

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕНАТАЛЬНОГО ПАССИВНОГО КУРЕНИЯ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ ХЕМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ У НОВОРОЖДЁННЫХ КРЫС (IN VITRO)

Болычевский С. Е., Зинченко Е. А., Мирошниченко И. В.

*ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Оренбург, e-mail: singlsb@mail.ru*

Пассивное курение матери во время беременности увеличивает вероятность возникновения синдрома апноэ во время сна у новорожденных. В исследовании проводилась оценка особенностей центральной хемочувствительности у новорожденных крыс, матери которых во время беременности (с 1 по 20 день) подвергались фумигации табачным дымом. У бульбоспинальных препаратов мозга новорожденных крыс (БСП), перенесших пренатальное пассивное курение, в исходном состоянии в вентральных корешках С<sub>3</sub>-С<sub>5</sub> регистрировались инспираторные разряды меньшей амплитуды и продолжительности. Продолжительность респираторного цикла была на 13.6 % меньше, чем у препаратов контрольной группы. Реакция БСП контрольной группы на увеличение содержания СО<sub>2</sub> в перфузате (с 5 % до 10 %) характеризовалась уменьшением продолжительности респираторного цикла и амплитуды инспираторных разрядов, увеличением доли среднечастотных осцилляций в спектре разрядов за счет уменьшения мощности осцилляций низкочастотного диапазона. Особенностью реакции на гиперкапническое воздействие БСП мозга новорожденных крыс, перенесших пренатальное пассивное курение, являлось отсутствие изменений продолжительности респираторного цикла, меньшая выраженность снижения амплитуды инспираторных разрядов и смещение пика среднечастотного диапазона спектра разрядов в сторону больших частот. Таким образом, в нашем исследовании было установлено, что фумигация табачным дымом беременных самок крыс вызывает существенные изменения в центральных механизмах генерации дыхательного ритма и хемочувствительности у их потомства в раннем постнатальном периоде.

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

## EFFECTS OF PRENATAL PASSIVE SMOKING ON THE CENTRAL CHEMOSENSITIVITY OF NEONATAL RATS (IN VITRO)

Bolychevsky S. E., Zinchenko E. A., Miroshnichenko I. V.

*Orenburg State Medical University, Orenburg, e-mail: singlsb@mail.ru*

Passive smoking during pregnancy increases the risk of sleep-apnea in infants. The study evaluated the features of central chemosensitivity of newborn rats from mothers who during pregnancy (1 to 20 days) was fumigated by tobacco smoke. In brainstem-spinal cord preparations of newborn rats undergoing prenatal exposure to tobacco smoke in the initial state in the ventral roots C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> recorded inspiratory discharges of smaller amplitude and duration. The duration of the respiratory cycle was 13.6 % less than the control group. The reaction of the brainstem-spinal cord preparations of control group to increase the CO<sub>2</sub> content in the perfusate (from 5 % to 10 %) was characterized by a decrease in the duration of the respiratory cycle and the amplitude of the inspiratory discharges, increasing the share of mid-range oscillations in the spectrum of discharges by reducing the power of the low frequency range of the oscillations. Feature of response to hypercapnia effects of brainstem-spinal cord preparations of newborn rats undergoing prenatal exposure to tobacco smoke is no change in the duration of the respiratory cycle, the less marked reduction of the amplitude of the inspiratory discharges and midrange shift of the peak of the spectrum to higher frequencies. Thus, in this study it was found that fumigation of pregnant female rats by tobacco smoke causes significant changes in the central respiratory rhythm generation mechanisms and chemosensitivity in their off spring in the early postnatal period.

Keywords: hypercapnia, the respiratory center, in vitro, passive smoking, brainstem-spinal cord preparation.

Согласно исследованию Gisell S. с соавт. (2010) [4], воздействия пассивного курения не могут избежать 30 % некурящих беременных женщин. У детей, матери которых во время беременности были подвержены пассивному курению, риск наступления внезапной

младенческой смерти (SIDS) значительно больше [12]. Остановку дыхания во время сна считают основной причиной возникновения SIDS [11]. У новорождённых, чьи матери были подвержены пассивному курению, апноэ во время сна встречается чаще, имеет большую продолжительность [5]. Увеличение продолжительности апноэ во время сна связывают со снижением центральной хемочувствительности. Хроническое введение никотина во время беременности самкам грызунов [6,7,11] приводит к уменьшению выраженности реакции дыхательного центра на гиперкапническое воздействие, однако табачный дым содержит более 4000 химических веществ, часть из которых способны преодолевать плацентарный барьер. В данном исследовании было изучено влияние фумигации табачным дымом беременных самок крыс на центральную хемочувствительность их потомства в условиях *in vitro*.

### **Материалы и методы исследования**

В исследовании использованы данные, полученные от 107 изолированных БСП мозга новорожденных (возраст 0–1 сутки) белых беспородных крыс. Экспериментальную группу составили 57, а контрольную 50 новорожденных крыс. После датирования беременности самки с 1 по 20 сутки содержались в вентилируемых (95 м<sup>3</sup>/час) герметичных камерах (V = 0,374 м<sup>3</sup>). Самки экспериментальной группы (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 твёрдых взвешенных частиц в воздухе при фумигации составляла 1мг/м<sup>3</sup>. Гермокамеры с самками контрольной группы (НК) вентилировались только атмосферным воздухом.

БСП были получены по методике, описанной Suzue T. (1984) [13]. Во время препаровки мозг орошали искусственной цереброспинальной жидкостью (температура 4 °С), насыщенной смесью 5 % CO<sub>2</sub> и 95 % O<sub>2</sub>, pH 7,3-7,4.

По окончании препаровки температура перфузата постепенно повышалась до +25 °С, и препарат помещался в регистрационную камеру объемом 3 мл. Перфузию препарата в камере проводили со скоростью 3 мл/мин. Электрическая активность вентральных корешков сегментов C<sub>3</sub>–C<sub>5</sub> отводилась с помощью всасывающего электрода. Гиперкапническое воздействие моделировалось путем насыщения искусственной цереброспинальной жидкости газовой смесью 10 % CO<sub>2</sub> и 90 % O<sub>2</sub>.

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

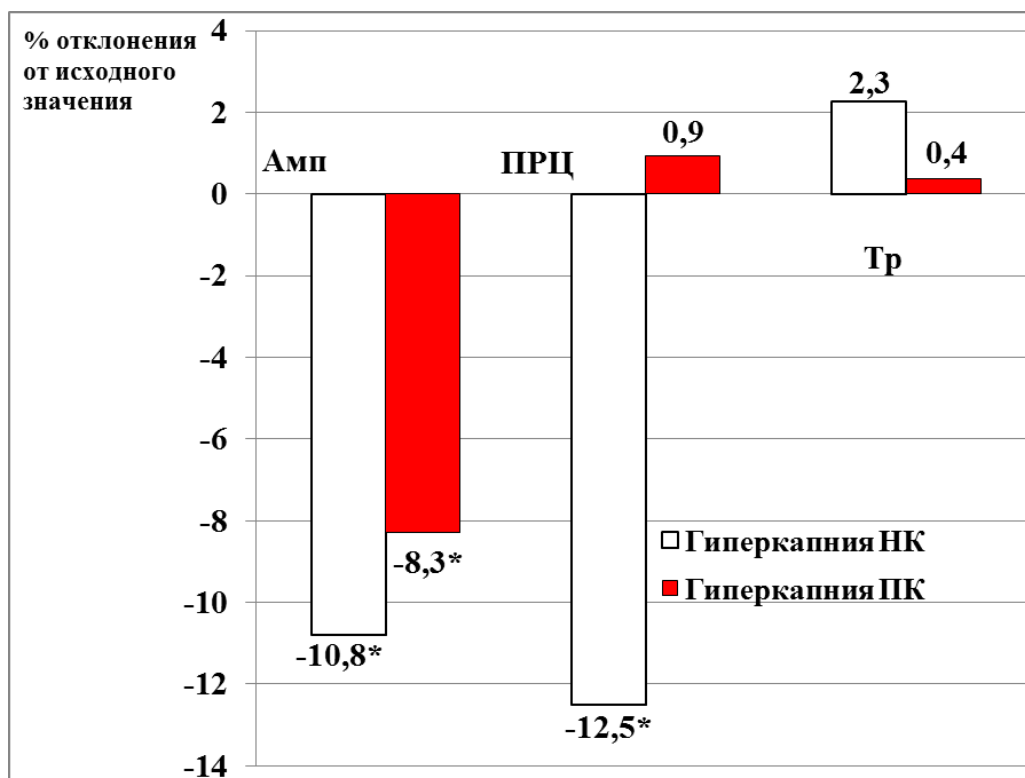
Анализ параметров электрической активности БСП мозга новорождённых крыс групп НК и ПК, зарегистрированных в исходном состоянии, показал наличие значимых различий между средними величинами: амплитуды и продолжительности инспираторных разрядов, продолжительности респираторного цикла, спектральной плотности мощности и частоты пиков низко- и среднечастотного диапазонов (таблица).

Изменение параметров респираторной активности бульбоспинальных препаратов на фоне воздействия пассивного курения в нормакапнических условиях ( $M \pm \sigma$ )  $n=107$

Параметры инспираторной активности	Группа НК n=50	Группа ПК n=57
Мощность низкочастотного пика (МНЧ), о.е.	4,88±0,31	4,09±0,23 *
Частота низкочастотного пика, Гц.	5,95±0,32	5,29±0,26 *
Мощность среднечастотного пика (МСЧ), о.е.	4,37±0,76	2,91±0,17 *
Частота среднечастотного пика, Гц.	18,52±1,3 1	15,87±0,6 3*
Соотношение МНЧ/МСЧ, у.е.	1,41±0,08	1,49±0,07
Амплитуда инспираторного разряда, мкВ.	53,79±2,8 6	45,13±2,1 2*
Продолжительность инспираторного разряда (Тр), с.	1,04±0,04	0,95±0,03 *
Коэффициент вариабельности Тр, у.е.	0,21±0,01	0,19±0,01
Продолжительность респираторного цикла (ПРЦ), с.	17,75±1,1 7	15,34±0,7 2*
Коэффициент вариабельности ПРЦ у.е.	0,19±0,01	0,19±0,01
Примечание: – * – достоверность различий параметров, $p < 0,05$ .		

Реакция БСП группы НК на гиперкапническое воздействие характеризовалось уменьшением продолжительности респираторного цикла и амплитуды инспираторных разрядов (рисунок 1). В спектре инспираторного разряда гиперкапническое воздействие вызывало изменение соотношения мощностей низкочастотного и среднечастотного

компонентов за счет снижения мощности низкочастотного пика (рисунок 2). У БСП мозга новорожденных крыс, перенесших пренатальное пассивное курение, на фоне гиперкапнического воздействия также происходило изменение соотношения мощностей в спектре инспираторного разряда (рисунок 2). Снижение амплитуды инспираторных разрядов было менее выражено, но осталось достоверным (рисунок 1). Реакция на гиперкапнию БСП группы ПК отличалась отсутствием сокращения продолжительности респираторного цикла (рисунок 1) и существенным смещением пика среднечастотного диапазона в сторону большей частоты (рисунок 2).



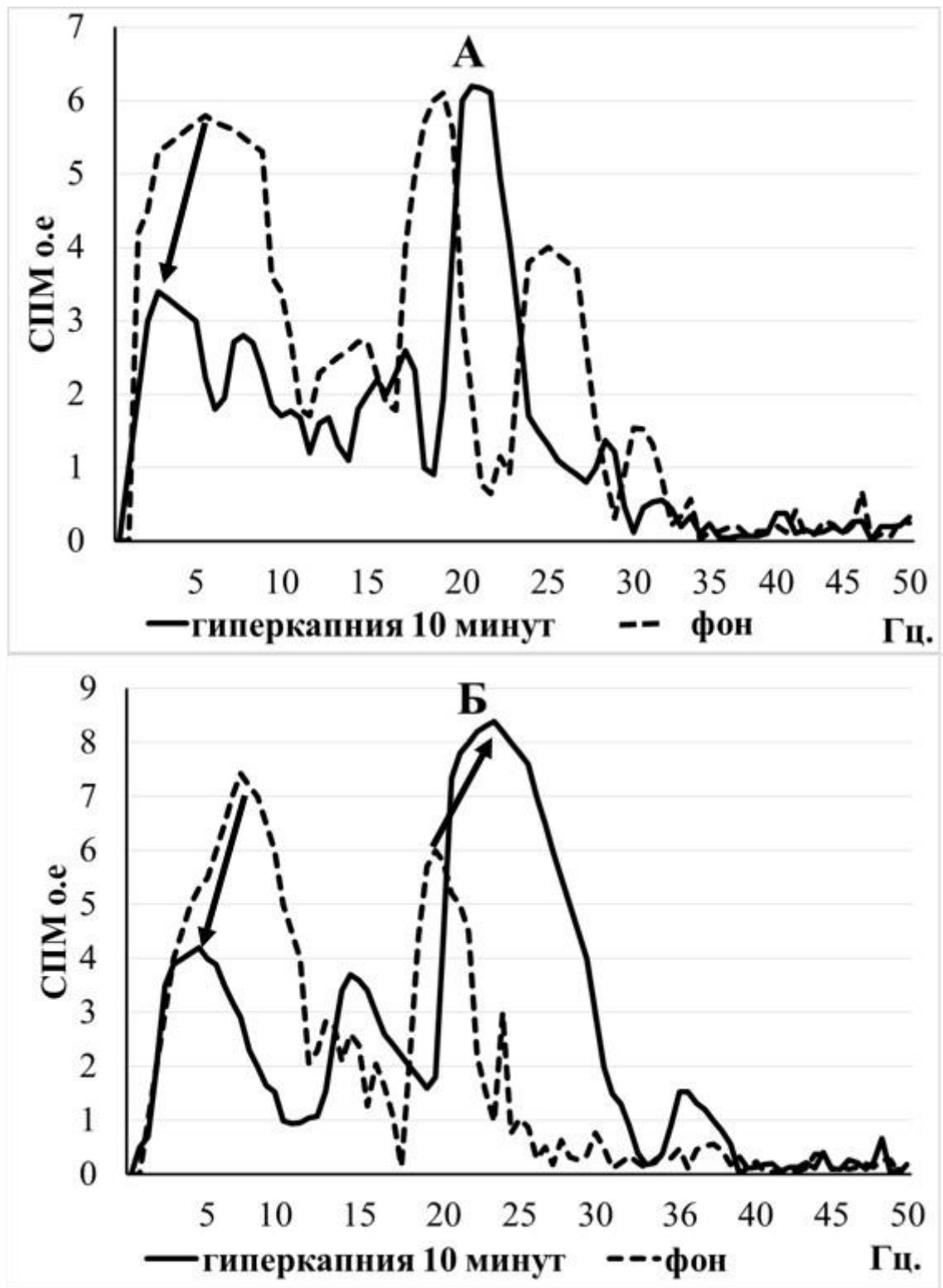
*Рис. 1. Изменение амплитудно-временных параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С3-С4 БСП новорождённых крыс групп ПК и НК при гиперкапническом воздействии*

Примечание 1: – \* – достоверность различий параметров,  $p < 0,05$ ;

Примечание 2: – Амп – амплитуда инспираторного разряда;

ПРЦ – продолжительность респираторного цикла;

Тр – продолжительность инспираторного разряда.



*Рис. 2. Изменение спектральных характеристик инспираторных разрядов, регистрируемых в вентральных С<sub>3</sub>-С<sub>4</sub> при гиперкапническом воздействии у БСП новорождённых крыс групп НК (А), ПК (Б)*

Примечание: – СПМ – спектральная плотность мощности, МНЧ – спектральная плотность мощности в низкочастотном диапазоне; МСЧ – спектральная плотность мощности в среднечастотном диапазоне; → направление достоверного смещения значений спектральной плотности мощности.

Представленные данные нашего экспериментального исследования *in vitro* достаточно наглядно свидетельствуют о существенном влиянии пассивного табакокурения беременных на механизмы генерации дыхательного ритма и центральную хемочувствительность у их потомства.

Особенностью данного исследования является подход к моделированию «пассивного табакокурения», в отличие от большинства предыдущих изысканий, в которых экспериментальным животным длительное время вводился никотин. В используемой нами модели животные непосредственно контактировали с сигаретным дымом, что даёт возможность оценить неблагоприятное влияние комплекса факторов пассивного табакокурения. Существует мнение [10], что фумигация табачным дымом обладает более выраженным повреждающим воздействием на центральные механизмы регуляции дыхания в отличие от хронического пренатального воздействия никотина. Так, например, сигаретный дым содержит монооксид углерода, который может проникать через гемато-плацентарный барьер и снижать эффективность доставки кислорода к тканям плода [9]. В то же время известно, что прерывистое гипоксическое воздействие может оказывать существенное влияние на центральные механизмы генерации дыхательного ритма и хемочувствительность [1].

Последствия воздействия табачного дыма на беременных активно изучаются на основании данных, полученных при обследовании новорожденных детей, и в различных модельных экспериментах на животных. В настоящее время накоплено достаточно много сведений о влиянии активного и пассивного табакокурения беременных на параметры респираторной активности и характер реакции системы дыхания на гиперкапнию [8]. Однако эти данные трудно сопоставимы между собой из-за разных методических подходов. Например, в исследовании *in vitro* на БСП и срезах продолговатого мозга новорожденных мышей, где пренатальное воздействие табачного дыма имитировалось с помощью введения никотина, было показано, что в исходном состоянии у БСП частота генерации инспираторных разрядов ниже, а у срезов мозга выше по сравнению с данными контрольных групп. При этом уменьшение выраженности реакции на ацидификацию у препаратов, полученных от новорожденных, перенесших пренатальное воздействие никотина, проявляется в снижении амплитуды, но не в частоте генерации инспираторных разрядов [3]. В другом подобном исследовании использовалась фумигационная модель пассивного табакокурения, при этом различий в параметрах исходной респираторной активности срезов продолговатого мозга, полученных от опытных и контрольных новорожденных крыс, не было обнаружено. Вместе с тем реакция на ацидификацию у препаратов среза продолговатого мозга опытных животных характеризовалась меньшей выраженностью

изменений как амплитуды, так и частоты генерации инспираторных разрядов.

Несмотря на разные методические подходы, данные, полученные нами и другими исследователями, подтверждают предположение о том, что воздействие табачного дыма на беременных приводит в дальнейшем к изменениям в механизме генерации дыхательного ритма и снижению центральной хемочувствительности у их потомства. Высказывается предположение о том, что действие факторов табачного дыма на респираторную нейронную сеть реализуется посредством двух основных механизмов: 1) реорганизации нейротрансмиттерных систем и 2) ремоделирования межнейронных связей [2].

### Список литературы

1. Мирошниченко И. В. Влияние периодических изменений газового состава внешней среды на формирование центральных механизмов регуляции дыхания в пренатальном периоде// И. В. Мирошниченко, В. Ф. Пятин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2002. – № 3. – С. 108–114.
2. Campos M. Respiratory dysfunctions induced by prenatal nicotine exposure / M. Campos, E. Bravo, J. Eugenín // ClinExpPharmacol Physiol. 2009 Dec.; 36(12):1205-17.
3. Coddou C. Alterations in cholinergic sensitivity of respiratory neurons induced by prenatal nicotine: a mechanism for respiratory dysfunction in neonatal mice / C. Coddou, E. Bravo, J. Eugenin // Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. 2009; 364(1529): 2527–35.
4. Gisell S. Environmental tobacco smoke exposure and perinatal outcomes: a systematic review and meta-analyses/ S. Gisell, R. Grady, J. Jones, S. D. Mc Donald // ActaObstetGynecol Scand. 2010; 89(4): 423-41.
5. Huang Y. H. Influence of prenatal nicotine exposure on postnatal development of breathing pattern/ Y. H. Huang, A. R. Brown, S. Costy-Bennett, Z. Luo // RespirPhysiolNeurobiol. 2004 Oct. 12; 143(1): 1-8.
6. Huang Z. G. Differential control of central cardiorespiratory interactions by hypercapnia and the effect of prenatal nicotine/ Z. G. Huang, K. J. Griffioen, X. Wang, O. Dergacheva, H. Kamendi, C. Gorini, E. Bouairi, D. Mendelowitz // J Neurosci. 2006 Jan. 4; 26(1): 21-9.
7. Huang Y. H. Influence of prenatal nicotine exposure on development of the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in neonatal rats/ Y.H. Huang, A. R. Brown, S. J. Cross, J. Cruz, A. Rice, J. Stuti, F. Ralph, J. Fregosi // ApplPhysiol 109: 149-158, 2010.
8. Lei F. Impairment of Central Chemoreception in Neonatal Rats Induced by Maternal Cigarette Smoke Exposure during Pregnancy/ F. Lei, X. Yan, F. Zhao, S. Zhang, Q. Zhang, H.

Zhou, Y. Zheng // PLoS One. 2015 Sep. 2; 10(9).

9. Zavorsky G. S. CO and NO pulmonary diffusing capacity during pregnancy: Safety and diagnostic potential/ G. S. Zavorsky, A. B. Blood, G. G. Power, L. D. Longo// *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2010 Mar. 31; 170 (3): 215-25.
10. Pendlebury J. D. Respiratory control in neonatal rats exposed to prenatal cigarette smoke / J. D. Pendlebury, R. J. Wilson, S. Bano, K. J. Lumb, J. M. Schneider, S. U. Hasan // *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2008; 177(11): 1255–61.
11. Slotkin T. A. Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome/ T. A. Slotkin, S. E. Lappi, E. C. McCook, B. A. Lorber, F. J. Seidler // *Brain Res Bull.*1995; 38(1): 69-75.
12. Shao X. M. Central cholinergic regulation of respiration: nicotinic receptors/ X. M. Shao, J. L. Feldman // *Acta Pharmacol Sin* 2009 Jun.; 30 (6): 761–770.
13. Johnson S. M. Isolated in vitro brainstem-spinal cord preparations remain important tools in respiratory neurobiology/ S.M. Johnson, S.M. Turner, A.G. Huxtable, F. Ben-Mabrouk // *Respir Physiol Neurobiol.* 2012 Jan. 15; 180(1): 1–7.