

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕСПИРАТОРНЫХ РЕАКЦИЙ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ ГАМК И ПЕНИЦИЛЛИНА В КОМПЛЕКС БЕТЦИНГЕРА И КОМПЛЕКС ПРЕ-БЕТЦИНГЕРА У КРЫС

© 2012 Н.Г. Маньшина, О.А. Ведясова<sup>1</sup>

В острых опытах на наркотизированных крысах изучены респираторные реакции на локальное введение растворов ГАМК ( $10^{-5}$  М) и неконкурентного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пенициллина ( $10^{-9}$  М) в комплекс Бетцингера (КБ) и комплекс пре-Бетцингера (КПБ). Выявлены различия в изменениях длительности вдоха, выдоха и частоты дыхания при введении ГАМК в КБ и КПБ, установлена большая выраженность этих эффектов при воздействии агониста на КПБ. Показано, что изменения глубины дыхания, напротив, имели более закономерный характер при инъекциях агониста и антагониста ГАМК-рецепторов в КБ. Обсуждается вопрос о различной роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов КБ и КПБ в реализации тормозного действия ГАМК на временные и объемные параметры паттерна дыхания.

**Ключевые слова:** дыхание, комплекс Бетцингера, комплекс пре-Бетцингера, ГАМК, пенициллин.

### Введение

Важным аспектом при решении проблемы формирования ритма и паттерна дыхания является выявление нейромедиаторной организации взаимосвязей в дыхательном центре. В процессе возникновения дыхательного ритма большую роль играет ГАМК (гамма-аминомасляная кислота) [9; 21] — главный тормозной нейротрансмиттер ЦНС, рецепторы которого широко распространены в структурах головного мозга [7]. Имеются данные о вовлечении медиаторных аминокислот, прежде всего ГАМК, в патохимические процессы при заболеваниях ЦНС (например, дрожательный паралич, эпилепсия) [6], а также в механизмы формирования патологических паттернов дыхания [8]. В связи с этим актуальными являются изучение значения ГАМКергической медиации и анализ роли различных классов ГАМК-рецепторов на уровне функционально различных нейросетей дыхательного центра в регуляции реакций системы дыхания на химические стимулы и в механизмах генерации и модуляции инспираторной и экспираторной активности [1; 3; 8; 19]. В этом плане особый интерес представляют такие отделы дыхательного

<sup>1</sup>Маньшина Надежда Геннадьевна (man\_shan@mail.ru), Ведясова Ольга Александровна (olgavedyasova@rambler.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

центра, как комплекс Бетцингера и комплекс пре-Бетцингера, образованные популяциями проприобульбарных экспираторных и инспираторных нейронов, непосредственно участвующих в формировании ритма и паттерна дыхания у плодов и новорожденных животных [10; 12; 18]. Цель нашего исследования заключалась в изучении особенностей регуляции паттерна внешнего дыхания в условиях активации и блокады ГАМКергических механизмов области комплекса Бетцингера (КБ) и комплекса пре-Бетцингера (КПБ) у взрослых крыс.

## 1. Методика исследования

Исследования проведены в острых опытах в условиях *in vivo* на 12 половозрелых беспородных крысах обоего пола массой 250–350 г, наркотизированных уретаном (внутрибрюшинно, из расчета 1,6 г на 1 кг массы). В ходе операционной подготовки крыс подвергали трахеотомии и вводили в трахею пластиковую канюлю, а затем обнажали дорсальную поверхность продолговатого мозга. После окончания хирургических процедур животное помещали в стереотаксический прибор СЭЖ-3 и фиксировали голову в положении вентрального сгибания. Для активации и блокады ГАМК-рецепторов КБ и КПБ использовали микроинъекции растворов ГАМК и пенициллина соответственно. Растворы ГАМК ( $10^{-5}$  М) и пенициллина ( $10^{-9}$  М) готовились непосредственно перед введением в мозг методом разведения в искусственной спинномозговой жидкости. Микроинъекции осуществляли через стеклянную канюлю с диаметром кончика 15–20 мкм, укрепленную на игле микрошприца МШ-1 по стереотаксическим координатам [11]. При микроинъекциях в КБ использовались следующие координаты: 1,6–2,6 мм роstralнее обех; 1,7–2,7 мм латеральнее срединного шва; 2,3–2,8 мм вглубь от дорсальной поверхности мозга. В случае инъекций в КПБ микроканюлю вводили на 1,5–1,6 мм роstralнее обех, на 1,8–2,5 мм латеральнее срединного шва и на глубину 2,3–2,8 мм от дорсальной поверхности мозга.

В качестве показателя дыхательной активности у животных регистрировали спирограммы в программе PowerGraph 3.2 Professional (ООО "Интероптика-С") в исходном состоянии, через 1 мин, а затем через каждые 5 мин в течение полутора часа. По спирограммам рассчитывали длительность фаз дыхательного цикла (с), частоту дыхания ( $\text{мин}^{-1}$ ) и дыхательный объем (мл). Статистическую обработку результатов проводили в программе SigmaStat 3.5, достоверность изменений проверяли при помощи однофакторного парного *t*-теста. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

## 2. Результаты исследования

В ходе проведенных опытов с введением раствора ГАМК в концентрации  $10^{-5}$  М в КБ крыс были получены результаты, указывающие на участие ГАМКергической системы в механизмах формирования паттерна дыхания на уровне указанной области дыхательного центра. В частности, с учетом гистрограмм, представленных на рис. 1, можно говорить, что после микроинъекции в КБ раствора ГАМК развивалась достоверная тенденция уменьшения продолжительности фазы инспирации (в среднем на 11,7%), проявлявшаяся с 5-й мин воздействия медиатора. Максимальное изменение значений данного параметра было зарегистрировано на 25-й мин экспозиции и составило 18,0 % ( $p < 0,05$ ). Эта реакция соче-

талась с увеличением экспираторной фазы, которое достигало статистически значимых отклонений уже на 1-й мин наблюдений. Результатом увеличения выдоха явилась динамика частоты дыхания, которая уменьшалась в течение всей экспозиции в диапазоне 7–10 % ( $p < 0,05$ ) относительно исходного уровня (рис. 1). Дыхательный объем при активации ГАМК-рецепторов КБ, напротив, демонстрировал тенденцию увеличения, которая приобретала достоверный характер начиная с 5-й мин воздействия. Как видно из рис. 1, активирующее влияние ГАМК на глубину дыхания нарастало по мере экспозиции, максимум эффекта был отмечен на 15-й мин после инъекции и составил 30,0 % ( $p < 0,05$ ).

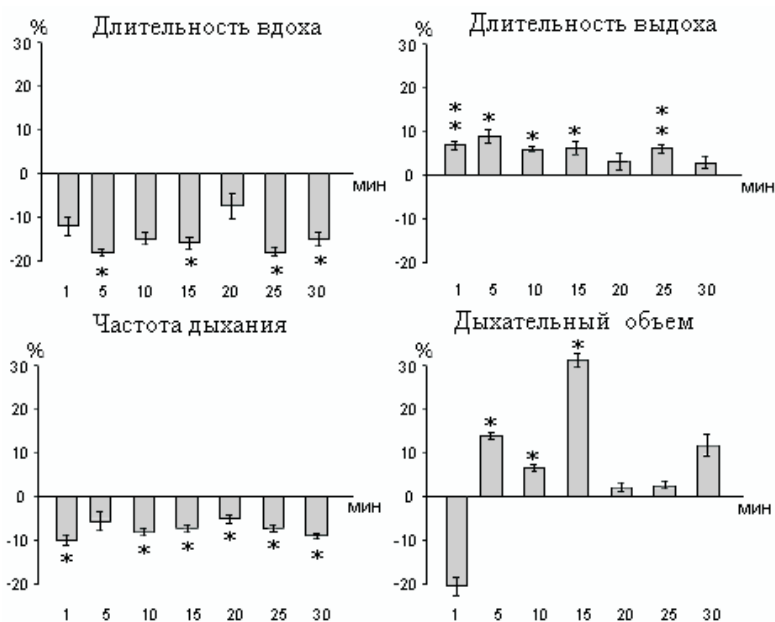


Рис. 1. Изменение (в % от исходного уровня) временных и объемных параметров паттерна внешнего дыхания у крыс в разные сроки после микроинъекции  $10^{-5}$  М раствора ГАМК в комплекс Бетцингера (\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ )

Анализируя респираторные реакции, вызываемые активацией ГАМК-рецептивных структур области КПБ, следует указать, что они определенным образом отличались от эффектов, наблюдаемых при действии ГАМК на КБ. В первую очередь, отличие касалось изменений продолжительности фаз дыхательного цикла. Так, из рис. 2 видно, что при микроинъекции раствора ГАМК в КПБ наблюдалось закономерное увеличение длительности фазы вдоха. Выраженность реакции зависела от времени экспозиции, и к 30-й мин воздействия продолжительность вдоха увеличивалась более чем в 2 раза по сравнению с 1-й мин, что составляло 30,0 % ( $p < 0,05$ ) от исходного уровня. Длительность фазы выдоха при введении медиатора в КПБ, как и КБ, увеличивалась, однако более выраженно. Максимальный прирост длительности выдоха приходился на последние сроки наблюдений и составлял 20,0 % ( $p < 0,05$ ), что более чем в 2 раза превышало эффект действия ГАМК на КБ. Снижение частоты дыхания при микроинъекции раствора ГАМК в КПБ (рис. 2) составляло в среднем 12,1 % ( $p < 0,05$ ). Что касается измене-

ний дыхательного объема, то они при инъекции раствора ГАМК в КПБ имели неопределенный и статистически недостоверный характер (рис. 2).

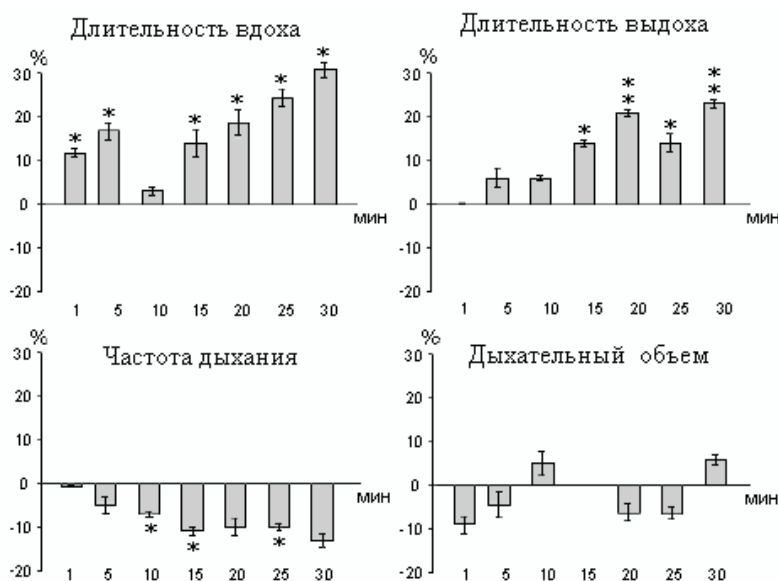


Рис. 2. Изменение (в % от исходного уровня) временных и объемных параметров паттерна внешнего дыхания у крыс в разные сроки после микроинъекции  $10^{-5}$  М раствора ГАМК в комплекс пре-Бетцингера (\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ )

Участие ГАМКергических механизмов, в т. ч. ГАМК-рецепторов класса А в регуляции дыхания структурами КБ и КПБ, подтвердилось в экспериментах с введением в указанные области дыхательного центра раствора неконкурентного антагониста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов пенициллина в концентрации  $10^{-9}$  М. На основании данных, представленных на рис. 3, а, можно говорить, что при микроинъекции в КБ раствора пенициллина развивалась тенденция увеличения продолжительности фазы инспирации. Максимальное пролонгирование вдоха было зарегистрировано на 25-й мин после микроинъекции антагониста и составило 35,0 % ( $p < 0,05$ ) от исходного уровня. Изменения длительности экспирации отличались меньшей закономерностью, имели отчетливый двухфазный характер и проявлялись уменьшением значений к концу экспозиции. За счет этих изменений формировалась динамика частоты дыхания, определяемая, главным образом, отклонениями вдоха. Частота дыхания достоверно уменьшалась, особенно заметно начиная с 20-й мин после инъекции блокатора в КБ, максимальное отклонение параметра (на 23,3 %,  $p < 0,05$ ) отмечалось на 25-й мин экспозиции (рис. 3, а).

Из гистограмм, представленных на рис. 3, б, видно, что микроинъекция  $10^{-9}$  М раствора пенициллина в КПБ, в отличие от инъекций в КБ, не вызывала каких-либо определенных и статистически значимых изменений длительности вдоха. Напротив, реакция удлинения экспираторной фазы формировалась сразу после инъекции и к 10-й мин воздействия антагониста приобретала достоверный

характер. Частота дыхания при этом снижалась, а дыхательный объем увеличивался (рис. 3, б).

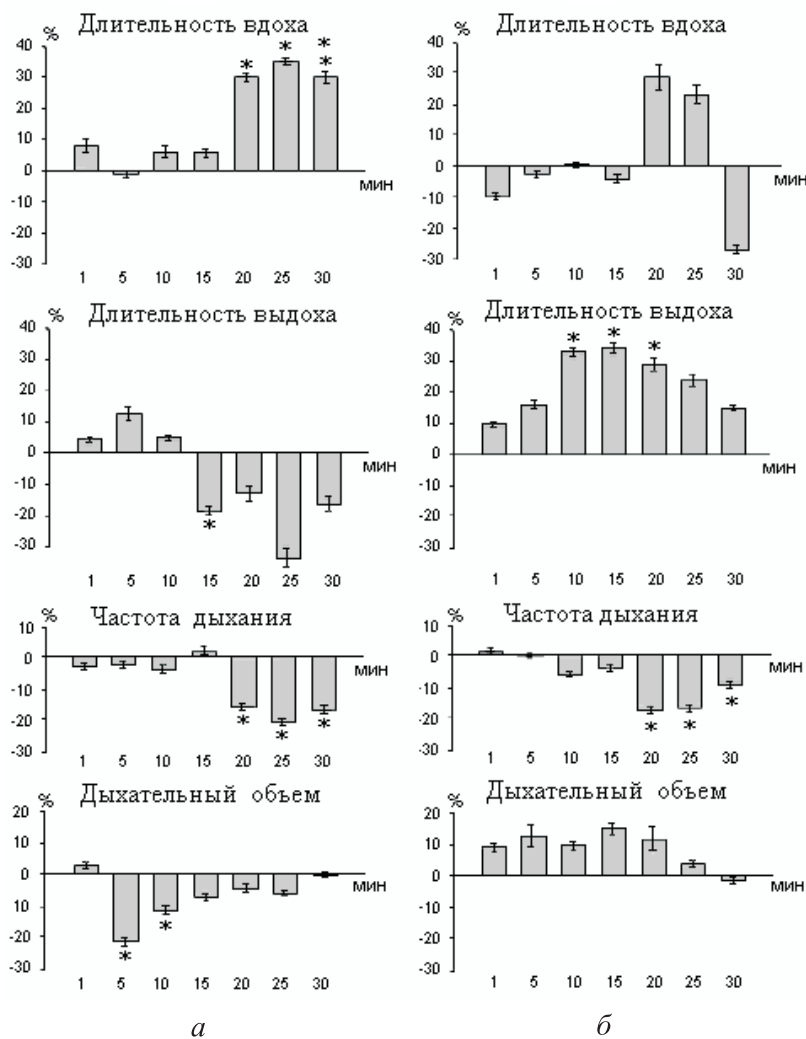


Рис. 3. Изменение (в % от исходного уровня) временных и объемных параметров паттерна внешнего внешнего дыхания у крыс в разные сроки после микроинъекции  $10^{-9}$  М раствора пенициллина в комплекс Бетцингера (а) и в комплекс пре-Бетцингера (б) (\* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$ )

### 3. Обсуждение результатов

В ходе исследования установлено, что микроинъекции ГАМК как агониста и пенициллина как антагониста ГАМК-рецепторов в область КБ и КПБ приводят к

разнообразным респираторным эффектам. Эти результаты, с одной стороны, свидетельствуют об участии ГАМК-рецепторов в деятельности нейронных сетей КБ и КПБ, а с другой — указывают на их разную функциональную роль в механизмах регуляции фазовой структуры цикла дыхания и его объемных показателей. Из литературных источников известно, что в КБ доминируют экспираторные нейроны [4; 15]. Вероятно, этим в определенной степени объясняется тот факт, что при микроинъекции растворов ГАМК в указанную область наблюдается удлинение фазы выдоха в сочетании с тенденцией уменьшения продолжительности вдоха и, как следствие этого, достоверное снижение частоты дыхания. Эти данные свидетельствуют, что при активации ГАМКергических структур, имеющихся в области КБ, происходит подавление респираторного ритма, что совпадает с результатами исследований других авторов [19]. Эффекты активации ГАМК-рецепторов КПБ в известной мере отличались от респираторных реакций, вызываемых микроинъекциями ГАМК в КБ. Основное различие заключалось в том, что действие ГАМК на КПБ способствовало снижению частоты дыхания за счет пролонгирования обеих фаз дыхательного цикла. Объяснением такой специфики реакций может служить нейронная организация КПБ. В настоящее время этот отдел дыхательного центра рассматривают как некую группу ритмогенерирующих нейронов, основными среди которых являются преинспираторные нейроны [10; 15; 18; 22]. В отдельных работах в опытах на крысах показано, что регуляция частоты дыхательного ритма осуществляется ранними инспираторными и постинспираторными нейронами КПБ [2]. Можно предположить, что в результате действия ГАМК на КПБ тормозятся ранние инспираторные нейроны и активируются заторможенные перед этим постинспираторные нейроны, что и приводит к увеличению длительности инспираторной и экспираторной фаз дыхания. Наблюдаемое на этом фоне уменьшение дыхательного объема может быть связано с компенсаторным ослаблением активности премоторных и моторных инспираторных нейронов, локализованных за пределами КПБ, но имеющих с ним билатеральные связи [13].

Неоднозначное действие раствора ГАМК на КБ и КПБ может быть связано с различной чувствительностью к изучаемому нейромедиаторному веществу и разными механизмами активации имеющихся здесь ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов. В частности, как свидетельствуют литературные данные, активация метаботропных ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов происходит более низкими концентрациями агонистов, чем ионотропных ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов [14; 17]. Кроме того, интенсивность ГАМКергической передачи модулируется ее сложными взаимодействиями с другими нейротрансмиттерными механизмами. Например, для КПБ продемонстрирована локализация ГАМК<sub>B</sub>-сайтов с  $\mu$ -опиатными и нейрокининовыми рецепторами [16], а также установлено наличие рецепторов соматостатина, глутамата, тиролиберина, серотонина [9].

Анализируя изменения частотно-временных параметров паттерна дыхания при микроинъекциях растворов пенициллина в КБ, прежде всего необходимо отметить эффект снижения частоты дыхания, который формировался, главным образом, за счет увеличения длительности инспираторной фазы. Возможным объяснением данного эффекта может быть то, что поздние инспираторные нейроны, расположенные в КБ наряду с экспираторными, являются тормозными нейронами, переключаящими инспирацию на экспирацию [20]. По всей видимости, в момент действия антагониста поздние инспираторные нейроны растормаживаются, в результате чего их разряды пролонгируются и способствуют пролонгированию вдоха. Отмечаемое на этом фоне снижение величины дыхательного объема,

вероятно, обусловлено ослаблением активности премоторных инспираторных нейронов других структур дыхательного центра, в частности, вентральной респираторной группы [3]. Отмеченный характер изменений фаз дыхания при блокаде ГАМКергической передачи на уровне КПБ можно связать с тем, что пенициллин, оказывающий свое тормозное влияние преимущественно через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы [17], участвует в экспираторном торможении инспираторных нейронов, что подтверждается в наших экспериментах тенденцией укорочения вдоха и эффектом выраженного пролонгирования выдоха. Оценивая механизмы наблюдаемых реакций дыхания, необходимо указать, что ГАМК, являясь главным тормозным нейротрансмиттером, ограничивает возбуждающий стимул как пресинаптически через ГАМК<sub>B</sub>-рецепторы, функционально связанные с потенциал-зависимыми кальциевыми каналами, так и постсинаптически через ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, ассоциированные с потенциал-зависимыми хлорными каналами [5; 7]. Поскольку наиболее закономерным респираторным эффектом при введении пенициллина в КБ и КПБ оказалось снижение частоты дыхания, то, опираясь на мнение [17], механизм тормозного действия данного ГАМК<sub>A</sub>-антагониста в изучаемых ядрах можно связать с блокадой хлор-ионного тока через ионофор ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов.

## Заключение

Таким образом, с учетом полученных экспериментальных данных можно заключить, что ГАМКергическая система на уровне КБ примерно в равной степени вовлечена в механизмы контроля фазовой структуры дыхательного цикла и глубины дыхания, тогда как в области КПБ ГАМК принимает более активное участие в регуляции временных параметров дыхания. Специфика респираторных реакций у крыс, наблюдаемая при воздействии ГАМК и пенициллина на КБ и КПБ, возможно, связана с различным представительством ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов и их неоднозначной ролью в процессах формирования ритма и модуляции паттерна внешнего дыхания в изучаемых отделах дыхательного центра.

## Литература

- [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] Андрианов Б.А. Нейрофизиологическая и нейроанатомическая организация пре-Бецингера комплекса и его роль в формировании дыхательного ритма: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Самара, 2005. 21 с.
- [3] Ведясова О.А., Ковалев А.М. Реакции дыхания на микроинъекции ГАМК и пенициллина в различные отделы вентральной респираторной группы // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 2. С. 137–141.
- [4] Дыхательный центр и регуляция его деятельности супрабульбарными структурами // Н.А. Меркулова [и др.]. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2007. 170 с.
- [5] Калуев А.В. Как организован хлорный ионофор ГАМК<sub>A</sub>-рецептора // Нейронауки. 2006. № 3 (5). С. 31–43.
- [6] Раевский К.С., Георгиев В.П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрхимические аспекты. М: Медицина, 1986. 239 с.

- [7] Семьянов А.В. Диффузная внесинаптическая нейротрансмиссия посредством глутамата и ГАМК // Журн. высш. нерв. деят. им. И. П. Павлова. 2004. Т. 5. № 1. С. 66–82.
- [8] Тараканов И.А., Сафонов В.А. Нейрогуморальные механизмы некоторых патологических форм дыхания центрального генеза // Современные аспекты клинической физиологии в медицине: сб. статей, посв. 110-летию со дня рожд. М.В. Сергиевского. Самара: Волга-Бизнес, 2008. С. 72–77.
- [9] Alheid G.F., McCrimmon D.R. The chemical neuroanatomy of breathing // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2008. V. 16. P. 3–11.
- [10] Butera R.J., Rinzell J., Smith J.C. Models of respiratory rhythm generation in the Pre-Bötzinger complex. II. Populations of coupled pacemaker neurons // *J. Neurophysiol.* 1999. V. 81. P. 398–415.
- [11] 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. V. 821. № 2. P. 3–6.
- [12] Duffin J. Functional organization of respiratory neurons: a brief review of current question and speculations // *Exp. Physiol.* 2004. V. 89. P. 517–529.
- [13] Duffin J., van Alphen J. Bilateral connections from ventral group inspiratory neurons to phrenic motoneurons in the rat determined by cross-correlation // *Brain Res.* 1995. V. 69. P. 55–60.
- [14] GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B) R1 and GABA(B) R2 / K.A. Jones [et al.] // *Nature.* 1998. V. 396 (6712). P. 674–679
- [15] Hilare G., Duron B. Maturation of the Mammalian Respiratory System // *Physiol. Rev.* 1999. V. 79. № 2. P. 325–360.
- [16] Normal breathing requires pre-Bötzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons / P.A. Gray [et al.] // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. P. 927–930.
- [17] Penicillin blocks human alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S GABAA channels that open spontaneously / C.E Lindquist [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* 2004. V. 95. P. 23–32.
- [18] Ramirez J.M. Respiratory rhythm generation in mammals: synaptic and membrane properties // *Respir. Physiol.* 1997. V. 110. P. 71–85.
- [19] Respiratory responses induced by blockades of GABA and glycine receptors within the Böttinger complex and the pre-Böttinger complex of the rabbit / F. Bongianini [et al.] // *Brain Res.* 2010. V. 13. P. 13–17.
- [20] Respiratory rhythm generation: plasticity of a neuronal network / D.W Richter [et al.] // *Neuroscientist.* 2000. V. 6. P. 188–205.
- [21] Ritter B., Zhang W. Early postnatal maturation of GABAA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generating network of the mouse // *Eur. J. Neurosci.* 2000. V. 12. P. 2975–2984.
- [22] Shao X.M., Feldman J.L. Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Bötzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission // *J. Neurophysiol.* 1997. V. 77. P. 1853–1860.



**COMPARATIVE ANALYSIS OF RESPIRATORY  
REACTIONS TO MICROINJECTION OF GABA  
AND PENICILLIN INTO THE BÖTZINGER COMPLEX  
AND THE PRE-BÖTZINGER COMPLEX IN RATS**

© 2012 N.G. Manshina, O.A. Vedyasova<sup>2</sup>

In acute experiments on anesthetized rats, the respiratory responses to local administration of GABA ( $10^{-5}$  M) and noncompetitive GABAA antagonist penicillin ( $10^{-7}$  M) into Bötzing complex (BC) and pre-Bötzing complex (PBC) were studied. The differences in the responses of respiratory frequency, inspiratory and expiratory duration after injection of GABA into the BC and PBC were found. The effects were more pronounced when GABA administered into the PBC. It is shown that the response of tidal volume, in contrast, was more frequent when both GABA and penicillin injected into the BC. The question of the role of GABA<sub>A</sub> receptors of BC and PBC in the realization of the inhibitory action of GABA on the temporal and volumetric parameters of breathing pattern is discussed.

**Key words:** respiration, Bötzing complex, pre-Bötzing complex, GABA, penicillin.

Paper received 29/II/2012.

Paper accepted 29/II/2012.

---

<sup>2</sup>Manshina Nadezhda Gennadievna ([man\\_shan@mail.ru](mailto:man_shan@mail.ru)), Vedyasova Olga Alexandrovna ([olgavedyasova@rambler.ru](mailto:olgavedyasova@rambler.ru)), the Dept. of Human and Animal Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.