

# НОВЫЕ АСПЕКТЫ АДАПТАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ К ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

DOI: 10.17691/stm2018.10.4.07

УДК 611.81:618.33–001.8

Поступила 8.08.2018 г.



**М.Д. Уразов**, младший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий<sup>1</sup>; аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>;

**Т.А. Астраханова**, младший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий<sup>1</sup>; аспирант кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>;

**А.В. Усенко**, лаборант лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий<sup>1</sup>; магистр кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>;

**Т.А. Мищенко**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий<sup>1</sup>; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ<sup>2</sup>;

**Н.А. Щелчкова**, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>; зав. отделом молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ<sup>2</sup>;

**Г.А. Кравченко**, к.б.н., доцент кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>;

**М.В. Ведунова**, д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>; директор Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>;

**Е.В. Митрошина**, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины<sup>1</sup>; старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий<sup>1</sup>; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий ЦНИЛ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1, Н. Новгород, 603005

**Цель исследования** — изучить особенности влияния хронической и острой пренатальной гипоксии на показатели функциональной активности ЦНС и оценить роль митохондрий в защите ЦНС от гипоксических повреждений в эксперименте.

**Материалы и методы.** Эксперименты *in vivo* были выполнены на мышах линии C57BL/6. Для моделирования хронической пренатальной гипоксии беременные самки мышей ежедневно, начиная с 14-го дня гестации и до родов, помещались в гипобарическую барокамеру, в которой в течение 2 ч поддерживали давление 280–300 мм рт. ст., что соответствует высоте 8000 м над уровнем моря. Моделирование острой пренатальной гипоксии осуществлялось на 18-й день гестации. Беременные самки на 4–5 мин, до первого агонального вдоха, помещались в барокамеру, в которой создавалось давление 220–240 мм рт. ст., соответствующее высоте 10 000 м над уровнем моря. Оценивали скорость потребления кислорода митохондриями клеток головного мозга мышат на 1-е сутки постнатального развития с помощью респирометра высокого разрешения Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Австрия). Для определения общего состояния ЦНС в отдаленном постгипоксическом периоде животным в возрасте 4 нед проводили оценку неврологического статуса по шкале определения неврологического дефицита у мелких лабораторных животных и шкале Гарсии, а также оценку мнестических и когнитивных способностей путем тестирования в водном лабиринте Морриса.

**Для контактов:** Митрошина Елена Владимировна, e-mail: helenmitroshina@gmail.com

**Результаты.** Разработаны протоколы моделирования острой и хронической пренатальной гипоксии на мышцах *in vivo*. Установлено, что острое гипоксическое повреждение приводит к значительному снижению базальной скорости потребления кислорода и интенсивности окислительного фосфорилирования митохондриями головного мозга новорожденных мышат, а также к активации II дыхательного комплекса. После перенесенной хронической пренатальной гипоксии базальная скорость потребления кислорода и интенсивность окислительного фосфорилирования достоверно увеличивались по сравнению с интактной группой.

**Заключение.** Разработанные протоколы экспериментального моделирования пренатальной гипоксии позволили выявить особенности адаптации митохондриального аппарата нервных клеток к разным типам гипоксического повреждения. Установлено, что хроническая гипоксия приводит к адаптации митохондриального аппарата, проявляющейся в интенсификации окислительного фосфорилирования.

**Ключевые слова:** пренатальная гипоксия; окислительное фосфорилирование; митохондрии; ЦНС.

**Как цитировать:** Urazov M.D., Astrakhanova T.A., Usenko A.V., Mishchenko T.A., Schelchkova N.A., Kravchenko G.A., Vedunova M.V., Mitroshina E.V. New aspects of central nervous system adaptation to prenatal hypoxia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 60–68, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.07>

## English

### New Aspects of Central Nervous System Adaptation to Prenatal Hypoxia

**M.D. Urazov**, Junior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies<sup>1</sup>; PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>;

**T.A. Astrakhanova**, Junior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies<sup>1</sup>; PhD Student, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>;

**A.V. Usenko**, Laboratory Assistant, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies<sup>1</sup>; Master, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>;

**T.A. Mishchenko**, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies<sup>1</sup>; Senior Researcher, Molecular and Cell Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>;

**N.A. Schelchkova**, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>; Head of Molecular and Cell Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>;

**G.A. Kravchenko**, PhD, Associate Professor, Department of Molecular Biology and Immunology; Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>;

**M.V. Vedunova**, DSc, Leading Researcher, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>; Director of Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>;

**E.V. Mitroshina**, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine<sup>1</sup>; Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies<sup>1</sup>; Senior Researcher, Molecular and Cell Technologies Department, Central Scientific Research Laboratory<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>2</sup>Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

**The aim of the investigation** was to study the effect of chronic and acute prenatal hypoxia on the parameters of CNS functional activity and to assess the role of mitochondria in the protection of the CNS against experimental hypoxic influence *in vivo*.

**Materials and Methods.** The experiments *in vivo* were performed on C57BL/6 mice. In order to model chronic prenatal hypoxia, pregnant female mice were placed daily into a hypobaric chamber beginning with the fourteenth day of gestation up to delivery. 280–300 mm Hg pressure corresponding to the altitude of 8000 m above sea level was maintained in the chamber for 2 h. Acute prenatal hypoxia was modeled on the eighteenth day of gestation. Pregnant females were placed for 4–5 min (till the first agonal breath) in the hypobaric chamber under 220–240 mm Hg pressure corresponding to the altitude of 10,000 m above sea level.

Oxygen consumption rate by mice brain mitochondria was assessed on the first day of the post-natal period using a high-resolution Oxygraph-2k respirometer (Oroboros Instruments, Austria). To determine a general state of the CNS in the remote post-hypoxic period, a neurological status of the 4-week-old animals was evaluated according to the neurological deficit scale for small laboratory animals and Garcia's scale. Mnestic and cognitive abilities were also tested in Morris water maze.

**Results.** Protocols of acute and chronic prenatal hypoxia modeling for mice have been designed. Acute hypoxic damage has been shown to result in the significant decrease of the basal oxygen consumption rate and intensity of oxidative phosphorylation by the brain

mitochondria of the newborn mice, and in the activation of the respiratory complex II. After chronic prenatal hypoxia, the basal oxygen consumption rate and oxidative phosphorylation intensity significantly increased relative to the intact group.

**Conclusion.** The designed protocols of experimental prenatal hypoxia modeling allowed us to reveal a specific pattern of mitochondrial apparatus adaptation to various types of hypoxic damage. Chronic hypoxia leads to adaptation of the mitochondrial apparatus characterized by intensification of oxidative phosphorylation.

**Key words:** prenatal hypoxia; oxidative phosphorylation; mitochondria; CNS.

## Введение

Пренатальная гипоксия представляет собой патологическое состояние, характеризующееся пониженным содержанием кислорода в тканях, и является одним из ключевых факторов, определяющих патогенез широкого спектра заболеваний, которые встречаются у плода. Тяжелые гипоксические поражения ЦНС в пренатальном периоде могут обуславливать повреждения развивающегося плода, способствуя возникновению энцефалопатии, детского церебрального паралича, асфиксии, гидроцефалии, вторичной микроцефалии, а также являться одной из основных причин грубой задержки психоэмоционального развития, судорожных симптомов и детской смертности [1].

Согласно статистике, 65% случаев повреждений ЦНС у новорожденных обусловлены гипоксическими ишемическими нарушениями и только 15% приходятся на различные постнатальные и генетические факторы [2]. Поражения нервной системы приводят к детской инвалидности в 20,6% случаев, при этом в 70–80% случаев они обусловлены перинатальными факторами [3].

Последствия пренатальной гипоксии не всегда соотносятся со степенью ее тяжести. Большое значение имеют сроки онтогенеза, в которые произошло нарушение поступления кислорода. В пренатальном и раннем постнатальном онтогенезе выделяют несколько критических периодов, когда организм (и в особенности мозг) становится особенно восприимчивым к неблагоприятным воздействиям, а негативные последствия таких воздействий наиболее значимы [4].

Нарушения, обусловленные действием гипоксии во время раннего онтогенеза, могут приводить к возникновению не только грубых дефектов развития (врожденные аномалии — уродства), но и различных функциональных нарушений в деятельности клеток, органов и систем всего организма. При действии повреждающих факторов в ранние сроки, в период активного органогенеза, могут происходить гибель плода, увеличение частоты возникновения хромосомных aberrаций в клетках тканей организма, а также появление таких пороков развития, как анэнцефалия, ацефалия, анофтальмия, заячья губа, фкомелия, амелия, атрезия ротового отверстия и др. Функциональные нарушения связывают с более поздними сроками пренатального онтогенеза [5, 6].

В некоторых особо чувствительных структурах мозга, например коре больших полушарий, вследствие

воздействия гипоксии изменяется нормальный баланс нейромедиаторов (глутамата, дофамина, серотонина, ацетилхолина и др.) и продуктов их обмена [7], кроме того, происходят нарушения структурно-функциональных свойств клеточных мембран, что может вызывать гибель клеток [8]. Гипоксия также способна приводить к изменению активности транскрипции генов, ответственных за программируемую гибель клеток [9].

В то же время многие особенности адаптации ЦНС к воздействию гипоксии в пренатальном периоде, особенно компенсаторные реакции митохондриального аппарата нервных клеток, остаются неисследованными. Их изучение позволит решить одну из актуальных задач современной фундаментальной и практической медицины.

Большую роль в изучении пренатальной гипоксии и ее негативных последствий играют исследования на животных. Однако используемые в настоящее время экспериментальные модели не являются достаточно точными, поскольку зачастую не позволяют получить выраженное гипоксическое повреждение мозга плода, а также исследовать воздействие хронического гипоксического пренатального стресса. Подавляющее большинство авторов предлагают различные варианты однократного гипоксического воздействия на беременную самку [5, 7, 10, 11]. Поскольку адаптационный потенциал у экспериментальных животных значительно выше, чем у человека, подобные подходы не позволяют достичь выраженных нарушений функции ЦНС. Также следует учитывать, что аппроксимация экспериментальных данных, полученных при моделировании патологии на животных, к человеку требует знания соотношения основных поведенческих характеристик и критических периодов развития плода у человека и экспериментального животного. Вследствие этого разработка адекватной комплексной модели для тестирования состояния ЦНС при гипоксическом постнатальном стрессе является актуальной проблемой экспериментальной медицины.

При проведении исследований особое внимание необходимо уделять методам оценки когнитивных функций и общего состояния нервной системы. Важно учитывать время предъявления воздействия, критические сроки наибольшей уязвимости нервных клеток в течение беременности.

Беременность лабораторных животных так же, как и у человека, принято условно разделять на три периода. Так, начало третьего «триместра» беременности у мышей представляет собой этап, в течение которого

в мозге эмбрионов активно протекают процессы пролиферации и миграции клеток. Этот этап является наиболее значимым и для становления врожденных форм двигательного поведения. Для полноценного развития когнитивных процессов очень важны периоды пролиферации и миграции нейробластов и их созревания и дифференцировки. Нарушение эмбрионального развития в течение этих периодов может послужить причиной повреждения механизмов кратковременной и долговременной памяти [12].

С учетом этих данных моделирование хронической пренатальной гипоксии проводилось на животных с 14-го дня беременности ежедневно. Моделирование острой пренатальной гипоксии выполняли однократно на 18-й день гестации, когда уровень пролиферации клеток в мозге снижается и ускоряются процессы их созревания и дифференцировки.

**Цель исследования** — изучить особенности влияния хронической и острой пренатальной гипоксии на показатели функциональной активности ЦНС и оценить роль митохондрий в защите ЦНС от гипоксических повреждений в эксперименте.

## Материалы и методы

**Объект исследования.** Эксперименты *in vivo* были выполнены на мышах линии C57BL/6. Содержание животных в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета соответствовало требованиям приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 и №267 МЗ РФ от 19.06.2003, а эксперименты выполнялись согласно международным правилам «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), отвечали требованиям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006), и были согласованы с Биоэтической комиссией ННГУ.

Для моделирования хронической пренатальной гипоксии беременных самок мышей ежедневно (начиная с 14-го дня гестации и до родов) помещали в гипобарическую барокамеру, в которой в течение 2 ч поддерживали давление 280–300 мм рт. ст., что соответствует высоте 8000 м над уровнем моря.

Моделирование острой пренатальной гипоксии осуществлялось на 18-й день гестации. Беременные самки на 4–5 мин, до первого агонального вдоха, помещались в барокамеру, в которой создавалось давление 220–240 мм рт. ст., соответствующее высоте 10000 м над уровнем моря.

**Оценка неврологического статуса.** Для определения общего состояния ЦНС после воздействия гипоксии проводили оценку неврологического статуса животных по шкале определения неврологического дефицита у мелких лабораторных животных и шкале Гарсии. Обе шкалы представляют собой серию простых тестов на различные когнитивные способности

животных с балльной системой оценки. Для шкалы определения неврологического дефицита у мелких лабораторных животных проводится тест из 10 поведенческих реакций, каждую из которых оценивают от 0 до 2 баллов, где 2 балла — отсутствие реакции. Полученные баллы суммируют. Интерпретация результатов оценки неврологического статуса:

от 10 до 20 баллов — выраженное повреждение ЦНС;

от 6 до 9 баллов — умеренное повреждение ЦНС;

от 1 до 5 баллов — легкое повреждение ЦНС.

В шкале Гарсия используются 6 тестов для оценки асимметрии движений и реакций животного в баллах (от 1 — выраженные нарушения до 3 — отсутствие нарушений), которые также затем суммируются. Минимальный неврологический результат составляет 3 балла (максимальные нарушения), а максимальный — 18 баллов (отсутствие нарушений).

С целью оценки возможных отдаленных последствий пренатальной гипоксии и их влияния на метаболизм животных проводили оценку массы новорожденных мышат в динамике.

Для исследования процессов пространственного обучения и памяти было использовано тестирование в водном лабиринте Морриса [13], которое проводили с помощью модифицированного протокола К.М. Frick с соавт. [14]. Процесс обучения в лабиринте длился 5 дней и представлял собой 5 сеансов по 3 попытки поиска платформы для каждого животного. Перерыв между попытками составлял 30 с. При воспроизведении навыка на 7-й день платформа убиралась из бассейна и каждое животное тестировалось однократно в течение 60 с. Помимо регистрации отсроченного коэффициента сохранения ( $оК_c$ ) — доли времени пребывания животного в зоне, где находилась платформа, по отношению к общему времени пребывания животного в водном лабиринте Морриса — нами также оценивались:

характер поиска животными цели в лабиринте Морриса (прямой поиск — животное непосредственно направлялось к месту бывшего расположения платформы; активный поиск — животное осуществляло циркулярные и радиальные поисковые движения, прежде чем достигнуть цели; хаотический поиск — отсутствие выраженной стратегии достижения цели);

дистанция, пройденная животным до достижения цели (расстояние, пройденное с момента помещения в лабиринт Морриса до нахождения места бывшего расположения платформы) [13].

**Оценка функционального состояния митохондрий.** Для анализа влияния гипоксии на функциональное состояние митохондрий проводили оценку скорости потребления ими кислорода. Определение функциональной активности митохондрий выполняли у новорожденных мышат через 24 ч после родов. Все манипуляции осуществляли на льду. Оборудование и среды выделения были охлаждены. Митохондрии выделяли из ткани головного мозга мышей с помощью



дифференциального центрифугирования по методике М.В. Егоровой с соавт. [15, 16]. Определение содержания белка в изолированных митохондриях проводили по методу Брэдфорда. Потребление кислорода изолированными митохондриями регистрировали полярографически при помощи респирометра высокого разрешения OxuGraph-2k (Oroboros Instruments, Австрия) в 2 мл среды инкубации (маннит — 210 мМ; сахараза — 70 мМ; ЭГТА — 0,1 мМ; HEPES — 10 мМ; рН=7,4) при постоянном перемешивании. Скорость потребления кислорода (O<sub>2</sub>) выражали в пикомолях за 1 с в расчете на 1 мг белка митохондрий.

Полученные результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего (M±SEM). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли при помощи критерия Манна–Уитни в программе SigmaPlot 11.0 (США). Различия считали статистически значимыми при p≤0,01.

### Результаты

На первом этапе работы нами была выбрана и модифицирована методика моделирования хронической пренатальной гипоксии. Для нашего исследования была необходима методика, которая позволяла бы сохранять достаточную жизнеспособность беременных самок для проведения хронического эксперимента. При подборе протокола были протестированы варианты подъема на высоту 10 500, 9000 и 8000 м. На высоте 10 500 м время жизни колебалось от 2 до 10 мин, на высоте 9000 м — до 20 мин, на высоте 8000 м — около 120 мин. Поскольку для разработки релевантной модели гипоксического воздействия должно быть максимально длительным, была выбрана высота, на которой самки сохраняли жизнеспособность в течение 2 ч.

Поскольку активное формирование синаптических контактов между нейронами начинается после формирования основных морфологических структур мозга в процессе эмбриогенеза, в качестве оптимального

периода для начала моделирования хронической гипоксии выбран 14-й день гестации, соответствующий третьему «триместру» беременности. Таким образом, протокол моделирования хронической пренатальной гипоксии предусматривал подъем беременных самок в вакуумной проточной барокамере на высоту 8000 м со скоростью 183 м/с на 2 ч ежедневно (начиная с 14-го дня гестации до наступления родов). Такая скорость подъема выбрана с целью получения выраженного гипоксического повреждения головного мозга. При подъеме с меньшей скоростью могут быть задействованы срочные адаптационные механизмы организма, чего в данной экспериментальной модели следовало избегать.

Для моделирования острой гипоксии выбран 18-й день гестации как один из критических периодов формирования головного мозга. Именно в этот период завершается процесс нейрогенеза и между зрелыми нейронами начинается активное формирование синаптических контактов [17]. Поэтому для моделирования острой пренатальной гипоксии использовали режим подъема на 10 000 м со скоростью 175–183 м/с до первого агонального вдоха (4–5 мин) на 18-й день гестации.

Для оценки функционального состояния нервной системы животных в отдаленном периоде после хронической пренатальной гипоксии проводили определение неврологического статуса. При тестировании самок мышей, перенесших гипоксию, количество набранных ими баллов неврологического статуса полностью совпадало с баллами неврологического статуса интактных животных по обеим шкалам, следовательно, значимых нарушений состояния ЦНС не произошло.

В течение первых 4 нед жизни наблюдали динамику массы мышат (рис. 1). У детенышей, перенесших хроническую гипоксию, к 4-й неделе жизни наблюдается выраженная тенденция к увеличению их массы по сравнению с интактными животными. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о влиянии пренатальной гипоксии на склонность к метаболической дисрегуляции и ожирению [11, 18].

Для оценки когнитивных функций животных, перенесших хроническую пренатальную гипоксию, по достижении ими возраста одного месяца проводили тестирование в водном лабиринте Морриса. Анализ полученных данных показал формирование у мышей пространственной памяти. Установлено, что время нахождения платформы мышами обеих групп сокращалось с каждым последующим сеансом обучения, поиск цели становился направленным. При воспроизведении навыка на 7-й день отмечено, что более 50% животных интактной группы двигались непосредственно к цели (прямой поиск), в то время как в группе после «гипоксии» прямой поиск использовали лишь 33% животных, а 45% выбирали активный поиск цели. Таким образом, у животных, перенесших хроническую гипоксию, изменилась стратегия поиска цели (см. таблицу).

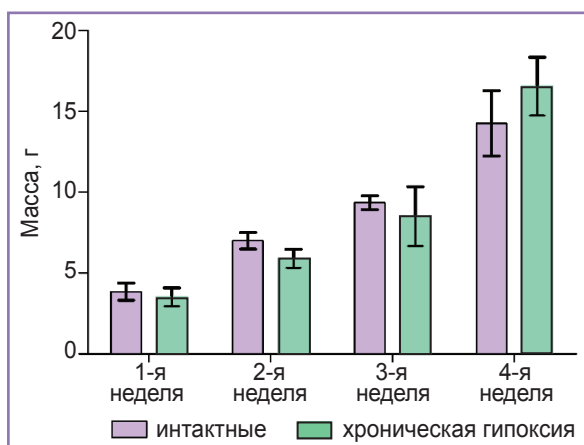


Рис. 1. Динамика массы детенышей мышей линии C57BL/6, перенесших хроническую гипоксию, в течение первых 4 нед жизни

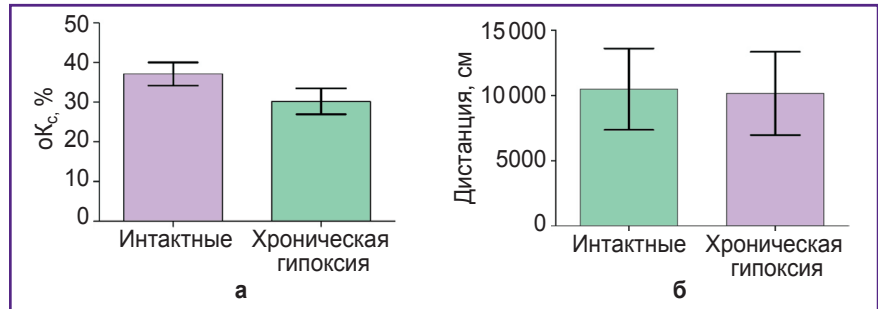
Для оценки состояния долговременной памяти осуществлялся расчет отсроченного коэффициента сохранения ( $OK_c$ ) и дистанции, пройденной животными до достижения цели (рис. 2). По итогам теста наблюдалась тенденция к уменьшению этих показателей у группы животных с гипоксией, однако статистически значимых различий не выявлено. Коэффициент сохранения составил  $37,5 \pm 7,5\%$  у интактных животных и  $31,8 \pm 5,4\%$  — у животных, перенесших хроническую пренатальную гипоксию. Длина трека животных составила от 8950 до 10 200 см.

Таким образом, разработанные нами экспериментальные протоколы моделирования пренатальной гипоксии прошли успешную верификацию, поскольку позволяют вызвать типичные для гипоксического повреждения нарушения когнитивных функций в отдаленном периоде и метаболические изменения, ведущие к характерному для перенесших гипоксию детей ожирению, и тем самым исследовать различные аспекты нарушений, возникающих при пренатальном гипоксическом стрессе, в том числе на клеточном и молекулярном уровнях.

Следующим этапом наших исследований явилась оценка функционального состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга мышей на 1-е сутки постнатального развития, поскольку в последние годы показана особая роль митохондрий в адаптации организма к гипоксическому повреждению [19–21]. Установлено, что базальная скорость потребления кислорода при окислении субстратов глутамата и малата у животных с пренатальной хронической гипоксией статистически значимо — на 45% — увеличивалась по сравнению с интактной группой ( $2796,4 \pm 366,5$  пмоль/(с·мл) на 1 мг белка) и составила  $4053,88 \pm 582,10$  пмоль/(с·мл) на 1 мг белка (рис. 3, а). Интенсивность окислительного фосфорилирования в экспериментальной группе ( $16016,38 \pm 1196,90$  пмоль/(с·мл) на 1 мг белка) возрастала на 45% относительно интактных значений

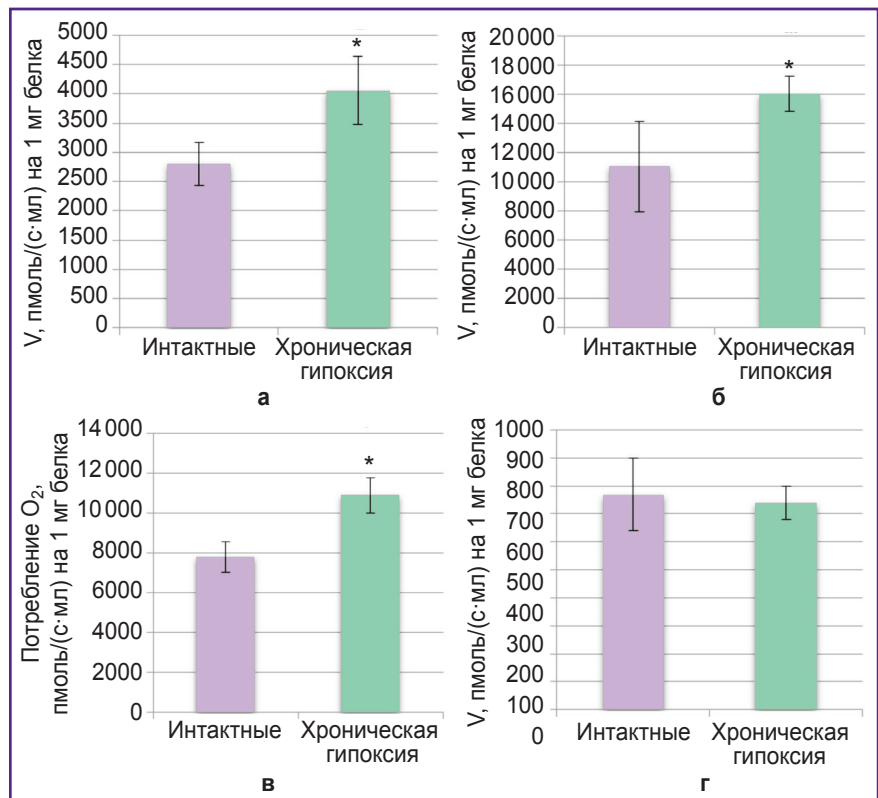
**Стратегия поиска цели у животных при тестировании в водном лабиринте Морриса, %**

Животные	Прямой поиск	Активный поиск	Хаотический поиск
Интактные	55	27	18
Хроническая гипоксия	33	45	22



**Рис. 2. Оценка показателей у мышей после тестирования в водном лабиринте Морриса:**

а — отсроченный коэффициент сохранения ( $OK_c$ ); б — дистанция, пройденная животным до достижения цели



**Рис. 3. Состояние дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга новорожденных мышат линии C57BL/6 после хронической пренатальной гипоксии:**

а — базальная скорость потребления кислорода митохондриями на фоне избытка субстратов глутамата и малата; б — окислительное фосфорилирование дыхательной цепи митохондрий; в — сукцинатзависимый путь окисления субстратов (активная работа II комплекса дыхательной цепи митохондрий при окислении сукцината); г — ротенонзависимое ингибирование I комплекса дыхательной цепи митохондрий; \* — статистически значимые отличия от показателей интактной группы;  $p < 0,01$ ; критерий Манна–Уитни

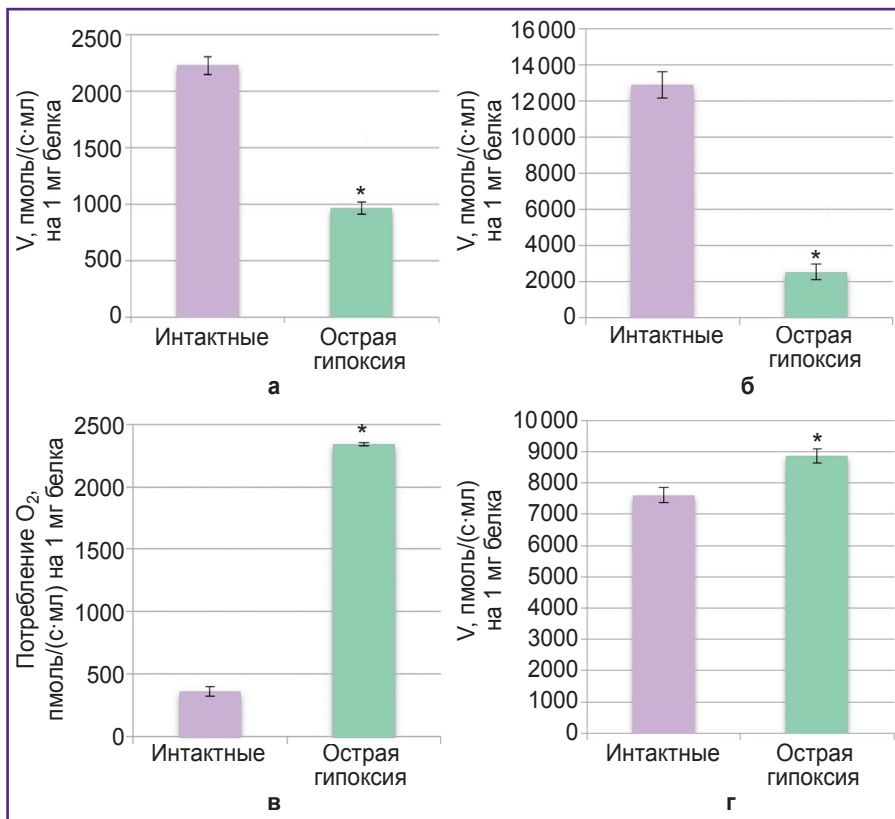


Рис. 4. Показатели состояния дыхательной цепи митохондрий клеток головного мозга новорожденных мышат линии C57BL/6 после эпизода острой пренатальной гипоксии:

а — базальная скорость потребления кислорода митохондриями на фоне избытка субстратов глутамата и малата; б — окислительное фосфорилирование дыхательной цепи митохондрий; в — ротенонзависимое ингибирование I комплекса дыхательной цепи митохондрий; г — сукцинатзависимый путь окисления субстратов, острая гипоксия (активная работа II комплекса дыхательной цепи митохондрий при окислении сукцината); \* — статистически значимые отличия от показателей интактной группы;  $p < 0,01$ ; критерий Манна–Уитни

(11 053,3±3112,0 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка) (рис. 3, б). Также отмечался рост активности II комплекса дыхательной цепи, при котором показатели у экспериментальных животных (10 907,80±884,67 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка) были в 1,4 раза выше, чем в интактной группе (7796,4±756,8 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка) (рис. 3, в). При ингибировании НАДН-дегидрогеназы ротеноном не получено статистически значимых отличий между интактной и экспериментальной группами (рис. 3, г).

При исследовании функционального состояния митохондрий головного мозга у новорожденных животных линии C57BL/6 после моделирования острой пренатальной гипоксии зарегистрировано значительное (в 2 раза) снижение базальной скорости потребления кислорода митохондриями, при этом значения у экспериментальных животных составили 962,16±57,70 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка, а значения в интактной группе — 2225,6±80,2 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка (рис. 4, а). Активность окислительного фосфорилирования (рис. 4, б) после перенесенного эпизода острой пренатальной гипоксии снизилась в 5,1 раза по сравнению с интактными показателями (2514,6±433,4 и 12 872,8±708,7 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка соответственно).

Интересно отметить, что на фоне значительного снижения общей функциональной активности митохондрий после моделирования острой гипоксии наблюдалось значительное увеличение скорости при ротенонзависимом ингибировании I комплекса дыха-

тельной цепи митохондрий — значения у животных с гипоксией составили 2339,1±13,2 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка, что в 6,5 раз выше интактных значений — 361,3±37,0 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка (рис. 4, в). При стимулировании II комплекса дыхательной цепи митохондрий сукцинатом значения в экспериментальной группе составили 8860,7±221,9 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка, что в 1,6 раза выше интактных — 7609,5±230,1 пмоль/(с·мл) на 1 мг белка (рис. 4, г).

### Обсуждение

Хроническая пренатальная гипоксия является наиболее тяжелой формой гипоксии, развивающейся в процессе беременности. В результате нее происходит активация анаэробного гликолиза. Недостаточное снабжение организма кислородом приводит к перераспределению кровообращения с преимущественным кровоснабжением жизненно важных органов. Вследствие централизации кровообращения происходит ацидоз, сопровождающийся резким повышением уровня лактата в крови, что приводит к увеличению проницаемости сосудистой стенки и далее — к образованию внутрисосудистых тромбов. В результате этих и иных патологических процессов возникает тяжелое поражение головного мозга, последствия которого могут проявляться и в отдаленном постгипоксическом периоде в виде различных нарушений физиологических, когнитивных функций, процессов обучения и памяти [10].

Исследование когнитивных функций животных с хронической пренатальной гипоксией в отдаленном периоде путем оценки долговременной памяти с помощью тестирования в водном лабиринте Морриса показало, что со временем изменяется стратегия поиска цели и доля времени пребывания животного в зоне, где находилась платформа, т.е. нарушаются процессы формирования и воспроизведения долговременной памяти.

Поскольку выраженных нарушений общего состояния ЦНС при определении неврологического статуса не выявлено, можно предположить, что нарушения в поведении животных, подвергавшихся хронической пренатальной гипоксии, не обусловлены грубыми структурными повреждениями головного мозга. Скорее всего, они могут быть связаны с разнообразными нейрохимическими нарушениями [22].

Большой интерес представляют данные, полученные при изучении митохондриального дыхания. Обращают на себя внимание разнонаправленные изменения скорости базального потребления кислорода митохондриями и окислительного фосфорилирования при моделировании острой и хронической гипоксии.

Известно, что ответ организма на гипоксию включает различные адаптивные реакции, способствующие устранению функционально-метаболических нарушений, типичных для этого состояния и направленных прежде всего на сохранение функции митохондрий. При этом используются 2 типа механизмов: а) срочный компенсаторный, цель которого — предотвращение последствий острой гипоксии и быстрое восстановление в постгипоксический период; б) долгосрочные механизмы адаптации к гипоксии, которые формируются в течение более длительного периода и способствуют увеличению неспецифической резистентности к дефициту кислорода [19].

Можно предположить, что процессы усиления митохондриального дыхания при хронической гипоксии связаны с этими долгосрочными механизмами адаптации.

Острое гипоксическое повреждение приводит к активации II дыхательного комплекса, что согласуется с ранее полученными результатами при моделировании гипоксии в постнатальный период [23]. Особый интерес представляют данные по долговременной адаптации митохондриального аппарата, которые могут быть связаны с синтезом большего количества белков дыхательной цепи и ядерной регуляцией митохондриального генома [20].

## Заключение

Исследование особенностей функционирования митохондрий головного мозга новорожденных мышат после перенесенной пренатальной гипоксии показало, что эпизод острой пренатальной гипоксии снижает базальную скорость потребления кислорода митохондриями и угнетает окислительное фосфорилирова-

ние, в то же время хроническая гипоксия приводит к адаптации митохондриального аппарата, проявляющейся в интенсификации окислительного фосфорилирования. Таким образом, разработанные протоколы экспериментального моделирования пренатальной гипоксии позволили выявить особенности адаптации митохондриального аппарата нервных клеток к разным типам гипоксического повреждения.

**Финансирование исследования.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект 18-75-10071) в части разработки протоколов пренатальной гипоксии и при поддержке государственного задания (проекты 17.3335.2017/ПЧ и 6.6379.2017/БЧ) в части исследования функциональной активности митохондрий.

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература/References

1. Ferriero D.M. Neonatal brain injury. *N Engl J Med* 2004; 351(19): 1985–1995.
2. Семина В.И., Степанова Ю.А. Перинатальная гипоксия: патогенетические аспекты и подходы к диагностике (обзор литературы). Часть I. Медицинская визуализация 2015; 2: 95–105. Semina V.I., Stepanova Y.A. Perinatal hypoxia: pathogenetic aspects and approaches to diagnostics (review of literature). Part I. *Meditsinskaya vizualizatsiya* 2015; 2: 95–105.
3. Козлова Е.М. Особенности позднего неонатального периода у новорожденных, перенесших тяжелую перинатальную гипоксию. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Н. Новгород; 2009. Kozlova E.M. *Osobennosti pozdnego neonatal'nogo perioda u novorozhdennykh, perenessikh tyazheluyu perinatal'nuyu gipoksiyu*. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk [Features of the late neonatal period in newborns suffered severe perinatal hypoxia. PhD Thesis]. Nizhny Novgorod; 2009.
4. Kassil' V.G., Otellin V.A., Khozhai L.I., Kostkin V.B. Critical phases of the brain development. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 2000; 86(11): 1418–1425. Kassil' V.G., Otellin V.A., Khozhai L.I., Kostkin V.B. Critical phases of the brain development. *Rossiiskii fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova* 2000; 86(11): 1418–1425.
5. Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ватаева Л.А. Влияние гипоксии в раннем пренатальном онтогенезе на поведение и структурные характеристики головного мозга. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии* 2012; 48(5): 467–473. Otellin V.A., Khozhai L.I., Vataeva L.A. Effect of hypoxia in early perinatal ontogenesis on behavior and structural characteristics of the rat brain. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii* 2012; 48(5): 467–473.
6. Golan H., Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci* 2006; 9(4): 338–349. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00498.x>.
7. Tyul'kova E.I., Semenov D.G., Vataeva L.A., Belyakov A.V., Samoilov M.O. Effect of prenatal hypobaric hypoxia on glutamatergic signal transduction in rat brain. *Bull*



*Exp Biol Med* 2011; 151(3): 275–277, <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1307-y>.

8. Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79(4): 1431–1568, <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1431>.

9. Rybnikova E., Gluschenko T., Tulkova E., Churilova A., Jaroshevich O., Baranova K., Samoilov M. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rats before and following severe hypobaric hypoxia. *J Neurochem* 2008; 106(3): 1450–1458, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05516.x>.

10. Bourque S.L., Gragasin F.S., Quon A.L., Mansour Y., Morton J.S., Davidge S.T. Prenatal hypoxia causes long-term alterations in vascular endothelin-1 function in aged male, but not female, offspring. *Hypertension* 2014; 62(4): 753–758, <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.01516>.

11. Chen L., Zadi Z.H., Zhang J., Scharf S.M., Pae E.K. Intermittent hypoxia in utero damages postnatal growth and cardiovascular function in rats. *J Appl Physiol* 2018; 124(4): 821–830, <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01066.2016>.

12. Golan M.H., Mane R., Molczadzki G., Zuckerman M., Kaplan-Louison V., Huleihel M., Perez-Polo J.R. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. *Neuropharmacology* 2009; 57(5–6): 511–522, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.028>.

13. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11(1): 47–60, [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4).

14. Frick K.M., Stillner E.T., Berger-Sweeney J. Mice are not little rats. *NeuroReport* 2000; 11(16): 3461–3465, <https://doi.org/10.1097/00001756-200011090-00013>.

15. Егорова М.В., Афанасьев С.А. Выделение митохондрий из клеток и тканей животных и человека: современные методические приемы. *Сибирский медицинский журнал* 2011; 26(1–1): 22–28. Egorova M.V., Afanasyev S.A. Isolation of mitochondria from cells and tissues of animals and human: modern methodical approaches. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* 2011; 26(1–1): 22–28.

16. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Миронов А.А., Сахарнова Т.А., Пимашкин А.С., Бобров М.Ю., Хаспеков Л.Г.,

Мухина И.В. Нейропротекторное действие каннабиноида N-арахидоноилдофамина при моделировании острой гипобарической гипоксии мозга. *Неврологический вестник им. Бехтерева* 2012; 44(1): 14–19. Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Mironov A.A., Saharnova T.A., Pimashkin A.S., Bobrov M.Y., Khaspeckov L.G., Mukhin I.V. Neuroprotective effect of endocannabinoid N-arachidonoyldopamine in acute hypobaric hypoxia. *Neurologicheskiy vestnik im. Bekhtereva* 2012; 44(1): 14–19.

17. Rueda-Clausen C.F., Stanley J.L., Thambiraj D.F., Poudel R., Davidge S.T., Baker P.N. Effect of prenatal hypoxia in transgenic mouse models of preeclampsia and fetal growth restriction. *Reprod Sci* 2014; 21(4): 492–502, <https://doi.org/10.1177/1933719113503401>.

18. Khalyfa A., Cortese R., Qiao Z., Ye H., Bao R., Andrade J., Gozal D. Late gestational intermittent hypoxia induces metabolic and epigenetic changes in male adult offspring mice. *J Physiol* 2017; 595(8): 2551–2568, <https://doi.org/10.1113/jp273570>.

19. Лукьянова Л.Д. Сигнальная роль митохондрий при адаптации к гипоксии. *Фізіологічний журнал* 2013; 59: 141–154. Luk'yanova L.D. Signaling role of mitochondria in adapting to hypoxia. *Fiziologichnyi zhurnal* 2013; 59: 141–154.

20. Wheaton W.W., Chandel N.S. Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300(3): 385–393, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>.

21. Kristián T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium* 2004; 36(3–4): 221–233, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.02.016>.

22. Perrin D., Mamet J., Scarna H., Roux J.C., Bérod A., Dalmaz Y. Long-term prenatal hypoxia alters maturation of brain catecholaminergic systems and motor behavior in rats. *Synapse* 2004; 54(2): 92–101, <https://doi.org/10.1002/syn.20065>.

23. Astrakhanova T.A., Urazov M.D., Usenko A.V., Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Schelchkova N.A., Vedunova M.V. BDNF-mediated regulation of the brain mitochondria functional state in hypoxia. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2018; 10(3): 88–94, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.3.10>.