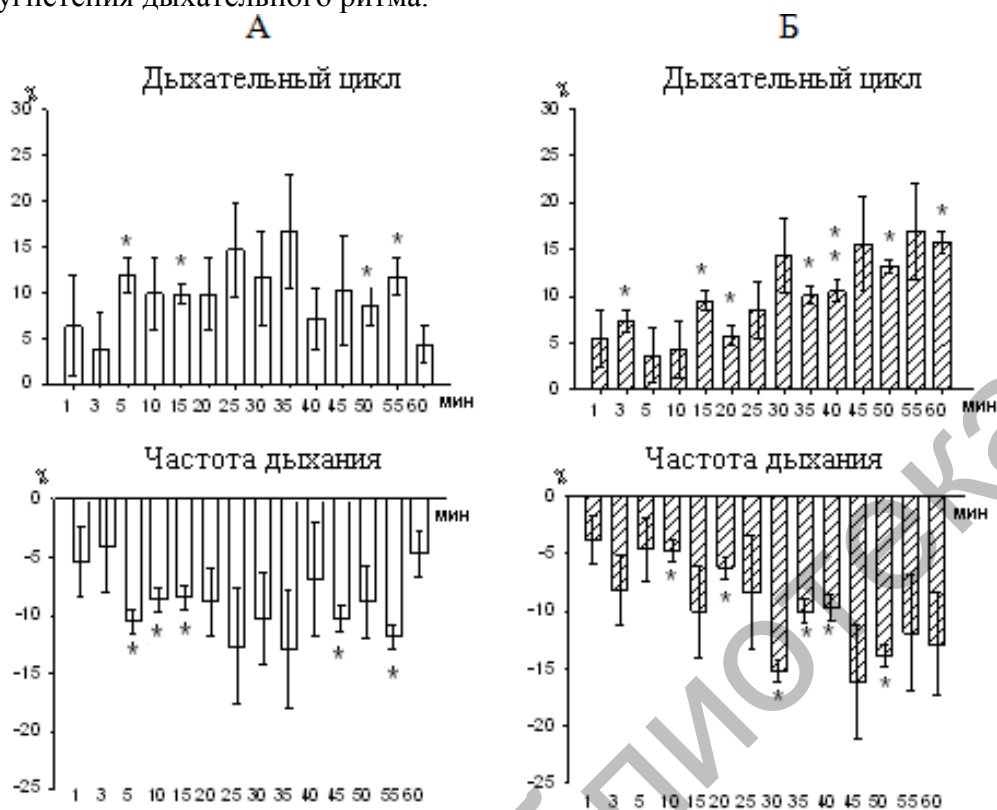
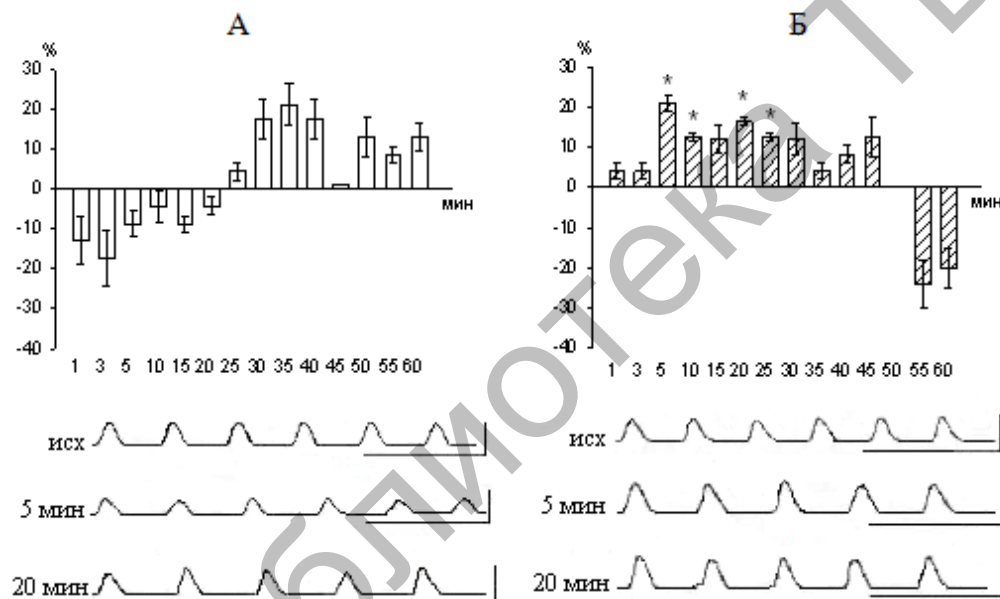


Рис. 2. Изменение (в % от исходного уровня) длительности дыхательного цикла и частоты дыхания после микроинъекции  $10^{-6}$  М раствора бикакуллина в комплекс Бетцингера (А) и комплекс пре-Бетцингера (Б) у крыс.

\* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

Одновременно с изменениями частотных параметров паттерна дыхания отмечалась определенная динамика его объемных показателей, которые при микроинъекциях ГАМК в КБ и КПБ менялись по-разному. Так, при введении бикакуллина в КБ величина дыхательного объема отклонялась относительно исходного уровня как в сторону уменьшения (1-я–20-я минуты экспозиции), так и увеличения (25-я–60-я минуты), однако эти отклонения не достигали границ статистической достоверности (рис. 3А). В противоположность этому при введении антагониста в КПБ дыхательный объем, начиная с 1-й минуты воздействия увеличивался, причем достоверный максимум данной реакции устанавливался через 5 минут после инъекции, а с 30-й минуты реакция ослаблялась (рис. 3Б). В частности, до начала фармакологического воздействия на КПБ дыхательный объем у крыс был равен  $0,24 \pm 0,05$  мл, на 5-й минуте после инъекции он достигал

значения  $0,29 \pm 0,06$  мл, а на 35-й составлял только  $0,25 \pm 0,09$  мл, что соответствовало приросту на 20,5% ( $p < 0,05$ ; парный t-test) и 4,2 % от исходного уровня. Что касается минутного объема дыхания, то он, в полном соответствии с изменениями дыхательного объема, при инъекции бикукуллина в КПБ увеличивался от  $20,94 \pm 6,26$  мл/мин (исходный уровень) до  $24,50 \pm 4,02$  мл/мин (25-я минута экспозиции), что составляло 11,7% ( $p < 0,05$ ; парный t-test), а при инъекции в КБ менялся неоднозначно и менее выражено. Примером типичных изменений объемов дыхания при блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на уровне КБ и КПБ служат спирограммы, представленные на рис. 3.



Р и с . 3 . Изменения амплитудных параметров паттерна дыхания при микроинъекциях бикукуллина ( $10^{-6}$  М) в комплекс Бетцингера (А) и комплекс пре-Бетцингера (Б) у крыс:

вверху – изменение (в % от исходного уровня) дыхательного объема (\* –  $p < 0,05$ ); внизу – спирограммы, зарегистрированные в разные сроки после микроинъекции (калибровка – 1 мл, 1 с)

Таким образом, из результатов проведенного исследования следует, что ГАМКергическая система у половозрелых крыс играет существенную роль в регуляции паттерна дыхания. Несомненно, что в реализации влияний ГАМК на дыхание принимают участие ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы КБ и КПБ, на что указывают респираторные реакции, наблюдаемые при микроинъекциях в эти структуры ГАМК<sub>A</sub>-антагониста бикукуллина. Обращает внимание, что на фоне блокады ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КБ и КПБ, несмотря на неоднозначные изменения отдельных фаз дыхательного цикла, частота дыхания в обоих случаях уменьшалась, причем с большей выраженностью при инъекциях бикукуллина в КПБ. Изменения частотных параметров спирограмм у

крыс сопровождалось отклонениями дыхательного объема, который при действии ГАМК<sub>A</sub>-антагониста на КБ менялся незначительно, а на КПБ – закономерно возрастал. Именно за счет изменений дыхательного объема формировалась динамика минутного объема дыхания, которая в первом случае характеризовалась вариабельностью значений данного параметра, а во втором – отличалась устойчивой тенденцией к увеличению легочной вентиляции.

Позволительно считать, что выявленные различия в респираторных эффектах, по крайней мере частично, обусловлены гетерогенностью ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, имеющих на нейронах КБ и КПБ. Как известно, физиологические и фармакологические свойства ГАМК-рецепторов определяются их молекулярной структурой, в частности, наличием тех или иных субъединиц, что, в свою очередь, зависит от локализации рецепторов. Например,  $\alpha 2$  субъединица находится исключительно в рецепторах, расположенных в пределах сомато-дендритных синапсов [8], причем некоторые из таких подтипов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов обладают очень высокой чувствительностью к медиатору [17]. В отличие от этого ГАМК-рецепторы, содержащие  $\delta$  субъединицу, преимущественно располагаются вне синапсов и характеризуются иной фармакокинетикой [3; 5; 9]. Кроме того, специфика отмечаемых нами реакций внешнего дыхания может определяться различным представительством ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на ранних инспираторных и экспираторных нейронах [6], популяции которых в КПБ и КБ неравноценны [14; 22].

Исходя из большей выраженности респираторных реакций, наблюдаемых нами при введении бикакуллина в КПБ, можно сделать заключение о более широком участии ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КПБ, по сравнению с КБ, в регуляции частотно-амплитудных параметров паттерна дыхания у половозрелых крыс. Следует также отметить, что изменения дыхательного объема и легочной вентиляции, наблюдаемые при микроинъекциях бикакуллина в КПБ, имели характер, противоположный эффектам, вызываемым действием ГАМК. Так, в наших предыдущих исследованиях [2] установлено, что при микроинъекциях ГАМК в КПБ объемы дыхания закономерно снижаются, поэтому с учетом их увеличения при воздействии бикакуллина допустимо говорить об участии ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КПБ в реализации тонического тормозящего влияния эндогенной ГАМК на механизмы, регулирующие глубину дыхания

### **Список литературы**

1. *Александрова Н.П., Александров В.Г., Иванова Т.Г.* Влияние гамма-аминомасляной кислоты на инспираторно-тормозящий рефлекс

- Геринга – Брейера // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 12. С. 1356–1364.
2. Ведясова О.А, Маньшина Н.Г., Сафонов В.А., Тараканов И.А. Респираторные реакции при микроинъекциях ГАМК и баклофена в комплекс Бетцингера и комплекс пре-Бетцингера у крыс // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2012. Т. 98, № 5. С. 618–626.
  3. Головки А.И. Субъединицы ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и реакции на нейрофармакологические вещества // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999. № 4. С. 67–71.
  4. Сафонов В.А., Лебедева М.А. Автоматия или ритмообразование в дыхательном центре // Физиология человека. 2003. Т. 29, № 1. С. 108–121.
  5. Семьянов А.В. ГАМКергическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // Нейрофизиология. 2002. Т. 34, № 1. С. 82–92.
  6. Тараканов И.А., Сафонов В.А. ГАМКергическая система и ее значение для регуляции дыхания // Физиол. человека. 1998. № 2. С. 116–128.
  7. Alheid G.F., McCrimmon D.R. The chemical neuroanatomy of breathing // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008. Vol. 164. P. 3–11.
  8. Bai D., Zhu G., Pennefather P., Jackson M.F., MacDonald J.F., Orser B.A. Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons // *Mol. Pharmacol.* 2001. Vol. 59, № 4. P. 814–824.
  9. Banks M.I., Pearce R.A. Kinetic differences between synaptic and extrasynaptic GABA(A) receptors in CA1 pyramidal cells // *J. Neurosci.* 2000. Vol. 20, № 3. P. 937–948.
  10. Bongianini F., Mutolo D., Cinelli E. et al. Respiratory responses induced by blockades of GABA and glycine receptors within the Böttinger complex and the pre-Böttinger complex of the rabbit // *Brain Res.* 2010. Vol. 1344. P. 134–147.
  11. Bormann J. The «ABC» of GABA receptors // *Trends Pharmacol. Sci.* 2000. Vol. 21, № 1. P. 16–19.
  12. Chitravanchi V.C., Sapru H.N. Phrenic nerve responses to chemical stimulation of the subregions of ventral medullary neuronal group in the rat // *Brain Res.* 1999. Vol. 821, № 2. P. 443–446.
  13. Ezure K., Tanaka I. Activity of brainstem respiratory neurons just before the expiration-inspiration transition in the rat // *J. Physiol.* 2003. Vol. 547. P. 629–640.
  14. Feldman J.L., Del Negro C.A. Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. Vol. 7. P. 232–242.



15. *Haji A., Takeda R., Okazaki M.* Neuropharmacology of control of respiratory rhythm and pattern in mature mammals // *Pharmacol. Ther.* 2000. Vol. 86. P. 277–304.
16. *Korpi E.R., Grunder G., Luddens H.* Drug interactions at GABA(A) receptors // *Prog. Neurobiol.* 2002. Vol. 67. P. 113–159.
17. *Mehta A.K., Ticku M.K.* An update on GABAA receptors // *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1999. Vol. 29, № 2/3. P. 196–217.
18. *Nattie E., Li A.* Bicuculline dialysis in the retrotrapezoid nucleus (RTN) region stimulates breathing in the awake rat // *Respir. Physiol.* 2001. Vol. 124. P. 179–193.
19. *Pierrefiche O., Schwarzacher S.W., Bischoff A.M., Richter D.W.* Blockade of synaptic inhibition within the pre-Bötzinger complex in the cat suppresses respiratory rhythm generation in vivo // *J. Physiol (Lond.)*. 1998. Vol. 509. P. 245–254.
20. *Ritter B., Xhang W.* Early postnatal maturation of GABA<sub>A</sub>-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse // *Eur. J. Neurosci.* 2000. Vol. 12. P. 2975–2984.
21. *Shen L., Li Y.M., Duffin J.* Inhibitory connections among rostral medullary expiratory neurones detected with cross-correlation in the decerebrate rat // *Pflugers Arch.* 2003. Vol. 446. P. 365–372.
22. *Smith J.C., Abdala A.P., Koizumi H., Rybak I.A., Paton F.F.R.* Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms // *J. Neurophysiol.* 2007. Vol. 98. P. 3370–3387.
23. *Zhang W., Barnbrock A., Gajic S., Pfeiffer A., Ritter B.* Differential ontogeny of GABA(B)-receptor-mediated pre- and postsynaptic modulation of GABA and glycine transmission in respiratory rhythm-generating network in mouse // *J. Physiol.* 2002. Vol. 540. P. 435–446.

**REACTIONS OF THE BREATHING PATTERN  
TO MICROINJECTIONS OF BICUCULLINE  
INTO THE BÖTZINGER  
AND PRE-BÖTZINGER COMPLEX IN RATS**

**N.G. Manshina, O.A. Vedyasova, D.S. Tatarintseva**

Samara State University

Microinjections of selective GABA<sub>A</sub>-antagonist bicuculline ( $10^{-6}$  M) into Bötzing complex (BC) and pre-Bötzing complex (PBC) in mature rats caused the respiratory changes. In particular, the injections into BC extended both the inspiratory and expiratory time while after the injections into PBC only expiratory time was extended. When bicuculline injected into PBC, tidal

volume increased while injections of bicuculline into BC did not induce any significant change in tidal volume. The respiratory effects of bicuculline demonstrate the various role of GABA<sub>A</sub>-receptors at the BC and PBC level in the control of temporal and volume respiratory pattern parameters.

**Keywords:** GABA<sub>A</sub>-receptors, Bötzinger complex, pre-Bötzinger complex, respiration, bicuculline.

*Об авторах:*

МАНЬШИНА Надежда Геннадьевна–аспирант кафедры физиологии человека и животных, ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет», 443011, Самара, ул. акад. Павлова, д. 1, e-mail: man\_shan@mail.ru

ВЕДЯСОВА Ольга Александровна–профессор кафедры физиологии человека и животных, ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет», 443011, Самара, ул. акад. Павлова, д. 1, e-mail: olgavedyasova@rambler.ru

ТАТАРИНЦЕВА Дарья Сергеевна–магистрант кафедры физиологии человека и животных, ФГБОУ ВПО «Самарский государственный университет», 443011, Самара, ул. акад. Павлова, д. 1, e-mail: Darta2007@yandex.ru