

БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского

Биология. Химия. Том 6 (72). 2020. № 2. С. 3–12.

УДК [612.64.014.46.+612.216.014.46+612.284]:57.0898

DOI 10.37279/2413-1725-2020-6-2-3-12

ЭФФЕКТ ПРЕНАТАЛЬНОГО ПАССИВНОГО КУРЕНИЯ НА ХОЛИНЕРГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ МОДУЛИРОВАНИЯ ДЫХАТЕЛЬНОГО РИТМА У НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС (IN VITRO)

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

*ФГБОУ ВО Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия
E-mail: singlsb@gmail.com*

Как активное, так и пассивное курение увеличивает риск возникновения внезапной смерти новорождённых. В связи с этим интенсивно изучается влияние хронической инфузии никотина, как одного из ведущих нейрогенных факторов табачного дыма на холинергические механизмы регуляции дыхания у новорожденных. В данной работе с использованием фумигационной модели пассивного курения, проверялось предположение о том, что пассивное курение, перенесенное в пренатальном периоде, изменяет выраженность опосредованного через никотиновые рецепторы активирующего влияния холинергической системы ствола мозга на процессы генерации электрической активности респираторной нейронной сети. Установлено, что фумигация табачным дымом беременных крыс снижает у их потомства чувствительность респираторной нейронной сети к действию экзогенного никотина и повышает участие тонического холинергического влияния, опосредованного никотиновыми холинергическими рецепторами в модуляции дыхательного ритма.

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

ВВЕДЕНИЕ

Курение беременных, как активное, так и пассивное, увеличивает риск наступления внезапной смерти у детей в возрасте от одного месяца до года [1]. Хроническое пренатальное воздействие никотина усиливает экспрессию никотиновых холинергических рецепторов (НХР) в нервной системе млекопитающих [2]. НХР участвуют в активирующей модуляции глутаматергических межнейронных синаптических связей в пре-Бетзингеровом комплексе, а также мотонейронах ядра подъязычного и диафрагмального нервов [3]. Блокада физостигмином ацетилхолинэстеразы вызывает увеличение частоты генерации, амплитуды и продолжительности респираторных разрядов, регистрируемых с корешка подъязычного нерва среза продолговатого мозга, содержащего пре-Бетзингеров комплекс в условиях in vitro [4].

Одновременно с феноменом up-regulation НХР, хроническое пренатальное воздействие никотина ускоряет их десенситизацию и замедляет последующее функциональное восстановление [5]. В исследованиях *in vitro* с использованием препаратов мозга в форме бульбоспинальных блоков или срезов, содержащих пре-Бетзингеров комплекс, полученных от новорождённых грызунов, перенесших в пренатальном периоде хроническое воздействие никотина, выявлено снижение выраженности респираторной реакции на экзогенный никотин [5]. Пренатальная хроническая инфузия никотина снижает модулирующее влияние никотина на параметры респираторной активности мотонейронов ядра XII пары черепно-мозговых нервов [1]. Предполагается, что обнаруженное нарушение холинергической модуляции генерации дыхательного ритма и паттерна может лежать в основе патогенеза внезапной младенческой смерти.

Респираторная нейронная сеть ствола мозга получает тоническое активирующее холинергическое влияние [4]. Однако, нет однозначного ответа о том какие холинергические рецепторы опосредуют активирующее тоническое влияние эндогенного ацетилхолина на респираторную сеть ствола мозга. Hatori E. с соавт. (2006) приводят данные о том, что тоническое активирующее холинергическое влияние на респираторную активность опосредовано именно НХР [6]. Однако, в своём исследовании Coddou C. с соавт. [7] подтверждает участие только мускариновых холинергических рецепторов (МХР) в реализации тонического холинергического влияния на генерацию дыхательного ритма и не обнаруживает значимых изменений в нем после хронической пренатальной инфузии никотина.

Цель работы: учитывая существенность изменений как в функциональном состоянии НХР так и их количества, вызванных хроническим пренатальным введением никотина и их широкую вовлеченность в модулирование респираторной активности у новорожденных в данном исследовании проверялось предположение о том, что пренатальное пассивное курение может изменять выраженность и характер опосредованного через НХР тонического активирующего модулирующего влияния холинергической системы продолговатого мозга на процессы генерации инспираторного ритма и паттерна активности респираторной нейронной сети *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использованы данные, полученные от 40 изолированных бульбоспинальных препаратов (БСП) мозга новорожденных (возраст 0-1 сутки) белых беспородных крыс. Экспериментальную группу составили 22, а контрольную 18 препаратов. После датирования беременности, самки с 1 по 20 сутки содержались в вентилируемых (95 м³/час) герметичных камерах ($V = 0,374 \text{ м}^3$). 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 1 мг/м³. Гермокамеры с самками контрольной группы (НК) вентилировались только атмосферным воздухом.

БСП были получены по методике, описанной Suzue T. (1984) [8]. Во время препаровки мозг орошали искусственной цереброспинальной жидкостью температурой 4 °С, насыщенной газовой смесью 5 % CO₂ и 95 % O₂, 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 C₃–C₅ отводилась с помощью всасывающего электрода. После записи фоновых значений, в перфузат добавляли селективный блокатор Н-холинорецепторов (мекамиламин) и селективный агонист Н-холинорецепторов (никотин), в концентрациях 100 мкМ/л и 0,5 мкМ/л соответственно.

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 И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты подтверждают наличие у экзогенного никотина (0,5 мкМ/л) мощного активирующего влияния на частоту генерации, амплитуду и продолжительность инспираторных разрядов БСП мозга новорожденных крыс контрольной группы. Установлено, что увеличение амплитуды инспираторных разрядов сопровождается ростом спектральной плотности мощности в среднечастотном диапазоне их спектрограмм (рисунок 1А; 3). У БСП мозга новорожденных крыс, перенёсших пренатальное воздействие табачного дыма, экзогенный никотин увеличивал только частоту генерации инспираторных разрядов, при этом выраженность укорочения продолжительности респираторного цикла уменьшалась по сравнению с контрольными данными (37 % и 50,7 % соответственно) (рисунок 1Б; 1В). Амплитуда инспираторных разрядов и мощность среднечастотных осцилляций под действием экзогенного никотина у БСП опытной группы существенно снижалась, а продолжительность разряда значимых изменений не претерпевала (рисунок 1А; 1Б; 3).

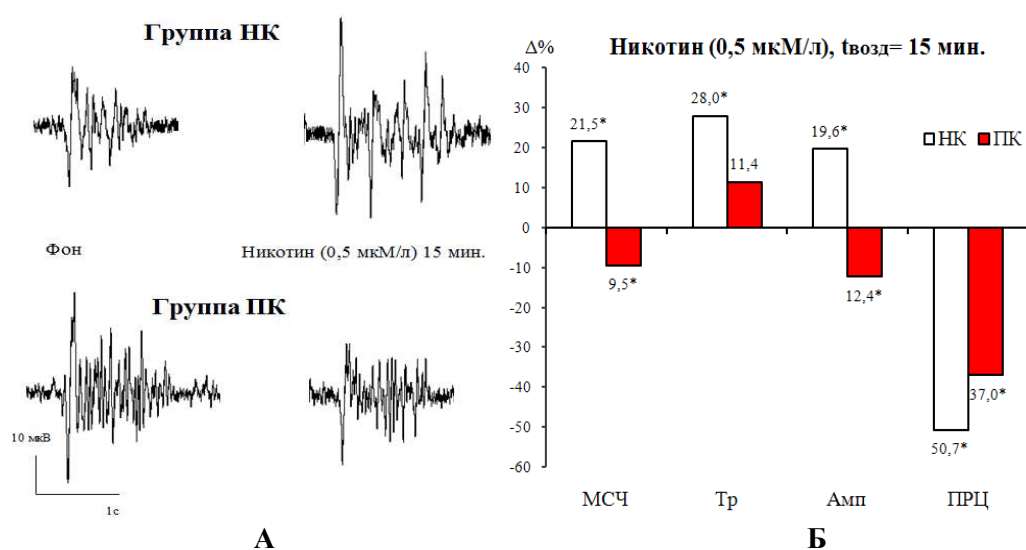


Рис. 1 А; 1 Б. Изменение параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С₃-С₄ БСП новорождённых крыс групп ПК и НК при фармакологической стимуляции никотиновых холинорецепторов.
 Примечание 1: * – достоверность различий параметров, $p < 0,05$;
 Примечание 2: Ампл – амплитуда инспираторного разряда; ПРЦ – продолжительность респираторного цикла; Тр – продолжительность инспираторного разряда; МСЧ – спектральная плотность мощности в среднечастотном диапазоне.

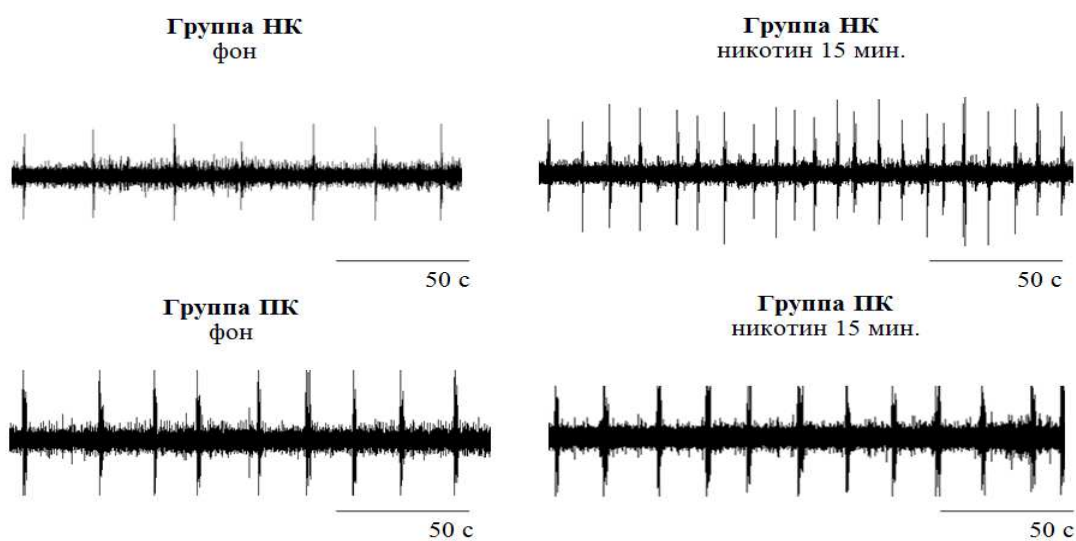


Рис. 1 В. Изменение параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С₃-С₄ БСП новорождённых крыс групп ПК и НК при фармакологической стимуляции никотиновых холинорецепторов.

Мекамилламин (100 мкМ/л), селективный блокатор Н-холинорецепторов, добавленный в перфузат БСП контрольной группы, вызвал достоверное увеличение амплитуды и продолжительности инспираторных разрядов, без существенного изменения продолжительности респираторного цикла (рисунок 2А; 2Б). В то же время у БСП мозга новорожденных крыс, перенесших пренатальное воздействие табачного дыма, блокада НХР приводила к увеличению продолжительности респираторного цикла, которое сопровождалось ростом продолжительности инспираторных разрядов, при этом остальные параметры респираторной активности достоверно не изменялись (рисунок 2Б; 2В).

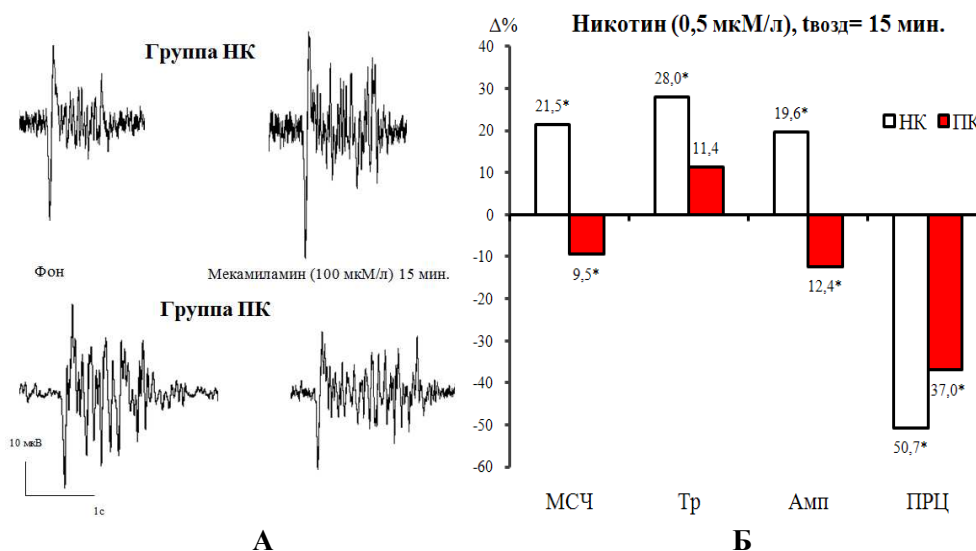


Рис. 2 А, 2 Б. Изменение параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С₃-С₄ БСП новорождённых крыс групп ПК и НК при фармакологической блокаде никотиновых холинорецепторов.

Примечание1: * – достоверность различий параметров, $p < 0,05$;

Примечание2: Амп – амплитуда инспираторного разряда; ПРЦ – продолжительность респираторного цикла; Тр – продолжительность инспираторного разряда; МСЧ – спектральная плотность мощности в среднечастотном диапазоне.

Представленные результаты исследования показывают, что хроническое пренатальное воздействие табачного дыма, также как инфузия никотина [3], вызывает феномен функционального down-regulation НХР в генерирующей респираторный ритм нейронной сети, которая, как считается, локализуется в пре-Бетзингеровом комплексе [4]. Феномен функционального down-regulation НХР при хроническом воздействии никотина связывают с их быстрой десенситизацией никотином и последующим медленным восстановлением [5].

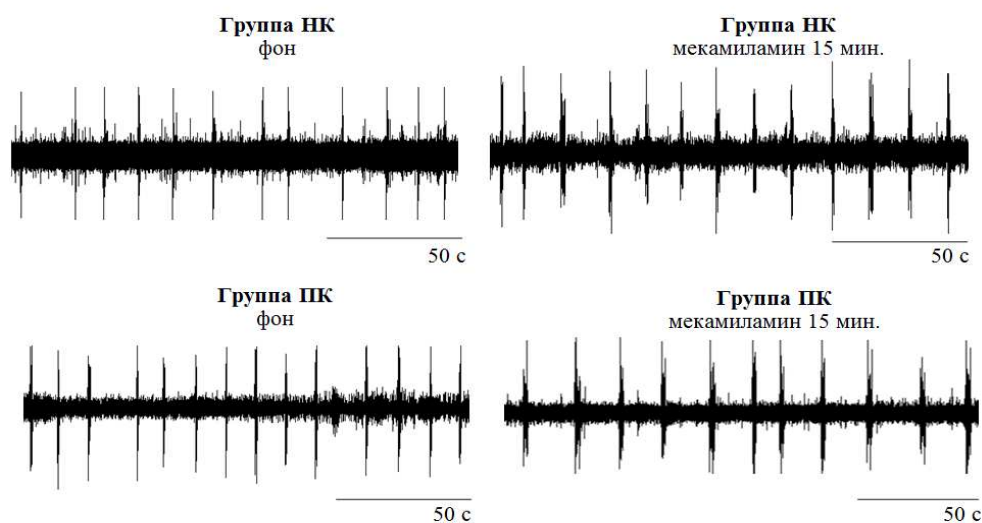


Рис. 2 В. Изменение параметров респираторной активности, регистрируемой с вентральных корешков С₃-С₄ БСП новорождённых крыс групп ПК и НК при фармакологической блокаде никотиновых холинорецепторов.

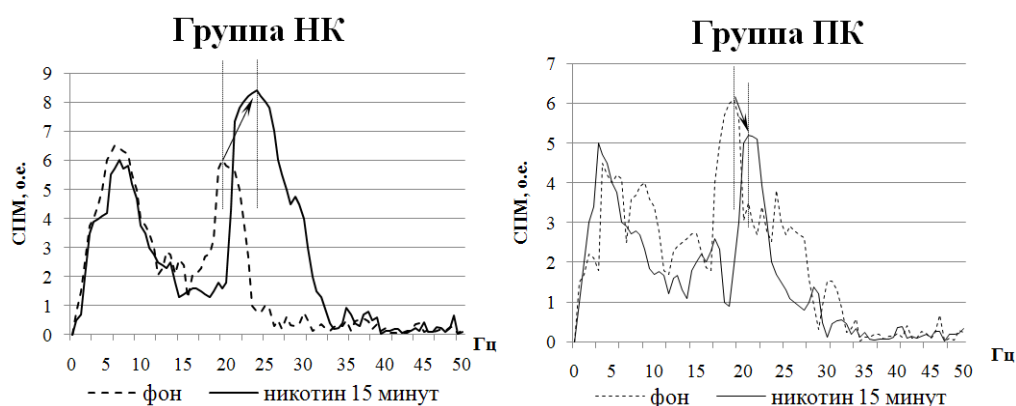


Рис. 3. Изменение спектральных характеристик инспираторных разрядов, регистрируемых в вентральных С₃-С₄ при воздействии никотина у БСП новорождённых крыс групп НК, ПК.

Примечание: СПМ – спектральная плотность мощности, → направление достоверного смещения значений спектральной плотности мощности.

Оценка влияния активации НХР на параметры инспираторных разрядов является неоднозначной. Так в исследовании Dehkordi O. с соавт. [9] обнаружено, что воздействие экзогенного никотина вызывало снижение амплитуды и приводит к увеличению продолжительности инспираторных разрядов, регистрируемых с корешков подъязычного нерва бульбоспинальных препаратов, полученных от

интактных животных [3]. Однако как показали X. M. Shao, J. L. Feldman [4] физостигмин, ингибитор ацетилхолинэстеразы вызывает повышение амплитуды и продолжительности разрядов, регистрируемых с корешков подъязычного нерва. Активирующее влияние никотина на инспираторную активность, зарегистрированное нами, а также другими исследователями, по всей видимости, реализуется на уровне диафрагмальных мотонейронов, 60 % которых экспрессируют НХР [10]. Представленные выше различия в результатах, можно объяснить наличием возможности прямого и опосредованного через паттерн генерирующие нейронные сети ствола мозга действием никотина на диафрагмальные мотонейроны. Например, микроинъекции никотина в пре-Бетзингеров комплекс вызывает снижение амплитуды разрядов, регистрируемых с корешков подъязычного нерва медуллярных срезов [9].

Обнаруженное нами изменение характера реакции инспираторной активности на никотин у препаратов мозга новорожденных крыс, перенесших пренатальное воздействие табачного дыма, подтверждает высокую пластичность холинергических механизмов модуляции функциональных свойств респираторных мотонейронов.

Препараты мозга - бульбоспинальные блоки и срезы ствола лишены одного из основных источников нисходящего холинергического влияния на респираторную нейронную сеть (ядер ножек моста и латеральных дорсальных ядер покрышки). Однако источником эндогенного ацетилхолина могут быть холинергические нейроны в ростральной вентролатеральной области продолговатого мозга [11, 12]. Активирующее влияние блокады холинэстеразы физостигмином на генерацию ритма и инспираторного паттерна в бульбоспинальных препаратах [6, 4] подтверждает наличие в них элементов активирующей холинергической системы ствола мозга. Вопрос участия НХР в тоническом холинергическом влиянии на респираторную нейронную сеть не имеет однозначного подтверждения. В работе Hatori E. [6] с соавторами было показано, что блокада НХР вызывает дозозависимое замедление дыхательного ритма, генерируемого бульбоспинальными препаратами мозга новорожденных крыс. В то же время данные полученные Coddou C. [7] с соавторами не подтверждают наличия тонического холинергического влияния на ритм-генерирующую респираторную нейронную сеть, опосредованного НХР. Представленные в работе данные о наличии тормозного тонического холинергического влияния опосредованного НХР на процесс генерации инспираторного паттерна дает основание предполагать участие ГАМК-ергических механизмов в его модуляции. Известно, что НХР усиливают ГАМК-ергическую синаптическую передачу [13], а блокирование бикикуллином ГАМК рецепторов в спинном мозге вызывает существенное увеличение амплитуды респираторных разрядов [3], регистрируемых с корешков С₄ бульбоспинальных препаратов.

Пренатальное воздействие табачного дыма, в отличие от хронической инфузии никотином [7], изменяет функциональную активность холинергической системы ствола мозга. Возникающее при блокировании НХР мекамиламином (100 мкМ/л) замедление респираторного ритма у препаратов опытной группы, в отличие от

контрольной, свидетельствует об усилении роли НХР в реализации влияния ацетилхолина на процесс генерации респираторного ритма и повышение фоновой тонической активности холинергической системы. По всей видимости, различие эффектов воздействия никотина и табачного дыма обусловлено многокомпонентностью воздействия последнего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное нами исследование показало, что фумигация табачным дымом беременных крыс снижает у их потомства в раннем постнатальном периоде чувствительность респираторной нейронной сети к действию экзогенного никотина и повышает участие тонического холинергического влияния, опосредованного никотиновыми холинергическими рецепторами, в модуляции дыхательного ритма.

Список литературы

1. Robinson D. M. Prenatal nicotine exposure increases apnoea and reduces nicotinic potentiation of hypoglossal inspiratory output in mice / D. M. Robinson, K. C. Peebles, H. Kwok, B. M. Adams // *Physiol.* – 2002. – 538(Pt 3) – P. 957–973.
2. Gentry C. L. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure / C. L. Gentry, R. J. Lukas // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* – 2002. – (4) – P. 359–385.
3. Pilarski J. Q. Prenatal nicotine exposure alters medullary nicotinic and AMPA-mediated control of respiratory frequency in vitro / J. Q. Pilarski, R. F. Fregosi // *Respir Physiol Neurobiol.* – 2009. – 169(1) – P. 1–10.
4. Shao X. M. Cholinergic neurotransmission in the preBotzinger complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm Neuroscience / X. M. Shao, J. L. Feldman // *Author manuscript; available in PMC.* – 2015. – 130(4) – P. 1069–1081.
5. Pilarski J. Q. Increased nicotinic receptor desensitization in hypoglossal motor neurons following chronic developmental nicotine exposure / J. Q. Pilarski, E. Hilary, A. J. Wakefield, R. B. Fuglevand // *Neurophysiol.* – 2012. – 107(1) – P. 257–264.
6. Hatori E. Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats / E. Hatori, S. Sakuraba, M. Kashiwagi, J. Kuribayashi // *Biol. Res.* – 2006. – Vol. 39, no. 2 – P. 321–330.
7. Coddou C. Alterations in cholinergic sensitivity of respiratory neurons induced by pre-natal nicotine: a mechanism for respiratory dysfunction in neonatal mice / C. Coddou, E. Bravo, J. Eugénín // *B Biol Sci.* – 2009. – 364(1529) – P. 2527–2535.
8. Suzue T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat / T. Suzue // *J Physiol.* – 1984. – 354 – P. 173–183.
9. Dehkordi O. Expression of alpha-7 nAChRs on spinal cord-brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm / O. Dehkordi, M. A. Haxhiu, R. M. Millis, G. C. Dennis, P. Kc, A. J. afri, M. Khajavi, C. O. Trouth, S. I. Zaidi // *Respir Physiol Neurobiol.* – 2004. – 141(1) – P. 21–34.
10. Gentry C. L. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure / C. L. Gentry, R. J. Lukas // *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* – 2002. – 1 (4) – P. 359–385.
11. Jones B. E. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat / B. E. Jones // *J Comp Neurol.* – 1990. – 295 – P. 485–514.
12. Ruggiero D. A. Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat / D. A. Ruggiero, R. M. Giuliano, R. Anwar, D. J. Stornetta // *J Comp Neurol.* – 1990. – 292 – P. 1–53.
13. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors / S. Wonnacott // *Trends Neurosci.* – 1997. – 20(2) – P. 92–98.

EFFECTS OF PRENATAL PASSIVE SMOKING ON CHOLINERGIC MECHANISMS SIMULATION RESPIRATORY RHYTHM IN NEONATAL RATS (IN VITRO)

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

*Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia
E-mail: singlsb@gmail.com*

Both active and passive smoking increases the risk of sudden death of the newborn. Researchers are actively studying the effect of chronic nicotine infusion, as one of the leading neurogenic factors of tobacco smoke on cholinergic mechanisms of respiratory control. In this paper, using a fumigation model of passive smoking, tested the assumption that second-hand smoke that is transferred in the prenatal period, changes the expression mediated by nicotinic receptors activating influence of the cholinergic system of the brain stem to the processes of the respiratory activity of the neural network generation. It is found that the fumigation of tobacco smoke pregnant rats decreases their progeny respiratory sensitivity to the action of a neural network and exogenous nicotine increases cholinergic part tonic effect mediated by nicotinic cholinergic receptors in the modulation of respiratory rhythm. The study uses data obtained from 40 brain stem-spinal cord preparations (BSP) of the newborn rats. The experimental group was 22, and the control group was 18 newborn rats. In the processing of neurograms, the duration of the cycle of respiratory activity, duration, and the amplitude of inspiratory discharges were measured. To describe the peaks of the respiratory discharge spectrum, the following parameters were used: the peak frequency and the peak power spectral density of the peak. Analysis of the statistical differences was made using Student's t-test for mean values. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Our results confirm the presence for exogenous nicotine of powerful activating effect on the generation frequency, amplitude and duration of inspiratory discharges of the BSP of newborn rats in the control group. It is established that an increase in the amplitude of the inspiratory discharges is accompanied by an increase in the spectral power density in the mid-frequency range of their spectrograms. In the BSP of the brain of newborn rats with prenatal exposure to tobacco smoke, exogenous nicotine increased only the frequency of inspiratory discharge generation. The amplitude of the inspiratory discharges and the power of the mid-frequency oscillations under the influence of exogenous nicotine in the BSP of the experimental group was significantly reduced. Mecamylamine, a selective blocker of nAChR, added to the perfusate of the BSP of the control group, caused a significant increase in the amplitude and duration of the inspiratory discharges, without significantly changing the duration of the respiratory cycle. At the same time, in BSP of newborn rats subjected to prenatal exposure to tobacco smoke, nAChR blockade resulted in an increase in the duration of the respiratory cycle. Thus, our study showed that fumigation of pregnant rats with tobacco smoke reduces the sensitivity of the respiratory neural network to the action of exogenous nicotine in early postnatal period and increases the involvement of tonic cholinergic effect mediated by nicotinic cholinergic receptors in modulating the respiratory rhythm.

Keywords: respiratory center, in vitro, passive smoking, bulbospinal preparation, cholinergic receptors.

References

1. Robinson D. M., Peebles K. C., Kwok H., Adams B. M. Prenatal nicotine exposure increases apnoea and reduces nicotinic potentiation of hypoglossal inspiratory output in mice, *Physiol.*, **538(Pt 3)**, 957 (2002).
2. Gentry C. L., Lukas R. J. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.*, **1 (4)**, 359 (2002).
3. Pilarski J. Q., Fregosi R. F. Prenatal nicotine exposure alters medullary nicotinic and AMPA-mediated control of respiratory frequency in vitro, *Respir Physiol Neurobiol.*, **169(1)**, 1 (2009).
4. Shao X. M., Feldman J. L. Cholinergic neurotransmission in the preBotzinger complex modulates excitability of inspiratory neurons and regulates respiratory rhythm, *Neuroscience*, **130(4)**, 1069 (2005).
5. Pilarski J. Q., Hilary E., Wakefield A. J., Fuglevand R. B. Increased nicotinic receptor desensitization in hypoglossal motor neurons following chronic developmental nicotine exposure, *Neurophysiol.*, **107(1)**, 257 (2012).
6. Hatori E., Sakuraba S., Kashiwagi M., Kuribayashi J. Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats, *Biol. Res.*, **39, 2**, 321 (2006).
7. Coddou C., Bravo E., Eugenín J. Alterations in cholinergic sensitivity of respiratory neurons induced by pre-natal nicotine: a mechanism for respiratory dysfunction in neonatal mice, *B. Biol. Sci.*, **364(1529)**, 2527 (2009).
8. Suzue T. Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat, *J Physiol.*, **354**, 173 (1984).
9. Dehkordi O., Haxhiu M. A., Millis R. M., Dennis G. C., Kc P., J afri A., Khajavi M., Trouth C. O., Zaidi S.I. Expression of alpha-7 nAChRs on spinal cord-brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm, *Respir Physiol Neurobiol.*, **141(1)**, 21 (2004).
10. Gentry C. L., Lukas R. J. Regulation of nicotinic acetylcholine receptor numbers and function by chronic nicotine exposure, *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.*, **1 (4)**, 359 (2002).
11. Jones B. E. Immunohistochemical study of choline acetyltransferase-immunoreactive processes and cells innervating the pontomedullary reticular formation in the rat, *J Comp Neurol.*, **295**, 485 (1990).
12. Ruggiero D. A., Giuliano R. M., Anwar R., Stornetta, D. J. Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat, *J Comp Neurol.*, **292**, 1 (1990).
13. Wonnacott S. Presynaptic nicotinic ACh receptors, *Trends Neurosci.*, **20(2)**, 92 (1997).