

УДК 612.216-014.46:613.84:612.273.2]591.392

DOI: 10.12737/20046

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ДЫХАТЕЛЬНОГО ЦЕНТРА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС, ПЕРЕНЕСШИХ ПРЕНАТАЛЬНОЕ ПАССИВНОЕ КУРЕНИЕ, НА ГИПОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ (IN VITRO)**С.Е.Болычевский, Е.А.Зинченко, И.В.Мирошниченко***Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный медицинский университет»**Министерства здравоохранения Российской Федерации, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6***РЕЗЮМЕ**

Предполагается, что выявленное у новорожденных, перенесших в пренатальном периоде хроническое воздействие никотина, снижение выраженности респираторной реакции на гипоксическое воздействие может быть причиной внезапной смерти младенцев. Влияние табачного дыма может отличаться от действия никотина. Исследование выполнено на бульбоспинальных препаратах (БСП) мозга новорожденных крыс (n=38) в условиях *in vitro*. В экспериментальной группе (ПК) моделирование пассивного курения осуществлялось фумигацией сигаретным дымом самок с 1 по 20 день беременности. Гипоксическое воздействие моделировалось путем насыщения искусственной цереброспинальной жидкости газовой смесью 5% CO₂ и 95% N₂. Гипоксическая депрессия респираторного ритма БСП контрольной группы (НК) наступала на 5 минуте, восстановление происходило через 10 минут при нормоксии, одновременно с этим происходило увеличение амплитуды инспираторных разрядов, которая не вернулась к исходным значениям (15 минут). У препаратов группы НК на 10 минуте гипоксии уменьшалась продолжительность инспираторных разрядов, которая восстанавливалась через 10 минут при нормоксии. Увеличение соотношения мощности низкочастотных и среднечастотных осцилляций в группе НК наблюдалось на 15 минуте гипоксии, с восстановлением в течение 10 минут. В экспериментальной группе (ПК) увеличение продолжительности респираторного цикла происходило на 10 минуте гипоксии, с динамикой восстановления аналогичной группе НК. Увеличение амплитуды инспираторных разрядов происходило на 10 минуте гипоксии, с периодом восстановления 10 минут. У БСП группы ПК уменьшение продолжительности инспираторных разрядов и увеличение соотношения мощности осцилляций низко- и среднечастотного диапазона наступало на 5 и 10 минуте гипоксии, и к исходным значениям эти параметры не пришли. Наши данные подтверждают, что пренатальное пассивное курение оказывает влияние на механизмы центральной хемочувствительности у потомства в раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: дыхательный центр, *in vitro*, пассивное курение, бульбоспинальный препарат, гипоксия.

SUMMARY**FEATURES OF THE RESPONSE OF THE RESPIRATORY CENTER OF NEWBORN RATS THAT WERE EXPOSED TO PRENATAL PASSIVE SMOKING TO HYPOXIA (IN VITRO)****S.E.Bolychevsky, E.A.Zinchenko, I.V.Miroshnichenko***Orenburg State Medical University, 6 Sovetskaya Str.,
Orenburg, 460000, Russian Federation*

It is expected that in neonates that underwent prenatal chronic effect of nicotine the identification of the reduction of intensiveness of respiratory response to hypoxic exposure may be the cause of sudden infant death. The effect of cigarette smoke may differ from the effect of nicotine. The study was performed on brain stem spinal cord preparations (BSS) in the brain of newborn rats (n=38) *in vitro*. In the experimental group (EG) the modeling of passive smoking was carried out by fumigation of cigarette smoke of rat females from the 1st to 20th day of gestation. Hypoxia was simulated by an artificial cerebrospinal fluid saturated with a gas mixture of 5% CO₂ and 95% N₂. Hypoxic depression of BSS respiratory rhythm of the control group (CG) occurred at the 5th minute; the restoration took place in 10 minutes at normoxia, at the same time there was an increase of the amplitude of the inspiratory discharges which did not return to baseline values (15 minutes). In preparations of CG at the 10th minute of hypoxia the duration of inspiratory discharges decreased and restored after 10 minutes at normoxia. The increase of the ratio of the power of low-frequency and medium-frequency oscillations was observed in the CG at the 15th minute of hypoxia with the restoration during 10 minutes. In the experimental group (EG) the increase of the duration of the respiratory cycle occurred at the 10th minute of hypoxia with the dynamics of recovery similar to that of CG. The increase of the amplitude of inspiratory discharges occurred at the 10th minute of hypoxia; a recovery period took 10 minutes. In the BSS of EG the reduction in the duration of the inspiratory discharges and the increase of the ratio of the power oscillations of low- and mid-range occurred at the 5th and 10th minutes of hypoxia and these parameters never returned to baseline values. Our data suggest that prenatal exposure to secondhand smoke has an effect on the mechanisms of central chemosensitivity in the offspring in the early postnatal period.

Key words: respiratory center, in vitro, passive smoking, brain stem spinal cord preparations, hypoxia.

Никотин считается основным нейротоксическим фактором, обуславливающим нарушение функций нервной системы новорожденных, матери которых являлись во время беременности активными или пассивными курильщиками [4]. Предполагается, что выявленное у новорожденных, перенесших в пренатальном периоде хроническое воздействие никотина, снижение выраженности респираторной реакции на гипоксическое влияние [6] может быть причиной внезапной смерти младенцев [9]. Возрастной особенностью респираторной реакции на гипоксию у новорожденных млекопитающих является слабо выраженная и непродолжительная фаза аугментации, после которой следует мощная фаза депрессии, заканчивающаяся остановкой дыхания. Считается, что слабая выраженность фазы аугментации у новорожденных обусловлена незрелостью периферических хеморецепторов, активация которых лежит в основе начальной гипоксической гипервентиляции [1]. Фаза депрессии в основном является следствием активации процессов в респираторной нейронной сети пре-Бетзингера комплекса, ответственной за генерацию респираторного ритма. В исследовании *in vivo* было установлено уменьшение выраженности, как фазы аугментации, так и фазы депрессии у новорожденных крыс, перенесших пренатальное хроническое действие никотина [12]. В то же время, в исследованиях *in vitro* показано снижение способности срезов ствола мозга новорожденных мышей, перенесших пренатальную экспозицию никотином, поддерживать дыхательный ритм во время воздействия тяжелой гипоксии [6].

Влияние табачного дыма может отличаться от действия никотина вследствие сложности его состава. Важным фактором воздействия табачного дыма на организм является угарный газ, способный проникать через гистогематический барьер и вызывать образование карбоксигемоглобина у плода, что может приводить к фетальной гипоксии [2]. Прерывистая гемическая гипоксия, по нашему предположению, может изменить характер хронического влияния никотина в пренатальном периоде на способность респираторной нейронной сети ствола мозга реагировать на гипоксические воздействия. Нами были исследованы особенности гипоксической реакции бульбоспинальных препаратов мозга (БСП) новорожденных крыс *in vitro*, полученных от самок, перенесших во время беременности периодическое фумигирование табачным дымом.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 38 изолированных БСП мозга новорожденных белых беспородных крыс в условиях *in vitro*. Препараты были получены из мозга 38 новорожденных крыс в возрасте одних суток. Экспериментальную группу составил 21 БСП. В экспериментах использовались крысы после самопроизвольного рождения. После датирования бе-

ременности самки с 1 по 20 сутки содержались в вентилируемых (95 м³/час) герметичных камерах ($V=0,374$ м³). Самки экспериментальной группы (моделирование пассивного курения – ПК) 5 дней в неделю подвергались фумигации сигаретным дымом. Фумигация осуществлялась каждые 60 минут дымом, полученным от 1 тлеющей сигареты, с 9.00 до 17.00 местного времени. Концентрация твердых взвешенных частиц в воздухе при фумигации составляла 1 мг/м³. Гермокамеры с самками контрольной группы (НК) вентилировались только атмосферным воздухом.

БСП были получены по методике, описанной T.Suzue [13]. Во время препарирования мозг орошали искусственной цереброспинальной жидкостью (температура +4°C), насыщенной газовой смесью 5% CO₂ и 95% O₂, pH 7,3-7,4. По окончании препарирования температура перфузата постепенно повышалась до +25°C и препарат помещался в регистрационную камеру объемом 3 мл. Перфузию препарата в камере проводили со скоростью 3 мл/мин. Электрическая активность вентральных корешков сегментов C3-C5 отводилась с помощью всасывающего электрода. Гипоксическое воздействие моделировалось путем насыщения искусственной цереброспинальной жидкости газовой смесью 5% CO₂ и 95% N₂.

При обработке нейрограмм измерялись продолжительность цикла респираторной активности (с), продолжительность (с) и амплитуда инспираторных разрядов (мкВ).

Спектральный анализ разрядов производился с использованием алгоритма быстрого преобразования Фурье. В спектрограммах респираторных разрядов выделялись максимальные пики в низко- (1-10 Гц) и среднечастотном (10-50 Гц) диапазонах. Для описания пиков спектра респираторных разрядов использовались следующие параметры: частота пика (Гц) и спектральная плотность мощности (СПМ) пика (относительные единицы). Показатели спектральных характеристик рассчитывались на основании данных, полученных от 10 спектрограмм последовательных инспираторных разрядов.

Анализ статистических различий производился с помощью t-теста Стьюдента для средних величин. Различия считались достоверными при $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В группе НК у БСП новорожденных крыс (0-1 сутки) не удалось четко выделить фазу аугментации в нормокапнических условиях. Описанное ранее вызываемое гипоксическим воздействием увеличение частоты генерации респираторных разрядов, регистрируемых с корешка подъязычного нерва поперечного среза ствола мозга с пре-Бетзингеровым комплексом, не было статистически достоверным в отличие от последующего снижения частоты [9]. В нашем исследовании были использованы препараты мозга, полученные от новорожденных крыс в первые сутки после рождения, в этот период фаза аугментации или слабо выражена или отсутствует вовсе [1].

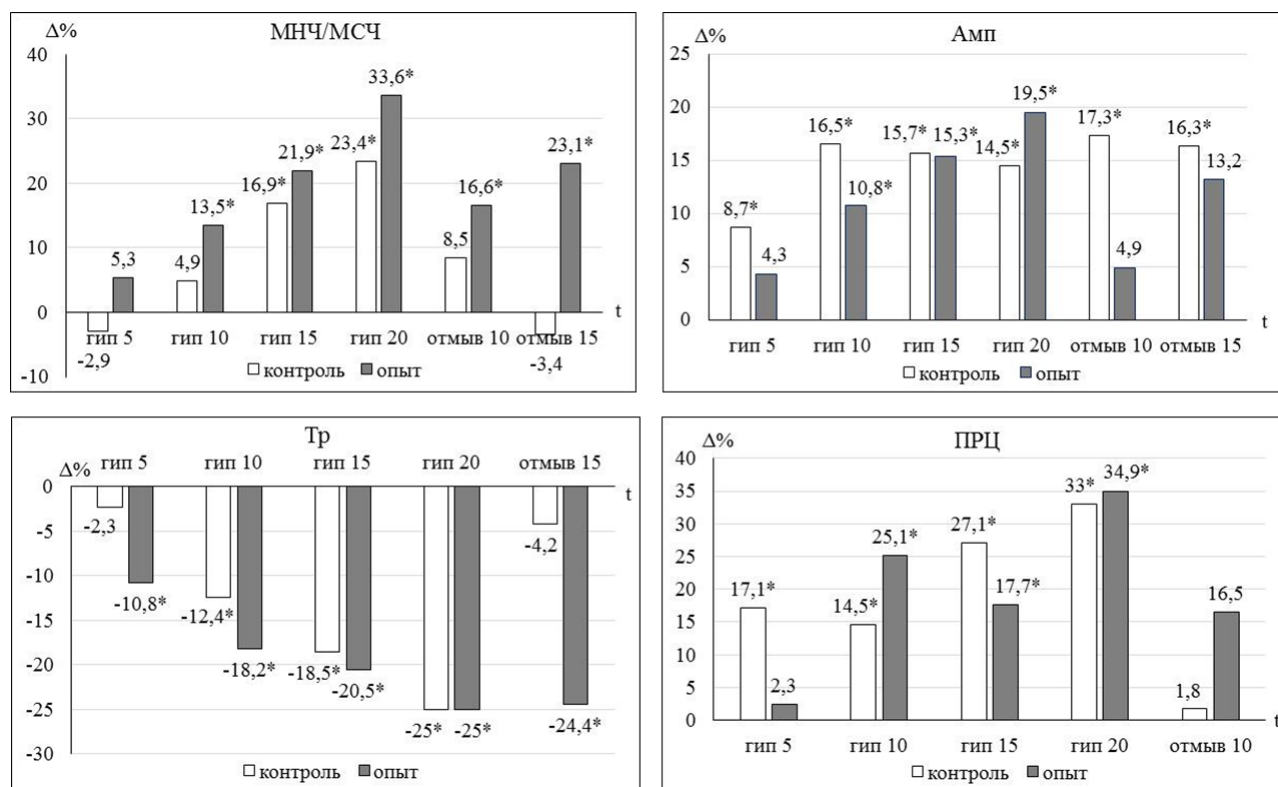


Рис. Изменение параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С3-С4 БСП новорождённых крыс групп ПК и НК в условиях гипоксии.

Примечание: Ампл – амплитуда инспираторного разряда; ПРЦ – продолжительность респираторного цикла; Тр – продолжительность инспираторного разряда; МНЧ/МСЧ – соотношение спектральной плотности мощности пиков респираторных разрядов в низко- и среднечастотном диапазоне.

Гип 5, гип 10 – продолжительность гипоксического воздействия в минутах.

* – достоверность различий параметров ($p < 0,05$).

В наших исследованиях депрессия респираторного ритма БСП группы НК достигала достоверной выраженности на 5 минуте перфузии церебро-спинальной жидкостью, насыщенной газовой смесью 95% N_2 и 5% CO_2 (рис.). Восстановление респираторного ритма до исходного уровня после прекращения гипоксического воздействия происходило через 10 минут. Одновременно с увеличением продолжительности респираторного цикла происходило значимое увеличение амплитуды инспираторных разрядов (рис.), которая не восстанавливалась до исходных значений в течение всего периода восстановления после гипоксического воздействия (15 минут). У препаратов группы НК на 10 минуте гипоксического воздействия достоверно уменьшалась продолжительность инспираторных разрядов (рис.), которая восстанавливалась через 10 минут после прекращения гипоксического воздействия. Достоверное увеличение соотношения мощности низкочастотных и среднечастотных осцилляций в группе НК наблюдалось на 15 минуте гипоксического воздействия, эти изменения сохранялись в течение первых 10 минут периода восстановления.

В группе ПК, так же как и в контрольной, у большинства БСП на фоне гипоксического воздействия нельзя выделить фазу аугментации. При оценке влияния пренатального пассивного курения на динамику развития гипоксической депрессии респираторного

ритма было отмечено, что значимое увеличение продолжительности респираторного цикла в группе ПК происходило позже, чем в контрольной группе (на 10 минуте воздействия, см. рисунок). При этом динамика восстановления респираторного ритма после гипоксического воздействия остается аналогичной той, что наблюдалась в контроле. У БСП мозга новорожденных крыс группы ПК достоверное увеличение амплитуды инспираторных разрядов происходило на 10 минуте гипоксического воздействия (рис.), в отличие от группы НК. Особенностью динамики изменения амплитуды инспираторных разрядов при гипоксическом воздействии в группе ПК является не только более позднее развитие увеличения, но и то, что в период восстановления оно возвращается к исходному уровню на 10 минуте, а в группе НК оставалось повышенной до конца эксперимента.

В отличие от препаратов группы НК, у БСП опытной группы уменьшение продолжительности инспираторных разрядов и увеличение соотношения мощности осцилляций низко- и среднечастотного диапазона наступает раньше – на 5 и 10 минуте гипоксического воздействия, соответственно (рис.). После прекращения гипоксического воздействия в течение 15 минут оба этих параметра не пришли к исходному значению в обеих группах.

В настоящее время накоплено достаточно много

сведений о влиянии пренатального воздействия никотина на характер реакции системы дыхания на гипоксию у новорождённых животных. Так, H.Hu et al. [6] обнаружили, что пренатальное воздействие никотина приводит к увеличению вариабельности респираторного ритма во время воздействия тяжелой гипоксии, чего не обнаружили мы в своей работе. По данным J.Eugenín et al. [3], подверженные никотину новорожденные крысы демонстрировали уменьшение чувствительности к гипоксии на 0-3 послеродовой день, заключающееся в отсутствии изменений в паттерне инспираторного разряда и продолжительности респираторного цикла *in vivo* на фоне гипоксического воздействия, что отличается от полученных нами результатов. В то же время T.A.Slotkin et al. [11] напротив, обнаружили повышенную чувствительность к гипоксии у подверженных пренатальному воздействию никотина новорождённых животных. В исследованиях R.A.Neff et al. [9] пренатальное воздействие никотина существенно не влияло на частоту или длительность респираторного залпа у подопытных животных, что также не в полной мере подтверждается нашими результатами.

Как известно, АТФ-зависимые калиевые каналы участвуют в возникновении депрессии респираторной активности продолговатого мозга в условиях гипоксии [8]. Уровни глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК) увеличиваются в начале гипоксического воздействия, что совпадает с возрастанием активности диафрагмального нерва, а затем снижаются во время центрального апноэ. Серотонин и аденозин медленно и неуклонно увеличиваются с наступлением депрессии деятельности диафрагмального нерва на фоне гипоксии [10]. Пренатальное воздействие никотина изменяет ответ ГАМК-эргических нейронов на гипоксию с двухфазного ответа на стремительное снижение спонтанной частоты ГАМК-эргической активности.

Как было отмечено выше, важным фактором влияния табачного дыма на организм является угарный газ, который может приводить к фетальной гипоксии [2]. Известно, что внутриутробная гипоксия может повлиять на развитие мозга и привести к изменению респираторной активности после рождения. Так, пренатальное воздействие угарного газа увеличивает чувствительность к CO_2 у 4-дневных морских свинок [7]. У плода, вероятно, хроническая гипоксия усиливает хеморефлекторную деятельность [5].

Особенностью нашего исследования является подход к моделированию «пассивного табакокурения». В используемой нами модели животные непосредственно контактировали с сигаретным дымом, что даёт возможность оценить неблагоприятное влияние комплекса факторов пассивного табакокурения, включая и фетальную гипоксию. Фумигация табачным дымом обладает более выраженным повреждающим воздействием на центральные механизмы регуляции дыхания, в отличие от хронического пренатального воздействия никотина, что может объяснить расхождения в результатах, полученных нами и другими исследова-

телями. Обнаруженное нами более позднее изменение частоты респираторного ритма и амплитуды инспираторного разряда на фоне гипоксии у БСП опытной группы в сравнении с контрольной, можно объяснить адаптацией нейронов генератора респираторного ритма к периодической фетальной гемической гипоксии, вызванной воздействием факторов пассивного курения.

Несмотря на разные методические подходы, данные, полученные нами и другими исследователями подтверждают предположение о том, что пренатальное пассивное курение вызывает существенные изменения в механизмах центральной хемочувствительности у потомства в раннем постнатальном периоде, что может быть результатом реорганизации нейротрансмиттерных систем пре-Бётзингерова комплекса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bissonnette J.M. Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000. Vol.278, №6. P.1391–1400.
2. Ekblad M., Korkeila J., Lehtonen L. Smoking during pregnancy affects foetal brain development // *Acta Paediatr.* 2015. Vol.104, №1. P.12–18.
3. Eugenín J., Otárola M., Bravo E., Coddou C., Cerpa V., Reyes-Parada M., Llona I., von Bernhardt R. Prenatal to early postnatal nicotine exposure impairs central chemoreception and modifies breathing pattern in mouse neonates: a probable link to sudden infant death syndrome // *J. Neurosci.* 2008. Vol.28, №51. P.13907–13917.
4. Gisell S., Grady R., Jones J., Mc Donald S.D. Environmental tobacco smoke exposure and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analyses // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2010; Vol.89, №4. P.423–441.
5. Hanson M.A. Role of chemoreceptors in effects of chronic hypoxia // *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 1998. Vol.119, №3. P.695–703.
6. Hu H., Brahmabhatt A., Upadhyaya R., Vega D., Hill A.A. Prenatal nicotine exposure alters the response of the mouse *in vitro* respiratory rhythm to hypoxia // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2012. Vol.181, №2. P.234–247.
7. McGregor H.P., Westcott K., Walker D.W. The effect of prenatal exposure to carbon monoxide on breathing and growth of the newborn guinea pig // *Pediatr. Res.* 1998. Vol.43, №1. P.126–131.
8. Mironov S.L., Langohr K., Haller M., Richter D.W. Hypoxia activates ATP-dependent potassium channels in inspiratory neurones of neonatal mice // *J. Physiol.* 1998. Vol.509, Pt.3. P.755–766.
9. Neff R.A., Simmens S.J., Evans C., Mendelowitz D. Prenatal nicotine exposure alters central cardiorespiratory responses to hypoxia in rats: implications for sudden infant death syndrome // *J. Neurosci.* 2004. Vol.24, №42. P.9261–9268.
10. Richter D.W., Schmidt-Garcon P., Pierrefiche O., Bischoff A.M., Lalley P.M. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats // *J. Physiol.* 1999. Vol.514, Pt.2. P.567–

578.

11. Slotkin T.A., Lappi S.E., McCook E.C., Lorber B.A., Seidler F.J. Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome // *Brain Res. Bull.* 1995. Vol.38, №1. P.69–75.

12. Simakajornboon N., Vukmir V., Hong Li., Sawnani H. Effect of prenatal nicotine exposure on biphasic hypoxic ventilatory response and protein kinase C expression in caudal brain stem of developing rats // *J. Appl. Physiol.* 2004. Vol.96, №6. P.2213–2219.

13. Suzue T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat // *J. Physiol.* 1984. Vol.354. P.173–183.

REFERENCES

1. Bissonnette J.M. Mechanisms regulating hypoxic respiratory depression during fetal and postnatal life. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000; 278(6):R1391–1400.

2. Ekblad M., Korkeila J., Lehtonen L. Smoking during pregnancy affects foetal brain development. *Acta Paediatr.* 2015; 104(1):12–18.

3. Eugén J., Otárola M., Bravo E., Coddou C., Cerpa V., Reyes-Parada M., Llona I., von Bernhardt R. Prenatal to early postnatal nicotine exposure impairs central chemoreception and modifies breathing pattern in mouse neonates: a probable link to sudden infant death syndrome. *J. Neurosci.* 2008; 28(51):13907–13917.

4. Gisell S., Grady R., Jones J., Mc Donald S.D. Environmental tobacco smoke exposure and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analyses. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2010; 89(4):423–441.

5. Hanson M.A. Role of chemoreceptors in effects of

chronic hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 1998; 119(3):695–703.

6. Hu H., Brahmabhatt A., Upadhyaya R., Vega D., Hill A.A. Prenatal nicotine exposure alters the response of the mouse in vitro respiratory rhythm to hypoxia. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2012; 181(2):234–247.

7. McGregor H.P., Westcott K., Walker D.W. The effect of prenatal exposure to carbon monoxide on breathing and growth of the newborn guinea pig. *Pediatr. Res.* 1998; 43(1):126–131.

8. Mironov S.L., Langohr K., Haller M., Richter D.W. Hypoxia activates ATP-dependent potassium channels in inspiratory neurones of neonatal mice. *J. Physiol.* 1998; 509(Pt.3):755–766.

9. Neff R.A., Simmens S.J., Evans C., Mendelowitz D. Prenatal nicotine exposure alters central cardiorespiratory responses to hypoxia in rats: implications for sudden infant death syndrome. *J. Neurosci.* 2004; 24(42):9261–9268.

10. Richter D.W., Schmidt-Garcon P., Pierrefiche O., Bischoff A.M., Lalley P.M. Neurotransmitters and neuromodulators controlling the hypoxic respiratory response in anaesthetized cats. *J. Physiol.* 1999; 514(Pt.2):567–578.

11. Slotkin T.A., Lappi S.E., McCook E.C., Lorber B.A., Seidler F.J. Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome. *Brain Res. Bull.* 1995; 38(1):69–75.

12. Simakajornboon N., Vukmir V., Hong Li., Sawnani H. Effect of prenatal nicotine exposure on biphasic hypoxic ventilatory response and protein kinase C expression in caudal brain stem of developing rats. *J. Appl. Physiol.* 2004; 96(6):2213–2219.

13. Suzue T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.* 1984; 354:173–183.

Поступила 26.02.2016

Контактная информация

Станислав Евгеньевич Болычевский,

аспирант кафедры нормальной физиологии,

Оренбургский государственный медицинский университет,

460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6.

E-mail: singlsb@mail.ru

Correspondence should be addressed to

Stanislav E. Bolychevsky,

Postgraduate student of Department of Normal Physiology,

Orenburg State Medical University,

6 Sovetskaya Str., Orenburg, 460000, Russian Federation.

E-mail: singlsb@mail.ru