

УДК 612.282: 612.216.2
DOI: 10.26456/vtbio357

РЕАКЦИИ ДЫХАНИЯ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ БАКЛОФЕНА И 2-ГИДРОКСИСАКЛОФЕНА В РЕТРОТРАПЕЦИЕВИДНОЕ ЯДРО У КРЫС

**А.И. Будаев, О.А. Ведясова, А.Т. Конашенкова,
С.И. Павленко, И.Г. Кретьова**

Самарский национальный исследовательский университет
им. академика С.П. Королева, Самара

В опытах на наркотизированных крысах изучали изменения внешнего дыхания и электромиограммы (ЭМГ) диафрагмальной мышцы при микроинъекциях в ретротрапециевидное ядро (РТЯ) растворов агониста ГАМК_B-рецепторов баклофена и их антагониста 2-гидроксисаклофена. Введение в РТЯ баклофена угнетало легочную вентиляцию, при этом отмечалось снижение дыхательного объема и пролонгирование выдоха. Микроинъекции 2-гидроксисаклофена оказывали стимулирующее влияние, увеличивая дыхательный объем и минутный объем дыхания. Значимые реакции диафрагмы отмечались при микроинъекциях баклофена и проявлялись изменениями длительности инспираторных залпов и межзалповых интервалов на ЭМГ. Полученные данные позволяют обсуждать вопрос об участии ГАМКергических механизмов в регуляции деятельности РТЯ у крыс.

Ключевые слова: *паттерн внешнего дыхания, диафрагма, электромиограмма, ретротрапециевидное ядро, баклофен, 2-гидроксисаклофен.*

Введение. Ретротрапециевидное ядро (РТЯ), входящее в хеморефлекторный контур регуляции вегетативных функций, играет важную роль в респираторном контроле (Alheid, McCrimmon, 2008; Moreira et al., 2021), что подтверждается экспериментальными и клиническими данными. Так, разрушение РТЯ у крыс повышает порог чувствительности к CO₂ и прекращает центральный хеморефлекс (Souza et al., 2018). Генетические аномалии развития РТЯ, вызывающие гибель его нейронов у животных, также сопряжены с угнетением гиперкапнического вентиляционного ответа (Ferreira et al., 2022). У человека мутации генов в нейронах РТЯ могут вызывать развитие синдрома врожденной центральной гиповентиляции (Harsono et al., 2022).

Свое участие в регуляции дыхания РТЯ осуществляет через многочисленные связи с другими отделами центральной

респираторной нейронной сети (РНС) (Rosin et al., 2006), при этом до конца не изученной остается роль тормозной, в частности ГАМКергической, медиации в опосредовании этих связей. Наличие ГАМКергической сигнализации в районе РТЯ подтверждается присутствием в парафациальной области клеток, иммунореактивных к GAD67 (Dehkordi et al., 2007), играющему ключевую роль в синтезе ГАМК, при этом ГАМКергические проекции могут поступать в РТЯ от римп-клеток ядра одиночного пути (Takakura et al., 2007). В то же время, молекулярные механизмы обеспечения эндогенного ГАМКергического торможения нейронов РТЯ пока не определены. В ряде работ показано, что у животных введение в РТЯ агонистов и антагонистов ГАМК_A-рецепторов подавляет реакции дыхания в условиях гипоксии и гиперкапнии (Takakura et al., 2013), а также влияет на легочную вентиляцию при дыхании обычным воздухом (Ведясова и др., 2020). Данные о респираторных эффектах воздействия на РТЯ агонистов и антагонистов ГАМК_B-рецепторов единичны. Между тем, такие данные могут способствовать уточнению механизмов, лежащих в основе тормозной модуляции активности нейронов РТЯ, вовлеченных в регуляцию ритма и паттерна дыхания.

Цель нашего исследования заключалась в анализе изменений паттерна внешнего дыхания и электромиограммы (ЭМГ) диафрагмальной мышцы в ответ на введение в РТЯ агониста ГАМК_B-рецепторов баклофена и их антагониста 2-гидроксисаклофена у крыс, дышащих обычным атмосферным воздухом

Методика. Поставлены острые опыты на лабораторных беспородных крысах массой 180-250 г под уретановым наркозом (1.6 г/кг, в/б). При подготовке к опыту крысам проводили трахеостомию, открывали доступ к диафрагмальной мышце со стороны левого купола, обнажали поверхность черепа. Крыс фиксировали в стереотаксисе СЭЖ-3 и высверливали в черепе отверстие для микроинъекций в РТЯ. Растворы готовили на основе искусственной спинномозговой жидкости и инъецировали в объеме 200 нл. Баклофен (baclofen, Sigma-Aldrich) вводили в концентрации 10^{-7} М (n = 8) и 10^{-4} М (n = 8), 2-гидроксисаклофен (2-hydroxysaclofen, Sigma-Aldrich) – в тех же концентрациях (10^{-7} М; n = 8 и 10^{-4} М; n = 8). В контрольной серии (n = 8) делали микроинъекции искусственной спинномозговой жидкости. Микроинъекции проводили по стереотаксическим координатам, указанным для РТЯ (Li, Nattie, 2002), через стеклянную канюлю (диаметр кончика 30–50 мкм, длина 12 мм) с использованием микрошприца МШ-1. На рис. 1 для наглядности представлена схема фронтального среза продолговатого мозга крысы (Paxinos, Watson, 2005) с указанием области, соответствующей координатам РТЯ.

Статистическую обработку проводили в программе SigmaPlot (v. 12.5). Нормальность распределения оценивали в тесте Shapiro–Wilk. При выявлении различий между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (One-way ANOVA). Post hoc сравнения проводили методом Bonferroni в случае нормального распределения данных и методом Dunn при отклонении распределения от нормального. Первичные данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка ($M \pm SEM$) и как медиана и квартили ($Me; P 25 - P 75$). Кроме того, наблюдаемые изменения рассчитывали в % от контроля. Статистически значимыми считали различия при $P < 0,05$

Результаты и обсуждение. Анализ результатов показал, что у экспериментальных животных в ответ на микроинъекции баклофена в РТЯ происходило угнетение внешнего дыхания за счет изменения его объемных и, в меньшей степени, частотных параметров. При этом введение агониста ГАМК_B-рецепторов в концентрации 10^{-7} М и 10^{-4} М вызывало дозозависимое снижение МОД по сравнению с контролем, максимальные отклонения составляли 17,7% ($P < 0,05$) и 37,9% ($P < 0,01$) соответственно (рис. 2). Изменения МОД определялись уменьшением V_t , которое при действии высокой концентрации баклофена составляло 32,2% ($P < 0,01$) от контроля и значимо ($P < 0,01$) отличалось от снижения в ответ на низкую концентрацию вещества. Одновременно увеличивалась T_e , в том числе до 0,84 с (0,64 с – 0,99 с) при действии 10^{-7} М раствора баклофена ($P < 0,05$) и до 0,83 с (0,63 с – 0,95 с) при действии 10^{-4} М раствора ($P < 0,05$), тогда как контрольное значение T_e равнялось 0,59 с (0,54 с – 0,69 с). В изменениях T_i наблюдалась недостоверная тенденция снижения по сравнению с контролем, но при этом было выявлено статистически значимое различие между эффектами низкой и высокой концентраций. Значения f и V_i при микроинъекциях баклофена в РТЯ существенно не менялись (рис. 2).

В экспериментах с микроинъекциями в РТЯ 2-гидроксисаклофена развивалось усиление дыхания. Однако, значимые реакции наблюдались при действии только высокой концентрации и проявлялись изменениями объемных параметров паттерна дыхания. Так, отмечалось увеличение МОД на 26,1% ($P < 0,05$) и прирост V_t на 29,1% ($P < 0,01$) относительно контроля (рис. 3). Изменения других параметров спирограммы не имели закономерного характера.

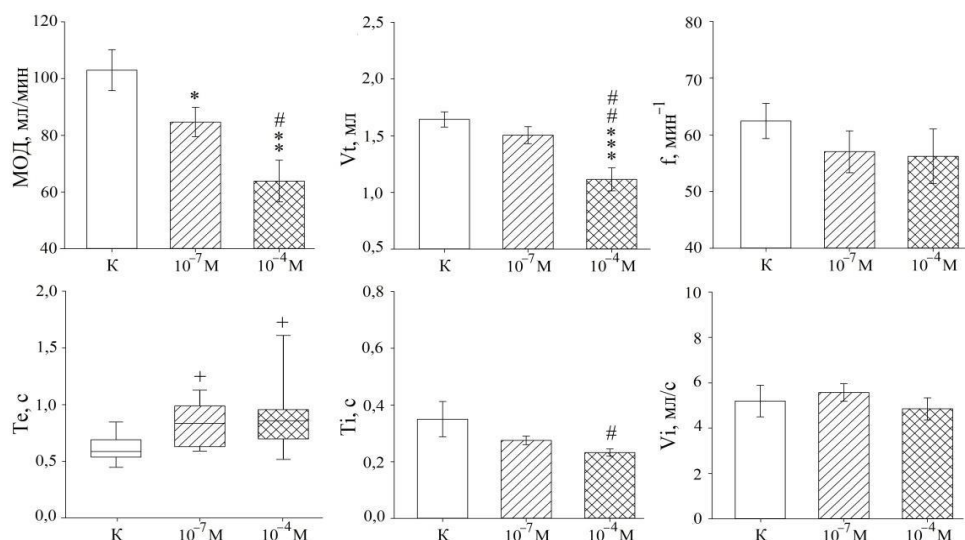


Рис. 2. Изменения параметров паттерна внешнего дыхания у крыс после микроинъекций в РТЯ растворов баклофена: белые столбики – контроль; столбики с косой штриховкой – 10⁻⁷ М, столбики с перекрестной штриховкой – 10⁻⁴ М; * – P<0,05; ** – P<0,01; *** – P<0,01 (различия с контролем, Bonferroni post hoc test); + – P<0,05 (различия с контролем, Dunn post hoc test); # – P<0,05; ## – P<0,01 (различия между экспериментальными группами, Bonferroni post hoc test)

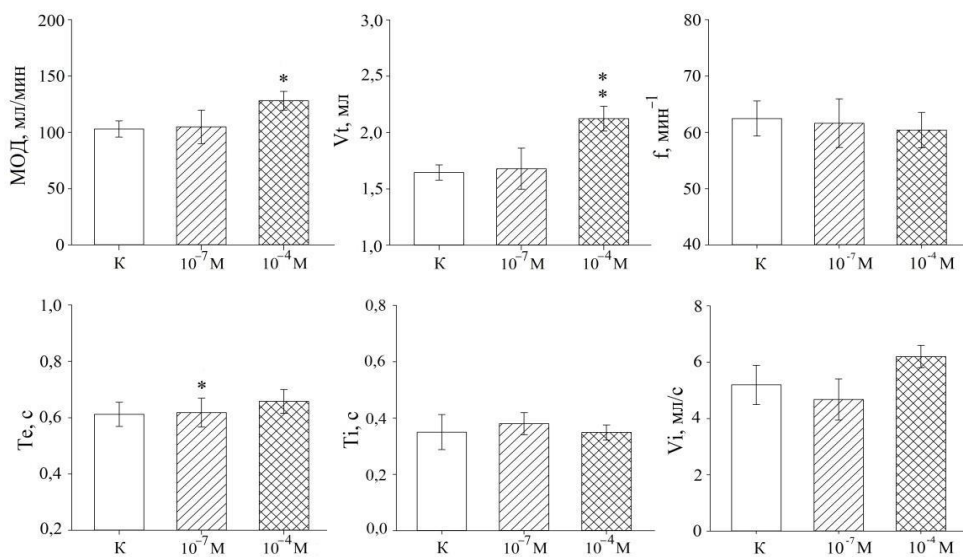


Рис. 3. Изменения параметров паттерна внешнего дыхания у крыс после микроинъекций в РТЯ растворов 2-гидроксисаклофена: белые столбики – контроль; столбики с косой штриховкой – 10⁻⁷ М, столбики с перекрестной штриховкой – 10⁻⁴ М; * – P<0,05; ** – P<0,01 (различия с контролем, Bonferroni post hoc test)

При действии на РТЯ баклофена и 2-гидрохлорид баклофена наблюдались определенные изменения ЭМГ диафрагмы. Микроинъекции баклофена в целом тормозили биоэлектрическую активность диафрагмальной мышцы, о чем можно судить, в первую очередь, по пролонгированию МЗИ на ЭМГ. При действии низкой концентрации максимальный прирост МЗИ составлял 45,9%, а в случае высокой концентрации – 65,4% от контроля ($P < 0,05$). Высокая концентрация агониста также вызывала увеличение ДЗ на ЭМГ на 40,0% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 4 А). Микроинъекции 2-гидрохлорид баклофена существенно не влияли на диафрагмальную активность, вызывая колебания ДЗ и МЗИ, не имевшие статистической значимости (рис. 4 Б).

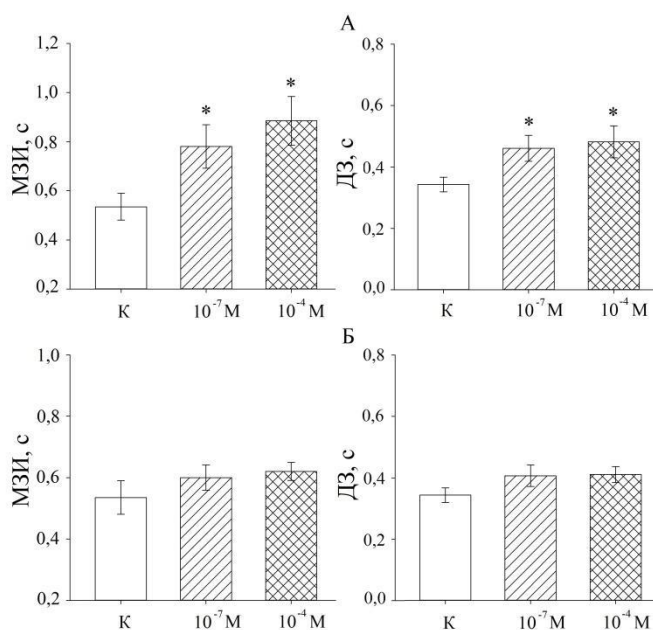


Рис. 4. Изменения параметров ЭМГ диафрагмы у крыс после микроинъекций в РТЯ растворов баклофена (А) и 2-гидрохлорид баклофена (Б): белые столбики – контроль; столбики с косой штриховкой – 10^{-7} М, столбики с перекрестной штриховкой – 10^{-4} М. * – $P < 0,05$ (различия с контролем, Bonferroni post hoc test)

Из полученных результатов следует, что типичным эффектом микроинъекций агониста ГАМК_B-рецепторов баклофена в РТЯ было ослабление МОД и биоэлектрической активности диафрагмы, тогда как введение ГАМК_B-блокатора 2-гидрохлорид баклофена оказывало стимулирующее влияние на МОД. Эти данные можно рассматривать как функциональное доказательство участия ГАМКергических механизмов в деятельности РТЯ. Одним из источников ГАМК в изучаемом ядре могут быть аксоны ГАМКергических рmp-нейронов

ядра солитарного тракта, вступающие в РТЯ и участвующие в торможении его хемочувствительных клеток во время вдоха (Takakura et al., 2007). Что касается вопроса о молекулярных механизмах, опосредующих влияние баклофена и 2-гидроксисаклофена на РТЯ, то однозначного ответа на него нет. Гистохимические данные о ГАМК_B-рецепторах в области РТЯ пока отсутствуют. При этом стоит заметить, что представление о вкладе других рецепторов ГАМК (например, ГАМК_A) в регуляцию дыхания на уровне РТЯ и других отделов РНС также основано на эмпирических данных (Takakura et al., 2013; Ghali, 2019; Ведясова и др., 2020).

Объясняя респираторные реакции на микроинъекции баклофена в РТЯ, допустимо предположить, что они вызваны ингибированием имеющихся здесь глутаматергических нейронов, посылающих аксональные проекции к дыхательным нейронам вентральной респираторной группы и преинспираторным нейронам комплекса пре-Бетцингера (Bochorishvili et al., 2012; Guyenet, Bayliss, 2015). Возможно, торможение глутаматергических нейронов РТЯ снижает возбуждающее влияние на указанные отделы РНС, вызывая уменьшение легочной вентиляции. Наблюдаемое при этом увеличение межзальных интервалов на ЭМГ диафрагмы можно связать с ограничением возбуждающих сигналов из РТЯ к премоторным нейронам дорсальной респираторной группы, иннервирующим спинальные центры диафрагмальной мышцы. Стимулирующие респираторные эффекты микроинъекций в РТЯ 2-гидроксисаклофена, в свою очередь, могут рассматриваться как результат растормаживания глутаматергических нейронов РТЯ вследствие блокады ГАМКцепивных структур. Возможно, на этом фоне влияния из РТЯ усиливают возбуждение проприобульбарных и бульбоспинальных респираторных нейронов, вследствие чего у экспериментальных животных активируется дыхание.

Заключение. Таким образом, микроинъекции растворов баклофена и 2-гидроксисаклофена в область РТЯ у крыс вызывают соответственно угнетение и усиление внешнего дыхания и биоэлектрической активности диафрагмальной мышцы. Характер наблюдаемых реакций позволяет предполагать, что у крыс в условиях дыхания атмосферным воздухом обычного состава тормозная модуляция респираторной активности РТЯ осуществляется с участием ГАМКергических механизмов. Молекулярно-рецепторные аспекты этих механизмов требуют дальнейших исследований

Список литературы

- Ведасова О.А., Ковалева Т.Е., Будаев А.И.* 2020. Анализ роли ГАМКергических механизмов в регуляции респираторной активности парафациальных структур ствола мозга у крыс // Биомедицина. Т. 16. № 1. С. 56-64. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-56-64>.
- Alheid G.F., McCrimmon D.R.* 2008. The chemical neuroanatomy of breathing // *Respir. Physiol. Neurobiol.* V. 64. № 1-2. P. 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.07.014>.
- Bochorishvili G., Stornetta R.L., Coates M.B., Guyenet P.G.* 2012. Pre-Bötzing complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons // *J. Comp. Neurol.* V. 520. № 5. P. 1047-1061. <https://doi.org/10.1002/cne.22769>.
- Dehkordi O., Millis R.M., Dennis G.C., Jazini E., Williams C., Hussain D., Jayam-Trouth A.* 2007. Expression of alpha-7 and alpha-4 nicotinic acetylcholine receptors by GABAergic neurons of rostral ventral medulla and caudal pons // *Brain. Res.* V. 1185. P. 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.09.027>.
- Ferreira C.B., Silva T.M., Silva P.E., Castro C.L., Czeisler C., Otero J.J., Takakura A.C., Moreira T.S.* 2022. Phox2b mutation mediated by Atoh1 expression impaired respiratory rhythm and ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia // *Elife.* V. 11: e73130. <https://doi.org/10.7554/eLife.73130>.
- Ghali M.G.Z.* 2019. Respiratory rhythm generation and pattern formation: oscillators and network mechanisms // *J. Integr. Neurosci.* V. 18. № 4. P. 481-517. <https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.04.188>
- Guyenet P.G., Bayliss D.A.* 2015. Neural control of breathing and CO₂ homeostasis // *Neuron.* V. 87. № 5. P. 946-961. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.001>.
- Harsono M., Chilakala S., Bohn S., Pivnick E.K., Pourcyrus M.* 2022. A newborn infant with congenital central hypoventilation syndrome and pupillary abnormalities: a literature review // *AJP Rep.* V. 12. № 3: P. 139-143.
- Li A., Nattie E.* 2002. CO₂ dialysis in one chemoreceptor site, the RTN: stimulus intensity and sensitivity in the awake rat // *Respir. Physiol. Neurobiol.* V. 133. P. 11-22. [https://doi.org/10.1016/s1569-9048\(02\)00134-9](https://doi.org/10.1016/s1569-9048(02)00134-9).
- Moreira T.S., Sobrinho C.R., Falquetto B., Oliveira L.M., Lima J.D., Mulkey D.K., Takakura A.C.* 2021. The retrotrapezoid nucleus and the neuromodulation of breathing // *J. Neurophysiol.* V. 125. № 3. P. 699-719. <https://doi.org/10.1152/jn.00497.2020>.
- Paxinos G., Watson C.* 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates – The new coronal set. 5th ed. Elsevier Acad. Press. SanDiego, CA.
- Rosin D.L., Chang D.A., Guyenet P.G.* 2006. Afferent and efferent connections of the rat retrotrapezoid nucleus // *J. Comp. Neurol.* V. 499. № 1. P. 64-89. <https://doi.org/10.1002/cne.21105>.
- Souza G.M.P.R., Kanbar R., Stornetta D.S., Abbott S.B.G., Stornetta R.L., Guyenet P.G.* 2018. Breathing regulation and blood gas homeostasis after near complete lesions of the retrotrapezoid nucleus in adult rats // *J. Physiol.* V. 596. № 13. P. 2521-2545. <https://doi.org/10.1113/JP275866>.
- Takakura A.C., Moreira T.S., De Paula P.M., Menani J.V., Colombari E.* 2013. Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious

rats // *Exp. Physiol.* V. 98. № 1. P. 304-315.
Takakura A.C., Moreira T.S., West G.H., Gwilt J.M., Colombari E., Stornetta R.L., Guyenet P.G. 2007. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors // *J. Neurophysiol.* V. 98. № 1. P. 374-381. [https://doi: 10.1152/jn.00322.2007](https://doi.org/10.1152/jn.00322.2007).

RESPIRATORY REACTIONS TO MICROINJECTIONS OF BACLOFEN AND 2-HYDROXYSACLOFEN INTO THE RETROTRAPEZOID NUCLEUS IN RATS

**A.I. Budaev, O.A. Vedyasova, A.T. Konashenkova, S.I. Pavlenko,
I.G. Kretova**

Korolev Samara National Research University, Samara

In experiments on anesthetized rats, we recorded changes in external respiration and electromyogram (EMG) of the diaphragm during microinjections of solutions of the GABA_B receptors agonist baclofen and their antagonist 2-hydroxysaclofen into the retrotrapezoid nucleus (RTN). Administration of baclofen into the RTN reduced lung ventilation, with a decrease in tidal volume and prolongation of expiration. Microinjections of 2-hydroxysaclofen had a stimulating effect, increasing the tidal volume and minute volume of respiration. Significant reactions of the diaphragm observed during microinjections of baclofen and manifested by changes in the duration of inspiratory bursts and interbursts intervals on the EMG. The data obtained allow us to discuss the question of the participation of GABAergic mechanisms in the regulation of RTN activity in rats.

Keywords: *external respiration pattern, diaphragm, electromyogram, retrotrapezoid nucleus, baclofen, 2-hydroxysaclofen.*

Об авторах:

БУДАЕВ Александр Иванович – аспирант кафедры физиологии человека и животных, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», 443086, Самара, Московское шоссе, 34, e-mail: budaev.sasha@mail.ru.

ВЕДЯСОВА Ольга Александровна – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», 443086, Самара, Московское шоссе, 34, e-mail: o.a.vedyasova@gmail.com.

КОНАШЕНКОВА Анастасия Тарасовна – магистрант биологического факультета по направлению «Физиология, биохимия и

биотехнология», ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», 443086 Самара, Московское шоссе, 34, e-mail: konashenkova.an@gmail.com.

ПАВЛЕНКО Снежанна Ивановна – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», 443086 Самара, Московское шоссе, 34, e-mail: pavlenko.snezhanna@mail.ru.

КРЕТОВА Ирина Геннадьевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», 443086 Самара, Московское шоссе, 34, e-mail: igkretova@gmail.com

Ведясова О.А. Реакция дыхания на микроинъекции баклофена и 2-гидроксисаклофена в ретротрапецевидное ядро у крыс / О.А. Ведясова, А.Т. Конашенкова, С.И. Павленко, И.Г. Кретова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2024. № 2(74). С. 17-26.

Дата поступления рукописи в редакцию: 29.12.23
Дата подписания рукописи в печать: 01.03.24