

Дата публикации: 01.06.2022
DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_02_4
УДК 612.282; 612.216.2

Publication date: 01.06.2022
DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_02_4
UDC 612.282; 612.216.2

РЕСПИРАТОРНЫЕ РЕАКЦИИ НА МИКРОИНЪЕКЦИИ АНТАГОНИСТА ГАМК_B-РЕЦЕПТОРОВ 2-ГИДРОКСИСАКЛОФЕНА В РЕТРОТРАПЕЦИЕВИДНОЕ ЯДРО У КРЫС

А.И. Будаев¹, О.А. Ведясова¹, А.Т. Конашенкова¹, Т.Е. Ковалева²

¹Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, г. Самара, Россия

²Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия

Аннотация. В острых опытах на наркотизированных крысах изучены реакции внешнего дыхания на микроинъекции растворов блокатора ГАМК_B-рецепторов 2-гидрохлорид саклофена в ретротрапезиевидное ядро. Установлены различия в изменениях объемных и частотных параметров паттерна дыхания при воздействиях низкой (10^{-7} Моль) и высокой (10^{-4} Моль) концентраций антагониста, при этом выявлено закономерное усиление легочной вентиляции под влиянием только высокой концентрации. Результаты свидетельствуют об участии ГАМК_B-рецепторов ретротрапезиевидного ядра в регуляции дыхания, но в то же время позволяют говорить об ограниченном представительстве данного класса рецепторов в изучаемом отделе респираторной нейронной сети.

Ключевые слова: ГАМК_B-рецепторы, 2-гидрохлорид саклофен, ретротрапезиевидное ядро, паттерн внешнего дыхания.

RESPIRATORY REACTIONS TO MICROINJECTIONS OF THE ANTAGONIST OF GABA_B-RECEPTORS 2-HYDROXYSACLOFEN INTO THE RETROTRAPEZOID NUCLEUS IN RATS

A.I. Budaev¹, O.A. Vedyasova¹, A.T. Konashenkova¹, T.E. Kovaleva²

¹Samara National Research University, Samara, Russia

²N.V. Postnikov Samara Region Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russia

Annotation. In acute experiments on anesthetized rats, we studied the reactions of external respiration to microinjections of solutions of the GABA_B-receptor blocker 2-hydroxysaclophen into the retrotrapezoid nucleus. Differences in changes of the volumetric and frequency parameters of external respiration pattern were established under the action of low (10^{-7} M) and high (10^{-4} M) concentrations of the antagonist, while revealing increase of lung ventilation under the influence only high concentration. The results indicate the involvement of the GABA_B-receptors of the retrotrapezoid nucleus in regulation of respiration, but at the same time allow us to speak about the limited representation of this class receptors in the studied compartment of the respiratory neural network.

Keywords: GABA_B-receptors, 2-hydroxysaclofen, retrotrapezoid nucleus, pattern of external respiration.

Введение. Нормальное дыхание во многом определяется нейрохимическими механизмами центральной респираторной нейронной сети, в том числе активностью нейротрансмиттерных систем и процессами нейромодуляции эффективности синаптических взаимодействий в популяциях инспираторных и экспираторных нейронов [1]. В настоящее время особую актуальность

вопросу о функционировании респираторной нейросети придает ситуация эпидемии COVID-19 [2-3], поскольку установлено, что вирус SARS-CoV-2 способен инфицировать нейроны различных отделов дыхательного центра [4]. В связи с этим возникает необходимость в более глубоком изучении и понимании нейрохимической природы процессов регуляции дыхания.

В аспекте сложности и полихимичности межнейронных связей вызывает интерес такой отдел респираторной нейросети, как ретротрапециевидное ядро (РТЯ) [5-6], при аномалиях которого возможны серьезные нарушения регуляции дыхания, включая врожденный центральный гиповентиляционный синдром [7]. Это может объясняться тем, что РТЯ выполняет специфические функции в механизмах центральной хеморецепции, благодаря наличию нейронов, экспрессирующих уникальный набор белков (TASK-2 и GPR4), отвечающих за детекцию изменений CO_2/H^+ . Кроме того, отличительным свойством нейронов РТЯ является наличие фактора транскрипции Phox2b и транспортера глутамата VGLUT2, благодаря которым и было идентифицировано данное ядро [8]. Свое участие в регуляции дыхания РТЯ реализует через нисходящие пути к различным отделам дыхательного центра, включая глутаматергические проекции в комплекс пре-Бетцингера, играющий решающую роль в генерации респираторного ритма [9-10].

Согласно литературным данным, РТЯ одновременно получает сигналы, опосредуемые многими нейромедиаторами и нейромодуляторами, при этом изменение активности даже одного модулятора потенциально может повлиять на характер дыхания за счет компенсаторных реакций, обусловленных другими лигандами [1]. Поэтому важно иметь информацию о респираторных эффектах воздействия на нейроны РТЯ различных эндогенных регуляторов. В частности, требует детализации участие в модуляции дыхания ГАМКергических механизмов, в том числе разных классов рецепторов ГАМК на уровне РТЯ. В ряде исследований представлены сведения о реакциях дыхания, вызываемых введением агонистов и антагонистов ионотропных ГАМК-рецепторов в РТЯ [5, 11], в то время как представительство и роль метаботропных ГАМК-рецепторов в области данного ядра практически не изучены.

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении вклада метаботропных ГАМК_B-рецепторов в области РТЯ в регуляции дыхания у крыс.

Методы и организация исследования. Поставлены острые опыты на 18 взрослых беспородных крысах массой 180-250 г, наркотизированных уретаном (1,6 мг/кг, внутривенно). Исследование проведено с соблюдением правил биоэтики соответственно требованиям Community Council Directive 2010/63/ЕЕС. У крыс регистрировали внешнее дыхание до и после микроинъекций в РТЯ 0,2 мкл блокатора ГАМК_B-рецепторов 2-гидроксисаклофена (2-hydroxisaclofen, Sigma-Aldrich), разведенного в искусственной спинномозговой жидкости до концентраций 10^{-7} Моль (1-я экспериментальная группа, n=6) и 10^{-4} Моль (2-я экспериментальная группа, n=6). Крысам контрольной группы (n=6) в том же объеме в РТЯ вводили искусственную спинномозговую жидкость. Для инъекций использовали стеклянную микроканюлю (диаметр кончика 50 мкм, длина кончика не менее 12 мм), которую при помощи микрошприца МШ-1 вводили в РТЯ через трепанационное отверстие в затылочной кости по стереотаксическим координатам [12]. Дыхание регистрировали посредством спирографа, подсоединяемого к животному через трахеостомическую трубку. От спирографа сигналы поступали на компьютер, фиксировались в виде пневмотахограммы, затем преобразовывались в спирограмму с помощью программы PowerGraph 3.2 Professional (ООО «Интероптика-С»). На спирограммах определяли длительность вдоха ($T_{\text{вд}}$, с) и выдоха ($T_{\text{выд}}$, с), дыхательный объем (ДО, мл). Рассчитывали частоту дыхания (ЧД, мин^{-1}), минутный объем дыхания (МОД, мл/мин), объемную скорость инспираторного потока ($V_{\text{инс}}$, мл/с). Запись велась непрерывно в исходном состоянии и в течение 60 минут после микроинъекции.

Статистический анализ результатов проводили в программе SigmaPlot 12.5. Нормальность распределения данных определяли в тесте Shapiro-Wilk. Для оценки достоверности изменений в случае параметрических данных применяли t-test и Paired t-test, в случае непараметрических – Wilcoxon Signed Rank test. Результаты представляли, как среднее арифметическое значение ± ошибка среднего ($M \pm SEM$) или как медианы с межквартильным размахом ($Me (P25-P75)$). Статистически значимыми считали изменения при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Анализ спирограмм показал, что реакции на микроинъекции в РТЯ растворов

блокатора ГАМК_B-рецепторов высокой и низкой концентраций различаются выраженностью изменений объемных и частотных параметров паттерна дыхания.

Из всех анализируемых параметров при инъекциях 2-гидроксисаклофена (10^{-7} и 10^{-4} Моль) наиболее выражено менялась величина $T_{\text{выд}}$, которая нарастала относительно контроля в ходе всей экспозиции. Однако, если с 1-й по 20-ю минуты записи действие обеих концентраций вызывало одинаковый прирост средних значений $T_{\text{выд}}$ (примерно на 30,0%), то в последующие сроки отмечалось доминирование эффекта низкой концентрации, который на 60-й минуте достигал 51,9% ($p < 0,05$) (рис. 1А).

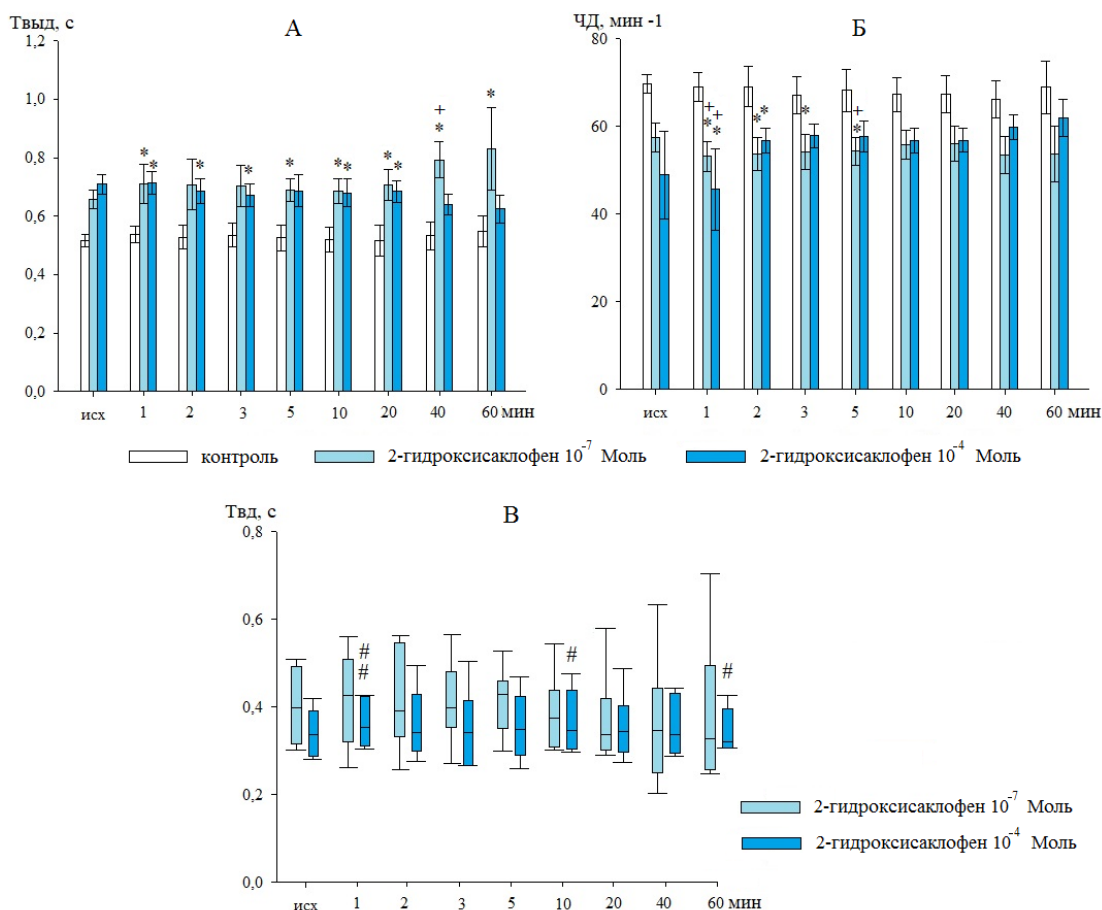


Рис. 1. Изменения ($M \pm SEM$) длительности выдоха (А) и частоты дыхания (Б) и динамика ($Me (P25-P75)$) длительности вдоха (В) при микроинъекциях 2-гидроксисаклофена в разных концентрациях в РТЯ у крыс

Примечание: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) – различия с контролем (t-test); + ($p < 0,05$) – различия с исходным уровнем (Paired t-test); # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$) – различия с исходным уровнем (Signed Rank Test)

Изменения $T_{\text{вд}}$ обуславливали снижение ЧД, по сравнению с контролем, в интервале с 1-й по 5-ю минуты воздействия обеих концентраций антагониста (рис. 1Б). Определенный вклад в замедление внешнего дыхания также вносила пролонгация $T_{\text{вд}}$, но относительно исходного уровня, на что указывают изменения медианы данного показателя. Эта реакция имела дозозависимый характер и более закономерно проявлялась при действии на РТЯ 2-гидроксисаклофена в концентрации 10^{-4} Моль (рис. 1В).

Зависимость респираторных эффектов от концентрации ГАМК_B-блокатора

касалась также такого параметра, как ДО. При микроинъекциях в РТЯ раствора в концентрации 10^{-7} Моль изменения ДО отличались нестабильностью и не имели статистически значимого характера. При введении раствора высокой концентрации наблюдалось значимое увеличение медианы ДО относительно исходного уровня, причем особенно выраженное в поздние сроки экспозиции. В частности, ДО исходно составлял 1,50 (1,14-1,59) мл, а на 20-й минуте действия 2-гидроксисаклофена (10^{-4} Моль) увеличивался до 1,75 (1,44-1,97) мл и продолжал нарастать далее (рис. 2А).

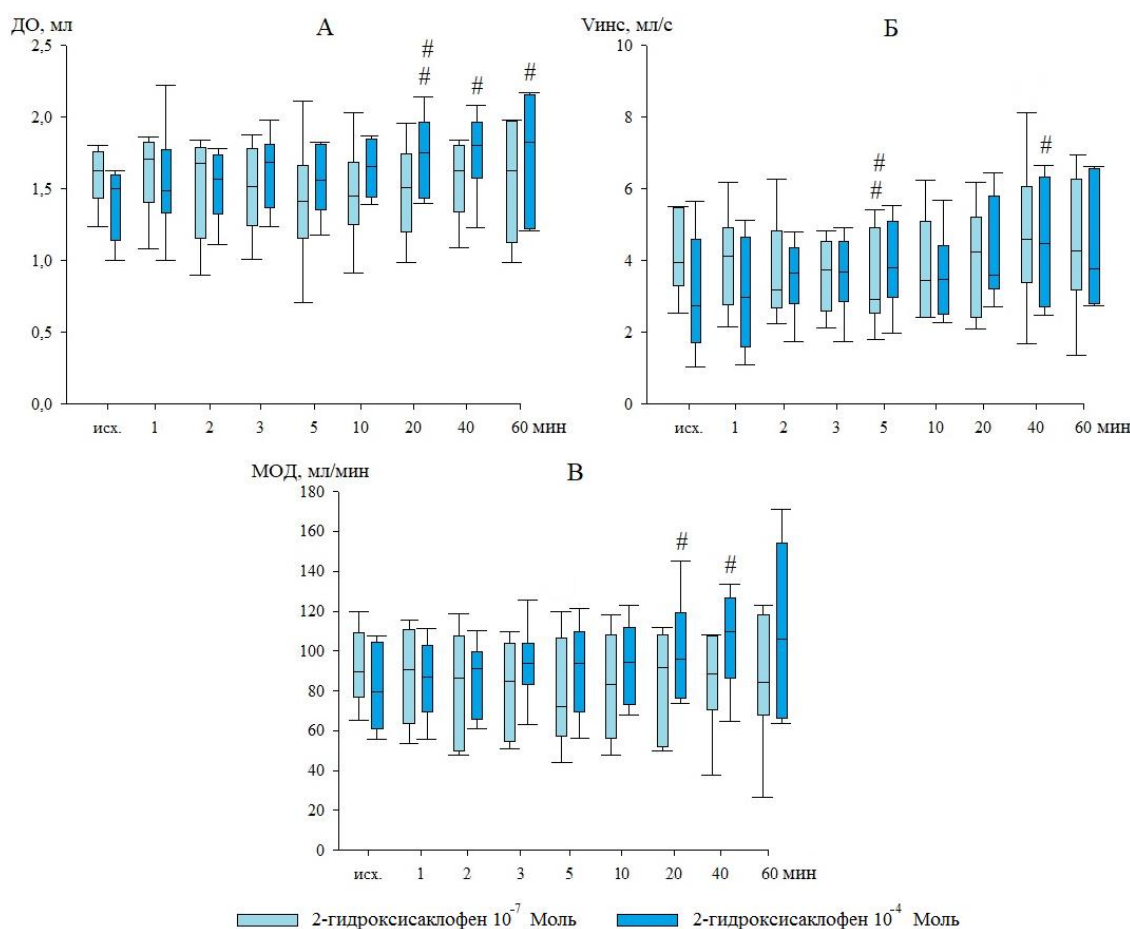


Рис. 2. Изменения (Me (P25 – P75)) дыхательного объема (А), объемной скорости инспираторного потока (Б) и минутного объема дыхания (В) при микроинъекциях 2-гидроксисаклофена в разных концентрациях в РТЯ у крыс

Примечание: # ($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$) – различия с исходным уровнем (Signed Rank Test)

Динамика параметра $V_{\text{инс}}$ при действии антагониста в концентрации 10^{-7} Моль выражалась кратковременным снижением медианы и межквартильного размаха от 3,95 (3,29-5,48) мл/с (фон) до 2,92 (2,53-4,90) мл/с на 5-й минуте экспозиции. Затем наблюдался возврат значений $V_{\text{инс}}$ к исходному уровню. В серии опытов с высокой концентрацией антагониста первоначальное снижение $V_{\text{инс}}$ имело недостоверный характер, а после 15-й минуты оно сменялось тенденцией роста, который достигал статистически значимого уровня ($p=0,04$) на 40-й минуте наблюдений (рис. 2Б).

Что касается МОД, то его изменения проявлялись увеличением медианы относительно исходного уровня при действии на РТЯ 2-гидроксисаклофена в концентрации 10^{-4} Моль (рис. 2В). При этом стоит отметить, что статистически значимое изменение МОД начиналось с 15-й минуты экспозиции, что совпадало по срокам с началом роста ДО.

Из полученных данных следует, что микроинъекции блокатора ГАМК_В-рецепторов 2-гидроксисаклофена в РТЯ в концентрациях 10^{-7} и 10^{-4} Моль вызывали различные изменения отдельных параметров паттерна внешнего дыхания. Так, низкая концентрация антагониста (10^{-7} Моль) в большей степени влияла на временные параметры, в то время как высокая концентрация (10^{-4} Моль) меняла преимущественно объемные показатели спирограмм. В целом наблюдаемые респираторные реакции указывают на вовлеченность ГАМКергических механизмов, в частности ГАМК_В-рецепторов в области РТЯ в регуляцию дыхания у крыс. Вместе с тем, незначительная выраженность эффектов низкой концентрации и более закономерный характер изменений дыхания при действии высокой концентрации антагониста (10^{-4} Моль) может служить показателем относительно ограниченного представительства ГАМК_В-рецепторов в РТЯ. Характерным эффектом действия высокой концентрации ГАМК_В-блокатора была стимуляция легочной вентиляции, на

что указывает рост МОД. Возможно, такая реакция связана с активацией глутаматергических Phox2b нейронов РТЯ [9] за счет устранения влияния эндогенной ГАМК на инактивированные ГАМК_В-рецепторы, предположительно локализованные на возбуждающих и/или тормозных интернейронах данного ядра.

Согласно литературным сведениям, уровень активности ГАМК-рецепторов в РТЯ в значительной степени зависит от типа синаптических взаимодействий, в которых участвуют различные медиаторы и модуляторы [6-7]. Например, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что нейроны РТЯ возбуждаются при активации пуриновых рецепторов P2Y и ингибируются при активации рецепторов P2X в тормозных ГАМК/глицин интернейронах [1, 13]. С учетом этого, допустимо полагать, что одной из причин стимуляции дыхания при введении 2-гидроксисаклофена может быть ограничение взаимодействия ГАМК_В-рецепторов нейронов РТЯ с ГАМК, выделяемой при активации P2X рецепторов на вставочных ГАМКергических нейронах изучаемой области респираторной нейросети.

Заключение. Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о включении ГАМКергических механизмов РТЯ в регуляцию внешнего дыхания у крыс. Определенный вклад в реализацию эффектов ГАМК на уровне РТЯ вносят метаболитные ГАМК_В-рецепторы, что подтверждается усилением легочной вентиляции при их блокаде селективным антагонистом 2-гидроксисаклофеном. Различия респираторных реакций на действие блокатора ГАМК_В-рецепторов в высокой и низкой концентрациях, в том числе закономерный стимулирующий эффект именно высокой концентрации, позволяют высказать предположение о небольшой плотности данного типа рецепторов в изучаемой области. Однако высказанное предположение требует дополнительного экспериментального обоснования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The retrotrapezoid nucleus and the neuromodulation of breathing / Moreira T. S., Sobrinho C. R., Falquetto B. [et al] // *J. Neurophysiol.* – 2021. – Vol. 125. – № 3. – pp. 699-719. DOI: 10.1152/jn.00497.2020.
2. Александрова, Н. П. Патогенез дыхательной недостаточности при коронавирусной болезни (COVID-19) / Н. П. Александрова // *Интегративная физиология.* – 2020. – Т. 1. – № 4. – С. 285-293. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-285-293. [In English] Aleksandrova N.P. Pathogenesis of respiratory failure in coronavirus disease (COVID-19). *Integrative Physiology*, 2020, vol. 1, no 4, pp. 285-293. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-285-293.
3. Baig, A. M. Computing the effects of SARS-CoV-2 on respiration regulatory mechanisms in COVID-19 / A. M. Baig // *ACS Chemical Neuroscience.* – 2020. – Vol. 11. – № 16. – pp. 2416-2421. DOI: 10.1021/acscchemneuro.0c00349.
4. Paniz-Mondolfi, A. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) / A. Paniz-Mondolfi, Z. C. Bryce, R. E. Grimes // *Journal of Medical Virology.* – 2020. – Vol. 92. – № 7. – pp. 699-702. DOI: 10.1002/jmv.25915.
5. Cream, C. The retrotrapezoid nucleus (RTN): local cytoarchitecture and afferent connections / C. Cream, A. Li, E. Nattie // *Respir. Physiol. Neurobiol.* – 2002. – Vol. 130. – pp. 121-137.
6. α 1- and α 2-adrenergic receptors in the retrotrapezoid nucleus differentially regulate breathing in anesthetized adult rats / Oliveira L. M., Moreira T. S., Kuo F. S. [et al] // *J. Neurophysiol.* – 2016. – Vol. 116. – pp. 1036-1048.
7. The retrotrapezoid nucleus: central chemoreceptor and regulator of breathing automaticity / Guyenet P. G., Stornetta R. L., Souza G. M. P. R. [et al] // *Trends Neurosci.* – 2019. – Vol. 42. – № 11. – pp. 807-824. DOI: 10.1016/j.tins.2019.09.002.
8. The retrotrapezoid nucleus and breathing / Guyenet P. G., Stornetta R. L., Abbott S. B. G. [et al] // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 758. – pp. 115-122. DOI: 10.1007/978-94-007-4584-1_16.
9. Guyenet, P. G. Rostral ventrolateral medulla, retropontine region and autonomic regulations / P. G. Guyenet, R. L. Stornetta // *Auton. Neurosci.* – 2022. – Vol. 237. – 102922. DOI: 10.1016/j.autneu.2021.102922.
10. Pre-Bötzinger complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons / G. Bochorishvili, R. Stornetta, M. Coates, P. Guyenet // *J. Comp. Neurol.* – 2012. – Vol. 520. – № 5. – pp. 1047-1061. DOI: 10.1002/cne.22769.
11. Ventrolateral medulla mechanisms involved in cardiorespiratory responses to central chemoreceptor activation in rats / A. Takakura, E. Colombari, J. Menani, T. Moreira // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2011. – Vol. 300. – pp. 501-510.
12. Contribution of the retrotrapezoid nucleus and carotid bodies to hypercapnia- and hypoxia-induced arousal from sleep / Souza G. M. P. R., Stornetta R. L., Stornetta D. S. [et al] // *J. Neurosci.* – 2019. – Vol. 4. – № 39(49). – pp. 9725-9737. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1268-19.2019.
13. Regulation of ventral surface CO₂/H⁺-sensitive neurons by purinergic signaling / Wenker I. C., Sobrinho C. R., Takakura A. C. [et al] // *J. Physiol.* – 2012. – Vol. 590. – pp. 2137-2150.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Александр Иванович Будаев – аспирант кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, e-mail: budaev.sasha@mail.ru.

Ольга Александровна Ведясова – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, e-mail: o.a.vedyasova@gmail.com.

Анастасия Тарасовна Конашенкова – студентка кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева, Самара, e-mail: konashenkova.an@gmail.com.

Татьяна Евгеньевна Ковалева – биолог бактериологической лаборатории, Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, Самара, e-mail: kovalova.t.e@gmail.com.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:

Aleksandr Ivanovich Budaev – Post-Graduate Student of the Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University, Samara, e-mail: budaev.sasha@mail.ru.

Ol'ga Aleksandrovna Vedyasova – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University, Samara, e-mail: o.a.vedyasova@gmail.com.

Anastasia Tarasovna Konashenkova – Student of the Department of Human and Animal Physiology, Samara National Research University, Samara, e-mail: konashenkova.an@gmail.com.

Tat'yana Evgen'evna Kovaleva – Biologist of the Bacteriological Laboratory, N.V. Postnikov Samara Region Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, e-mail: kovalova.t.e@gmail.com.

Для цитирования: Респираторные реакции на микроинъекции антагониста ГАМК_в-рецепторов 2-гидроксисаклофена в ретротрапециевидное ядро у крыс / А.И. Будаев, О.А. Ведясова, А.Т. Конашенкова, Т.Е. Ковалева // Современные вопросы биомедицины. – 2022. – Т. 6. – № 2. DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_02_4

For citation: Budaev A.I., Vedyasova O.A., Konashenkova A.T., Kovaleva T.E. Respiratory reactions to microinjections of the antagonist of GABA_B-receptors 2-hydroxysaclofen into the retrotrapezoid nucleus in rats. *Modern Issues of Biomedicine*, 2022, vol. 6, no. 2. DOI: 10.51871/2588-0500_2022_06_02_4