

НЕОНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ, АССОЦИИРОВАННЫЙ С НАРУШЕНИЯМИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ И СЕРОТОНИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ВЗРОСЛЫХ КРЫС

© 2024 г. Е. И. Тюлькова*, В. А. Стратиллов, О. В. Ветровой

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

* e-mail: etyulkova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.07.2024 г.

После доработки 06.08.2024 г.

Принята к публикации 06.08.2024 г.

Было проведено исследование концентрации адренокортикотропного гормона (АКТГ), кортикостерона и серотонина в плазме крови ювенильных и взрослых крыс, а также поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” и уровня серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс, подвергавшихся трем сеансам гипобарической гипоксии (360 мм.рт.ст. 2 ч) на 8–10-е сутки после рождения. Эта неинвазивная модель неонатальной гипоксии (НГ) на крысах моделирует перинатальную гипоксическую травму средней тяжести у плодов и недоношенных детей. В тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” 3-месячные НГ крысы показали снижение исследовательской активности и повышение тревожности, что сопровождалось снижением уровня серотонина в Ядрах Шва этих животных. В плазме крови взрослых крыс, подвергавшихся НГ, не было выявлено изменений уровня кортикостерона и серотонина, однако содержание АКТГ было достоверно ниже по отношению к контролю. Таким образом, показано, что гипоксический стресс в раннем постнатальном онтогенезе крыс приводит к перестройкам серотониновой системы мозга, модификации гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС) и, как следствие, к длительным изменениям поведения.

Ключевые слова: крысы, неонатальная гипоксия, глюкостероидная система, серотонинергическая система, поведение

DOI: 10.31857/S0044452924050079, **EDN:** XPCSUR

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем современной перинатологии является гипоксически-ишемическая энцефалопатия. Чаще всего это заболевание встречается у новорожденных детей с перинатальной асфиксией. За последние 30 лет количество преждевременных родов увеличилось на 20%. Недоношенный ребенок прежде всего подвергается гипоксическим воздействиям вследствие недоразвития легких [1]. В процессе родов обвитие пуповиной или аномальная амниотическая жидкость могут вызвать дистресс плода, асфиксию и гипоксию. Гипоксия-ишемия нарушает формирование центральных двигательных путей новорожденного и может повлиять на нормальное развитие пластичности мозга [2]. Повышенная восприимчивость перивентрикулярного белого вещества к гипоксии-ишемии у недоношенных детей также предрасполагает к двигательному, когнитивному и сенсорному дефициту. Считается, что когнитивные

нарушения и атипичное развитие мозга являются последствиями преждевременных и/или отягощенных родов.

7–10-й послеродовые дни у грызунов (крысы, мыши) с точки зрения этапа развития мозга совпадают с наиболее распространенными сроками недоношенной беременности человека. Аналогично человеческому плоду на 34 неделе беременности у грызунов в семидневном возрасте рост мозга достигает пика и начинается кортикальная миелинизация [3]. В это время завершаются запрограммированные гистогенетические процессы пролиферации, миграции и дифференцировки всех структурных элементов нервной ткани. Происходит становление и упорядочение слоев неокортекса, активно протекают синаптогенез и ангиогенез. Наиболее часто используемой на сегодняшний день моделью гипоксически-ишемической энцефалопатии является модель Райса-Ванушци [4, 5], которая включает два этапа: перевязку правой общей сонной артерии и последующее воздействие гипоксической

смесью газов. Эта модель, имитирующая неонатальную гипоксию-ишемию, приводит к неврологическим расстройствам, которые подтверждаются серией поведенческих оценок, таких как оценка Zea-Longa, оценка неврологической тяжести, тест водного лабиринта Морриса, тест Y-лабиринта, тест ротарода и тест отрицательного геотаксиса [6]. Не всегда недоношенная беременность сочетается с травматическими повреждениями мозга, однако практически все недоношенные дети испытывают гипоксию различной степени тяжести, что также может повлечь “перепрограммирование” развития мозга. Поэтому кроме модели Райса-Вануцци используются и чисто гипоксические воздействия в ранний неонатальный период. Применение гипоксии в период от 6 до 12 дней после рождения, являющийся критическим периодом для развития мозга (период созревания синапсов) и уязвимости к гипоксическим воздействиям, может приводить к различным расстройствам [7, 8]. Эта модель может воспроизводить последствия хронической или повторяющейся гипоксии, которая может возникать при определенных клинических состояниях, таких как хронические заболевания легких у недоношенных детей или апноэ во сне. Физиологические и патологические процессы, которые призваны воспроизвести эта модель, могут включать в себя воздействие повторяющейся гипоксии на развитие мозга, повреждение нейронов и потенциальный долгосрочный неврологический дефицит. Модель может быть применима для изучения таких состояний, как перинатальная асфиксия и другие неонатальные травмы головного мозга, связанные с гипоксией [7, 8].

Переменяющаяся гипоксия в первые дни после рождения является распространенным стрессором у недоношенных новорожденных [9]. Неонатальные стрессоры могут оказывать долгосрочное программирующее/перепрограммирующее воздействие на развивающийся мозг, и последствия таких перестроек могут сохраниться у взрослых. Было показано, что воздействие гипобарической гипоксии в раннем неонатальном периоде (первые сутки после рождения) приводит к более выраженным нарушениям исследовательского поведения и когнитивному дефициту и модификации дофаминергической системы, чем нормобарической гипоксии [10, 11]. Мы предположили, что интервальная гипобарическая гипоксия на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза может вызывать стрессовую реакцию и изменять активность глюкокортикоидной системы ювенильных и взрослых крыс. Целью данного исследования было изучение последствий предъявления крысам неонатального гипоксического (НГ) воздействия на 8–10-е сутки после рождения (сеансы гипобарической гипоксии

360 мм рт ст на 2 ч трехкратно через 24 ч) на концентрации АКТГ, кортикостерона и серотонина в плазме крови ювенильных и взрослых крыс, а также поведение и уровень серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на животных из ЦКП “Биоколлекция лабораторных млекопитающих разной таксономической принадлежности” Института физиологии им. Павлова РАН. В работе были использованы взрослые беременные самки крыс линии Вистар в возрасте 12–13 недель и массой 220–250 г и их потомство.

Перед рождением потомства беременных крыс рассаживали по отдельным клеткам, и в дальнейшем каждый помет содержался отдельно. После отъема крыс-самцов помещали в клетки размером 60 × 30 × 20 см, по 6 животных в каждой. Каждая группа крыс состояла из случайно отобранных крысят, родившихся от разных матерей, чтобы свести к минимуму неравномерность помета. Крысы получали пищу (сухой корм производства завода комбикормов в г. Тосно Ленинградской области) и воду в неограниченном количестве и содержались по циклу темнота–свет 12:12 ч при комнатной температуре с постоянной влажностью около 60%.

Последующая работа производилась на детенышах самцах. Схема эксперимента представлена на рис. 1. Половину крысят подвергали трем сеансам гипобарической гипоксии (неонатальная гипок-

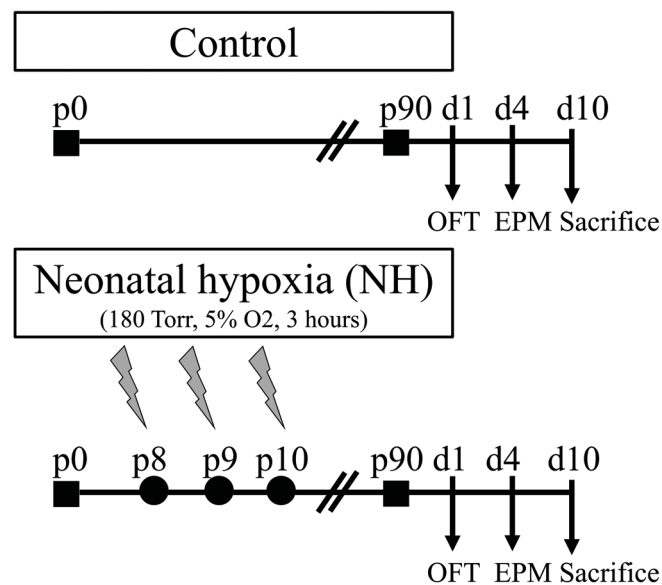


Рис. 1. Дизайн исследования. NH, неонатальная гипоксия; p0, день рождения; p8, p9, p10, p90, постнатальные дни; d1, d4, d10, дни эксперимента; OFT, тест “открытое поле”, EPM, “приподнятый крестообразный лабиринт”.

сия, НГ). Для создания НГ на 8, 9 и 10-е сутки постнатального периода крысят помещали в барокамеру проточного типа и снижали давление до 360 мм.рт.ст., что соответствует 10% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия 2 ч, интервал между воздействиями 24 ч. После каждого воздействия крысят возвращали в материнскую клетку. С целью стандартизации условий контрольных животных также помещали в барокамеру по аналогичному протоколу, но не снижали давление. Ранее эта модель была использована нами для проверки гипотезы возможного “перепрограммирования” последствий пренатальной гипоксии на 14–16-е сутки беременности [12].

С помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа определяли концентрацию адренокортикотропного гормона (АКТГ) (ab263880, Abcam, Великобритания), кортикостерона (АС-14F1, Хема, Россия) и серотонина (ab133053, Abcam, Великобритания) в сыворотке артериальной крови 2-недельных и 3-месячных контрольных и НГ крыс. Для определения концентрации серотонина в Ядрах Шва 3-месячных контрольных и НГ крыс декапитировали и извлекали Ядра Шва. Далее осуществляли выделение цитозольной фракции при помощи набора Nuclear and Cytoplasmic Protein Extraction Kit (78833, NEPERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Scientific, США). Концентрацию серотонина в цитозольной фракции Ядер Шва измеряли при помощи коммерческого набора для иммуноферментного анализа (ab133053, Abcam, Великобритания), нормируя данные на концентрацию общего белка, измеренную при помощи набора PierceTM Rapid Gold BCA (Thermo Scientific, США). Все работы проводили в соответствии с инструкциями производителей, а колориметрические измерения осуществляли при помощи планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, BMG Labtech, Германия).

Поведение взрослых 3-месячных контрольных и НГ крыс оценивали в тестах “открытое поле” (исследовательская активность) и “приподнятый крестообразный лабиринт” (тревожность). Тестирование животных проводилось в первой половине дня (с 10 ч. утра) в месте, изолированном от шума.

Тест “открытое поле” (“Open Science”, Россия) проводился на круглой арене (диаметр 97 см, высота стенок 42 см). Поверхность арены в периферийной зоне была разделена на двенадцать секций, а в центральной зоне — на семь секций. Центральная зона находилась при ярком освещении (100–120 люкс). Каждую крысу помещали в центр арены. Установленная на потолке камера фиксировала движения крыс. Общее количество поперечных сечений в периферической (периферическая активность) и центральной зоне (центральная активность), ко-

личество стоек (вертикальная активность), а также количество актов исследования отверстий (норы) и время, затраченное на груминг, измеряли в течение 5 мин.

“Приподнятый крестообразный лабиринт” (“Open Science”, Россия) (120 × 120 × 40 см, высота над полом 1 м) состоял из четырех приподнятых рукавов. Рукава были расположены крестообразно: два противоположных рукава были окружены стенками высотой 50 см (закрытые рукава), а два других рукава были без стенок (открытые рукава). Четыре плеча соединялись центральной платформой прямоугольной формы (10 × 10 см). И центральная платформа, и открытые рукава находились при ярком освещении (100–120 люкс), а закрытые рукава — при слабом освещении (30 люкс). Каждую крысу помещали на центральную платформу мордой к открытому рукаву. Установленная на потолке камера фиксировала движения крыс. Время, проведенное в закрытых и открытых рукавах, время, проведенное на центральной платформе (центральная активность), количество свешиваний с открытых рукавов, количество переходов между закрытыми рукавами и время, затрачиваемое на груминг, измеряли в течение 5 мин.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы GraphPad Prism 10. Для оценки нормальности распределений использовался тест Шапиро–Уилка ($p > 0.05$) и диаграмма QQ-plot. Гомоскедастичность оценивалась критерием Фишера. В качестве параметрического теста использовался t тест Стьюдента ($p < 0.05$), а в случае гетерогенности выборок использовался тест Уэлша ($p < 0.05$). Данные для нормальных распределений представлены как средние $\pm$ SEM. В качестве непараметрического теста использовался U критерий Манна–Уитни ($p < 0.05$), а данные представлены диаграммами box plot.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние неонатальной гипоксии на гормональные показатели крови ювенильных и взрослых крыс

НГ привела к достоверному снижению концентрации АКТГ в сыворотке крови как ювенильных 2-недельных (рис. 2а, $p = 0.018$, Welch’s t -test), так и взрослых 3-месячных крыс (рис. 2д, $p = 0.05$, Welch’s t -test). При этом, ни у 2-недельных, ни у 3-месячных НГ крыс снижение концентрации АКТГ не оказывало влияние на концентрацию кортикостерона (рис. 2б, е). Кроме того, при исследовании концентрации серотонина в сыворотке крови нами также не обнаружено различий между контрольными и НГ ювенильными и взрослыми животными (рис. 2с, ф).

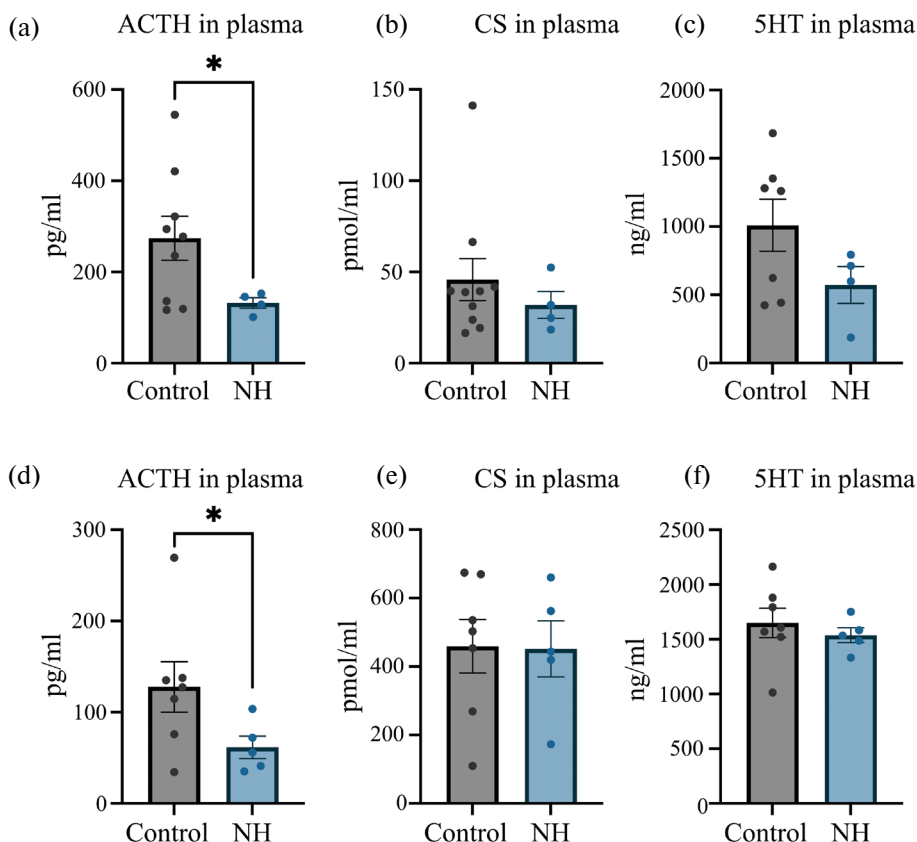


Рис. 2. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на концентрацию АКТГ (ACTH) (a, d), кортикостерона (CS) (b, e) и серотонина (5HT) (c, f) в сыворотке крови 2-недельных (a–c) и 3-месячных (d–f) крыс.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Welch's t-test), $n = 5–7$.

Влияние неонатальной гипоксии на концентрацию серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс

При исследовании концентрации серотонина в Ядрах Шва взрослых крыс нами показано достоверное снижение концентрации этого нейромедиатора (рис. 3, $p = 0.03$, Mann-Whitney test).

Влияние неонатальной гипоксии на поведение взрослых крыс в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт”

Сравнительный анализ поведения в тестах “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” выявил существенные различия между контрольными и НГ крысами (рис. 4, рис. 5).

Так в тесте “открытое поле” НГ крысы демонстрировали достоверно сниженную периферическую (рис. 4a, $p = 0.008$, Student's t-test), центральную (рис. 4b, $p = 0.006$, Mann-Whitney test) и вертикальную активность (рис. 4c, $p = 0.05$, Student's t-test) по сравнению с контрольными животными. Различий в количестве исследуемых нор или времени, потраченном на груминг между

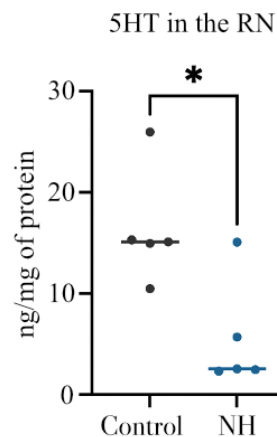


Рис. 3. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на концентрацию серотонина (5HT) в Ядрах Шва (RN) 3-месячных крыс.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test), $n = 5$.

контрольными и НГ животными не выявлено (рис. 4d, рис. 4e).

В тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” НГ крысы отличались достоверным снижением времени, проведенным в открытых рукавах

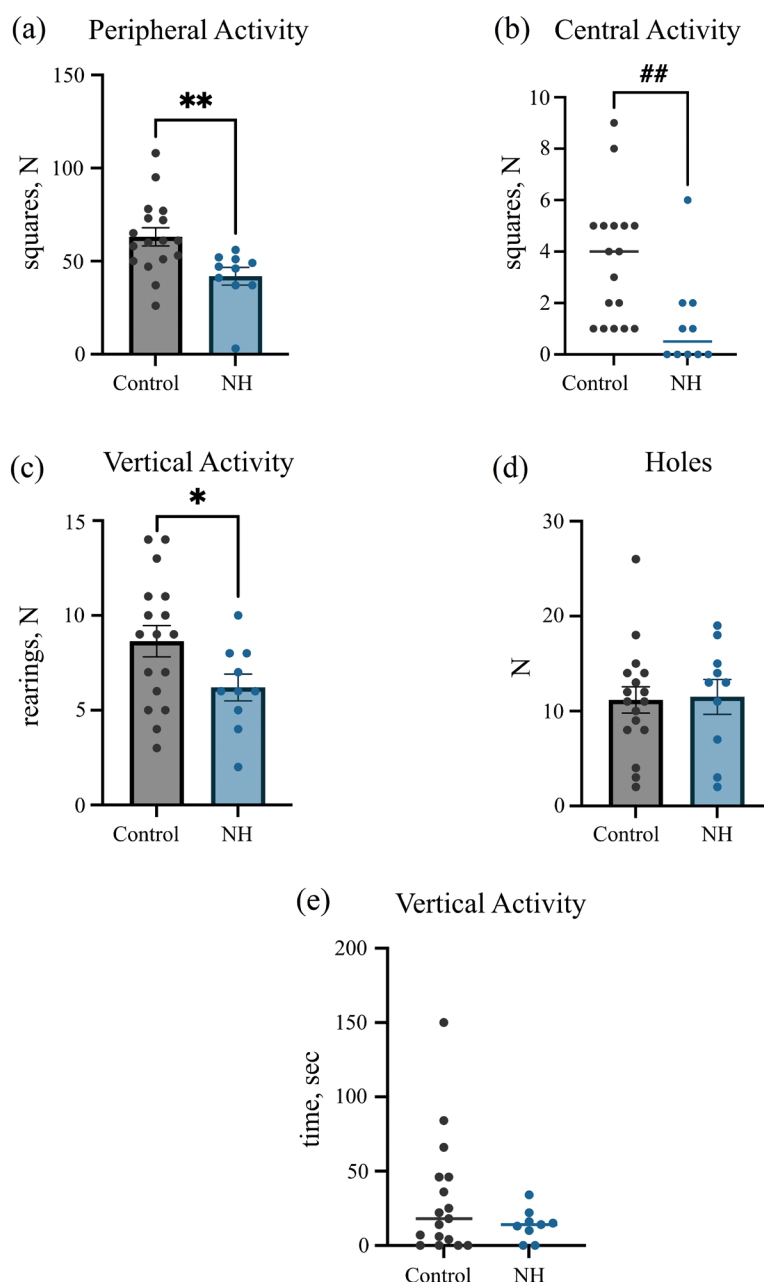


Рис. 4. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на количество поперечных сечений в периферической зоне (периферическая активность) (a), центральной зоне (центральная активность) (b), количество стоек (вертикальная активность) (c), количество актов исследования отверстий (норы) (d) и время груминга (e) у взрослых крыс в тесте “открытое поле”.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Student’s t-test); ** $p < 0.01$ (Student’s t-test); ## $p < 0.01$ (Mann-Whitney test), $n = 10-17$.

(рис. 5a, $p = 0.005$, Mann-Whitney test) и увеличением времени, проведенного в закрытых рукавах (рис. 5b, $p = 0.04$, Student t-test). Кроме того, НГ крысы демонстрировали меньшее количество свешиваний с открытых рукавов по сравнению с контролем (рис. 5e, $p = 0.02$, Mann-Whitney test), но не отличались по времени нахождения на центральной платформе (рис. 5c), количеству переходов

между рукавами (рис. 5d) и времени, затраченном на груминг (рис. 5f).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гипоксия в пре- и неонатальном периодах может приводить к нарушениям развития центральной нервной системы, что влечет за собой и изменения поведения, которые зависят не только от типа и ин-

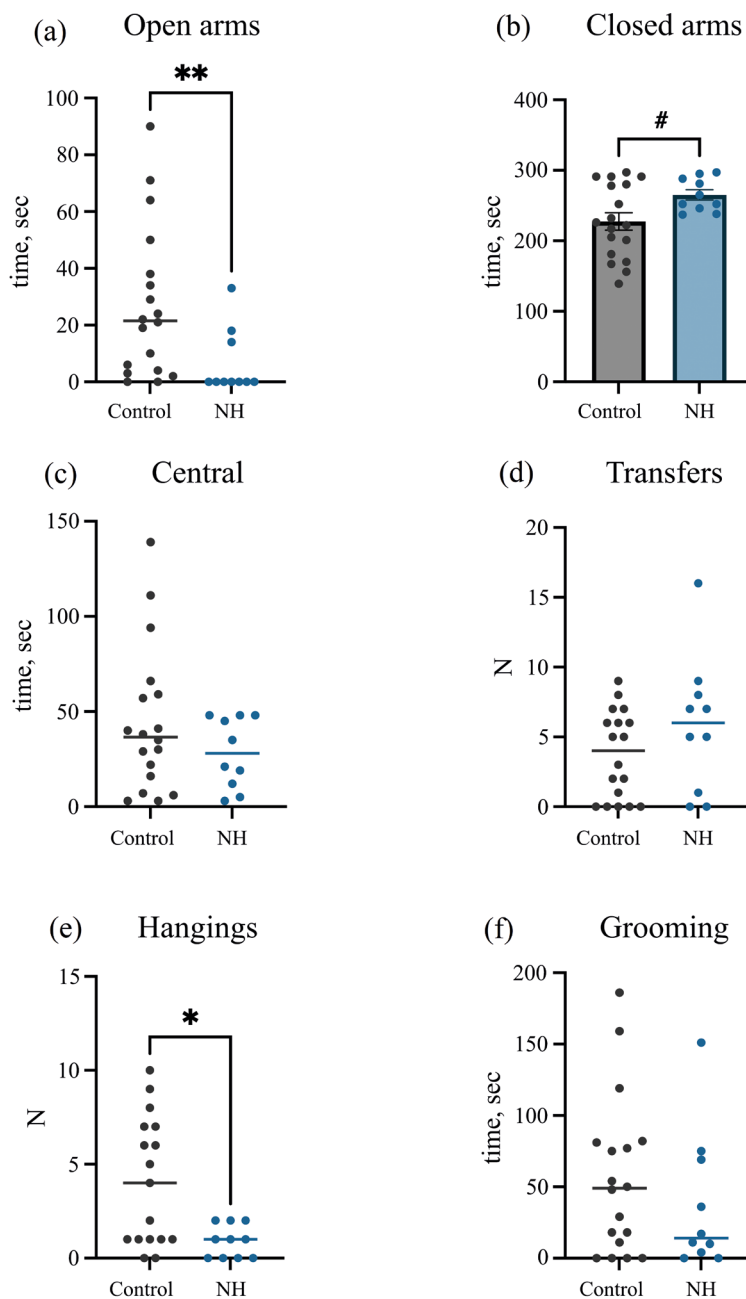


Рис. 5. Влияние неонатальной гипоксии (NH) на время, проведенное в и открытых рукавах (а), закрытых рукавах (б), центральной платформе (с), количество переходов между закрытыми рукавами (д), свешиваний с открытых рукавов (е) и время груминга (ф) взрослых крыс в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт”.

* различия с контролем достоверны, $p < 0.05$ (Mann-Whitney test); ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney test), # $p < 0.05$ (Student's t-test), $n = 10-17$.

тенсивности гипоксии /стресса, но и от периода развития, в котором они происходят.

В этой работе мы провели исследование поведения взрослых крыс после воздействия гипобарической гипоксии на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза и попытались оценить вклад серотониновой системы и нарушений/модификации работы гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальной

системы (ГГАС). Тесты “открытое поле” и “приподнятый крестообразный лабиринт” активно применяются для оценки уровня тревожности и исследовательской активности животных в незнакомой обстановке. Поэтому в настоящей работе было сочтено целесообразным использовать эти тесты для исследования особенностей поведения взрослых крыс, переживших гипоксию на 8–10-е

сутки постнатального онтогенеза. Как оказалось, даже умеренное гипоксическое воздействие на 8–10-е сутки постнатального онтогенеза приводит к изменению поведения взрослых крыс, а именно повышению уровня тревожности и снижению ориентировочно-исследовательского поведения. Экспериментальные животные выглядели более пассивными по сравнению с контрольными – сниженная двигательная активность на периферии в “открытом поле”, уменьшение по сравнению с контролем выходов в центр поля и количества стоек. Похожий тип поведения был показан в работе, в которой авторы предъявляли крысам с 7-го по 14-й постнатальные дни нормобарическую гипоксию (7% кислорода и 93 % азота), что привело во взрослом возрасте также к снижению двигательной активности и уменьшению количества стоек [8]. В нашем исследовании аналогичные особенности поведения прослеживаются и в тесте “приподнятый крестообразный лабиринт” – уменьшение времени пребывания в открытых рукавах и увеличение в закрытых, снижение числа свешиваний. Похожие результаты были получены нами ранее при исследовании поведения взрослых крыс, подвергавшихся воздействию тяжелой гипобарической гипоксии на 14–16-е сутки гестации [13, 14]. Нарушения ориентировочно-исследовательского и тревожного поведения могут быть обусловлены изменениями функциональной активности нейронов в результате воздействия гипоксии в перинатальном периоде развития, что подтверждается сниженным уровнем серотонина в Ядрах Шва у этих животных.

Гипоксия является распространенным неонатальным стрессом, приводящим к значительному краткосрочному дистрессу и долгосрочным осложнениям [15]. Успешная адаптация к неонатальной гипоксии требует скоординированной физиологической реакции, включая увеличение высвобождения глюкокортикоидов из коры надпочечников [16]. Мы предположили, что неонатальное воздействие умеренной гипоксии, так же, как и гипоксия/стресс в пренатальном периоде, приведет к изменениям активности ГГАС у взрослых крыс. Действительно, было показано, что и у ювенильных (2-недельных), и у взрослых (3-месячных) НГ крыс уровень АКТГ в плазме крови достоверно ниже, чем у контрольных животных, однако уровень кортикостерона и серотонина не отличается от контрольного уровня. Влияние гипоксии в перинатальном периоде на развитие ГГАС хорошо известно. В ряде работ было показано, что реакция гипофиза и коры надпочечников на гипоксию существенно различается на разных этапах онтогенеза [17, 18]. Так концентрация АКТГ в плазме крови после неонатальной нормобарической гипоксии (8%) значительно выше у крысят в возрасте 8 суток, чем у 2-дневных,

а у детенышей в возрасте 5 суток уровень АКТГ не коррелирует с концентрацией кортикостерона. Авторы предполагают, что 5 суток после рождения – это критический период, в течение которого формируется прямая зависимость продукции глюкокортикоидов надпочечниками от поступающего АКТГ [17, 18]. Ключевым компонентом реакции на гипоксию является адреномедулярная выработка катехоламинов, обусловленная системными (например, сердечно-сосудистыми) эффектами и местным стимулирующим воздействием на функцию коры надпочечников [19–22]. Развитие путей спинномозговой иннервации мозгового вещества и коры надпочечников завершается к возрасту 8 суток [23]. Адреномедулярные хромаффинные клетки в неонатальном периоде обладают клеточным механизмом активации синтеза и высвобождения катехоламинов в ответ на снижение кислородного снабжения [24]. При этом после 8 суток постнатального онтогенеза у крыс этот механизм перестает проявляться [25]. Повышенный уровень АКТГ и АКТГ-зависимого уровня кортикостерона на 8-е сутки после рождения в этой модели позволяет регулировать повышенный базальный уровень кортикостерона и активность ГГАС.

В наших экспериментах применялась гипоксия (360 мм.рт.ст 10% кислорода 3 раза по 2 ч с 24 ч перерывом). Мы определяли уровень АКТГ через 4 суток после последнего сеанса гипоксии/стресса, т.е. на 14-е сутки после рождения, и у взрослых самцов. Выявленное стабильное снижение уровня АКТГ в результате НГ, вероятно, представляет собой результат “перепрограммирования” ГГАС, направленного на дальнейшее поддержание нормального уровня кортикостерона у этих животных в течение дальнейшей жизни. В свою очередь, в модели пренатальной гипоксии тревожное поведение крыс было обусловлено стрессом матери во время беременности, нарушающим эффективность глюкокортикоидной отрицательной обратной связи через снижение экспрессии экстратегипоталамических глюкокортикоидных рецепторов в мозге потомства на протяжении всей жизни [14, 26]. Таким образом, предъявление гипоксического воздействия в пре- и постнатальном онтогенезе приводят к изменению уровня тревожности, которые обусловлены различными модификациями глюкокортикоидной системы.

В наших предыдущих работах было показано, что в Ядрах Шва взрослых крыс, подвергавшихся тяжелому гипоксическому воздействию на 14–16-е сутки пренатального онтогенеза уровень серотонина не отличался от контрольного [26]. Однако, в модели НГ установлено, что несмотря на то, что уровень серотонина в плазме крови экспериментальных животных не отличается от контрольного, содержание серотонина в Ядрах Шва взрослых

крыс, подвергавшихся НГ достоверно ниже, чем у контрольных. Существующее общее мнение о роли биогенных аминов в патофизиологии психологических расстройств, говорит о том, что депрессия, мания и тревожные расстройства связаны со снижением уровня серотонина в ЦНС [27, 28]. Сниженный уровень серотонина объясняет проявления угнетенного эмоционального состояния этих животных.

Таким образом, неонатальная гипоксия в возрасте 8–10 суток постнатального онтогенеза крыс вызывает существенные изменения активности ГГАС и серотониновой системы, что отражается в снижении исследовательского поведения и повышении тревожности во взрослом возрасте.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Е.И.Т.), сбор данных (В.А.С., О.В.В.), обработка данных (В.А.С., О.В.В.), написание и редактирование манускрипта (Е.И.Т., В.А.С., О.В.В.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протокол исследования рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Института физиологии им. Павлова (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (№ 1023032400236-8-3.1.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы исследования декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Beyersdorf DQ, Stevens HE, Jones KL* (2018) Prenatal Stress, Maternal Immune Dysregulation, and Their Association with Autism Spectrum Disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 20(9):76. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0945-4>
2. *Rocha-Ferreira E, Hristova M* (2016) Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plast* 72016:2016:4901014. <https://doi.org/10.1155/2016/4901014>
3. *Bennet L, Tan S, Van den Heuvel L, Derrick M, Groenendaal F, van Bel F, Juul S, Back SA, Northington F, Robertson NJ, Mallard C, Gunn AJ* (2012) Cell therapy for neonatal hypoxia-ischemia and cerebral palsy. *Ann Neurol* 71: 589–600. <https://doi.org/10.1002/ana.22670>
4. *Rice JE3rd, Vannucci RC, Brierley JB* (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9: 131–141. <https://doi.org/10.1002/ana.410090206>
5. *Yager JY, Ashwal S* (2009) Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatr Neurol* 40: 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.10.025>
6. *Arteni NS, Salgueiro J, Torres I, Achaval M, Nett CA* (2003) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat. *Brain Res* 973: 171–178. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02436-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02436-3)
7. *Millar LJ, Shi L, Hoerder-Suabedissen A, Molnár Z* (2017) Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci* 11:78. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
8. *Bakhtazad S, Ghotbeddin Z, Tabandeh MR, Rahimi K* (2024) Alpha-pinene ameliorate behavioral deficit induced by early postnatal hypoxia in the rat: study the inflammatory mechanism. *Sci Rep* 14(1):6416. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56756-1>
9. *Hermansen CL, Lorah KN* (2007) Respiratory distress in the newborn. *Am Fam Physician* 76: 987–994.
10. *Trnski S, Nikolić B, Ilic K, Drlje M, Bobic-Rasonja M, Darmopil S, Petanjek Z, Hranilovic D, Jovanov-Milosevic N* (2022). The signature of moderate perinatal hypoxia on cortical organization and behavior: altered PNN-Parvalbumin interneuron connectivity of the cingulate circuitries. *Front Cell Dev Biol* 10:810980. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.810980>
11. *Nikolic B, Trnski-Levak S, Kosic K, Drlje M, Banovac I, Hranilovic D, Jovanov-Milosevic N* (2024) Lasting mesothalamic dopamine imbalance and altered exploratory behavior in rats after a mild neonatal hypoxic event. *Front Integr Neurosci* 17:1304338. <https://doi.org/10.3389/fnint.2023.1304338>
12. *Ветровой ОВ, Стратилов ВА, Ломерт ЕВ, Тюлькова ЕИ* (2022) Оценка возможности коррекции нарушений глюкокортикоидной системы гиппокампа крыс, вызванных пренатальной гипоксией. *Нейрохимия* 39(3): 205–209 [Vetrovoy OV, Stratilov VA, Lomert EV, Tyulkova EI (2022) Possible correction of impairments to the glucocorticoid system of the rat hippocampus induced by prenatal hypoxia. *Neurochem J* 16(3): 228–232. (In Russ)]. <https://doi.org/10.1134/S1819712422030126>
13. *Стратилов ВА, Ветровой ОВ, Ватаева ЛА, Тюлькова ЕИ* (2021) Ассоциированные с возрастом изменения исследовательской активности в тесте “открытое поле” у крыс, переживших пренатальную гипоксию. *Журн высш нервн деят* 71(3): 428–436. [Stratilov VA, Vetrovoy OV, Vataeva LA, EI Tyulkova (2022) Age-Associated Changes in Exploratory Activity in the Open Field Test in Rats Surviving Prenatal Hypoxia. *Neurosci Behav Physiol* 52(2): 271–276. (In Russ)]. <https://doi.org/10.31857/S0044467721030102>
14. *Stratilov V, Potapova S, Safarova D, Tyulkova E, Vetrovoy O* (2024) Prenatal Hypoxia Triggers a Glucocorticoid-Associated Depressive-like Phenotype in Adult Rats,

- Accompanied by Reduced Anxiety in Response to Stress
Int J Mol Sci 25: 5902.
<https://doi.org/10.3390/ijms25115902>
15. Raff H, Jacobson L (2007) Glucocorticoid feedback control of corticotropin in the hypoxic neonatal rat. *J Endocrinol* 192(2):453–458.
<https://doi.org/10.1677/JOE-06-0103>
 16. Hanukoglu A, Fried D, Nakash I, Hanukoglu I (1995) Selective increases in adrenal steroidogenic capacity during acute respiratory disease in infants. *Europ J Endocrinol* 133: 552–556.
<https://doi.org/10.1530/eje.0.1330552>
 17. Bruder ED, Taylor JK, Kamer KJ, Raff H (2008) Development of the ACTH and corticosterone response to acute hypoxia in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1195 – R1203.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.90400.2008>
 18. Chintamaneni K, Bruder ED, Raff H (2013) Effects of age on ACTH, corticosterone, glucose, insulin, and mRNA levels during intermittent hypoxia in the neonatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 304: R782–R789.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00073.2013>
 19. Bodnar M, Sarrieau A, Deschepper CF, Walker CD (1997) Adrenal vasoactive intestinal peptide participates in neonatal corticosteroid production in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1163–R1172.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.3.R1163>
 20. Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez J, Holst JJ, Waterman MR, Scherbaum WA (1995) Sympathoadrenal regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Res* 21: 13–24.
<https://doi.org/10.3109/07435809509030417>
 21. Schinner S, Bornstein SR (2005) Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol* 16: 91–98.
<https://doi.org/10.1385/ep:16:2:091>
 22. Seidler FJ, Slotkin TA (1985) Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* 358: 1–16.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015536>
 23. Engeland WC (1998) Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res* 30: 311–314.
<https://doi.org/10.1055/s-2007-978890>
 24. Nurse CA, Buttigieg J, Thompson R, Zhang M, Cutz E (2006) Oxygen sensing in neuroepithelial and adrenal chromaffin cells. *Novartis Found Symp* 272: 106–114.
 25. Tin W (2004) Optimal oxygen saturation for preterm babies. Do we really know? *Biol Neonate* 85: 319–325.
<https://doi.org/10.1159/000078173>
 26. Vetrovoy O., Stratilov V., Lomert E., Tyulkova E (2023) Prenatal Hypoxia-Induced Adverse Reaction to Mild Stress is Associated with Depressive-Like Changes in the Glucocorticoid System of Rats. *Neurochem Res* 48: 1455–1467.
<https://doi.org/10.1007/s11064-022-03837-0>
 27. Kandel E (2001) Depression, mania and anxiety disorders. In *Principles of Neural Science*, 4th edn. Eds E. Kandel, J. Schwartz & T. Jessell, pp. 1209–1225. McGraw-Hill, New York.
 28. Mitroshina EV, Marasanova EA, Vedunova MV (2023) Functional Dimerization of Serotonin Receptors: Role in Health and Depressive Disorders. *Int J Mol Sci* 24(22): 16416.
<https://doi.org/10.3390/ijms2422>

NEONATAL HYPOXIA INDUCES BEHAVIORAL DEFICIT ASSOCIATED WITH IMPAIRMENT IN THE GLUCOCORTICOID AND SEROTONERGIC SYSTEMS IN ADULT RATS

E. I. Tyulkova[#], V. A. Stratilov and O. V. Vetrovoy

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

[#]*e-mail: etyulkova@yandex.ru*

We investigated the behavioral responses, raphe serotonin levels, and serum concentrations of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone, and serotonin in adult rats subjected to three sessions of hypobaric hypoxia (360 mmHg, 2 hours each) within 8–10 days post-partum. This non-invasive rat model of neonatal hypoxia (NH) simulates mild perinatal hypoxic trauma in fetuses and premature infants. At 3 months of age, NH-exposed rats exhibited reduced exploratory behavior and increased anxiety in both the open field and plus maze tests. These behavioral changes were accompanied by decreased serotonin levels in the raphe nuclei. In the blood serum of adult NH-exposed rats, corticosterone and serotonin levels remained unaltered, while ACTH levels showed a significant decrease. Our findings suggest that early postnatal hypoxic stress disrupts the serotonin system and alters HPA axis function, leading to long-lasting behavioral changes.

Keywords: Rats, neonatal hypoxia, glucocorticoid system, serotonin system, behavior