

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ ПЕРИОДА РАННЕГО
ОРГАНОГЕНЕЗА НА ПОКАЗАТЕЛИ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО
РИТМА У КРЫСЯТ В ПРЕПУБЕРТАТНЫЙ И ПУБЕРТАТНЫЙ ПЕРИОДЫ**

© 2024 г. А. В. Граф^{1,2,*}, А. С. Маклакова¹, М. В. Маслова¹, Я. В. Крушинская¹,
А. А. Гусева¹, Н. А. Соколова¹

¹Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

²Физтех-школа природоподобных, плазменных и ядерных технологий имени И. В. Курчатова,
Москва, Россия

*E-mail: nastjushka@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 01.10.2024 г.

Принята к публикации 01.10.2024 г.

Факторы риска, связанные с воздействием окружающей среды, особенно в критические периоды внутриутробного развития, влияют на развитие плода и повышают риск определенных заболеваний во взрослой жизни, в том числе сердечно-сосудистых (ССЗ). Самой распространенной и клинически значимой формой внутриутробного стресса является гипоксия, причем системные патологические изменения, которые она вызывает, в 78% случаев касаются поражений сердечно-сосудистой системы. Цель данного исследования – оценить влияние гипоксического стресса, перенесенного на 10-е сутки гестации, на сердечный ритм и его регуляцию в препубертатный и пубертатный периоды жизни потомства крыс, а также проанализировать зависимость возникающих нарушений от пола. Показано, что к началу пубертатного периода ЧСС крысят, переживших пренатальную гипоксию, оказывается значимо выше, чем в контроле, и сопровождается достоверным падением вариабельности сердечного ритма (dX), что закономерно приводит к росту стресс-индекса (SI) и свидетельствует об усилении симпатической активности в регуляции ритма сердца. В то же время базовый сердечный ритм у животных, перенесших гипоксию внутриутробно, оказывается ниже, чем у контрольных. То, что у взрослых половозрелых животных обоих полов, переживших пренатальную гипоксию в период раннего органогенеза, также сохраняются изменения dX и SI, свидетельствует о долгосрочных и необратимых нарушениях регуляции сердечного ритма. Таким образом, гипоксия в период закладки первичной сердечной петли носит программирующий характер, потенциально увеличивая риск развития ССЗ уже у взрослых животных. При этом нарушения баланса вегетативной системы в сторону активации симпатического тонуса более выражены у самок, что делает их более уязвимыми к риску развития сердечной патологии в пубертатном периоде.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, вариабельность сердечного ритма, вегетативная нервная система; пренатальное программирование

DOI: 10.31857/S0869813924100051, EDN: VRPZKD

ВВЕДЕНИЕ

В большинстве развитых стран мира сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются ведущей причиной инвалидности и смертности [1, 2]. Одним из направлений для снижения развития сердечно-сосудистых патологий и связанных с ними заболеваемости и смертности является поиск новых факторов риска их развития и как можно более ранняя диагностика потенциальных нарушений. Помимо генетической предрасположенности и традиционных факторов риска, таких как ожирение, малоподвижный образ жизни, курение и пр., все больше данных о перинатальных факторах, влияющих на последующие риски развития ССЗ во взрослом возрасте. Концепция фетального программирования подразумевает, что факторы, воздействующие во время зачатия или во время внутриутробного и неонатального периодов, могут навсегда изменять анатомию и физиологию ключевых органов и систем у потомства, тем самым увеличивая риски многих заболеваний в более позднем возрасте [3]. Самой распространенной формой внутриутробного стресса является гипоксия. Плод может испытывать гипоксический стресс по различным причинам: беременность в высокогорье, беременность с анемией, плацентарная недостаточность, сдавление пуповины, преэклампсия и др. [4]. Большая часть исследований, посвященных программирующему влиянию внутриутробной гипоксии, сосредоточена на долгосрочных последствиях нарушения развития нервной системы, таких как церебральный паралич, эпилепсия, когнитивные проблемы [5]. При этом от 25 до 60% детей, страдающих от асфиксии при рождении, в неонатальном периоде имеют клинические признаки сердечных осложнений [6]. Несмотря на очевидную связь внутриутробной гипоксии с высоким риском развития ССЗ, основные исследования направлены на изучение хронических воздействий кислородной недостаточности и нарушений механизмов адаптации. И очень мало доказательств того, что острые перинатальные воздействия также увеличивают риск ССЗ во взрослом возрасте. Особую опасность представляют «скрытые» нарушения развития, когда новорожденные рождаются внешне здоровыми, в результате чего им не проводят ранний скрининг заболеваний. Однако вследствие внутриутробной гипоксии у плода нарушается функция сосудистого эндотелия, развивается окислительный стресс [7, 8], наблюдаются морфологические изменения структуры сердца и сосудов [8, 9], изменяется активность вегетативной нервной системы (ВНС) [10], что может стать одним из ключевых факторов развития артериальной гипертензии [11]. Тяжесть возникающих нарушений зависит не только от силы стрессорного фактора, но также от периода его воздействия [12, 13]. Несмотря на то, что большая часть исследований посвящена влиянию стрессорных воздействий в предродовой и ранний постнатальный периоды, нами было показано, что последствия гипоксического стресса в период раннего органогенеза часто носят более выраженный характер и могут представлять повышенный риск для последующего развития заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых [12]. Цель данного исследования – оценить влияние гипоксического стресса, перенесенного в критический для развития сердца период, на сердечный ритм и его регуляцию в препубертатный и пубертатный периоды жизни потомства, а также проанализировать зависимость возникающих нарушений от пола.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Крыс содержали при температуре 21 ± 2 °C и относительной влажности $53 \pm 5\%$ с циклом 12/12 ч свет/темнота (свет 9:00 = ZT 0, свет выключен 21:00 = ZT 12). Беременных самок крыс стока Wistar ($n = 3$) подвергали острой гипоксии по стандартной методике, описанной ранее [14, 15], на 10-е сутки беременности, что примерно соответствует концу первого месяца внутриутробного развития у человека, когда происходит образование «первичной (незрелой) сердечной петли» [16, 17]. Среднее время

пробывания беременных самок в условиях острой гипоксии составило 99.3 ± 16.4 с, то есть все они относились к группе низкоустойчивых к гипоксии. Первым днем беременности считали день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. Анализ вагинального мазка проводили через сутки после помещения самца в клетку с самками в соотношении 1 : 2. Контрольных беременных самок ($n = 4$) гипоксии не подвергали.

Использовали две экспериментальные группы: (1) контроль – потомство контрольных самок; $n = 15$ (самки, $n = 8$; самцы, $n = 7$); (2) ПГ(10) – потомство самок, пережившее острую пренатальную гипоксию (ПГ) на 10-е сутки гестации; $n = 13$ (самки, $n = 6$; самцы, $n = 7$). Роды у контрольных самок наступили на 22-е, а у опытных – на 23-е сутки беременности. В представленной экспериментальной серии не было обнаружено статистически значимых различий в количестве новорожденных детенышей между контрольной и опытной группами.

Для оценки работы сердца в обеих экспериментальных группах на 42-й и 56-й дни постнатального периода (ПНД) проводили неинвазивную регистрацию ЭКГ в свободном поведении в течение трех минут. Настоящее исследование является продолжением изучения последствий воздействия пренатальной гипоксии на регуляцию сердечного ритма у крыс на разных этапах постнатального онтогенеза и охватывает очень важный временной отрезок, оканчивающийся наступлением половой зрелости животных. Характерными особенностями выбранного временного отрезка у крыс могут быть некоторая гетерохрония морфологического и функционального созревания отдельных звеньев вегетативной нервной системы, а также гормональный дисбаланс. Отдельно следует отметить, что данный возрастной период характеризуется множеством изменений в нейроэндокринной функции, что может приводить как к немедленным, так и к долгосрочным влияниям на физиологию и поведение [18].

Таким образом, выбор сроков регистрации ЭКГ был продиктован следующими соображениями. С одной стороны, по ранее полученным данным, ЧСС крысят в первый месяц жизни постоянно и неуклонно растет, и показатели, регистрируемые один раз в неделю, каждый раз достоверно отличаются от показателей предыдущего возраста (рис. 1). Однако после относительной стабилизации ЧСС животных в четырехнедельном возрасте целесообразно увеличить интервалы времени между регистрацией, чтобы избежать возможной адаптации животных к хэндлингу и условиям эксперимента [19, 20]. Поэтому после записи ЭКГ на 28-й ПНД следующую регистрацию проводили с двухнедельной паузой, то есть в возрасте 42-х, а затем 56-ти дней.

С другой стороны, по литературным данным, репродуктивная зрелость у крыс наступает приблизительно на 38–42-й день после рождения, причем самки несколько опережают самцов, у которых этот показатель обладает большой вариативностью [21, 22]. Поскольку одной из задач представленной работы является анализ гендерных различий, важно было проводить регистрацию ЭКГ в один и тот же день у детенышей обоих полов. Таким образом, 42-й ПНД укладывается в препубертатный период для самцов и максимально приближен к нему для самок, в то время как 56-й ПНД для крыс обоих полов уже относится к пубертату.

С целью определения соотношения вкладов разных отделов ВНС в формирование сердечного ритма в указанные экспериментальные дни проводили фармакологический анализ путем последовательного введения кардиоблокаторов. Двойную блокаду использовали, чтобы исключить вклад симпатической и парасимпатической регуляции в ЧСС и определить базовый сердечный ритм, то есть ритм сердца после суммарной кардиоблокады [23].

Моделирование пренатальной гипоксии. Самок крыс подвергали острой гипобарической гипоксии (5% O_2) до первого агонального вдоха в декомпрессионной камере объемом 3.3 л, атмосферное давление снижали вакуумным насосом «MezMohelnice» (Чехия) за 1 мин [14].

Регистрация ЭКГ. Регистрацию ЭКГ проводили в течение трех минут в условиях свободного поведения с помощью детских ЭКГ-электродов (SkintactF-301) и специально изготовленных манжеток, не нарушающих покровы животного. Электроды в соответствии со II стандартным отведением закрепляли на правой передней и левой задней лапах животного. Для уменьшения сопротивления контакта использовали гель для ЭКГ («Гельтек-Медика»). Клеммы с помощью проходящих в манжетку проводов соединяли с контактами разъема, которые подключали к усилителю биопотенциалов, имевшему полосу частот от 10 до 20 кГц. От усилителя сигнал поступал на аналого-цифровой преобразователь (E14-440, L-Card, Россия), соединенный через USB-порт с компьютером. Запись осуществляли с помощью программы PowerGraph Professional v 3.3 (ДИСофт Россия) с частотой оцифровки 1 кГц. Для анализа вариабельности сердечного ритма (BCP) использовали непрерывные фрагменты записи длительностью 180 с.

Описанный способ регистрации ЭКГ не позволяет получить запись, достаточно четкую для оценки изменения характера QRST-комплекса, однако является неинвазивным и дает возможность получить выборку RR-интервалов для оценки основных параметров BCP в произвольных отрезках записи. Специально разработанные программы (Average, Intervals) позволяют рассчитать следующие параметры BCP: среднее значение RR-интервала в выборке; вариабельность ритма (dX): $dX = RR_{max} - RR_{min}$, где RR_{max} – максимальное, а RR_{min} – минимальное значение RR-интервала в выборке; индекс RMSSD (Root Mean Square of Successive Differences) – квадратный корень из суммы разностей последовательного ряда RR-интервалов:

$$RMSSD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n-1} (RR_i - RR_{i+1})^2},$$

где n – число RR-интервалов в выборке, стресс-индекс, или индекс напряженности, (SI):

$$SI = \frac{AMo}{2 * Mo * \Delta X},$$

где Mo – мода выборки RR-интервалов – наиболее часто встречающиеся по длительности кардиоинтервалы; AMo – амплитуда моды – доля наиболее часто встречающегося RR-интервала в выборке [24].

Введение блокаторов. Последовательное введение блокаторов кардиотропных влияний ВНС проводили для определения соотношения вкладов парасимпатического и симпатического отделов ВНС в формирование сердечного ритма и выявления нарушений в нервной регуляции работы сердца. Блокаду влияний парасимпатической нервной системы на сердце осуществляли введением атропина (M1300000; Sigma Aldrich, США), неселективного блокатора М-холинорецепторов, в дозе 1 мг/кг. Для блокады кардиотропных влияний симпатической нервной системы вводили β_1 -адреноблокатор атенолол (A7655; Sigma Aldrich, США), 2 мг/кг. Навески блокаторов готовили в день эксперимента и растворяли в физиологическом растворе, объем введения составлял 0.01 мл/г. Введения осуществляли подкожно в область холки животного, промежутки между введениями составляли не менее 15 мин. Трехминутные записи ЭКГ проводили до и через 12 мин после введения каждого из веществ. Таким образом, общее время эксперимента, включая период первоначальной адаптации к условиям регистрации, не превышало 40 мин.

Статистика. Значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием GraphPadPrism, версия 8.4.3. (GraphPadSoftwareInc., Ла-Хойя, США). Достоверность различий между двумя группами оценивали с помощью U-критерия Манна – Уитни. Несколько экспериментальных групп анализировали с использованием дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма в препубертатном и пубертатном периодах

У крысят контрольной группы ЧСС с рождения и до позднего пубертатного периода меняется следующим образом: постепенно возрастает, начиная с 258.5 ± 7.8 уд/мин в первые дни жизни, достигает максимальных значений в 562.0 ± 8.2 уд/мин на 28-й ПНД [25], затем постепенно снижается до 462.3 ± 6.2 уд/мин к 56-му дню жизни (рис. 1), что соответствует ЧСС взрослых животных [12]. При этом на 56-й ПНД ЧСС у самок составляет 476.1 ± 7.6 уд/мин и значимо выше, чем 449.5 ± 9.1 уд/мин у самцов (рис. 2), что хорошо согласуется с данными литературы [26, 27].

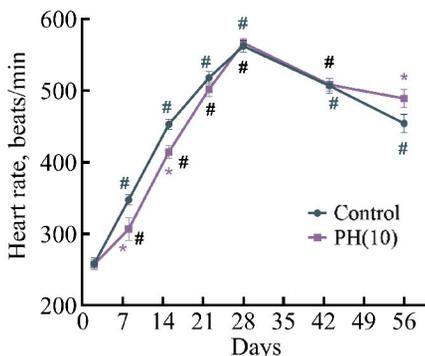


Рис. 1. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на возрастную динамику ЧСС. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Значения ЧСС на 2–28-й ПНД получены в работе [25]. Условные обозначения: PH(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сутки гестации. * – значимые ($p < 0.05$) различия между экспериментальными группами. #, # – значимые ($p < 0.05$) различия между разными возрастными периодами соответствующих экспериментальных групп.

В целом возрастная динамика ЧСС у потомства, пережившего внутриутробную гипоксию в период раннего органогенеза, носит схожий с контрольной группой характер, однако достигнутые к 42-му ПНД значения ЧСС в 508.2 ± 8.9 уд/мин более значимо не снижаются (рис. 1) и сохраняются на этом уровне также у взрослых [12]. В пубертатном периоде у самок регистрируется более высокая ЧСС, чем у самцов (521.4 ± 6.9 уд/мин против 493.4 ± 9.4 уд/мин соответственно), и в обоих случаях частота сердечного ритма у крысят, переживших пренатальную гипоксию, оказывается значимо выше, чем у животных соответствующего пола в контрольных группах (рис. 2). Кроме того, более высокая ЧСС детенышей обоих полов сопровождается достоверным падением ВСП, dX, что закономерно приводит к росту у них стресс-индекса SI (рис. 2) и косвенно свидетельствует об усилении симпатической активности в регуляции сердечного ритма.

Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели сердечного ритма при блокаде кардиотропных нервных влияний в препубертатном и пубертатном периодах

Для оценки возможных механизмов, обуславливающих нарушения регуляции сердечного ритма у потомства, пережившего пренатальную гипоксию, проводили последовательную фармакологическую блокаду парасимпатического и симпатического отделов ВНС.

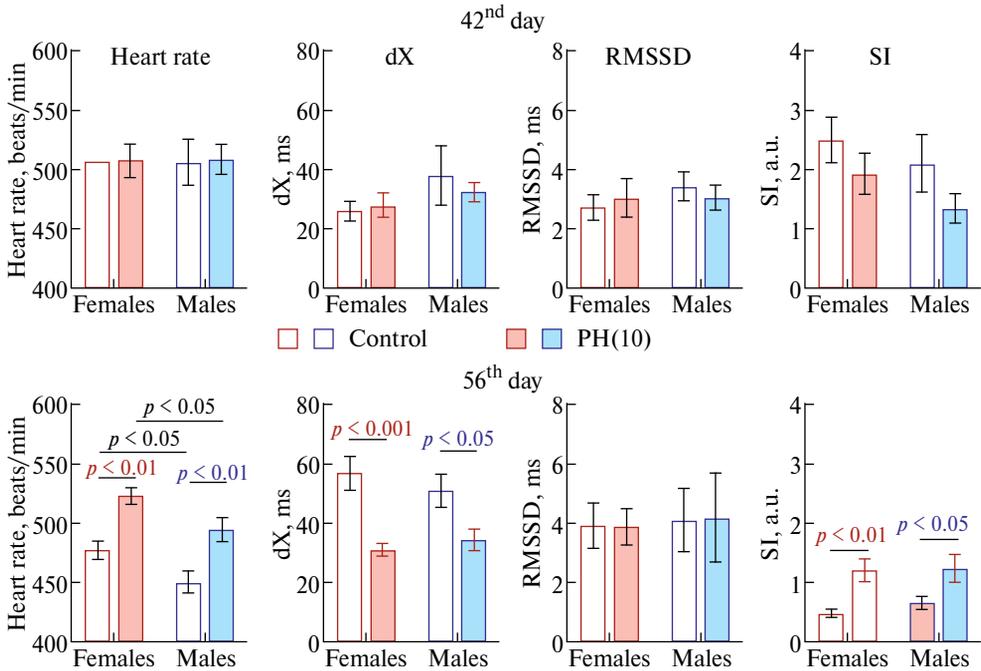


Рис. 2. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крыс стока Wistar в препубертатном и пубертатном периодах. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего. Условные обозначения: PH(10) – острая пренатальная гипоксия на 10-е сутки гестации. На графиках показаны значимые различия между экспериментальными группами животных разных возрастов, определенные с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений с апостериорным тестом (post-hoc) Сидака. #, # – значимые ($p < 0.05$) различия между разными возрастными периодами соответствующих групп.

Введение атропина крысам на 42-й ПНД не привело к ожидаемому увеличению ЧСС: ярко выраженной реакции на атропин не было ни в опытной, ни в контрольной группах независимо от пола животных (рис. 3а). Отсутствие хронотропного эффекта может быть связано с возрастными особенностями уровня экспрессии M_2 -холинорецепторов в сердце [28]. В этом же возрасте в ответ на введение ателолола у крысят обоих полов наблюдали значимое снижение ЧСС, сходное у контрольных и опытных животных (рис. 3б). Таким образом, у полуторамесячного потомства не было выявлено влияний гипоксии, перенесенной внутриутробно, ни на базовый ритм сердечных сокращений (418.3 ± 7.3 уд/мин в опыте против 425.0 ± 7.3 уд/мин в контроле), ни на регуляцию этого ритма со стороны ВНС (рис. 3).

Две недели спустя реакция контрольных животных обоих полов на атропин оставалась такой же, тогда как у крысят, перенесших пренатальную гипоксию, были зафиксированы достоверные межполовые различия. При этом у самок наблюдалось заметное падение ЧСС, нехарактерное для детенышей мужского пола (рис. 3а). Введение адреноблокатора также продемонстрировало существенную разницу между опытными крысятами разных полов. Если у самцов наблюдали заметное падение ЧСС, сопоставимое с реакцией контрольных животных, то у самок изменения сердечного ритма не наблюдали (рис. 3б). В итоге у молодых животных периода пубертата, перенесших внутриутробную гипоксию, базовый ритм сердца составил 398.9 ± 3.1 уд/мин, что достоверно ниже, чем 417.9 ± 5.6 уд/мин у контрольных.

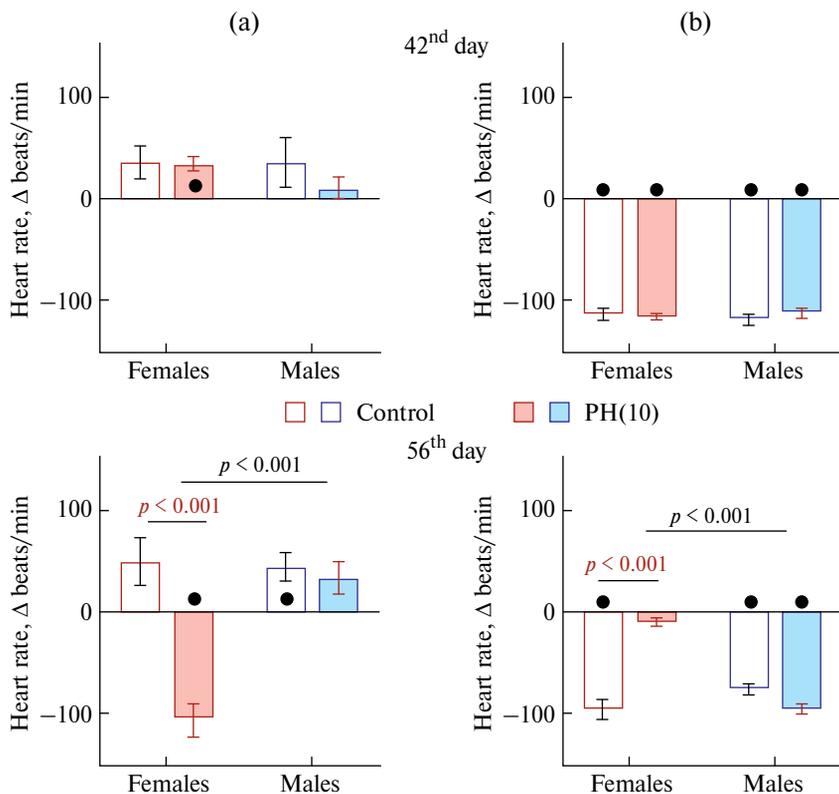


Рис. 3. Влияния пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на ЧСС крыс на фоне блокаторов парасимпатических (а) и симпатических (б) кардиотропных нервных влияний, зарегистрированные в препубертатном и пубертатном возрасте. • – $p < 0.05$ по сравнению с фоном. Остальные обозначения как на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что регуляция деятельности сердца может осуществляться за счет разных контуров: с одной стороны, за счет центрального управления, с другой стороны, за счет работы автономных механизмов, причем в онтогенезе наблюдается попеременное преобладание этих влияний. В соответствии с литературными данными, к общим закономерностям возрастного становления регуляции сердечного ритма можно отнести неравномерность становления симпато-парасимпатических регуляторных влияний.

Если в первую неделю жизни имеет место общая слабость всех регуляторных механизмов, то постепенно в течение 2–3-й недели происходит усиление сначала симпатических, а затем, к четырехнедельному возрасту, – парасимпатических влияний. С началом полового созревания у шестинедельных крысят хронотропная функция сердца формируется под влиянием высокой активности симпатического канала, и только с наступлением половой зрелости наблюдается относительный баланс парасимпатических и симпатоадреналовых влияний на формирование сердечного ритма в состоянии покоя. В процессе онтогенеза меняется чувствительность и экспрессия определенных подтипов адренергических и холинергических рецепторов, происходят изменения в системах внутриклеточных посредников, а также повышаются возможности гуморального канала регуляции, вероятно, в результате изменения чувствительности ре-

цепторов мембран кардиомиоцитов к регуляторным факторам, циркулирующим во внутренней среде [26, 27].

Несмотря на небольшую выборку животных и относительно короткий временной интервал наблюдений в данной работе, полученные результаты в целом отражают основной вектор возрастных изменений в регуляции хронотропной функции сердца. Действительно, контрольные 42-дневные крысы имеют достоверно более высокие ЧСС и индекс напряженности и более низкую вариабельность сердечного ритма, чем половозрелые животные, что можно трактовать как свидетельство преобладания симпатических влияний в регуляции сердечного ритма на данном этапе онтогенеза. С другой стороны, высокая вариабельность кардиоинтервалов и низкая ЧСС у половозрелых детенышей свидетельствуют о повышении активности парасимпатического канала регуляции при одновременном снижении симпатoadреналовых влияний на сердце.

У 42-дневных детенышей, как и ранее в течение первого месяца жизни, мы не обнаружили значимых различий между самцами и самками по ЧСС и основным показателям ВСР, что может служить косвенным подтверждением незрелости детенышей этого возраста [25]. Половозрелые же самки крыс уже имеют более высокую ЧСС, что, вероятно, связано с потенцированием синтеза кортикостероидов и роста симпатического тонуса эстрогенами. Однако, если на ранних этапах развития активация симпатoadреналовой системы может иметь защитное значение, влияя на созревание миокарда и периферической сосудистой сети [29], то сохраняющийся высокий тонус и активность симпатической нервной системы в дальнейшем может быть одним из ведущих факторов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний.

Поскольку высшим регулятором ЧСС и сердечного выброса у взрослых является ВНС, принято считать, что хронический вегетативный дисбаланс играет решающую роль в развитии сердечной недостаточности, а повышенный симпатический тонус в сочетании со снижением парасимпатической активности наблюдается на ранних стадиях хронической сердечной недостаточности [28]. Действительно, гиперактивность симпатической нервной системы наблюдается при ряде заболеваний сердца, включая гипертонию и дисфункцию левого желудочка [29], а снижение ее активности увеличивает выживаемость животных на модели хронической сердечной недостаточности [29], что позволяет предполагать решающую роль усиления симпатической передачи сигналов в прогрессировании сердечных дисфункций.

Нам не удалось обнаружить проявлений воздействия  пренатальной гипоксии на регуляцию сердечного ритма у 42-дневных животных, не достигших половой зрелости. Однако у молодого половозрелого потомства обоих полов внутриутробная гипоксия приводит к падению базового сердечного ритма, а также к увеличению ЧСС и стресс-индекса наряду со снижением ВСР, то есть стрессорное воздействие способствует росту симпатoadреналовых влияний на хронотропную функцию сердца. Так, если у контрольных животных данного возраста базовый ритм сердца составляет 92% от ЧСС, то после перенесенной гипоксии – только 79.8%, что подразумевает повышенный вклад вегетативной регуляции в формирование сердечного ритма.

Примечательно, что в первую неделю жизни крысят, пережившие гипоксию внутриутробно, напротив, демонстрируют более высокий базовый сердечный ритм при достоверно более низкой ЧСС [25]. В последующие восемь недель базовый ритм контрольных животных вырос на 262.7 ± 5.9 уд/мин против 226.7 ± 4.9 уд/мин у экспериментальных ($p < 0.001$). Что касается ЧСС, то за тот же временной отрезок в контроле этот показатель увеличился на 106.6 ± 10.1 уд/мин, а после гипоксии – на 182.2 ± 14.4 уд/мин ($p < 0.001$). Таким образом, на ранних этапах постнатальной жизни пренатальная гипоксия приводит к замедлению закономерного роста базового сердечного ритма и ускоряет характерное для контрольных животных нарастание ЧСС.

У взрослых трехмесячных крыс обоих полов, переживших внутриутробную гипоксию, ЧСС уже не отличается от значений контрольных животных, но изменения

dX и SI, характерные для двухмесячного потомства, сохраняются, что свидетельствует о долгосрочных и необратимых нарушениях регуляции сердечного ритма [12]. Таким образом, можно предполагать, что гипоксия в период раннего органогенеза действительно носит программирующий характер, потенциально увеличивая риск развития ССЗ уже у взрослых животных. Можно также отметить, что большая часть исследований влияния пренатальной гипоксии на сердечную функцию потомства проведена на взрослых половозрелых животных, преимущественно 4–6-месячных. Результаты представленной работы свидетельствуют о том, что определенные отклонения в работе сердца можно зарегистрировать и в более молодом возрасте, что делает возможными раннюю диагностику и профилактику.

Как последствия внутриутробной гипоксии, так и предрасположенность к патологиям сердца у взрослых часто предполагают зависимость от пола [12, 13]. Потомство женского пола, как правило, располагает защитными механизмами против программирующих эффектов пренатальной гипоксии, тогда как потомство мужского пола характеризуется повышенной предрасположенностью к ССЗ [30]. Традиционно считается, что самцы имеют более высокую предрасположенность к развитию артериальной гипертензии в раннем возрасте [31] и повышенную восприимчивость к ишемическому/реперфузионному повреждению по сравнению с самками [32]. Данные различия могут быть обусловлены увеличением продукции активных форм кислорода у самцов или снижением активности системы антиоксидантной защиты [33], а также эпигенетическими механизмами [12]. Факторами риска для развития ССЗ считаются также повышенный уровень тестостерона и, наоборот, сниженное содержание эстрогена [34].

Однако в нашей модели гипоксического стресса нарушения баланса вегетативной регуляции сердца оказались более выраженными у самок, что делает их более уязвимыми к риску развития сердечной патологии в пубертатном периоде. Особое беспокойство вызывает нехарактерное и резко отличное от такового у самцов изменение сердечного ритма в ответ на введение классических кардиоблокаторов, что может быть результатом изменения чувствительности кардиомиоцитов или изменения соотношения определенных подтипов рецепторов. Известно, что гипоксия вызывает окислительный стресс и подавляет экспрессию целого ряда генов, вовлеченных в передачу сигналов внутри клетки, коммуникацию между клетками, защиту, пролиферацию и выживание клеток в эмбриональном сердце, то есть генов, которые оказывают длительное или пожизненное влияние на функции сердца во взрослом возрасте [35, 36]. В частности, к генам, которые могут быть запрограммированы внутриутробной гипоксией, относятся гены β -адренорецепторов (β -АР) и определенных G-белков, а результатом программирования является увеличение во взрослом сердце β_2 -АР и соотношения белков Gs/Gi [29]. Увеличение β_2 -АР и подавление Gi обеспечивают в сердце, перенесшем гипоксию, развитие положительного инотропного эффекта, опосредованного β_2 -АР. Однако сверхвыраженная экспрессия в сердце β_2 -АР, как и подавление экспрессии Gi-белка, могут иметь и негативные последствия. В первом случае вследствие усиления сократимости миокарда повышен риск развития ишемии, во втором – у кардиомиоцитов ослаблены защитные механизмы против клеточной гибели, опосредованные через сигнальный каскад β_2 -АР с Gi-белками. У четырехмесячных самцов, переживших хроническую пренатальную гипоксию, не было обнаружено изменений в экспрессии M_2 -холинэргических и β_1 -АР в сердце [37], однако для самок, а также половозрелых животных более молодого возраста вопрос остается открытым.

Интересно, что у трехмесячных крысят, переживших внутриутробную гипоксию в период раннего органогенеза, наблюдались разнонаправленные зависимые от пола изменения активности оксоглутратдегидрогеназного комплекса (ОГДК): увеличение у самок и снижение у самцов, при этом у самок наблюдали корреляцию между изменением активности ОГДК и увеличением ацетилирования белков 13–17 кДа, соответствующих гистонам [12]. Гиперацетилирование может вызывать метаболическую не-

гибкость при таких кардиометаболических заболеваниях, как гипертония, сердечные аритмии, атеросклероз, а также участвовать в патогенезе гипертрофии сердца и сердечной недостаточности [38, 39]. Таким образом, если программирующие эффекты пренатального стресса направлены на ОГДК, то к эпигенетическим изменениям самки вполне могут оказаться чувствительнее самцов.

Полученные на относительно небольшой выборке животных результаты работы носят предварительный характер. Однако дальнейшее выявление молекулярных механизмов, обуславливающих повышение риска развития ССЗ, имеет важное значение как для разработки методов предупреждения сердечных патологий органогенеза, так и для своевременного, как можно более раннего, выявления самих заболеваний и разработки новых препаратов для их лечения. Наличие половых различий в вегетативной регуляции сердца в условиях раннего пубертата является экспериментальным подтверждением необходимости гендерного подхода к диагностике и терапии кардиальной дисфункции, возникшей в результате воздействия повреждающих факторов в пренатальном онтогенезе.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А. В. Г., М. В. М., Н. А. С.); сбор данных (А. В. Г., А. С. М., М. В. М., Я. В. К.); обработка данных (А. В. Г., А. А. Г.); написание и редактирование манускрипта (А. В. Г., А. С. М., М. В. М.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова №121032300071-8. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводились в соответствии с международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с лабораторными животными и были одобрены Комиссией по биоэтике Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, протокол №137-д от 11.11.2021 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mentz A, Yusuf S* (2017) Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res* 121: 677–694. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.308903>
2. *Magnussen C, Ojeda FM, Leong DP, Alegre-Diaz J, Amouyel P, Aviles-Santa L, De Bacquer D, Ballantyne CM, Bernabé-Ortiz A, Bobak M, Brenner H, Carrillo-Larco RM, de Lemos J, Dobson A, Dörr M, Donfrancesco C, Drygas W, Dullaart RP, Engström G, Ferrario MM, Ferrières J, de Gaetano G, Goldbourt U, Gonzalez C, Grassi G, Hodge AM, Hveem K, Iacoviello L, Ikram MK, Irazola V, Jobe M, Jousilahti P, Kaleebu P, Kavousi M, Kee F, Khalili D, Koenig W, Kontsevaya A, Kuulasmaa K, Lackner KJ, Leistner DM, Lind L, Linneberg A, Lorenz T, Lyngbakken MN, Malekzadeh R, Malyutina S, Mathiesen EB, Melander O, Metspalu A, Miranda JJ, Moitry M, Mugisha J, Nalini M, Nambi V, Ninomiya T, Oppermann K, d'Orsi E, Pajak A, Palmieri L, Panagiotakos D, Perianayagam A, Peters A, Poustchi H, Prentice AM, Prescott E, Risérus U, Salo-*

- maa V, Sans S, Sakata S, Schöttker B, Schutte AE, Sepanlou SG, Sharma SK, Shaw JE, Simons LA, Söderberg S, Tamosiunas A, Thorand B, Tunstall-Pedoe H, Twerenbold R, Vanuzzo D, Veronesi G, Waibel J, Wannamethee SG, Watanabe M, Wild PS, Yao Y, Zeng Y, Ziegler A, Blankenberg S (2023) Global effect of modifiable risk factors on cardiovascular disease and mortality. *N Engl J Med* 389: 1273–1285.
<https://doi.org/10.1056/NEJMOA2206916>
3. *Gluckman PD, Hanson MA, Phil D, Cooper C, Thornburg KL* (2008) Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 359: 61–73.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>
 4. *Chen X, Zhang L, Wang C* (2019) Prenatal hypoxia-induced epigenomic and transcriptomic reprogramming in rat fetal and adult offspring hearts. *Sci Data* 6: 238.
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0253-9>
 5. *Razaz N, Norman M, Alfvén T, Nchattingius S* (2023) Low Apgar score and asphyxia complications at birth and risk of longer-term cardiovascular disease: a nationwide population-based study of term infants. *Lancet Reg Health Eur* 24: 100532.
<https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2022.100532>
 6. *Rakesh K, Vishnu Bhat B, Adhisivam B, Ajith P* (2018) Effect of therapeutic hypothermia on myocardial dysfunction in term neonates with perinatal asphyxia – a randomized controlled trial. *J Matern-Fetal Neonatal Med* 31: 2418–2423.
<https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1344633>
 7. *Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, Blake EZ, Horder KA, Thakor AS, Hansell JA, Kane AD, Wooding FBP, Cross CM, Herrera EA* (2012) Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One* 7: e31017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031017>
 8. *Walton SL, Singh RR, Tan T, Paravicini TM, Moritz KM, Moritz KM* (2016) Late gestational hypoxia and a postnatal high salt diet programs endothelial dysfunction and arterial stiffness in adult mouse offspring. *J Physiol* 594: 1451–1463.
<https://doi.org/10.1113/JP271067>
 9. *Herrera EA, Camm EJ, Cross CM, Mullender JL, Wooding FBP, Giussani DA* (2012) Morphological and functional alterations in the aorta of the chronically hypoxic fetal rat. *J Vasc Res* 49: 50–58.
<https://doi.org/10.1159/000330666>
 10. *Svitok P, Molcan L, Stebelova K, Vesela A, Sedlackova N, Ujhazy E, Mach M, Zeman M* (2016) Prenatal hypoxia in rats increased blood pressure and sympathetic drive of the adult offspring. *Hypertens Res* 39: 501–505.
<https://doi.org/10.1038/hr.2016.21>
 11. *Rook W, Johnson CD, Coney AM, Marshall JM* (2014) Prenatal hypoxia leads to increased muscle sympathetic nerve activity, sympathetic hyperinnervation, premature blunting of neuropeptide Y signaling, and hypertension in adult life. *Hypertension* 64: 1321–1327.
<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04374>
 12. *Graf AV, Maslova MV, Artiukhov AV, Ksenofontov AL, Aleshin VA, Bunik VI* (2022) Acute prenatal hypoxia in rats affects physiology and brain metabolism in the offspring, dependent on sex and gestational age. *Int J Mol Sci* 23: 2579.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052579>
 13. *Sutovska H, Babarikova K, Zeman M, Molcan L* (2022) Prenatal hypoxia affects foetal cardiovascular regulatory mechanisms in a sex- and circadian-dependent manner: a review. *Int J Mol Sci* 23: 2885.
<https://doi.org/10.3390/ijms23052885>
 14. *Graf A, Trofimova L, Ksenofontov A, Baratova L, Bunik V* (2020) Hypoxic adaptation of mitochondrial metabolism in rat cerebellum decreases in pregnancy. *Cells* 9: 139.
<https://doi.org/10.3390/cells9010139>
 15. *Maslova MV, Graf AV, Maklakova AS, Krushinskaya YaV, Sokolova NA, Koshelev VB* (2005) Acute hypoxia during organogenesis affects cardiac autonomic balance in pregnant rats. *Bull Exp Biol Med* 139: 180–182.
<https://doi.org/10.1007/s10517-005-0241-2>
 16. *Marcela SG, Cristina RMM, Angel PGM, Manuel AM, Sofia DC, Patricia DLRS, Bladimir RR, Concepción SG* (2012) Chronological and morphological study of heart development in the rat. *Anat Rec* 295: 1267–1290.
<https://doi.org/10.1002/AR.22508>
 17. *Itani N, Salinas CE, Villena M, Skeffington KL, Beck C, Villamor E, Blanco CE, Giussani DA* (2018) The highs and lows of programmed cardiovascular disease by developmental hypoxia: studies in the chicken embryo. *J Physiol* 596: 2991–3006.
<https://doi.org/10.1113/JP274111>

18. *José Jaime H-P, Venus B-C, Graciela J-R, Tania H-HO, Lucía M-M* (2016) Young-adult male rats' vulnerability to chronic mild stress is reflected by anxious-like instead of depressive-like behaviors. *Neurosci J* 2016: 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2016/5317242>
19. *Marcotte M, Bernardo A, Linga N, Pérez-Romero CA, Guillou J-L, Sibille E, Prevot TD* (2021) Handling techniques to reduce stress in mice. *J Vis Exp* 25: 175.
<https://doi.org/10.3791/62593>
20. *Bigelow LJ, Pope EK, MacDonald DS, Rock JE, Bernard PB* (2023) Getting a handle on rat familiarization: The impact of handling protocols on classic tests of stress in *Rattus norvegicus*. *Lab Anim* 57: 259–269.
<https://doi.org/10.1177/00236772221142687>
21. *Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC* (2008) Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res* 1215: 40–52.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.056>
22. *Lenschow C, Sigl-Glöckner J, Brecht M* (2017) Development of rat female genital cortex and control of female puberty by sexual touch. *PLoS Biol* 15: e2001283.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001283>
23. *Sato S* (2008) Quantitative evaluation of ontogenetic change in heart rate and its autonomic regulation in newborn mice with the use of a noninvasive piezoelectric sensor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1708–H1715.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.01122.2007>
24. *Baevsky RM, Chernikova AG* (2017) Heart rate variability analysis: physiological foundations and main methods. *Cardiometry* 66–76.
<https://doi.org/10.12710/cardiometry.2017.10.6676>
25. *Граф АВ, Маклакова АС, Маслова МВ, Крушинская ЯВ, Гусева АА, Соколова НА* (2024) Влияние пренатальной гипоксии периода раннего органогенеза на показатели вариабельности сердечного ритма у крысят первого месяца жизни. *Вестн Московск универ Серия 16 Биология* 79: 151–159. [*Graf AV, Maklakova AS, Maslova MV, Krushinskaya YaV, Guseva AA, Sokolova NA* (2024) Prenatal hypoxia of the period of early organogenesis influence on heart rate variability in rat pups during the first month of life. *Vestn Moskovsk Univer Seriya 16 Biol* 79(2): 151–159. (In Russ)].
<https://doi.org/10.55959/MSU0137-0952-16-79-2-8>
26. *Курьянова ЕВ* (2008) К вопросу о методах анализа сердечного ритма и типах его регуляции на разных этапах онтогенеза белых крыс. *Естеств науки* 4: 77–84. [*Kuryanova EV* (2008) On the issue of methods for analyzing heart rate and types of its regulation at different stages of ontogenesis of white rats. *Natural Sci* 4: 77–84. (In Russ)].
27. *Курьянова ЕВ, Теплый ДЛ, Зеренинова НВ* (2011) Становление регуляции хронотропной функции сердца в постнатальном онтогенезе белых крыс по данным спектрального анализа вариабельности. *Бюл экспер биол мед* 2: 614–617. [*Kuryanova EV, Teply DL, Zereninova NV* (2011) Regulation of chronotropic heart function formation in postnatal ontogenesis of white rats according to spectral analysis of variability. *Bull Exp Biol Med* 12: 614–617. (In Russ)].
28. *Ziyatdinova NI, Sergeeva AM, Dementieva RE, Zefirov TL* (2012) Peculiar effects of muscarinic M1, M2, and M3 receptor blockers on cardiac chronotropic function in neonatal rats. *Bull Exp Biol Med* 154: 1–2.
<https://doi.org/10.1007/s10517-012-1859-5>
29. *Li G, Bae S, Zhang L* (2004) Effect of prenatal hypoxia on heat stress-mediated cardioprotection in adult rat heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* 286: H1712–H1719.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00898.2003>
30. *Zeman M, Okuliarova M* (2017) Sex-specific cardiovascular susceptibility to ischaemic myocardial injury following exposure to prenatal hypoxia. *Clin Sci* 131: 2791–2794.
<https://doi.org/10.1042/CS20171255>
31. *Gao Y, Dasgupta C, Huang L, Song R, Zhang Z, Zhang L* (2019) Multi-omics integration reveals short and long-term effects of gestational hypoxia on the heart development. *Cells* 8: 1608.
<https://doi.org/10.3390/cells8121608>
32. *Ostadal B, Ostadalova I, Szarszoi O, Netuka I, Olejnickova V, Hlavackova M* (2021) Sex-dependent effect of perinatal hypoxia on cardiac tolerance to oxygen deprivation in adults. *Can J Physiol Pharmacol* 99: 1–8.
<https://doi.org/10.1139/cjpp-2020-0310>
33. *Hellgren KT, Premanandhan H, Quinn CJ, Trafford AW, Galli GLJ* (2021) Sex-dependent effects of developmental hypoxia on cardiac mitochondria from adult murine offspring. *Free Radic Biol Med* 162: 490–499.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.11.004>

34. Song R, Mishra JS, Dangudubiyam SV, Antony KM, Baker TL, Watters JJ, Kumar S (2022) Gestational intermittent hypoxia induces sex-specific impairment in endothelial mechanisms and sex steroid hormone levels in male rat offspring. *Reprod Sci* 29: 1531–1541. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00739-4>
35. Zhang L (2005) Prenatal hypoxia and cardiac programming. *J Soc Gynecol Invest* 12: 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsg.2004.09.004>
36. Li G, Xiao Y, Estrella JL, Ducsay CA, Gilbert RD, Zhang L (2003) Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. *J Soc Gynecol Invest* 10: 265–274. [https://doi.org/10.1016/s1071-5576\(03\)00074-1](https://doi.org/10.1016/s1071-5576(03)00074-1)
37. Niu Y, Kane AD, Lusby CM, Allison BJ, Chua YY, Kaandorp JJ, Nevin-Dolan R, Ashmore TJ, Blackmore HL, Derks JB, Ozanne SE, Giussani DA (2018) Maternal allopurinol prevents cardiac dysfunction in adult male offspring programmed by chronic hypoxia during pregnancy. *Hypertension* 72: 971–978. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11363>
38. Funamoto M, Imanishi M, Tsuchiya K, Ikeda Y (2023) Roles of histone acetylation sites in cardiac hypertrophy and heart failure. *Front Cardiovasc Med* 10: 1133611. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.1133611>
39. Yang M, Zhang Y, Ren J (2020) Acetylation in cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866: 165836. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2020.165836>

Prenatal Hypoxia of Early Organogenesis Period Influence on Heart Rate Variability in Rats of Prepubescent and Pubertal Age

A. V. Graf^{a,*}, A. S. Maklakova^a, M. V. Maslova^a, Ya. V. Krushinskaya^a, A. A. Guseva^a, and N. A. Sokolova^a

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**e-mail: nastjushka@gmail.com*

Risk factors associated with environmental exposure, especially during critical periods of intrauterine development, affect fetal development and increase the risk of certain diseases in adulthood including cardiovascular diseases (CVD). Hypoxia is considered the most common and clinically significant form of intrauterine stress that causes systemic pathological changes, in 78% of cases associated with cardiovascular system disorders. The purpose of this study was to evaluate the effects of acute hypoxia on the 10th day of gestation on heart rate and its regulation in rats' offspring of prepubescent and pubertal age, as well as to analyze the dependence of resulting disorders on gender.

By the beginning of puberty the heart rate of rats survived prenatal hypoxia was significantly higher than in control accompanied by significant decrease in heart rate variability (dX) which naturally leads to stress index (SI) increase indicating growing sympathetic activity in heart rhythm regulation. At the same time the base heart rate in animals suffered intrauterine hypoxia turned out to be lower than in control. The fact that matured animals of both sexes, survived intrauterine hypoxia in early organogenesis, also show changes in dX and SI indicates long-term and irreversible disorders in heart rhythm regulation. Thus hypoxia during early organogenesis is of a programming nature potentially increasing the risk of developing CVD in adult animals. Moreover the autonomic system balance shift towards the activation of sympathetic tone was more pronounced in females making them more vulnerable to the risk of developing cardiac pathology in puberty.

Keywords: prenatal hypoxia, heart rate variability, autonomic nervous system, prenatal programming