

УДК 612.282:612.285

ВЛИЯНИЕ МИКРОИНЪЕКЦИЙ ГАСТРИН-РИЛИЗИНГ ПЕПТИДА В КОМПЛЕКС ПРЕ-БЕТЦИНГЕРА НА ПОКАЗАТЕЛИ ДЫХАНИЯ КРЫС

© 2012 А.А. Алиев, А.Н. Инюшкин¹

В статье представлены результаты изучения респираторных эффектов микроинъекций гастрин-релизинг пептида в комплекс пре-Бетцингера наркотизированных уретаном крыс. Установлено, что введение нейропептида приводит к возрастанию частоты дыхания, дыхательного объема, амплитуды залповой активности диафрагмы и наружных межреберных мышц. Статистически значимые изменения со стороны дыхания наблюдались при использовании 10^{-5} М гастрин-релизинг пептида, тогда как концентрация 10^{-8} М оказалась подпороговой и не вызывала изменений паттерна дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц. Обсуждаются вероятные механизмы действия данного нейропептида на уровне пре-Бетцингера комплекса.

Ключевые слова: гастрин-релизинг пептид, комплекс пре-Бетцингера, дыхательный центр, бомбезиновые рецепторы.

Введение

Слабо изученными с точки зрения участия в центральных механизмах регуляции дыхания являются родственные бомбезину пептиды, в частности, гастрин-релизинг пептид (ГРП). Данный 27-аминокислотный полипептид впервые выделен из ткани желудка и кишечника свиньи при использовании выделяющегося гастрина в качестве биопробы [1]. Этот пептид обладает обширным спектром физиологических эффектов как на периферии, так и в центральной нервной системе.

Интерес к гастрин-релизинг пептиду как потенциальному участнику бульбарных механизмов регуляции дыхания на уровне комплекса пре-Бетцингера вызван литературными данными об экспрессии специфических рецепторов к данному нейропептиду в исследуемой области дыхательного центра [2].

Целью настоящей работы, выполненной *in vivo* на наркотизированных крысах, являлось изучение респираторных эффектов гастрин-релизинг пептида на уровне комплекса пре-Бетцингера — ритмогенерирующей структуры, расположенной в вентральном отделе бульбарного дыхательного центра [3].

¹Алиев Артем Алиевич (ruptrih@yandex.ru), Инюшкин Алексей Николаевич (ainyushkin@mail.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

Методика проведения экспериментов

Исследование выполнено на взрослых лабораторных крысах обоего пола массой 200–320 г, наркотизированных уретаном (1,6 г/кг, внутривенно). Производилась трахеостомия, голова животного закреплялась в головодержателе так, что каудальная часть продолговатого мозга располагалась горизонтально. Осуществляли трепанацию затылочной кости и доступ к дорсальной поверхности продолговатого мозга.

Изучали реакции паттерна внешнего дыхания и биоэлектрической активности диафрагмы и наружных межреберных мышц при введении гастрин-релизинг пептида (Sigma) в комплекс пре-Бетцингера согласно координатам: 1,5 мм роstralнее обех, 2,2 мм вправо от средней линии и 2,5 мм вглубь от поверхности мозга. Микроинъекции выполнялись при помощи микрошприца МШ-1 через стеклянную микропипетку с диаметром кончика 20–30 мкм. Пептид растворяли *ex tempore* в искусственной цереброспинальной жидкости [4] и вводили со скоростью около 5 нл/с в концентрации 10^{-5} , 10^{-8} М в объеме 50 нл. По окончании эксперимента продолговатый мозг извлекали и помещали в 4 % раствор формальдегида для последующего гистологического контроля места микроинъекции (рис. 1). В контрольных экспериментах в ту же область вводили искусственную цереброспинальную жидкость в объеме 50 нл.



Рис. 1. Поперечный срез продолговатого мозга на уровне 1,5 мм роstralнее обех. Стрелка указывает на место микроинъекции гастрин-релизинг пептида (конец трека от инъекционной пипетки) в области комплекса пре-Бетцингера

Регистрация внешнего дыхания производилась инвазивным методом с помощью спирографа для мелких лабораторных животных. Электромиограмму диафрагмы и наружных межреберных мышц (VI–VIII межреберье слева) регистрировали с помощью стальных игольчатых биполярных электродов. Сигналы после усиления подавали на АЦП (L-780, L-Card, Россия) и регистрировали с помощью программы PowerGraph 3.2. На спирограмме определяли дыхательный объем, продолжительность вдоха и выдоха, вычисляли частоту дыхания и минутный объем дыхания. На электромиограмме инспираторных мышц измеряли амплитуду интегрированной активности. Значения исследуемых показателей спирограммы и ЭМГ определяли в исходном состоянии, ежеминутно в течение первых 10 минут и далее через 15, 20, 30, 40 и 60 минут после микроинъекции.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке с использованием *t*-теста Стьюдента для сравнения связанных выборок. Все дан-

ные представлены как средние арифметические \pm стандартные ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Характер и выраженность дыхательных реакций на введение гастрин-релизинг пептида в область ядра солитарного тракта зависели от концентрации исследуемого нейропептида в инъецируемом растворе. Микроинъекции 10^{-8} М гастрин-релизинг пептида ($n = 9$) не вызывали статистически значимого изменения паттерна дыхания и ЭМГ инспираторных мышц. Локальное введение 10^{-5} М раствора гастрин-релизинг пептида ($n = 6$) в исследуемую область приводило к стимуляции дыхания, что проявлялось в соответствующих изменениях исследуемых показателей внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц (рис. 2).

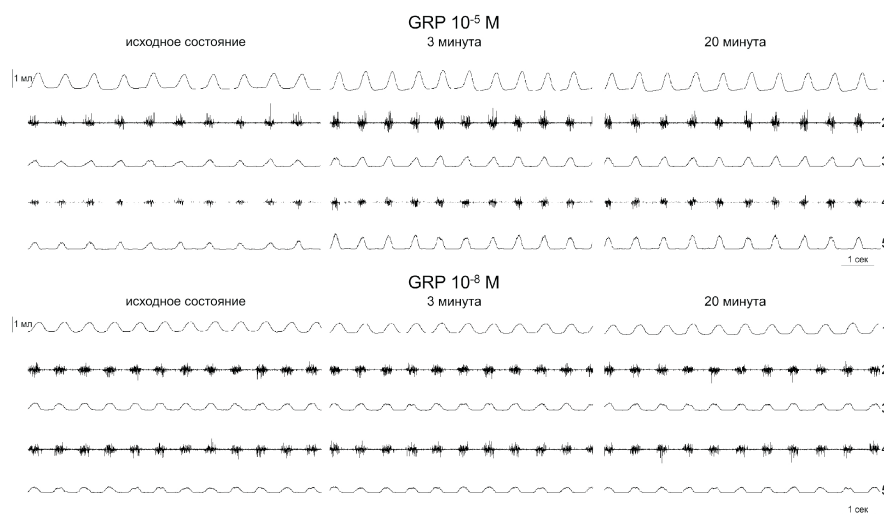


Рис. 2. Реакции внешнего дыхания и биоэлектрической активности инспираторных мышц на микроинъекции гастрин-релизинг пептида в комплекс пре-Бетцингера. На рисунке представлены фрагменты спирограммы (1), электромиограммы диафрагмы (2) и ее интегрированной производной (3), электромиограммы наружных межреберных мышц (4) и ее интегрированной производной (5) при микроинъекции 10^{-5} (А) и 10^{-8} М (Б) гастрин-релизинг пептида. Слева направо: исходное состояние; через 3 минуты после микроинъекции; через 20 минут после микроинъекции

Происходило статистически значимое увеличение частоты дыхания, которое характеризовалось коротким латентным периодом. Уже на первой минуте после инъекции изменения составили $+6,17 \pm 1,49$ мин $^{-1}$ ($p < 0,01$), а максимальный рост показателя зарегистрирован на третьей минуте воздействия пептида: на $7,74 \pm 2,11$ мин $^{-1}$ ($p < 0,05$). Анализ продолжительности фаз цикла внешнего дыхания показал, что снижение частоты дыхания произошло за счет укорочения выдоха, максимум изменений которого приходился на третью минуту после начала воздействия ($-0,07 \pm 0,01$ с; $p < 0,01$). Существенных изменений продолжительности вдоха обнаружено не было ($p > 0,05$).

Кроме этого наблюдалось статистически значимое увеличение дыхательного объема. Данный показатель наиболее существенно возрастал к 6 минуте после микроинъекции гастрин-рилизинг пептида — на $0,09 \pm 0,03$ мл ($p < 0,05$). Одновременно с дыхательным объемом возрастала амплитуда интегрированной электромиограммы наружных межреберных мышц и диафрагмы. Максимальное увеличение данных показателей наблюдались на 5 минуте после введения исследуемого нейропептида (на $21,21 \pm 7,85\%$ и $16,15 \pm 5,53\%$, соответственно: $p < 0,05$). При этом тенденция изменения амплитуды интегрированной кривой для наружных межреберных мышц в целом была выражена сильнее, чем для диафрагмы.

В течение первых трех минут после воздействия нейропептида минутный объем дыхания прогрессивно нарастал (максимально — на $13,26 \pm 3,75$ мл/мин к третьей минуте: $p < 0,05$).

В настоящей работе впервые продемонстрирована способность гастрин-рилизинг пептида вызывать дыхательные реакции при его локальном воздействии на комплекс пре-Бетцингера, при этом выраженность наблюдавшихся респираторных реакций существенно зависела от концентрации пептида в рабочем растворе. Микроинъекции 10^{-8} М гастрин-рилизинг пептида не вызывали статистически значимого изменения паттерна дыхания и ЭМГ инспираторных мышц, в то время как локальное введение 10^{-5} М раствора гастрин-рилизинг пептида приводило к изменениям исследуемых показателей дыхания.

Как известно, комплекс пре-Бетцингера является одной из важнейших респираторных областей, входящих в состав дыхательного центра. Предполагается, что его преинспираторные нейроны играют ключевую роль в генерации респираторного ритма в условиях *in vitro*, когда в эксперименте используются переживающие срезы неонатальных животных [5; 6]. В свою очередь, в условиях *in vivo* на уровне ЦНС взрослых животных пре-Бетцингеров комплекс вовлечен в сложную сеть взаимодействий, которая обеспечивает динамический контроль дыхания [7].

В контексте данного исследования важным является вопрос о типе рецепторов, опосредующих респираторные влияния гастрин-рилизинг пептида, о наличии в области пре-Бетцингера комплекса терминалей, содержащих пептиды и рецепторы бомбезинового семейства. Известно, что физиологическая активность гастрин-рилизинг пептида в организме млекопитающих прежде всего определяется активацией специфических бомбезиновых рецепторов, имеющих гептаспиральную структуру и ассоциированных с G-белками [8]. Наиболее изученными среди них являются рецепторы двух типов: BB_1 (НМВ-Р; преимущественный эндогенный лиганд-нейромедин В) и BB_2 (ГРП-Р; преимущественный эндогенный лиганд-гастрин-рилизинг пептид). Кроме этого, к настоящему времени идентифицированы еще два типа рецепторов: BB_3 и BB_4 [9; 10], однако сведения, касающиеся их функциональных свойств, крайне ограничены, поскольку природные лиганды, способные взаимодействовать с этими рецепторами с высокой аффинностью, пока не установлены.

На уровне продолговатого мозга количественно преобладает BB_1 подтип рецептора, хотя известно, что в данном отделе мозга присутствуют также рецепторы BB_2 и BB_3 [8]. При этом в области локализации дорсальных и вентральных структур дыхательного центра, включая местоположение пре-Бетцингера комплекса, продемонстрировано присутствие всех трех перечисленных типов бомбезиновых рецепторов [2; 11; 12].

Характерной особенностью реакций на микроинъекции 10^{-5} М гастрин-рилизинг пептида в комплекс пре-Бетцингера являлся рост частоты дыхания, главным

образом, благодаря укорочению продолжительности выдоха, в то время как дыхательный объем изменялся незначительно. Это отражает функциональные особенности самого комплекса пре-Бетцингера, инспираторные нейроны которого участвуют в регуляции ритмики дыхания, а не дыхательного объема [13; 14].

В предыдущих исследованиях были получены аналогичные результаты с родственным гастрин-релизинг пептиду веществом бомбезином, обладающим примерно одинаковой аффинностью как к BB_1 , так и BB_2 рецепторам. Введение 0,1 пМ–0,1 мМ бомбезина в пре-Бетцингеров комплекс приводило к увеличению вентиляции легких с возрастанием частоты дыхания при снижении продолжительности экспирации. Одновременно наблюдалось укорочение межзачатковых интервалов на ЭМГ диафрагмы и наружных межреберных мышц [15].

Стоит отметить, что дыхательные эффекты на микроинъекции гастрин-релизинг пептида были выражены при введении высоких доз нейропептида (10^{-5} М), тогда как бомбезин проявлял респираторную активность уже в минимальной концентрации (0,1 пМ). Это косвенно указывает на более высокую экспрессию рецепторов BB_1 подтипа в области пре-Бетцингера по сравнению с BB_2 подтипом, преимущественным агонистом которого является гастрин-релизинг пептид.

Микроинъекции гастрин-релизинг пептида в область пре-Бетцингера комплекса приводили к существенному росту активности инспираторных мышц. При этом тенденция изменения амплитуды интегрированной активности наружных межреберных мышц в целом была выражена сильнее, чем диафрагмы. Очевидно, это связано с относительной "консервативностью" функции диафрагмы, тогда как наружные межреберные мышцы характеризуются большей лабильностью и в первую очередь определяют рост дыхательного объема [16].

Одним из наиболее вероятных механизмов активирующего влияния гастрин-релизинг пептида в комплексе пре-Бетцингера являются деполяризация мембраны, увеличение входного сопротивления и рост спайковой активности спонтанно активных клеток, что было продемонстрировано в экспериментах *in vitro* с бомбезином [15].

Результаты выполненных экспериментов, в которых введение гастрин-релизинг пептида в область локализации комплекса пре-Бетцингера приводило к изменениям биоэлектрической активности инспираторных мышц и паттерна внешнего дыхания, а также данные об экспрессии специфических рецепторов в исследуемой области мозга [2] указывают на непосредственное участие эндогенного гастрин-релизинг пептида в регуляции дыхания на уровне данной структуры дыхательного центра.

Литература

- [1] Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue / T.J. McDonald [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1979. № 90(1). P. 227–233.
- [2] Comparison of gene expression for two distinct bombesin receptor subtypes in postnatal rat central nervous system / E. Wada [et al.] // Mol Cell Neurosci. 1992. № 3(5). P. 446–60.
- [3] Pre-Botzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals / J.C. Smith [et al.] // Science. 1991. № 254. P. 726–729.

- [4] Mitchell R.A., Loeschcke H.H., Massion N.H. Respiratory responses mediated through superficial chemosensitive areas on the medulla // *J. Appl. Physiol.* 1963. № 18(3). P. 523–533.
- [5] Butera R.J.Jr., Rinzel J., Smith J.C. Models of respiratory rhythm generation in the pre-Botzinger complex. II. Populations of coupled pacemaker neurons // *J. Neurophysiol.* 1999. № 82(1). P. 398–415.
- [6] Ramirez J.M., Richter D.W. The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation // *Curr Opin Neurobiol.* 1996. № 6(6). P. 817–825.
- [7] Respiratory rhythm generation in neonatal and adult mammals: the hybrid pacemaker-network model / J.C. Smith [et al.] // *Respiration Physiology.* 2000. № 122(2/3). P. 131–147.
- [8] Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates / H. Sano [et al.] // *Genomics.* 2004. № 84. P. 139–146.
- [9] Ohki-Hamazaki H., Iwabuchi M., Maekawa F. Development and function of bombesin-like peptides and their receptors // *Int. J. Dev. Biol.* 2005. № 49. P. 293–300.
- [10] 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. № 60(1). P. 1–42.
- [11] The distribution of the orphan bombesin receptor subtype-3 in the rat CNS / C.A. Jennings [et al.] // *Neuroscience.* 2003. № 120. P. 309–324.
- [12] Immunohistochemical localization of gastrin-releasing peptide receptor in the mouse brain / S. Kamichi [et al.] // *Brain Res.* 2005. № 1032. P. 162–170.
- [13] Инюшкин А.Н., Меркулова Н.А., Чепуров С.А. Комплекс пре-Ботзингера участвует в реализации респираторных эффектов тиролиберина // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 1998. № 84(4). С. 285–292.
- [14] Чепуров С.А., Инюшкин А.Н. Влияние микроинъекций тахикининов в область ядра солитарного тракта на дыхание и кровообращение у крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 1997. № 83(4). С. 117–125.
- [15] Инюшкин А.Н., Глазкова Е.Н. Респираторные эффекты бомбезина на уровне пре-Ботзингера комплекса крыс // *Рос. физиол. журн.* 2007. № 8. С. 914–925.
- [16] Influence of central chemoreceptor afferent inputs on respiratory muscle activity / M.A. Nahhiu [et al.] // *J. Physiol.* 1985. № 249(2). P. 266–273.

Поступила в редакцию 22/III/2012;
в окончательном варианте — 22/III/2012.

THE EFFECTS OF GASTRIN-RELEASING PEPTIDE MICROINJECTIONS INTO THE PRE-BOTZINGER COMPLEX ON THE RESPIRATORY PARAMETERS OF RATS

© 2012 A.A. Aliev, A.N. Inyushkin²

In the article, the results of investigation of the respiratory effects of gastrin-releasing peptide microinjections into the pre-Botzinger complex are presented. It was found that microinjections of neuropeptide induced an increase in respiratory rate, tidal volume, amplitude of diaphragm and external intercostal muscles bursting activity. The statistically significant respiratory responses observed when 10^{-5} M of GRP was used, while 10^{-8} M of GRP appeared to be sub-threshold and didn't alter the breathing pattern and activity of inspiratory muscles. The suggested mechanisms of action of GRP at the level of pre-Botzinger complex are discussed.

Key words: gastrin-releasing peptide, pre-Botzinger complex, respiratory center, bombesin receptors.

Paper received 22/III/2012.

Paper accepted 22/III/2012.

²Aliev Artem Alievich (ruptrih@yandex.ru), Inyushkin Alexey Nikolaevich (ainyushkin@mail.ru), the Dept. of Human and Animals Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.