



Check for updates

Краткие сообщения

УДК612.282 + 612.216.2

<https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-4-471-475>

## Респираторные реакции при стимуляции и блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов ретротрапециевидного ядра у крыс

А. И. Будаев<sup>1</sup>, О. А. Ведясова<sup>✉1</sup>

<sup>1</sup> Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева, 443086, Россия, г. Самара, Московское шоссе, д. 34

### Сведения об авторах

Александр Иванович Будаев,  
ORCID: 0000-0002-3729-0430,  
e-mail: [budaev.sasha@mail.ru](mailto:budaev.sasha@mail.ru)

Ольга Александровна Ведясова,  
SPIN-код: 1026-1978,  
Scopus AuthorID: 6507837326,  
Researcher ID: C-4744-2018,  
ORCID: 0000-0002-3392-6112,  
e-mail: [o.a.vedyasova@gmail.com](mailto:o.a.vedyasova@gmail.com)

### Для цитирования:

Будаев, А. И., Ведясова, О. А. (2021) Респираторные реакции при стимуляции и блокаде ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов ретротрапециевидного ядра у крыс. *Интегративная физиология*, т. 2, № 4, с. 471–475. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-4-471-475>

Получена 3 октября 2021; прошла рецензирование 4 ноября 2021; принята 12 ноября 2021.

### Финансирование:

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-14073).

Права: © А. И. Будаев, О. А. Ведясова (2021).

Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии ССВУ-NC 4.0.

**Аннотация.** В острых опытах на наркотизированных крысах в условиях дыхания обычным атмосферным воздухом изучали респираторные реакции на микроинъекции в ретротрапециевидное ядро (РТЯ) растворов мусцимола и бикукуллина. Установлено, что активация ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов РТЯ мусцимолом оказывает закономерное тормозное влияние на внешнее дыхание, снижая его минутный объем и объемную скорость инспираторного потока за счет пролонгирования фаз вдоха и выдоха и уменьшения дыхательного объема. Реакции дыхания на микроинъекции в РТЯ блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикукуллина не имели однозначного характера, однако в большинстве случаев проявлялись ростом минутной вентиляции легких на фоне увеличения дыхательного объема и объемной скорости инспирации. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы включены в деятельность РТЯ, в том числе являются важным звеном центральных механизмов респираторного контроля у взрослых крыс в условиях дыхания воздухом обычного состава, не вызывающего нарушений газового гомеостаза. Можно считать, что ионотропные рецепторы ГАМК в области РТЯ участвуют в тормозной модуляции активности нейронов, обеспечивающих регуляцию как продолжительности фаз дыхательного цикла, так и уровня глубины дыхания.

**Ключевые слова:** ретротрапециевидное ядро, ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, мусцимол, бикукуллин, внешнее дыхание

# Respiratory reactions to stimulation and blockade of GABA<sub>A</sub>-receptors of the retrotrapezoid nucleus in rats

A. I. Budaev<sup>1</sup>, O. A. Vedyasova<sup>✉1</sup>

<sup>1</sup> Samara National Research University, 34 Moskovskoe Rd., Samara, 443086, Russia

## Authors

Aleksandr I. Budaev,  
ORCID: 0000-0002-3729-0430,  
e-mail: [budaev.sasha@mail.ru](mailto:budaev.sasha@mail.ru)

Olga A. Vedyasova,  
SPIN: 1026-1978,  
Scopus AuthorID: 6507837326,  
ResearcherID: C-4744-2018,  
ORCID: 0000-0002-3392-6112,  
e-mail: [o.a.vedyasova@gmail.com](mailto:o.a.vedyasova@gmail.com)

## For citation:

Budaev, A. I., Vedyasova, O. A. (2021) Respiratory reactions to stimulation and blockade of GABA<sub>A</sub>-receptors of the retrotrapezoid nucleus in rats. *Integrative Physiology*, vol. 2, no. 4, pp. 471–475. <https://www.doi.org/10.33910/2687-1270-2021-2-4-471-475>

**Received** 3 October 2021;  
reviewed 4 November 2021;  
accepted 12 November 2021.

**Funding:** The work was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-29-14073).

**Copyright:** © A. I. Budaev, O. A. Vedyasova (2021). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

**Abstract.** The respiratory reactions to microinjections of muscimol and bicuculline solutions into the retrotrapezoid nucleus (RTN) were studied in acute experiments on anesthetized rats breathing ordinary atmospheric air. It was found that the activation of GABA<sub>A</sub>-receptors of the RTN by muscimol has inhibitory effect on external respiration, reducing its minute volume and volumetric rate of inspiratory flow due to prolongation of inspiration and expiration and a decrease in the tidal volume. The reactions to microinjections of the GABA<sub>A</sub>-receptors antagonist bicuculline into the RTN were not unambiguous, but in most cases they manifested as an increase in minute lung ventilation with an increase in tidal volume and volumetric inspiration rate. The data obtained indicate that GABA<sub>A</sub>-receptors are involved in the activity of the RTN, in particular, they are an important link in central mechanisms of respiratory control in adult rats when breathing air of normal composition, which does not cause disruption of gas homeostasis. It is suggested that ionotropic GABA receptors in the RTN region are involved in inhibitory modulation of neurons that regulate both the duration of the respiratory cycle phases and the level of breathing depth.

**Keywords:** retrotrapezoid nucleus, GABA<sub>A</sub>-receptors, muscimol, bicuculline, external breathing

## Введение

Ретротрапециевидное ядро (РТЯ) представляет собой группу специфических нейронов продолговатого мозга, расположенных вентральнее ядра лицевого нерва (Cream et al. 2002). Фенотип клеток РТЯ детально исследован; показано, что оно состоит из CO<sub>2</sub>-чувствительных нейронов, экспрессирующих глутаматный транспортер VGLUT2 (Holloway et al. 2015) и фактор транскрипции Phox2b (Guyenet et al. 2016). Указанные нейроны РТЯ иннервируют понтомедулярные структуры, генерирующие ритм и паттерн дыхания (Vochorishvili et al. 2012). В свою очередь, другие типы нейронов респираторной сети влияют на активность и хемочувствительность нейронов РТЯ посредством возбуждающих и тормозных сигналов, реализуемых через определенные типы синапсов (Wu et al. 2019). Это ставит вопрос о зависимо-

сти функционирования РТЯ при гиперкапнии и гипоксии от синаптических входов, но нейромедиаторная природа последних все еще до конца не уточнена. Вместе с тем показано, что у крыс нейроны РТЯ могут контролировать легочную вентиляцию не только во время гипоксических или гиперкапнических состояний, но и в условиях нормоксии, при этом отмечается модулирующее действие тормозных медиаторов, в том числе ГАМК (Huckstepp et al. 2015; Takakura et al. 2013; Vedyasova et al. 2020). Однако в целом вопрос о роли ГАМКергических механизмов РТЯ в формировании респираторных эффектов в нормальных физиологических условиях не решен.

Цель нашей работы состояла в исследовании роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов области РТЯ в регуляции респираторной активности у крыс при дыхании воздухом обычного состава.

## Материалы и методы

Поставлены острые эксперименты на нелинейных крысах массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1,5 г/кг, внутривенно), дышащих обычным атмосферным воздухом. Исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики согласно требованиям Community Council Directive 2010/63/ЕЕС. После операции трахеостомии и обнажения крыши черепа крыс размещали в стереотаксическом приборе СЭЖ-3, фиксировали голову и высверливали трепанационное отверстие в окципитальной кости для осуществления микроинъекций в РТЯ. В первой серии опытов ( $n = 9$ ) для микроинъекций использовали раствор ГАМК<sub>A</sub>-агониста мусцимола, во второй ( $n = 11$ ) — ГАМК<sub>A</sub>-блокатора бикикуллина (Sigma-Aldrich) в концентрации  $10^{-7}$  Моль. Вещества растворяли в искусственной спинномозговой жидкости (ИСЖ) и вводили в РТЯ в объеме 200 нл через стеклянную канюлю (диаметр кончика 20–25 мкм) с помощью микрошприца МШ-1 по стереотаксическим координатам (Cream et al. 2002). В третьей серии (контроль,  $n = 6$ ) в РТЯ в том же объеме вводили ИСЖ, которая не вызывала статистически значимых эффектов, поэтому изменения дыхания, наблюдаемые в первой и второй сериях, сопоставляли с исходными значениями.

Внешнее дыхание регистрировали посредством электронного спирографа (ИМЦ «Новые приборы», Россия), подсоединенного к трахеостомической трубке. Выходные сигналы в виде пневмотахограммы подавались на аналогово-цифровой преобразователь, затем на компьютер и записывались в программе PowerGraph 3.2 Professional (ООО «Интероптика-С») непрерывно в исходном состоянии и в течение 60 мин после микроинъекции. Пневмотахограммы интегрировали в спирограммы, на которых определяли дыхательный объем (ДО, мл), продолжительность вдоха (с) и выдоха (с). По спирограммам рассчитывали частоту дыхания (ЧД, цикл/мин), минутный объем дыхания (МОД, мл/мин), объемную скорость инспираторного потока ( $V_i$ , мл/с).

Статистический анализ выполняли в программе SigmaPlot 12.5 («Systat Software» Inc.). Использовали Normality Test Shapiro — Wilk и Paired t-test. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Микроинъекции мусцимола в РТЯ вызывали у крыс угнетение легочной вентиляции. Уменьшение МОД начиналось на первой минуте воздействия (10,5%;  $p < 0,05$ ) и достигало 23,7% ( $p < 0,05$ ) от исходного уровня ( $81,21 \pm 7,52$  мл) на 60 мин (рис. 1А). Данный эффект определялся однонаправленной динамикой ЧД и ДО, причем основной вклад вносила ЧД, которая в конце экспозиции уменьшалась на 17,5% ( $p < 0,05$ ) относительно фона ( $60,93 \pm 5,01$  цикл/мин). Изменения ЧД обуславливались пролонгированием обеих фаз дыхательного цикла. Особо стоит отметить удлинение вдоха, которое в ответ на активацию ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов РТЯ имело нарастающий характер и регистрировалось с первой (12,7%;  $p < 0,01$ ) по 50 мин (21,1%;  $p < 0,05$ ) наблюдений. Значимое увеличение продолжительности выдоха, в отличие от вдоха, формировалось позже, на 20 мин после введения мусцимола, было более выраженным и на 40–60 мин составляло в среднем 25,2% ( $p < 0,05$ ) от исходной величины ( $0,60 \pm 0,04$  с). Подтверждением роли ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов РТЯ в тормозной модуляции дыхания служит уменьшение при действии агониста значений  $V_i$  по сравнению с фоном ( $3,03 \pm 0,31$  мл/с). Эта реакция быстро развивалась в течение 10 мин после микроинъекции мусцимола. Так,  $V_i$  снижалась на первой минуте до  $2,59 \pm 0,11$  мл/с ( $p < 0,05$ ), на 10 — до  $2,25 \pm 0,30$  мл/с ( $p < 0,05$ ) и оставалась примерно на этом уровне до 60 мин (рис. 1В). Начальное снижение  $V_i$  было связано с ростом продолжительности фазы вдоха, а также зависело от величины ДО, достоверное уменьшение которого отмечалось в интервале с 3 по 10 мин действия мусцимола и равнялось в среднем 11,4% ( $p < 0,05$ ) от исходного фона.

Что касается респираторных реакций на микроинъекции в РТЯ раствора бикикуллина, то они имели неоднозначный характер, проявляясь ожидаемой стимуляцией дыхания лишь у части животных ( $n = 6$ ). Следует указать, что изменения отдельных параметров паттерна дыхания при блокаде ГАМК<sub>A</sub> рецепторов РТЯ у крыс не всегда совпадали во времени и могли максимально проявляться в разные сроки экспозиции. Так, статистически значимый прирост ДО (на  $0,08 \pm 0,009$  мл;  $p < 0,05$ ) относительно исходного уровня ( $1,43 \pm 0,06$  мл) наблюдался на 10 мин действия антагониста ( $1,51 \pm 0,05$  мл). Наиболее выраженная тенденция усиления МОД формировалась в конце экспозиции и достоверно проявлялась на 60 мин (рис. 1А), что в целом совпадало с динамикой изменений  $V_i$  (рис. 1В).

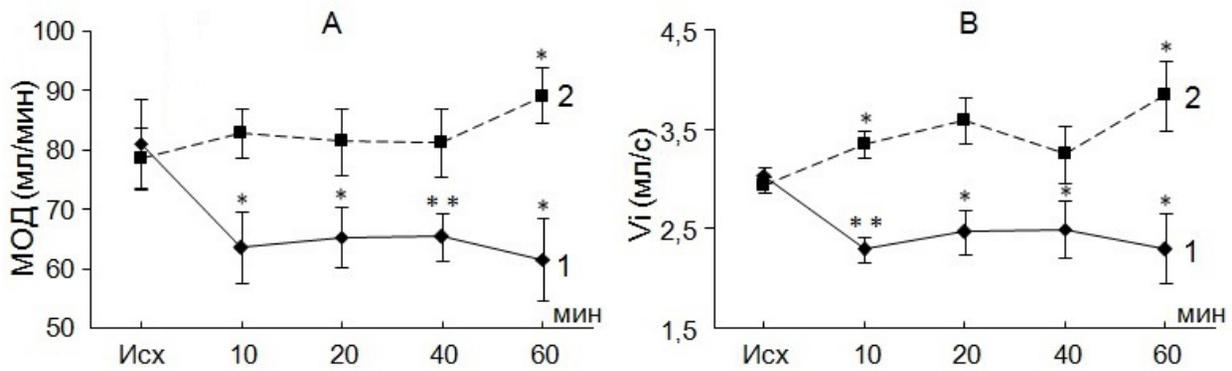


Рис. 1. Изменение минутного объема дыхания (А) и объемной скорости инспираторного потока (В) после микроинъекций мусцимола (1) и бикукуллина (2) в РТЯ у крыс. \* —  $p < 0,05$ , \*\* —  $p < 0,01$  — статистически значимые различия с исходным уровнем

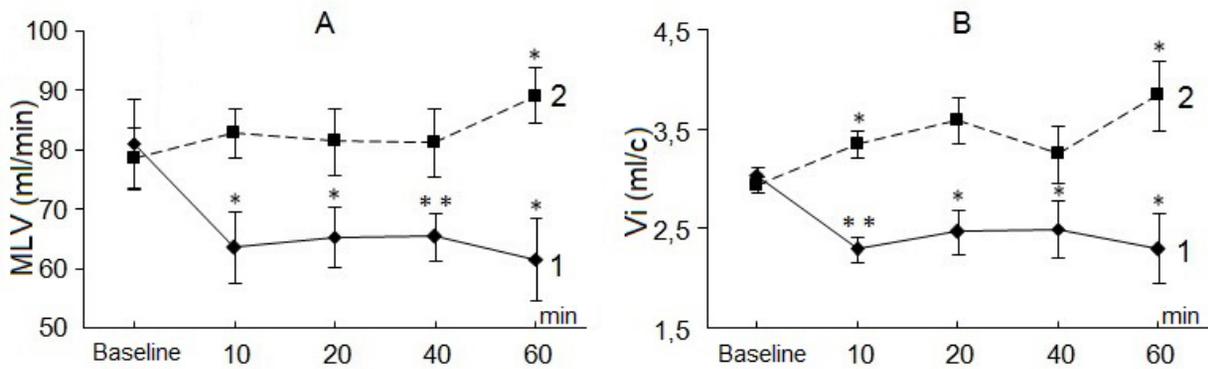


Fig. 1. Changes of minute lung ventilation (A) and volumetric rate of inspiratory flow (B) after microinjections of muscimol (1) and bicuculline (2) into RTN in rats. \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ )—statistically significant differences with the baseline

Таким образом, в ответ на микроинъекции мусцимола и бикукуллина в область РТЯ у наркотизированных крыс, дышащих воздухом неизмененного газового состава, происходили изменения частотных и объемных параметров спирограмм, указывающие на угнетение и усиление внешнего дыхания соответственно при стимуляции и блокаде ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. Наблюдаемые респираторные реакции свидетельствуют о модулирующем влиянии ГАМКергической передачи на нейрональную активность изучаемой области. Отмечаемые у животных изменения легочной вентиляции, видимо, обусловлены влиянием лигандов ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на деятельность Phox2b-нейронов, посылающих проекции к премоторным дыхательным нейронам вентральной респираторной группы и ядра солитарного тракта (Bochorishvili et al. 2012). Анализ результатов действия мусцимола и бикукуллина показал, что более выраженные и закономерные респираторные реакции отмечались в случае активации ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов РТЯ, при этом характерным эффектом являлось снижение ЧД за счет увеличения

продолжительности вдоха. Объяснением этого может служить лиганд-зависимая гиперполяризация (Scott, Aricescu 2019) нейронов РТЯ, имеющих связи с ритмогенерирующими отделами дыхательного центра (Silva et al. 2016b), а также с ядром Келликера — Фьюза, регулирующим продолжительность фаз дыхательного цикла (Silva et al. 2016a). Стимуляция дыхания при микроинъекциях бикукуллина связана, вероятно, с устранением ГАМКергического торможения глутаматергических нейронов РТЯ, проецирующихся в область ростральной вентральной респираторной группы и комплекс пре-Бётцингера (Silva et al. 2016b). В целом результаты проведенного нами исследования подтверждают имеющиеся данные о значении РТЯ для регуляции объемно-временной структуры дыхательного цикла (Huckstepp et al. 2015) и свидетельствуют об участии ГАМКергических механизмов РТЯ, в том числе ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов, в поддержании оптимального паттерна дыхания в условиях ненарушенного газового гомеостаза.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии потенциального или явного конфликта интересов.

## Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest, either existing or potential.

## Соответствие принципам этики

Эксперименты выполнены с соблюдением правил биоэтики в соответствии с требованиями Community Council Directive 2010/63/ЕЕС.

## Ethics Approval

The experiments were performed in compliance with the rules of bioethics in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament

and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

## Вклад авторов

а. Александр Иванович Будаев — планирование исследования, постановка экспериментов, анализ результатов, подготовка рукописи;

б. Ольга Александровна Ведясова — идея и координация исследования, анализ и трактовка результатов, подготовка рукописи.

## Author Contributions

a. Aleksandr I. Budaev: research planning, conducting experiments, analysing results, writing the paper;

b. Olga A. Vedyasova: idea and coordination of research, analysis and interpretation of results, writing the paper.

## References

- Bochorishvili, G., Stornetta, R. L., Coates, M. B., Guyenet, P. G. (2012) Pre-Bötzing complex receives glutamatergic innervation from galaninergic and other retrotrapezoid nucleus neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 520, no. 5, pp. 1047–1061. <https://doi.org/10.1002/cne.22769> (In English)
- Cream, C., Li, A., Nattie, E. (2002) The retrotrapezoid nucleus (RTN): Local cytoarchitecture and afferent connections. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, vol. 130, no. 2, pp. 121–137. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00338-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00338-3) (In English)
- Guyenet, P. G., Bayliss, D. A., Stornetta, R. L. et al. (2016) Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *The Journal of Physiology*, vol. 594, no. 6, pp. 1529–1551. <https://doi.org/10.1113/JP271480> (In English)
- Holloway, B. B., Viar, K. E., Stornetta, R. L., Guyenet, P. G. (2015) The retrotrapezoid nucleus stimulates breathing by releasing glutamate in adult conscious mice. *European Journal of Neuroscience*, vol. 42, no. 6, pp. 2271–2282. <https://doi.org/10.1111/ejn.12996> (In English)
- Huckstepp, R. T., Cardoza, K. P., Henderson, L. E., Feldman, J. L. (2015) Role of parafacial nuclei in control of breathing in adult rats. *The Journal of Neuroscience*, vol. 35, no. 3, pp. 1052–1067. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2953-14.2015> (In English)
- Silva, J. N., Lucena, E. V., Silva, T. M. et al. (2016a) Inhibition of the pontine Kölliker-Fuse nucleus reduces genioglossal activity elicited by stimulation of the retrotrapezoid chemoreceptor neurons. *Neuroscience*, vol. 328, pp. 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.028> (In English)
- Silva, J. N., Tanabe, F. M., Moreira, T. S., Takakura, A. C. (2016b) Neuroanatomical and physiological evidence that the retrotrapezoid nucleus/parafacial region regulates expiration in adult rats. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, vol. 227, pp. 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.02.005> (In English)
- Scott, S., Aricescu, A. R. (2019) A structural perspective on GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology. *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 54, pp. 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.023> (In English)
- Takakura, A. C., Moreira, T. S., De Paula, P. M. et al. (2013) Control of breathing and blood pressure by parafacial neurons in conscious rats. *Experimental Physiology*, vol. 98, no. 1, pp. 304–315. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.065128> (In English)
- Vedyasova, O. A., Kovaleva, T. E., Budaev, A. I. (2020) Analiz roli GAMKergicheskikh mekhanizmov v regulyatsii respiratornoj aktivnosti parafatsial'nykh struktur stvola mozga u krysa [Analysis of the role of GABAergic mechanisms in regulation of the respiratory activity of parafacial structures of the brainstem in rats]. *Biomeditsina — Journal Biomed*, vol. 16, no. 1, pp. 56–64. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-56-64> (In Russian)
- Wu, Y., Proch, K. L., Teran, F. A. et al. (2019) Chemosensitivity of Phox2b-expressing retrotrapezoid neurons is mediated in part by input from 5-HT neurons. *The Journal of Physiology*, vol. 597, no. 10, pp. 2741–2766. <https://doi.org/10.1113/JP277052> (In English)