

УДК 612.28

РЕСПИРАТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРИ МИКРОИНЪЕКЦИЯХ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И БИКУКУЛЛИНА В ОБЛАСТЬ ВЕНТРАЛЬНОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ГРУППЫ У КРЫС

© 2007 О.А. Ведясова, А.М. Ковалев¹

В острых опытах на крысах, наркотизированных уретаном, изучены изменения паттерна дыхания при микроинъекциях 10^{-3} М растворов ГАМК и бикикуллина в ростральный отдел вентральной респираторной группы (rVRG). Показано, что респираторные эффекты воздействия ГАМК и бикикуллина на продолжительность вдоха, выдоха и величину легочной вентиляции имеют противоположный характер. Обсуждается вопрос об участии ГАМК_A-рецепторов области rVRG в опосредовании тормозного действия ГАМК на бульбарные механизмы, определяющие длительность фаз дыхательного цикла.

Введение

Интегративная деятельность дыхательного центра (ДЦ) опосредуется многочисленными нейроактивными веществами – регуляторами и модуляторами эндогенной природы, среди которых важная роль принадлежит нейротрансмиттерам. Согласно литературным данным, в генерации и регуляции дыхательного ритма участвуют более 13 нейротрансмиттеров [12, 13] среди которых особое значение имеют медиаторы тормозной природы, и в частности, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК). Эффекты действия ГАМК и ее производных на функцию дыхания, исследованы достаточно подробно [1, 5, 6, 7, 21]. В частности, среди фактов, отражающих участие ГАМК в работе ДЦ, следует отметить уменьшение респираторной активности при микроподведении растворов данного медиатора к отдельным дыхательным нейронам, относящимся к категориям как ритмогенерирующих, так и паттернформирующих клеток ДЦ [5, 8]. Из ряда работ следует, что с участием ГАМК в клеточных ансамблях респираторной нейронной сети формируется возвратно-тормозной драйв [5, 20, 21]. Показано, что ГАМКергическая модуляция нейрональной активности имеет место в тех респираторных нейросетях, которые отвечают за генерацию таких паттернов дыхания как эйпноэ,

¹ Ведясова Ольга Александровна (olgavedyasova@rambler.ru), Ковалев Александр Михайлович, кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

кашель и чихание. Участие ГАМК в респираторном ритмогенезе подтверждается тем, что ее микроинъекция в комплекс пре-Бетцингера подавляет респираторный ритм, а введение блокаторов ГАМК-рецепторов, наоборот, вызывает увеличение частоты дыхания в сочетании с синхронным ослаблением моторного выхода из ДЦ [16, 20]. Следует также отметить, что сравнительный анализ результатов исследований на взрослых и новорожденных животных позволяет считать, что механизмы синхронизации респираторной активности на всех стадиях онтогенеза млекопитающих имеют общий ГАМКергический компонент [17].

Вместе с тем, нельзя не указать, что рецепторные механизмы реализации эффектов ГАМК на активность ДЦ, в том числе на деятельность его функционально различных нейронных скоплений, являются малоизученными и составляют одну из актуальных проблем нейрофизиологии дыхания. В частности, открытым остается вопрос о роли ГАМКергической системы в регуляции дыхания на уровне вентральной респираторной группы (VRG), которая привлекает к себе внимание в связи с наличием в ее пределах клеточных популяций, отвечающих за формирование ритма и паттерна дыхания. Эти процессы обеспечивают выявленные в составе VRG четыре класса респираторных нейронов, в том числе преинспираторные, постинспираторные, а также инспираторные и экспираторные клетки с возрастающим паттерном активности [18, 19]. VRG, как наиболее крупный кластер центрального механизма регуляции дыхания, принято делить на две части – ростральную (rVRG) и каудальную (иногда выделяют третью – промежуточную область), которые различаются по анатомическим и функциональным признакам [2, 8, 11].

Целью нашей работы было изучение особенностей и механизмов включения ГАМКергической медиации у крыс в управление паттерном дыхания на уровне rVRG путем анализа респираторных эффектов при микроинъекциях в указанную область ДЦ растворов ГАМК и специфического антагониста ГАМК_A-рецепторов бикукуллина.

Методика исследований

Были поставлены острые эксперименты на 14 беспородных крысах, массой 200 – 250 г, наркотизированных уретаном (1,5 мг/кг массы, внутривенно). После наркотизации крысам делалась операция трахеотомии, после чего их переворачивали спиной вверх, фиксировали голову в стереотаксическом приборе СЭЖ-3 в положении вентрального сгибания и проводили трепанацию затылочной кости с целью осуществления доступа к дорсальной поверхности продолговатого мозга.

Растворы ГАМК (γ -aminobutyric acid, ICN Pharmaceuticals, Inc.) и бикукуллина (bicuculline, ICN Pharmaceuticals, Inc.) для микроинъекций готовились *ex tempore* в концентрации 10^{-3} М. Концентрация веществ достигалась методом разведения 1 мг ГАМК или 3 мг бикукуллина в 10 мл искусственной спинномозговой жидкости.

Инъекции растворов в rVRG проводились в объеме 0,2 мкл через стеклянную микропипетку, укрепленную на игле микрошприца, по координатам стереотаксического атласа [15]: 1,0 мм роstralнее обех; 2,0 мм латеральнее срединного шва; 2,5 мм вглубь от поверхности продолговатого мозга.

Респираторные эффекты, вызываемые введением ГАМК и бикикуллина, оценивали по изменениям паттерна внешнего дыхания, который регистрировали методом спирографии. Для этого в трахею животного вводили канюлю и соединяли ее с миниатюрным спирографом, сигналы от которого через специальные преобразующие устройство поступали для регистрации на компьютер. Спирограммы записывались в специальной программе «Rats» в определенной последовательности: в исходном состоянии (до микроинъекции) и через 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 минут после микроинъекции растворов ГАМК и бикикуллина в rVRG.

На спирограммах измеряли основные временные и амплитудные параметры паттерна дыхания: длительность инспирации и экспирации (с), общую продолжительность дыхательного цикла (с) и дыхательный объем (мл). На основе этих показателей рассчитывали частоту дыхания (мин^{-1}) и легочную вентиляцию (минутный объем дыхания, мл/мин).

Статистическую обработку результатов исследования проводили методом прямых разностей с использованием парного t-теста в программах Excel 7.0 и SigmaStat.

Результаты исследований

В ходе исследования установлено, что локальные инъекции ГАМК и бикикуллина в концентрации 10^{-3} М в rVRG крыс вызвали у животных респираторные эффекты, которые выражались изменением всех анализируемых параметров спирограммы, что свидетельствует об участии ГАМКергической системы в центральных механизмах регуляции дыхания на уровне изучаемой области ДЦ. Оценивая наблюдаемые реакции, прежде всего следует отметить, что активация ГАМК-рецепторов в области rVRG экзогенным медиатором проявлялась различной выраженностью и направленностью изменений временных и амплитудных параметров паттерна внешнего дыхания. В частности, продолжительность фаз дыхательного цикла в указанных экспериментальных условиях имела тенденцию к незначительному уменьшению.

Как видно из рис. 1, микроинъекции ГАМК вызывали укорочение фазы вдоха с максимальным проявлением эффекта на 5-й минуте экспозиции. Данная реакция сочеталась с постепенным уменьшением во времени длительности выдоха, которая достигала наименьших значений на 30-й минуте после введения вещества в ДЦ. Интегральным результатом укорочения фаз дыхания явилась динамика частоты дыхания, которая после микроинъекции ГАМК в rVRG отличалась тенденцией к возрастанию значений параметра с первой минуты экспозиции.

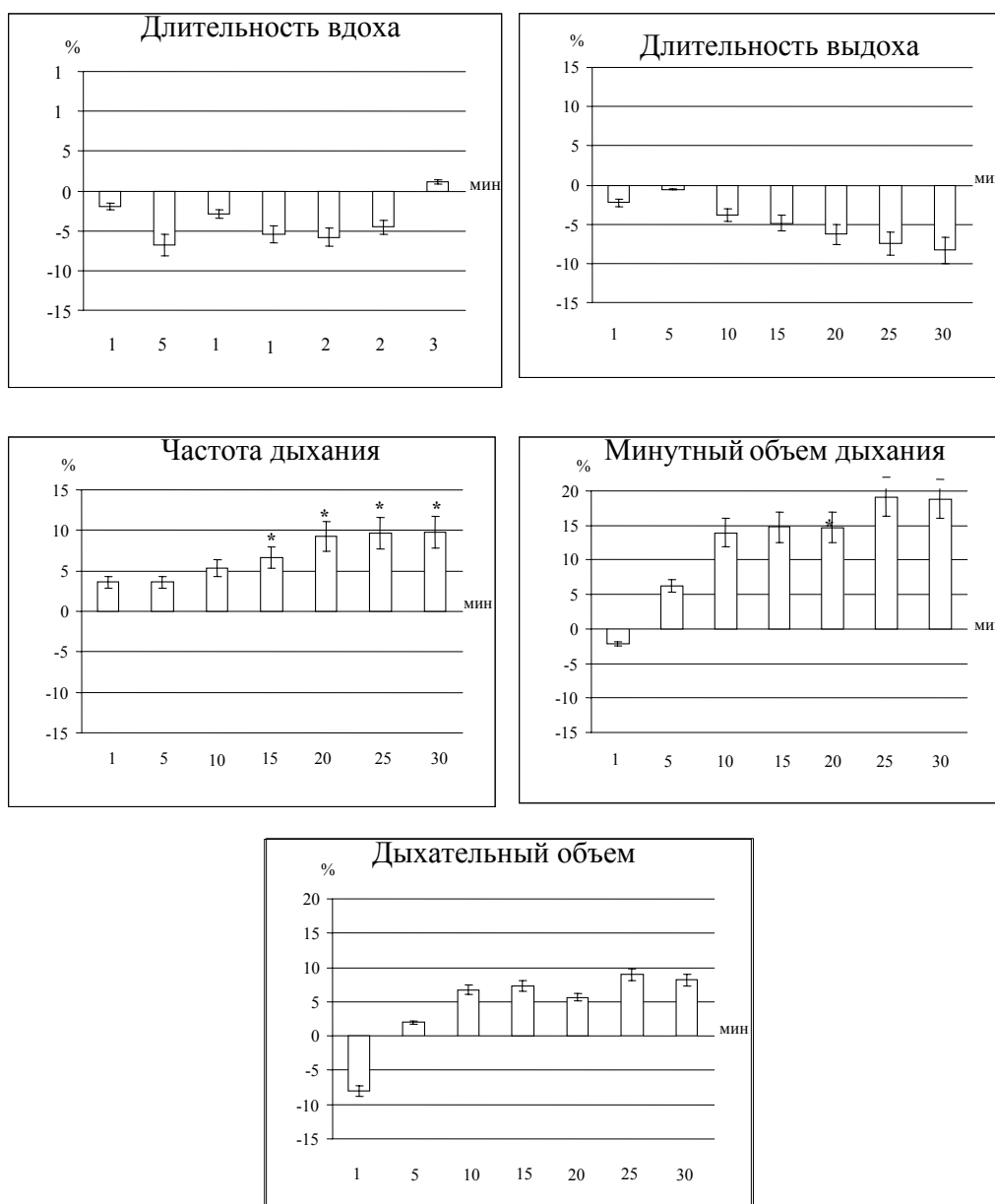


Рис. 1. Изменения (в процентах от исходного уровня) частотно-временных параметров паттерна внешнего дыхания в разные сроки после микроинъекции 10^{-3} М раствора ГАМК в rVRG крыс. * – $p < 0,05$

В интервале с 15-й по 30-ю минуты воздействия нейроактивного агента изменения частоты дыхания приобретали достоверный характер и на момент максимальных отклонений от исходного уровня достигали 9,8 % ($p < 0,05$).

Перестройки частотно-временных параметров паттерна дыхания, отмеченные в условиях активации ГАМК-рецепторов на уровне rVRG, сопровождались опре-

деленными изменениями объемных характеристик регистрируемых спирограмм (рис. 1). Анализ полученных записей позволяет констатировать, что микроинъекция ГАМК в rVRG, в целом, приводила к увеличению значений дыхательного объема у животных, однако, данная реакция развивалась постепенно и могла иметь во времени двухфазную динамику.

Как правило, на 1-й минуте экспозиции отмечалось небольшое уменьшение глубины вдоха, которое, начиная с 5-й минуты наблюдений, сменялось ее постепенным нарастанием. Максимальное отклонение анализируемого параметра от исходной величины составляло 8,9 % и было приурочено к окончанию экспозиции. По срокам это совпадало с наибольшей степенью изменений временных параметров спирограмм. Поскольку увеличение объема дыхания происходило на фоне снижения длительности вдоха, то данный эффект можно рассматривать как изовентиляторную перестройку паттерна дыхания компенсаторно-приспособительного характера.

Рост частоты и объема дыхания в ответ на активацию ГАМК-рецепторов rVRG обусловил достаточно выраженное увеличение такого интегрального показателя спирограммы как легочная вентиляция, о чем можно судить по значениям минутного объема дыхания. Характерно, что в динамике изменений этого параметра прослеживались те же закономерности, что и в изменениях дыхательного объема (рис. 1). Вместе с тем, следует отметить, что увеличение минутного объема дыхания на всех сроках экспозиции имело заметно большую степень выраженности и достоверности (15–20 %; $p < 0,05$), чем увеличение глубины вдоха.

Для выявления мембранных механизмов реализации респираторных эффектов ГАМК на дыхание была поставлена серия экспериментов с локальной блокадой ГАМК_A-рецепторов области вентральной респираторной группы антагонистом ГАМК бикикуллином. Эксперименты показали, что применяемый специфический блокатор ГАМК_A-рецепторов вызывал выраженные респираторные реакции, которые имели направленность, противоположную эффектам самого медиатора. Так, в отличие от ГАМК бикикуллин приводил к увеличению продолжительности инспирации и экспирации (рис. 2).

При этом удлинение инспираторной фазы достоверно проявлялось только в течение первых десяти минут экспозиции (максимум отклонений совпадал с 10-й минутой и составлял 27,6 %; $p < 0,05$), а в последующие сроки имело статистически несущественный характер. Длительность экспираторной фазы менялась в том же направлении, причем выраженность эффекта в данном случае не превышала 21,4 % ($p < 0,05$).

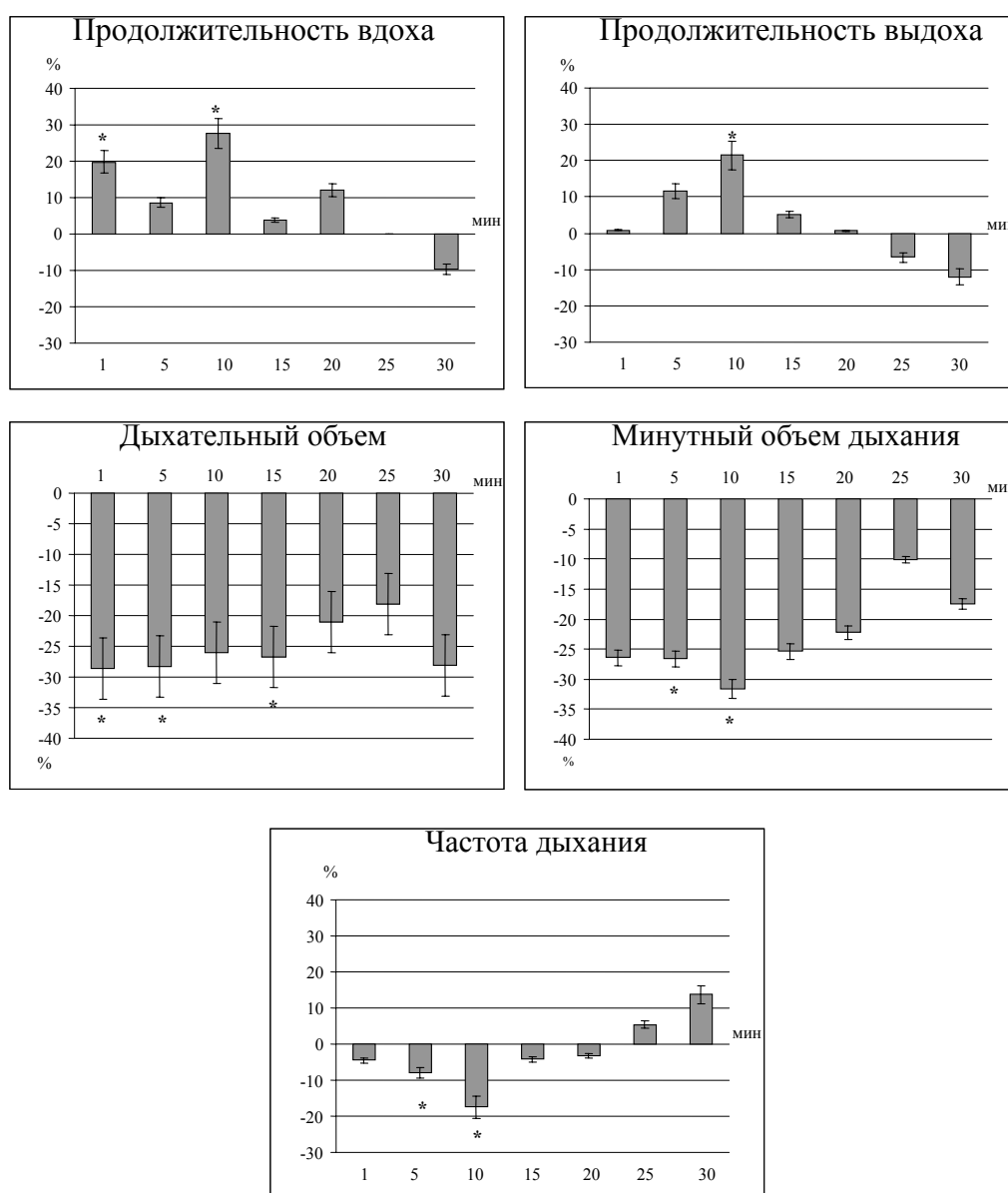


Рис. 2. Изменения (в процентах от исходного уровня) частотно-временных и объемных параметров паттерна внешнего дыхания в разные сроки после микроинъекции 10^{-3} М раствора бикикуллина в гVRG крыс. * – $p < 0,05$

Характер изменений фаз внешнего дыхания у крыс после микроинъекции бикикуллина в ДЦ обусловил соответствующую тенденцию в динамике респираторного ритма. В частности, в первые двадцать минут экспозиции отмечалось урежение частоты дыхания с наибольшей выраженностью на 10-й минуте (17,2 %; $p < 0,05$), а затем параметр начинал изменяться в противоположную сторону. Весьма показательным результатом действия бикикуллина на дыхание яви-

лось существенное уменьшение объема дыхания, свидетельствующее о снижении глубины вдоха в пределах 18,0 – 28,7 % на протяжении всего периода регистрации (рис. 2).

Соответственно характеру сдвигов частоты и глубины дыхания происходило снижение такого интегрального показателя деятельности ДЦ, как минутный объем дыхания. Наиболее существенные отклонения значений минутной вентиляции легких (на 31,6 %; $p < 0,05$) совпадали с начальными сроками воздействия блока-тора ГАМК_A-рецепторов на rVRG (рис. 2).

Обсуждение результатов

Респираторные реакции, наблюдаемые при микроинъекциях ГАМК и биккуллина в rVRG крыс, позволяют говорить о том, что ГАМКергическая система у млекопитающих животных на уровне изучаемого ядра ДЦ вовлечена в механизмы, обеспечивающие контроль за частотно-временными и объемными показателями внешнего дыхания. Характерно, что ГАМК при микроинъекциях в rVRG вызывала широкий спектр изменений ритмики и глубины дыхания, что возможно обусловлено неоднозначностью ее действия на функционально различные нейроны ДЦ в силу наличия у них разных классов ГАМК-рецепторов. Например, есть основания считать, что данный медиатор через ГАМК_A-рецепторы влияет на ранние инспираторные и экспираторные, а через ГАМК_B-рецепторы – на поздние инспираторные и экспираторные нейроны [3].

Типичным эффектом воздействия ГАМК на дыхание в наших экспериментах оказалось уменьшение длительности фаз дыхательного цикла. На наш взгляд, наблюдаемое укорочение вдоха и выдоха является результатом тормозного действия ГАМК на механизмы, регулирующие продолжительность разрядов нейронных элементов, ответственных за временную структуру инспирации и экспирации. Допустимо считать, что наблюдаемые при микроинъекциях ГАМК реакции обусловлены преждевременным прекращением инспирации и экспирации по механизму пресинаптического торможения возбуждающих афферентных входов, поступающих к экспираторным и инспираторным нейронам ростральной части амбигуального ядра и параамбигуальной области, являющихся анатомическими коррелятами rVRG, от других структур ДЦ.

Следует заметить, что источниками предполагаемых афферентных проекций, причем как возбуждающих, так тормозных, к rVRG могут быть нейроны ядра солитарного тракта [14], разные виды инспираторных нейронов комплекса пре-Бетцингера [19], а также поздние экспираторные нейроны с возрастающим типом активности, локализованные в комплексе Бетцингера [9, 10]. При этом нельзя исключать возможности того, что описанные тормозные эффекты опосредуются участием нейроактивных аминокислот-медиаторов, в том числе ГАМК. Возможно, что инъецируемая в ДЦ экзогенная ГАМК, пройдя через цепь метаболических превращений, включается в работу тормозных синапсов, в результате чего формируется экспериментальная модель преждевременного выключения меха-

низмов, обеспечивающих оптимальную (для наличного функционального состояния организма) продолжительность фаз дыхательного цикла. В результате этих процессов на выходе из респираторной нейронной сети происходит учащение ритмики дыхания.

Из литературы известно, что ГАМК действует на две основные группы молекулярных рецепторов – ионотропные рецепторы типа ГАМК_A/ГАМК_C и метаботропные рецепторы типа ГАМК_B [4]. Поэтому при оценке механизмов, лежащих в основе действия ГАМК на функцию дыхания, представляют интерес изменения его паттерна, вызываемые введением в rVRG раствора бикакуллина, способного специфически блокировать ГАМК_A-сайты на мембранах нервных клеток. Тот факт, что реакции ДЦ на микроинъекции бикакуллина носили характер, прямо противоположный реакциям, вызываемым экзогенной ГАМК, дает основание сделать заключение о том, что влияния эндогенного медиатора на паттерн дыхания реализуются, по крайней мере, частично через ГАМК_A-рецепторы области rVRG.

Заключение

Таким образом, из полученных данных следует, что регуляция дыхания структурами rVRG осуществляется с участием ГАМКергической медиации, а один из возможных способов реализации влияний ГАМК на дыхание может заключаться в ее тормозном действии через ГАМК_A-рецепторы на бульбарные механизмы, определяющие продолжительность фаз дыхательного цикла.

Литература

- [1] Ведясова, О.А. Системный компартментно-кластерный анализ механизмов устойчивости дыхательной ритмики млекопитающих / О.А. Ведясова, В.М. Еськов, О.Е. Филатова. – Самара: ООО «Офорт», 2005. – 215 с.
- [2] Инюшкин, А.Н. Сравнительная характеристика реакций паттерна дыхания на микроинъекции каиновой кислоты в различные отделы двойного ядра / А.Н. Инюшкин, Ю.В. Иванова, Е.И. Теньгаев // Росс. физиол. журн. им И.М.Сеченова. – 2002. – Т. 88. – № 7. – С. 914-924.
- [3] Сафонов, В.А. Автоматия или ритмообразование в дыхательном центре / В.А. Сафонов, М.А. Лебедева // Физиология человека. – 2003. – Т. 29. – № 1. – С. 108–121.
- [4] Семьянов, А.В. ГАМКергическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия / А.В. Семьянов // Нейрофизиология. – 2002. – Т. 34. – № 1. – С. 82–92.
- [5] Тараканов, И.А. Действие ГАМК-положительных веществ на хеморефлекторную регуляцию дыхания / И.А. Тараканов, В.А. Сафонов, Л.Н. Тихомирова // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1999. – Т. 128. – № 9. – С. 274–278.
- [6] Федорченко, И.Д. Амигдалофугальная модуляция инспираторно-тормозящего рефлекса Геринга-Брейера / И.Д. Федорченко, Н.А. Меркулова, А.Н. Инюшкин // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – № 4. – С. 371-373.

- [7] Филатова, О.Е., Еськов В.М. Биофизический мониторинг в исследованиях действия ГАМК и ее производных на нейросетевые системы продолговатого мозга / О.Е. Филатова, В.М. Еськов. – Пущино, 1997. – 151 с.
- [8] Bianchi, A.L. Central control of breathing in mammals: neuronal circuitry, membrane properties, and neurotransmitters / A.L. Bianchi, M. Denavit-Saubie, J. Champagnat // *Physiol Rev.* – 1995. – Vol. 75. – No 1. – P. 1–45.
- [9] Dean, J.B. Cell-cell coupling in CO_2/H^+ -excited neurons in brainstem slices / J.B. Dean, E.A. Kinkade, R.W. Putnam // *Respir. Physiol.* – 2001. – Vol. 129. – P. 83–100.
- [10] Ezure, K. Decrementing expiratory neurons of the Botzinger complex. II. Direct inhibitory synaptic linkage with ventral respiratory group neurons / K. Ezure, M. Manabe // *Exp. Brain Res.* – 1988. – Vol. 72. – P. 159–166.
- [11] Feldman, J.L. Breathing: rhythmicity, plasticity, chemosensitivity / J.L. Feldman, G.S. Mitchell, E.E. Nattie // *Annu. Rev. Neurosci.* – 2003. – Vol. 26. – P. 239–266.
- [12] Haxhiu, M.A. Monoaminergic neurons, chemosensation and arousal / M.A. Haxhiu, F. Tolentino-Silva, G. Pete, P. Kc, S.O. Mack // *Respir. Physiol.* – 2001. – Vol. 129. – P. 191–209.
- [13] Hilaire, G. Maturation of the mammalian respiratory system / G.Hilaire, B. Duron // *Physiol. Rev.* – 1999. – Vol. 79. – No 2. – P. 325–360.
- [14] Johnson, S.M. Electrophysiological properties of neurons within the nucleus ambiguus of adult guinea pigs / M.S. Johnson, P.A. Getting // *J. Neurophysiol.* – 1991. – Vol. 66. – P. 744–761.
- [15] Paxinos, G. The rat brain in stereotaxic coordinates / G.Paxinos, Watson C. – Ed. 3. – San Diego: Academic, 1998.
- [16] Respiratory rhythm generation in mammals: synaptic and membrane properties / J.M. Ramirez [et. al.] // *Respir. Physiol.* – 1997. – Vol. 110. – P. 71–85.
- [17] Respiratory rhythm generation: converging concept from in vitro and in vivo approaches? / J.-M. Ramirez [et. al.] // *Respir. Physiol. & Neurobiol.* – 2002. – V. 131. – P. 43–56.
- [18] Rybak, I.A. Modeling neural mechanisms for genesis of respiratory rhythm and pattern. III. Comparison of model performances during afferent nerve stimulation / I.A. Rybak, J.F.R. Paton, J.S. Schwaber // *J. Neurophysiol.* – 1997. – V. 77. – P. 2027–2039.
- [19] The medullary respiratory network in the rat / S.W. Schwarzacher [et. al.] // *J. Physiol. (Lond.)* – 1991. – Vol. 435. – P. 631–644.
- [20] Shao, X.M. Respiratory rhythm generation and synaptic inhibition of expiratory neurons in pre-Botzinger complex: differential roles of glycinergic and GABAergic neural transmission / X.M. Shao, J.L. Feldman // *J. Neurophysiol.* – 1997. – Vol. 77. – P. 1853–1860.
- [21] Zuperku, E.J. Gain modulation of respiratory neurons / E.J. Zuperku, D.R. McCrimmon // *Respir. Physiol. & Neurobiol.* – 2002. – Vol. 131. – P. 121–133.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

**RESPIRATORY EFFECTS CAUSED
BY MICROINJECTIONS OF Γ -AMINOBUTYRIC
ACID AND BICUCULLINE INTO VENTRAL
RESPIRATORY GROUP REGION IN RATS**

© 2007 O.A. Vedyasova, A.M. Kovalev²

Respiratory pattern alteration caused by GABA (10^{-3} M) and bicuculline (10^{-3} M) microinjections into rostral region of ventral respiratory group (rVRG) in anesthetized rats has been determined. GABA and bicuculline has opposite influences on inspiratory and expiratory phases duration and lung ventilation value. Participation GABA_A-receptor of rVRG region in providing with GABA brake action on bulbar mechanisms define duration of respiratory cycle phases is discussed.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

² Vedyasova Olga Alexandrovna (olgavedyasova@rambler.ru), Kovalev Alexander Mikhaylovich, Dept. of Human and Animals Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.