

УДК 612.282:612.285

## ГАСТРИН-РИЛИЗИНГ ПЕПТИД — ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ УЧАСТНИК БУЛЬБАРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ ДЫХАНИЯ

© 2011 А.А. Алиев<sup>1</sup>

В статье обсуждается роль гастрин-релизинг пептида в регуляции дыхания на уровне продолговатого мозга. Предоставляется информация, касающаяся процессинга данного нейропептида и экспрессии его рецепторов в функционально-специфических областях дыхательного центра. Приводятся результаты исследований респираторных эффектов родственного пептида бомбезина, а также влияние микроинъекций гастрин-релизинг пептида в область ядра солитарного тракта на показатели внешнего дыхания и биоэлектрическую активность инспираторных мышц.

**Ключевые слова:** гастрин-релизинг пептид, ядро солитарного тракта, дыхательный центр, бомбезиновые рецепторы.

### Введение

Гастрин-релизинг пептид (GRP) является 27-аминокислотным полипептидом, который относится к семейству, включающему также структурно связанные пептиды амфибий — бомбезин, ранатензин и филлолиторин [1]. Впервые он был выделен из ткани желудка и кишечника свиньи при использовании выделяющегося гастрина в качестве биопробы [2]. Гастрин-релизинг пептид обладает широким спектром физиологических эффектов, таких как регуляция циркадианных ритмов, терморегуляция, регуляция аппетита и чувства насыщения. Помимо эффектов в центральной нервной системе, GRP модулирует активность иммунной системы, в частности макрофагов, обладает трофическими влияниями в нормальных и неопластических клетках, включая аутокринную стимуляцию пролиферации клеток мелкоклеточного рака легких. В желудочно-кишечном тракте данный пептид участвует в регуляции секреции ферментов поджелудочной железы и соляной кислоты желудочного сока, стимулирует сокращение гладкой мускулатуры, а также стимулирует высвобождение ряда гормонов кишечника, включая гастрин [1; 3–6].

Данные последних лет позволяют предполагать непосредственное участие данного нейропептида в центральных механизмах регуляции дыхания. В пользу этого свидетельствуют представленность гастрин-релизинг пептида и его аналогов

<sup>1</sup>Алиев Артем Алиевич (ruptrih@yandex.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

в стволе мозга, а также наличие специфических рецепторов к гастрин-рилизинг пептиду [7; 8].

## 1. Особенности лиганд-рецепторной селективности GRP

Влияния GRP на деятельность органов и систем организма, в первую очередь, определяются активацией специфических бомбезиновых рецепторов. У млекопитающих данное семейство включает три связанных с G-белками гептаспиральных рецептора: рецептор  $BB_1$  к нейромедину В (NMB-R), рецептор  $BB_2$  к гастрин-рилизинг пептиду (GRP-R) и бомбезиновый рецептор  $BB_3$  (BRS-3). Они широко представлены в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и центральной нервной системе (ЦНС), где опосредуют эффекты в нормальных либо патофизиологических условиях [1; 4].

Открытие и идентификация бомбезиновых рецепторов происходили с использованием клонирования тканей и изучением сродства различных лигандов к соответствующим рецепторам. Предпочтительное связывание с тем или иным агонистом явилось основой для классификации рецепторов [1].

Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия гастрин-рилизинг пептида позволяют утверждать, что он является селективным агонистом  $BB_2$ -подтипа рецепторов. В частности, GRP обладает в 11–820 раз более высокой аффинностью к  $BB_2$ -подтипу, чем к  $BB_1$ . В свою очередь, GRP-R имеет в 50–310 раз более высокое сродство к гастрин-рилизинг пептиду, чем к другому бомбезин-родственному пептиду — нейромедину В. Значительный разброс в кратности аффинности связан с рассматриваемыми видами животных [9]. Стоит отметить, что бомбезин, являющийся первым выделенным представителем семейства бомбезин-родственных пептидов, имеет одинаково высокую аффинность как к GRP-R, так и к NMB-R [1; 6; 9]. Связывание с  $BB_2$ -подтипом рецептора происходит для гастрин-рилизинг пептида и бомбезина с одинаковой аффинностью, составляющей  $2,7 \pm 0,2$  нМ ( $IC_{50}$ ), тогда как к  $BB_1$ -подтипу аффинность бомбезина выше, чем GRP ( $IC_{50} = 5,3 \pm 0,4$  и  $30,8 \pm 1,2$  нМ, соответственно) [9].

## 2. Гастрин-рилизинг пептид в регуляции дыхания

Интерес к гастрин-рилизинг пептиду в отношении его вовлеченности в нейрохимические механизмы функционирования дыхательного центра вызван рядом исследовательских работ, указывающих на распределение данного пептида и его рецепторов в продолговатом мозге. В частности, при использовании гибридизации *in situ* удалось обнаружить матричную РНК гастрин-рилизинг пептида в ядре солитарного тракта (ЯСТ) [8]. Как известно, данная структура входит в состав дыхательного центра, и в ее вентролатеральной части расположена дорсальная респираторная группа [10]. Являясь центральным координатором кардиореспираторных процессов, ядро солитарного тракта получает афферентные волокна от рецепторов растяжения легких и рецепторов воздухоносных путей, проходящие в составе блуждающего (X) и языкоглоточного нерва (IX) [10]. Умеренный гибридационный сигнал на присутствие мРНК GRP был обнаружен в медиальных областях ЯСТ, дорсальном моторном ядре блуждающего нерва, а также в парабрахимальных ядрах. Обособленные популяции клеток с умеренным гибридационным

сигналом на мРНК GRP найдены в вентролатеральных областях ЯСТ, локализованных латерально от ростральной части моторного ядра блуждающего нерва [8]. В данной области залегают вентролатеральные подъядра ЯСТ, преимущественно содержащие инспираторные нейроны дорсальной респираторной группы [10]. Слабый гибридационный сигнал наблюдался в ростровентролатеральном ретикулярном ядре и ядре Келликера-Фьюза [8]. Двойное иммуногистохимическое маркирование в исследованиях на мышах, показало, что субпопуляции рецепторов к гастрин-релизинг пептиду (GRP-R) присутствуют в ГАМКергических нейронах миндалины и ЯСТ [3; 7]. В ядре солитарного тракта обнаружена умеренная иммунореактивность GRP-содержащих нейронов. Предполагается, что GRP/GRP-R система влияет на память за счет модуляции высвобождения нейротрансмиттера в локальной ГАМКергической сети [7; 11]. В пользу того что GRP может являться котрансмиттером ГАМК, свидетельствует экспрессия  $BB_2$ -подтипа рецепторов на ГАМКергических интернейронах полиморфного слоя гиппокампа. Активация данных рецепторов гастрин-релизинг пептидом вызывает сильные входящие токи и деполяризацию визуально идентифицированных интернейронов в срезах полиморфного слоя гиппокампа *in vitro*, что приводит к увеличению внеклеточного уровня ГАМК [12]. Присутствие эндогенного GRP в ядре солитарного тракта также продемонстрировано иммуногистохимически при использовании антисыворотки к N- и C-концам нейропептида. Иммунореактивность обнаруживалась в ядре солитарного тракта, в самом солитарном тракте, в близлежащем моторном ядре вагуса, а также в *area postrema* и желатинозной субстанции, отделяющей ЯСТ от *area postrema*. Позитивное иммунохимическое окрашивание наблюдалось в густой сети нервных волокон, которые проецируются вдоль ствола мозга. Иммунохимически маркированные клеточные тела располагались рострально от обих, главным образом, в медиолатеральных подъядрах ЯСТ. Данные нейроны, проецирующиеся каудально по направлению к комиссуральным подъядрам ЯСТ [13], включают нервные клетки второго порядка, которые принимают моносинаптические входы от быстроадаптирующихся рецепторов растяжения легких [14; 15]. Они же имеют длинные дендриты, направленные латерально и вентролатерально к ретикулярной формации, амбигуальному и фациальному ядрам [15].

В экспериментах на неонатальных крысах при использовании гибридизации *in situ* и клонированных молекул цДНК GRP и NMB в качестве области умеренной экспрессии мРНК  $BB_1$  и  $BB_2$ -подтипов рецептора было определено амбигуальное ядро [16]. Более того, эксперименты с инъекциями бомбезина в область *p.ambiguus*, проведенные на плетизмографической модели крыс, продемонстрировали дозозависимое увеличение дыхательного объема, тогда как частота дыхания снижалась при повышении концентрации пептида. Подобные эффекты не проявлялись при двустороннем пересечении блуждающего нерва [17].

Стоит отметить, что влияния микроинъекций GRP в различные функционально-специфические области дыхательного центра на показатели внешнего дыхания до настоящего времени не изучались. Тем не менее, подобные работы выполнялись с бомбезином. В частности, введение 0,1 нМ–0,1 мМ бомбезина в пре-Бетцингеров комплекс приводило к увеличению вентиляции легких с возрастанием частоты дыхания при снижении продолжительности экспирации. Одновременно наблюдалось укорочение межзальповых интервалов на ЭМГ диафрагмы и наружных межреберных мышц. Также на поперечных срезах ствола мозга крыс проводилось измерение мембранного потенциала, входного сопротивления и паттерна спонтанной активности нейронов пре-Бетцингера комплекса при аппликации бомбезина (1 нМ) в перфузионный раствор. В большинстве случаев (68 %) про-

исходили деполяризация мембраны, увеличение входного сопротивления и рост спайковой активности у спонтанно активных клеток [18]. В экспериментах с микроинъекциями  $10^{-13}$ – $10^{-4}$  М бомбезина в область ядра солитарного тракта наркотизированных крыс происходила стимуляция дыхания, что сопровождалось возрастанием уровня легочной вентиляции, дыхательного объема и биоэлектрической активности инспираторных мышц. Наиболее выраженные реакции дыхания возникали под влиянием средних концентраций пептида ( $10^{-10}$ – $10^{-7}$  М). Предполагается, что респираторная активность бомбезина в ядре солитарного тракта заключается в угнетении рефлекса Геринга — Брейера [19].

Однако, как уже отмечалось выше, бомбезин обладает одинаковой аффинностью как к  $BB_1$ , так и  $BB_2$  рецепторам, тогда как GRP является селективным агонистом  $BB_2$  подтипа, и его респираторные эффекты будут определяться, в первую очередь, экспрессией GRP-R в функционально-специфичных областях дыхательного центра. В отличие от бомбезина, выделенного у амфибий, гастрин-рилизинг пептид, наряду с нейромедином В, является специфичным для млекопитающих эндогенным нейропептидом [8].

В нашей работе исследовались реакции внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц на микроинъекции GRP в область ядра солитарного тракта. Эксперименты выполнялись на крысах массой 200–250 г, наркотизированных уретаном. Гастрин-рилизинг пептид ( $10^{-5}$  М) растворяли в искусственной цереброспинальной жидкости и вводили с помощью микрошприца через стеклянную микропипетку в объеме 50 нл в исследуемую область мозга. В контрольных экспериментах в ту же область инъецировали 50 нл искусственной цереброспинальной жидкости (см. рисунок).

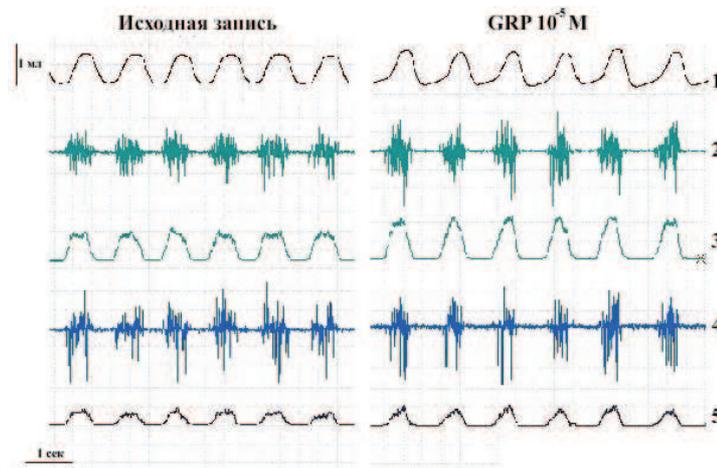


Рис. 1. Реакции паттерна дыхания (1), ЭМГ диафрагмы (2) и ее интегрированной производной (3), ЭМГ наружных межреберных мышц (4) и ее интегрированной производной (5) на микроинъекции  $10^{-5}$  М гастрин-рилизинг пептида в область ядра солитарного тракта

Микроинъекции GRP приводили к увеличению дыхательного объема на  $0,1 \pm 0,02$  мл ( $p < 0,01$ ). За счет возрастания продолжительности экспирации на  $0,15 \pm 0,03$  с ( $p < 0,01$ ) происходило снижение частоты дыхания на  $9 \pm 1$  мин $^{-1}$  ( $p < 0,01$ ). Статистически значимых изменений длительности вдоха не выявлено.

Реакции характеризовались коротким латентным периодом (1 минута). Реакции временных показателей дыхания имели максимальную выраженность на 4–8 минутах после инъекции, тогда как пик реакции амплитудных показателей приходился на 15–20 минуту.

## Заключение

Данные выполненных экспериментов, в которых введение гастрин-релизинг пептида в область локализации дорсальной респираторной группы приводило к изменениям биоэлектрической активности инспираторных мышц и паттерна внешнего дыхания, а также данные об экспрессии специфических рецепторов в исследуемой области мозга [8; 13], указывают на непосредственное участие эндогенного гастрин-релизинг пептида в регуляции дыхания. Гипотеза о вовлеченности бомбезиновых рецепторов в деятельность дыхательного центра подтверждается также результатами наших предшествующих работ, выполненных с неспецифичным для млекопитающих нейропептидом — бомбезином [19].

## Литература

- [1] International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian Bombesin Receptors: Nomenclature, Distribution, Pharmacology, Signaling, and Functions in Normal and Disease States / R.T. Jensen [et al.] // *Pharmacol Rev.* 2008. V. 60. P. 1–42.
- [2] Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue / T.J. McDonalda [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1979. V. 90. Issue 1. P. 227–233.
- [3] Ohki-Hamazaki Hiroko, Iwabichi Maiko, Maekawa Fumihiko. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors // *Int. J. Dev. Biol.* 2005. V. 49. P. 293–300.
- [4] Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates / Hideki Sano [et al.] // *Genomics.* 2004. V. 84. P. 139–146.
- [5] Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide / E.R. Spindel [et al.] // *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 1984. V. 81. P. 5699–5703.
- [6] Bombesin and its family of peptides: prospects for the treatment of obesity / K. Yamada [et al.] // *European Journal of Pharmacology.* 2002. V. 440. Issues 2–3. P. 281–290.
- [7] Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain / S. Kamichia [et al.] // *Brain Research.* 2005. V. 1032. P. 162–170.
- [8] Neuromedin B and Gastrin-Releasing Peptide mRNAs Are Differentially Distributed in the Rat Nervous System / E. Wada [et al.] // *The Journal of Neuroscience.* 1990. V. 10. Issues 9. P. 2917–2930.
- [9] Molecular Basis of the Selectivity of Gastrin-Releasing Peptide Receptor for Gastrin-Releasing Peptide / K. Tokita [et al.] // *Mol Pharmacol.* 2002. V. 61. P. 1435–1443.
- [10] Alheid G.F., McCrimmon D.R. The chemical neuroanatomy of breathing // *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2008. V. 164. P. 3–11.
- [11] Facilitation of the inhibitory transmission by gastrin-releasing peptide in the anterior cingulate cortex / Cao [et al.] // *Molecular Pain.* 2010. V. 6. P. 52.

- [12] Effect of gastrin-releasing peptide on rat hippocampal extracellular GABA levels and seizures in the audiogenic seizure-prone DBA/2 mouse / N. Andrews [et al.] // *Brain Research*. 2000. V. 859. P. 386–389.
- [13] King B.F., Jonesa M.V., Ewarta W.R. Immunohistochemical localisation of a gastrin-releasing peptide-like material in area postrema, nucleus of the solitary tract and vagal motor nucleus in the brainstem of rat // *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1989. V. 28. Issue 2. P. 97–104.
- [14] Lipski J., Ezure K., Wong She RB. Identification of neurons receiving input from pulmonary rapidly adapting receptors in the cat // *J. Physiol*. 1991. V. 443. P. 55–77.
- [15] Morphology of pulmonary rapidly adapting receptor relay neurons in the rat / K. Otake [et al.] // *J. Comp Neurol*. 2001. V. 430. Issue 4. P. 458–470.
- [16] Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in postnatal rat central nervous system / E. Wada [et al.] // *Mol Cell Neurosci*. 1992. V. 3. Issue 5. P. 446–460.
- [17] A centrally elicited respiratory stimulant effect by bombesin in the rat / J. Hedner [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. 1985. V. 115. Issue 1. P. 21–29.
- [18] Инюшкин А.Н., Глазкова Е.Н. Респираторные эффекты бомбезина на уровне пре-Бетцингерова комплекса крыс // *Российский физиологический журнал*. 2007. № 8. С. 914–925.
- [19] Инюшкин А.Н., Глазкова Е.Н. Респираторные реакции на микроинъекции бомбезина в ядро солитарного тракта и их механизм реализации // *Российский физиологический журнал*. 2005. № 5. С. 521–529.

Поступила в редакцию 10/XI/2010;  
в окончательном варианте — 10/XI/2010.

## GASTRIN-REALISING PEPTIDE — POTENTIAL PARTICIPANT INVOLVED IN THE BULBAR MECHANISMS OF THE REGULATION OF BREATHING

© 2011 A.A. Aliev<sup>2</sup>

In the article we review the role of gastrin-realising peptide in the respiratory control at the level of the medulla. The information concerning the distribution of this neuropeptide and its receptors expression in the functionally-specific regions of the respiratory center is presented. We also review some data about respiratory effects of related peptide — bombesin. The effects of gastrin-realising peptide microinjections into the nucleus tractus solitarii on the main parameters of breathing pattern and the activity of inspiratory muscles are presented.

**Key words:** gastrin-realising peptide, solitary tract nucleus, respiratory center, bombesin receptors.

Paper received 10/*XI*/2010.

Paper accepted 10/*XI*/2010.

---

<sup>2</sup>Aliev Artem Alievich ([ruptrih@yandex.ru](mailto:ruptrih@yandex.ru)), the Dept. of Human and Animals Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.