
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ЗАДЕРЖКА ВНУТРИУТРОБНОГО РАЗВИТИЯ НЕ ПРИВОДИТ
К ВЫРАЖЕННЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНЫХ
ОТВЕТОВ АРТЕРИЙ КРЫС В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ**

© 2024 г. А. А. Швецова¹, Е. К. Селиванова^{1,2}, Л. Д. Шилова¹, О. С. Тарасова^{1,3},
Д. К. Гайнуллина^{1,*}

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

²Научно-исследовательский институт «ХимРар», Химки, Московская область, Россия

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических
проблем РАН, Москва, Россия

*E-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2024 г.

После доработки 22.07.2024 г.

Принята к публикации 23.07.2024 г.

Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) является одной из наиболее частых патологий беременности. В результате данной патологии нарушается функционирование многих систем, в том числе сердечно-сосудистой. У взрослых животных, перенесших ЗВУР, увеличивается вклад проконстрикторных механизмов регуляции сосудистого тонуса (например, сигнального пути Rho-киназы), а вклад антиконстрикторных механизмов (например, эндотелиального NO), напротив, уменьшается, что может приводить к спазмированию сосудов и нарушению кровоснабжения органов. Поскольку NO и Rho-киназа обладают ярко выраженной вазомоторной ролью в раннем постнатальном онтогенезе, целью данной работы стала оценка влияния ЗВУР на вклад этих механизмов в регуляцию сократительных ответов артерий системного кровообращения в раннем постнатальном онтогенезе. ЗВУР моделировали путем ограничения количества потребляемого самками корма (на 50%) с 11-го дня беременности до родов. У потомства в возрасте 11–12 дней исследовали реакции изолированной подкожной артерии в изометрическом режиме, а также оценивали содержание в этой артерии интересующих мРНК и белков. ЗВУР не привела к изменению реактивности артерий потомства на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин. Увеличение сократительных ответов на метоксамин в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NNA, а также уровни экспрессии eNOS (мРНК и белка) и аргиназы-2 (мРНК) не были изменены в артериях крыс с ЗВУР, тогда как чувствительность артерий к экзогенному донору NO DEA/NO у них была выше, чем у контрольных крыс. Несмотря на сравнительно низкое содержание белков RhoA и Rho-киназы II в ткани артерий крыс группы ЗВУР, уменьшение сократительных ответов под действием ингибитора Rho-киназы Y27632 было одинаково выраженным в артериях крыс двух экспериментальных групп. Таким образом, ЗВУР, обусловленная ограничением питания матери во время беременности, не приводит к ярко выраженным изменениям в регуляции тонуса системных сосудов в раннем постнатальном периоде.

Ключевые слова: задержка внутриутробного развития, артерии, гладкая мышца, эндотелий, оксид азота, Rho-киназа, ранний постнатальный онтогенез

ВВЕДЕНИЕ

Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) является одной из наиболее часто встречаемых патологий беременности. Согласно данным медицинской статистики, ЗВУР сопровождает 5–15% всех беременностей в Европе и США и еще чаще встречается в странах с низким уровнем жизни (порядка 30–55% в Центральной Азии, 15–25% в Африке и 10–20% в Латинской Америке) [1]. В отсутствие генетических аномалий самого плода причинами этой патологии могут быть недостаточное питание матери, преэклампсия, ранняя беременность в подростковом возрасте, наличие у матери хронических заболеваний, бактериальные и вирусные инфекции во время беременности, употребление алкоголя или курение [1]. Для исследования ЗВУР в экспериментах на животных были разработаны и применяются различные модели, среди них – модель ограничения потребления пищи, которая часто используется у крыс для имитации недостаточного питания матери [2, 3].

ЗВУР сопряжена с недостаточным снабжением плода кислородом и питательными веществами и, как следствие, – с нарушением роста и дифференцировки тканей и органов, в том числе сердечно-сосудистой системы. В частности, показана связь ЗВУР с развитием гипертензии у детей в возрасте до двух лет [4–6]. К последствиям ЗВУР у взрослых половозрелых потомков относят дисфункцию эндотелия за счет уменьшения биодоступности NO [7–10] или вклада простаглицлина [11] в реакциях эндотелий-зависимого расслабления артерий [7–10]. Также показано, что в коронарных артериях крыс со ЗВУР во взрослом возрасте наблюдается уменьшение тонического антиконстрикторного влияния продуцируемого эндотелием оксида азота NO, что связано с повышенной проконстрикторной активностью Rho-киназы в эндотелиальных клетках [12].

Необходимо отметить, что в периоде раннего постнатального онтогенеза сердечно-сосудистая система претерпевает существенные количественные и качественные изменения. После рождения происходит интенсивный рост и развитие органов и, следовательно, их сосудистого русла: увеличивается количество сосудов, их длина и толщина стенки. На функциональном уровне для еще «незрелой» и нормально развивающейся сосудистой системы характерны специфические изменения механизмов регуляции тонуса артерий, такие как: (1) высокий уровень тонической продукции NO эндотелием сосудов, который ослабляет сократительные ответы артерий, т. е. оказывает антиконстрикторное влияние [13–15]; (2) высокая проконстрикторная активность Rho-киназы, что служит причиной высокой чувствительности сократительного аппарата гладкомышечных клеток к уровню внутриклеточного Ca^{2+} [16, 17].

Целью работы была проверка гипотезы о том, что ограничение питания матери во время беременности будет приводить к изменению механизмов регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде, затрагивая выраженность антиконстрикторного влияния NO и проконстрикторного влияния Rho-киназы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и модель задержки внутриутробного развития

В работе использовали крыс Wistar, полученных из питомника Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии. Животных содержали в стандартных условиях вивария биологического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова со световым циклом 12 ч день – 12 ч ночь (включение освещения в 09:00, выключение в 21:00). Задержку внутриутробного развития моделировали путем ограничения количества потребляемого корма самками во время беременности (с 11-го дня беременности и до родов), как описано ранее [12].

Для получения потомства половозрелых самцов и самок крыс ссаживали на одну ночь. Самок для ссаживания подбирали накануне путем оценки фазы эстрального

цикла по влагалищным мазкам. На следующий день после ссаживания (между 8 и 9 ч утра) у самок снова брали влагалищные мазки, наступление беременности констатировали по наличию в мазках сперматозоидов, этот день принимали за первый день беременности. Далее самок случайным образом распределяли на группы «Контроль» и «Задержка внутриутробного развития» (ЗВУР) и помещали в индивидуальные клетки. С первого до десятого дня беременности самки обеих групп имели неограниченный доступ к корму. С одиннадцатого дня беременности потребление корма самками группы «ЗВУР» снижали на 50% от среднего значения потребления корма контрольными беременными самками в соответствующие дни беременности. Сразу после родов доступ к корму самок группы «ЗВУР» снова делали неограниченным. Потребление воды было неограниченным как на протяжении всей беременности, так и в период вскармливания потомства. На второй день после родов потомство самок обеих групп ограничивали до 8 крысят в помете, оставляя преимущественно самцов. Эксперименты на изолированных сосудах проводили на потомстве мужского пола в возрасте 11–12 дней. Крысят декапитировали ножницами. Всего в работе было использовано потомство из 11 пометов (из них 5 пометов от контрольных самок и 6 пометов от самок группы «ЗВУР»). У крысят, которых брали в эксперимент на 11-й день жизни, измеряли уровень глюкозы в крови после декапитации с использованием глюкометра (Диаконт, Россия).

Регистрация сократительных ответов изолированных артерий в изометрическом режиме

Объектом исследования служила подкожная артерия (*a. saphena*). Подкожная артерия относится к сосудам мышечного типа и участвует в регуляции кожного кровотока, который составляет до 20% сердечного выброса у новорожденных крыс [18]. Выделение артерий проводили в холодном растворе для препаровки следующего состава (в мМ): NaCl 145; KCl 4.5; CaCl₂ 0.1; MgSO₄ 1; NaH₂PO₄ 1.2; ЭДТА 0.025; HEPES 5 (pH 7.4). Артерию очищали от окружающих тканей, вырезали из нее кольцевые сегменты длиной 2 мм и закрепляли их в многоканальном миографе (модели 410A, 420M или 620M, DMT, Дания) для регистрации сократительной активности в изометрическом режиме. После нагрева камер с раствором до 37 °C (в течение 20–30 мин) определяли растяжение препарата, оптимальное для проявления его сократительной активности [19]. В ходе этой процедуры также вычисляли нормализованный внутренний диаметр сосуда, соответствующий давлению 100 мм рт. ст. (d_{100}). После этого раствор в камере миографа сменяли на рабочий (в мМ): NaCl 120; NaHCO₃ 26; KCl 4.5; CaCl₂ 1.6; MgSO₄ 1.0; NaH₂PO₄ 1.2; D-глюкоза 5.5; EDTA 0.025; HEPES 5. Раствор непрерывно аэрировали карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂) для оксигенации и поддержания pH 7.4.

В начале каждого эксперимента проводили процедуру активации препарата, которая заключалась в добавлении (1) норэпинефрина (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин); (2) метоксамина (агонист $\alpha 1$ -адренорецепторов, 10 мкМ, длительность воздействия 5 мин), на фоне которого апплицировали ацетилхолин (10 мкМ) для оценки функциональной активности эндотелия (расслабление на ацетилхолин свидетельствовало о сохранности эндотелиального слоя); (3) метоксамина (10 мкМ, длительность воздействия 5 мин). После каждого из воздействий проводили отмывку, ее длительность составляла 15 мин, во время отмывки растворов в камере миографа сменяли не менее 5 раз.

Протокол эксперимента заключался в проведении двух последовательных зависимостей «концентрация – эффект» на метоксамин (в диапазоне концентраций от 10 нМ до 100 мкМ, длительность действия метоксамина в каждой концентрации – 3 мин). Первую зависимость проводили спустя 20 мин после окончания процедуры активации препарата, она позволяла убедиться, что исходно разные сегменты одной артерии обладают одинаковой чувствительностью к метоксамину. После отмывки от метоксамина в камеры миографа добавляли либо ингибитор NO-синтаз L-NNA (100 мкМ), либо ингибитор Rho-киназы Y27632 (3 мкМ), либо оба ингибитора совместно, в контрольные

сегменты артерий добавляли эквивалентный объем растворителя, через 20 мин проводили вторую зависимость «концентрация – эффект» на метоксамин, аналогично первой. В ряде экспериментов после второй зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин проводили отмывку препарата в канале с растворителем, добавляли L-NNA (100 мкМ) и через 20 мин проводили зависимость «концентрация – эффект» на донор оксида азота DEA/NO (диапазон концентраций 1 нМ – 3 мкМ) на фоне предсокращения артерий метоксамином (10 мкМ).

При обработке результатов из значения силы при каждой концентрации вазоактивного вещества вычитали значение пассивной силы, соответствующее расслабленному состоянию гладкой мышцы препарата (в растворе для препаровки после окончания процедуры определения оптимального растяжения препарата). Полученные значения активной силы выражали в % от максимальной силы сокращения препарата, определенной по первой зависимости «концентрация – эффект» (для метоксамин), или в % от уровня предсокращения препарата (для DEA/NO).

В работе использовали норэпинефрин, метоксамин, ацетилхолин, DEA/NO фирмы Sigma-Aldrich, Y27632 фирмы Tocris и L-NNA фирмы Alexis Biochemicals.

Оценка экспрессии мРНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Подкожные артерии быстро очищали от окружающих тканей и помещали в буфер RNeasy lysis (Qiagen, Германия), в котором их хранили при -20°C до выделения мРНК. Каждый образец включал две артерии от одного крысенка. Экстракцию РНК из образцов проводили с помощью набора «Clean RNA Standard» (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию нуклеотидов в полученных образцах определяли с помощью спектрофотометра (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США). Полученные образцы РНК были обработаны ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реактивов «MMLV RT kit» (Евроген, Россия) и праймеров со случайными последовательностями согласно прилагаемой инструкции. Синтезированную кДНК хранили при -20°C до проведения количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Количественную ПЦР проводили в амплификаторе RotorGene 6000 с использованием набора с реакционной смесью для ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) по прилагаемой инструкции. Экспрессию мРНК в образцах рассчитывали по формуле $1/E^{C_t}$, где E – эффективность праймеров, а C_t – номер цикла, на котором «экспоненциальный участок» кривой накопления продукта пересекает пороговый уровень флуоресценции. Полученные значения нормировали на среднее геометрическое экспрессии трех референсных генов (*Gapdh*, *Rplp0*, *Rn18s*) в том же образце и представляли в процентах от среднего значения в группе «Контроль». Праймеры для проведения ПЦР были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия), их последовательности приведены в табл. 1.

Оценка содержания белка в ткани артерий методом Вестерн-блоттинга

Образцы артерий замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80°C до проведения дальнейшего анализа. Каждый образец включал в себя две артерии от одного крысенка. Гомогенизировали образцы в буфере следующего состава: 0.0625 M Tris-HCl (pH 6.8), 2.5% SDS, 10% глицерина, 2.47% дитиотреитола с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (апротинин 50 мг/мл, лейпептин 100 мг/мл, пепстатин 30 мг/мл, NaF 2 мг/мл, Na_3VO_4 180 мг/мл), центрифугировали при 16 000 g в течение 5 мин при 4°C ; супернатант отбирали, добавляли к нему бромфеноловый синий (0.002%) и хранили при температуре -20°C . Белки разделяли с использованием метода электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (по Леммли)

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательности праймеров (5' – 3')
<i>Nos3</i>	Прямой: GGA TTC TGG CAA GAC CGA TTA C Обратный: GGT GAG GAC TTG TCC AAA CAC T
<i>Arg2</i>	Прямой: CCA GCC TAG CAG TGG ATG TGA Обратный: CTC TGG AAT GCT GTC GTG AA
<i>Gapdh</i>	Прямой: CAC CAG CAT CAC CCC ATT T Обратный: CCA TCA AGG ACC CCT TCA TT
<i>Rplp0</i>	Прямой: AGG GTC CTG GCT TTG TCT GTG G Обратный: AGC TGC AGG AGC AGC AGT GG
<i>Rn18s</i>	Прямой: CAC GGG TGA CGG GGA ATC AG Обратный: CGG GTC GGG AGT GGG TAA TTT G

и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Santa Cruz) с использованием системы переноса Trans-Blot Turbo (BioRad). Перенос визуализировали с помощью окрашивания мембраны Ponceau S. Ориентируясь на визуализированные полосы белков и молекулярную массу цветных маркеров (28 и 75 кДа (Abcam)), мембрану разрезали на три части, в которых содержались интересующие белки. Все части блокировали 5%-ным обезжиренным молоком (Applichem, Германия) в буфере TBS (20 mM Трис-НCl, pH 7.6; 150 mM NaCl) с 0.1% Twin 20 (TBSt). Затем в течение ночи нижнюю часть мембраны инкубировали с антителами против RhoA (Abcam, rabbit, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока), среднюю часть с антителами против GAPDH (Abcam, mouse, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока), а верхнюю часть с антителами против Rho-киназы II (Abcam, rabbit, 1 : 5000 в TBSt с 5% молока) или eNOS (BD Transduction Lab, mouse, 1 : 2000 в TBSt с 5% молока). На следующий день мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами: anti-mouse (Cell Signaling, 1 : 5000 в 5%-ном молоке в TBSt) или anti-rabbit (Cell Signaling, 1 : 10 000 в 5%-ном молоке в TBSt) в течение 1 ч. Для прояски сигнала использовали раствор Femto ECL (Thermo Scientific), разведенный в 10 раз в TBSt. Хемилюминесцентный сигнал регистрировали в приборе ChemiDoc фирмы Bio Rad (США). Регистрацию сигнала и первичную обработку результатов проводили в программе ImageLab Software (Bio-Rad, США). В каждом образце идентифицировали соотношение интересующего белка к GAPDH, затем среднее соотношение в контрольной группе принимали за 100%.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc.). Соответствие распределения данных нормальному оценивали с использованием теста Шапиро – Уилка. При сравнении двух групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений, *t*-тест Стьюдента или непараметрический тест Манна – Уитни. Различия считали статистическими значимыми при $p < 0.05$. Данные представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего или как медиана и межквартильный размах, *n* – количество животных в группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка эффектов модели задержки внутриутробного развития на общие характеристики потомства

Масса тела потомства самок крыс группы «ЗВУР» была снижена относительно группы «Контроль» на 11-й день жизни (табл. 2). Уровень глюкозы в крови не различался между двумя группами крысят в возрасте 11-ти дней (табл. 2).

Таблица 2. Характеристики потомства самок группы «Контроль» и «ЗВУР» на 11-й день жизни

Параметр	Контроль ($n = 16$)	ЗВУР ($n = 16$)
Масса тела, г	24.0 ± 0.4	22.0 ± 0.5 *
Уровень глюкозы в крови, ммоль/л	6.0 ± 0.1	6.2 ± 0.4

* $p < 0.05$ (непарный t -тест Стьюдента).

Оценка эффектов задержки внутриутробного развития на механизмы регуляции сократительных ответов артерий потомства

Нормализованный внутренний диаметр подкожной артерии не различался между двумя группами животных и составил 251 ± 8 мкм в группе «Контроль» ($n = 9$) и 235 ± 8 мкм в группе «ЗВУР» ($n = 9$, $p > 0.05$). Реактивность подкожной артерии 11–12-дневных крысят на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин групп «Контроль» и «ЗВУР» также не различалась (рис. 1). Также не наблюдалось различий в максимальной силе сокращения, развиваемой препаратами: она составила 8.4 ± 0.6 мН в группе «Контроль» ($n = 9$) и 8.2 ± 0.7 мН в группе «ЗВУР» ($n = 9$, $p > 0.05$).

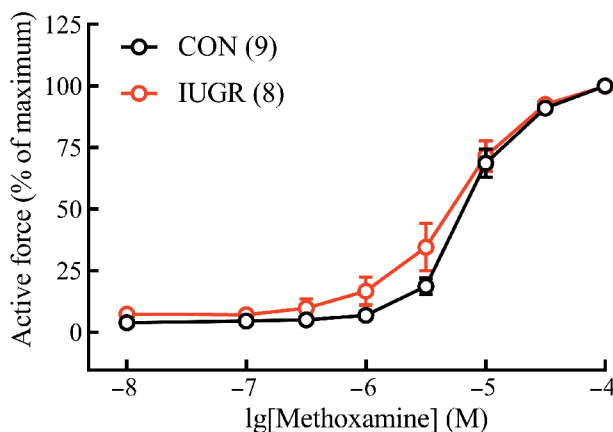


Рис. 1. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению реактивности подкожной артерии 11–12-дневного потомства на агонист α_1 -адренорецепторов метоксамин. Приведены первые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин артерий крысят в возрасте 11–12 дней в группах «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Цифры в скобках обозначают количество животных.

Следующим шагом стало сравнение антиконстрикторного влияния эндотелиального NO в артериях крысят двух экспериментальных групп. Инкубация артерий с ингибитором NO-синтаз L-NNA привела к увеличению сократительных ответов артерий крысят как группы «Контроль», так и группы «ЗВУР» (рис. 2а). Вместе с тем сократительные ответы артерий крысят группы «Контроль» и «ЗВУР» в присутствии L-NNA не различались (рис. 2а), что говорит о сопоставимом антиконстрикторном влиянии эндотелиального NO в подкожной артерии крысят двух групп. При этом расслабление артерий на донор NO DEA-NO (в присутствии L-NNA) было несколько более выраженным в группе «ЗВУР» по сравнению с группой «Контроль» (рис. 2б), что свидетельствует в пользу большей чувствительности гладкомышечных клеток артерий к NO у крысят группы «ЗВУР».

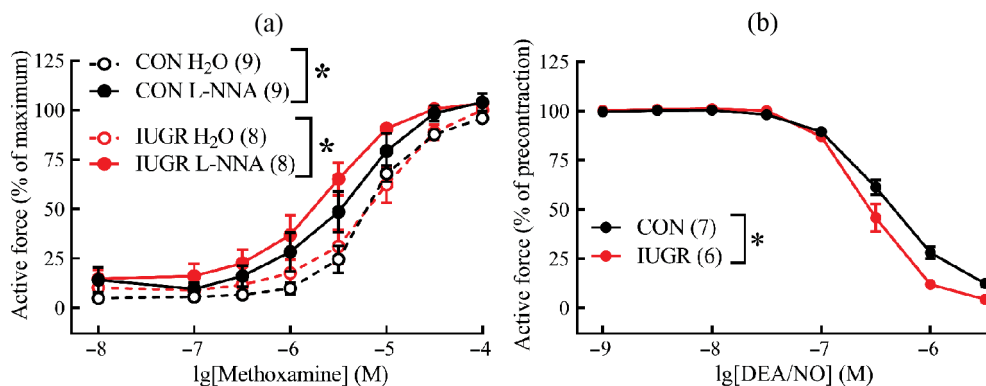


Рис. 2. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению антиконстрикторного вклада NO в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12-днев. (а) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NNA (100 мкМ) или эквивалентного объема растворителя (H₂O, 50 мкл). (б) – Зависимости «концентрация – эффект» на донор NO DEA/NO подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR) в присутствии ингибитора NO-синтаз L-NNA (100 мкМ). Цифры в скобках обозначают количество животных. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

Далее проводили оценку влияния ЗВУР на активность сигнального пути Rho-киназы в артериях 11–12-дневных крысят. Ингибитор Rho-киназы Y27632 существенно ослабил сократительные ответы подкожной артерии крысят как группы «Контроль», так и группы «ЗВУР» (рис. 3а). При этом не было выявлено межгрупповых различий в реактивности артерий на метоксамин в присутствии Y27632 (рис. 3а). Известно, что Rho-киназа может способствовать сокращению, оказывая влияние как в эндотелии, так и в гладкой мышце артерий [20]. В эндотелии Rho-киназа фосфорилирует eNOS, тем самым подавляя ее активность. В гладкомышечных клетках основной мишенью Rho-киназы является фосфатаза легких цепей миозина, активность которой также снижается в результате фосфорилирования Rho-киназой. Чтобы оценить вклад Rho-киназы в регуляцию сократительных ответов артерий крысят двух групп на уровне гладкомышечных клеток, была проведена серия экспериментов с ингибитором Rho-киназы Y27632 на фоне ингибитора NO-синтаз L-NNA. Как видно из рис. 3б, в присутствии L-NNA сократительные ответы артерий крысят обеих групп также ослаблялись после инкубации с Y27632, при этом различий в эффекте Y27632 между группами обнаружено не было.

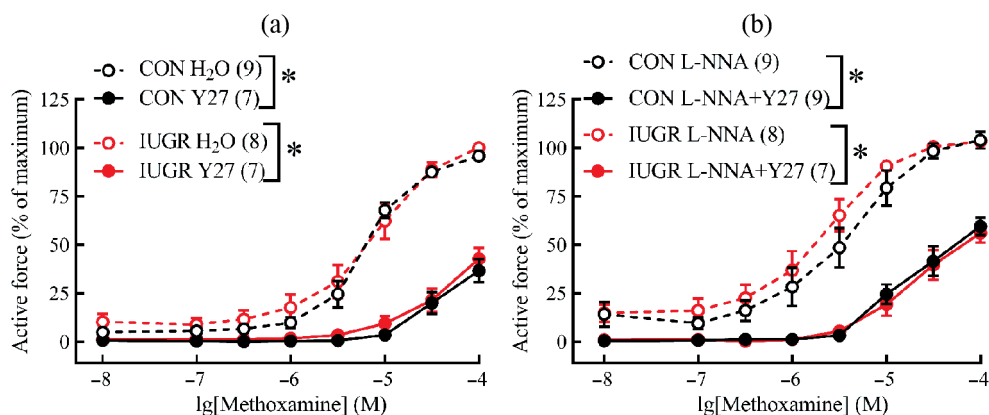


Рис. 3. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не приводит к изменению проконстрикторного вклада Rho-киназы в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12-дней. (а) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора Rho-киназы Y27632 (3 мкМ) или эквивалентного объема растворителя (H₂O). (б) – Вторые зависимости «концентрация – эффект» на метоксамин подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR), полученные в присутствии ингибитора NO-синтазы L-NNA (100 мкМ) или L-NNA совместно с Y27632. Цифры в скобках обозначают количество животных. * $p < 0.05$ (двухфакторный дисперсионный анализ для повторных измерений).

Оценка эффектов задержки внутриутробного развития на содержание мРНК и белка ключевых участников регуляции тонуса сосудов в периоде раннего постнатального онтогенеза

Функциональные измерения были дополнены молекулярно-биологическими экспериментами, в которых мы оценивали на уровне мРНК и белка экспрессию ключевых участников регуляции тонуса артерий.

Содержание как мРНК (рис. 4а), так и белка eNOS (рис. 5а) в ткани подкожной артерии крысят не различалось между группами «Контроль» и «ЗВУР». Экспрессия мРНК аргиназы-2, которая конкурирует с NO-синтазами за субстрат L-аргинин, также не различалась у двух групп (рис. 4б).

Вместе с тем содержание белка RhoA (малый гуанозинтрифосфат-связывающий белок, активирующий Rho-киназу), а также самой Rho-киназы было существенно снижено в ткани артерий крысят группы «ЗВУР» по сравнению с группой «Контроль» (рис. 5б, с).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами была применена модель ЗВУР, в которой беременным самкам, начиная с 11 дня беременности, на 50% уменьшали потребление корма. Аналогичная модель была ранее применена в ряде исследований [12, 21–23]. Потомство таких самок характеризовалось сниженной массой тела. Отметим, что ранее при использовании аналогичной модели ЗВУР нами было продемонстрировано уменьшение линейных размеров 11-дневных крысят [12]. Необходимо отметить, что, по-видимому, потомство в возрасте 11–12 дней с признаками ЗВУР не имело выраженных метаболических нарушений, поскольку уровень глюкозы в крови был таким же, как у контрольных животных такого же возраста. Вместе с тем у детей со ЗВУР в возрасте от 5

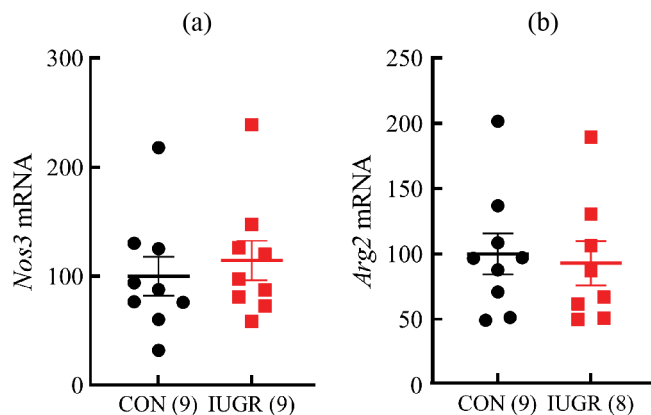


Рис. 4. Задержка внутриутробного развития (ЗВУР) не влияет на экспрессию мРНК *Nos3* (eNOS) и *Arg2* (аргиназа-2) в подкожной артерии потомства в возрасте 11–12 дней. Относительный уровень экспрессии мРНК *Nos3* (a) и *Arg2* (b) в подкожной артерии крысят групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Значения экспрессии нормированы на геометрическое среднее экспрессии трех референсных генов (*Gapdh*, *Rplp0*, *Rn18s*) и выражены в процентах от среднего значения в группе «Контроль». Цифры в скобках обозначают количество животных. Данные представлены в виде среднего и стандартной ошибки среднего.

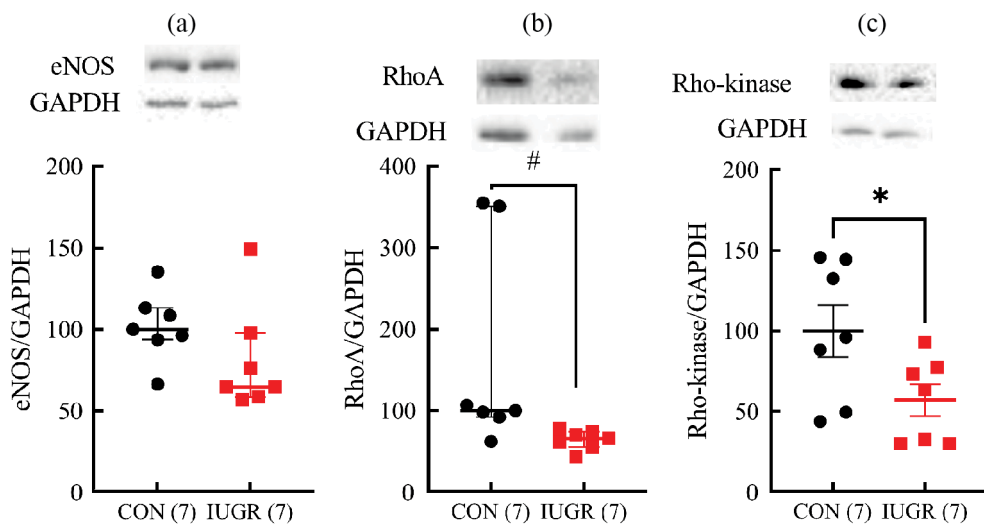


Рис. 5. Относительное содержание белка eNOS (a), RhoA (b) и Rho-киназы II (c) в подкожной артерии крысят в возрасте 11–12 дней групп «Контроль» (CON) и «ЗВУР» (IUGR). Значения нормированы на содержание референсного белка GAPDH и выражены в процентах от медианы (a, b) или от среднего (c) в группе «Контроль». Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (a, b) или среднего и стандартной ошибки среднего (c). Цифры в скобках обозначают количество животных. # $p < 0.05$ (непараметрический тест Манна – Уитни), * $p < 0.05$ (непарный *t*-тест Стьюдента).

до 11 лет в анамнезе было показано увеличение уровня глюкозы натощак, так же как и изменение липидного профиля, определяемого в крови [24]. Причины расхождений в результатах исследований неясны, вероятно, они могут быть следствием видовых и/или возрастных различий или же влияния других факторов, которые только предстоит определить. Вероятно, эти же факторы могут лежать в основе расхождений данных о влиянии ЗВУР на интегральные показатели сердечно-сосудистой системы, а именно на уровень артериального давления. Так, для детей в возрасте до 2 лет было показано повышение артериального давления вследствие ЗВУР [4], тогда как для новорожденных и 4-недельных овец со ЗВУР не было обнаружено различий в уровне артериального давления по сравнению с равновозрастным контролем [11].

Важным преимуществом использования животных моделей с экспериментальной патологией по сравнению с исследованиями с участием человека является возможность исследовать тонкие механизмы регуляции отдельных органов, включая кровеносные сосуды. В данном исследовании не было выявлено изменений в сократительных ответах артерий на агонист α_1 -адренорецепторов у 11–12-дневных крысят со ЗВУР по сравнению с равновозрастными контрольными животными. Также не наблюдалось различий во влиянии ингибитора NO-синтазы L-NNA на сократительные ответы артерий крысят контрольной и опытной групп, что указывает на сопоставимое антиконстрикторное влияние NO в двух группах животных в раннем постнатальном периоде и согласуется с отсутствием различий в содержании eNOS (как на уровне мРНК, так и на уровне белка), а также содержания мРНК аргиназы-2 – фермента, конкурирующего с eNOS за субстрат L-аргинин. Однако примечательно, что сравнение влияния донора NO DEA/NO на сосудистый тонус выявило увеличенную реактивность артерий крысят со ЗВУР на экзогенный NO (в присутствии L-NNA, то есть в условиях блокады продукции эндогенного NO), что указывает на повышение реактивности гладкомышечных клеток на NO. Сопоставление функциональных данных об отсутствии изменений во влиянии L-NNA у крысят со ЗВУР (по сравнению с равновозрастными контрольными животными) с увеличенной чувствительностью артерий к экзогенному NO предполагает снижение продукции NO эндотелием сосудов крысят со ЗВУР, которое компенсируется ростом чувствительности к NO на уровне гладкомышечных клеток. Важно, что такие «адаптационные» изменения в чувствительности гладкой мышцы к NO вследствие изменений в его продукции эндотелием у крысят со ЗВУР согласуются с данными литературы об обратной зависимости между синтезом NO эндотелием и чувствительностью гладких мышц к экзогенному NO [25, 26].

Отметим, что проведенные ранее исследования влияния ЗВУР на новорожденных овец не выявили изменений в выраженности эндотелий-зависимого расслабления бедренной артерии на ацетилхолин, а также в чувствительности этой артерии к экзогенному NO [11]. Примечательно, что в возрасте 4-х недель у овец со ЗВУР эндотелий-зависимое расслабление бедренной артерии на ацетилхолин значительно уменьшалось за счет уменьшения сосудорасширительного вклада простаноидов [11], что указывает на постепенное «ухудшение» эндотелий-зависимой регуляции тонуса сосудов у потомков со ЗВУР по мере взросления организма. В соответствии с этим в целом ряде работ для взрослого потомства со ЗВУР показано ослабление эндотелий-зависимой регуляции сосудистого тонуса [7–10, 12, 27].

Еще один механизм регуляции сосудистого тонуса, особенно важный в раннем постнатальном периоде, связан с проконстрикторным влиянием Rho-киназы [17, 28]. Ранее мы показали, что в коронарных артериях взрослых крыс со ЗВУР наблюдается увеличение проконстрикторного влияния Rho-киназы в эндотелии [12]. В данной работе мы впервые исследовали вовлечение этого механизма в регуляцию сосудистого тонуса у животных со ЗВУР в раннем постнатальном периоде. Известно, что Rho-киназа может оказывать свое проконстрикторное влияние как на уровне гладкой мышцы, так и на уровне эндотелия, где она может ингибировать активность eNOS [20]. В связи с этим нами были проведены эксперименты как на фоне L-NNA, так и без него. Однако ни

в тех, ни в других условиях не было выявлено различий во влиянии ингибитора Rho-киназы у контрольных крысят и крысят со ЗВУР. Примечательно, что содержание белка самой Rho-киназы и ее активатора RhoA было снижено в артериях крысят со ЗВУР, в то время как функциональный вклад Rho-киназы в регуляцию сократительных ответов не был изменен. На данный момент нет четкого ответа на вопрос о причине в расхождении результатов биохимических и функциональных экспериментов. Мы можем предполагать, что, несмотря на уменьшение содержания белка Rho-киназы в артериях крысят со ЗВУР, может происходить усиление ее активности, которая регулируется в том числе факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) [29]. Есть ли влияние ЗВУР на активность GEF и, если есть, то какое оно, остается неясным на настоящий момент и может служить предметом будущих исследований. Вместе с тем результаты данного исследования свидетельствуют о неизменном функциональном вкладе Rho-киназы в регуляцию сосудистого тонуса у животных со ЗВУР в раннем постнатальном периоде.

Таким образом, у крыс со ЗВУР не было обнаружено ярко выраженных изменений в регуляции сосудистого тонуса в раннем постнатальном периоде (в возрасте 1–2-х недель). Однако наши данные указывают на некоторые изменения в тонких механизмах регуляции тонуса артерий, а именно на возможное снижение продукции NO эндотелием сосудов, которое «компенсируется» на функциональном уровне ростом чувствительности гладкой мышцы к NO. Отметим, что, согласно данным литературы, выраженность последствий ЗВУР для сосудистой системы может градуально нарастать по мере развития организма в раннем постнатальном периоде [11], переходя в достаточно ярко выраженные нарушения регуляции тонуса артерий у взрослого потомства [7–10, 12, 27].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д. К. Г., О. С. Т.), сбор данных (А. А. Ш., Е. К. С., Л. Д. Ш., Д. К. Г.), обработка данных (А. А. Ш., Е. К. С., Л. Д. Ш., Д. К. Г.), написание и редактирование манускрипта (Д. К. Г., А. А. Ш., О. С. Т.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Государственного задания Правительства Российской Федерации Московскому государственному университету имени М. В. Ломоносова № 121032300071-8.

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 94-ж, 27.06.2019 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yzidorczyk C, Armengaud JB, Peyter AC, Chehade H, Cachat F, Juvet C, Siddeek B, Simoncini S, Sabatier F, Dignat-George F, Mitancher D, Simeoni U* (2017) Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *J Dev Orig Health Dis* 8: 448–464.
<https://doi.org/10.1017/S2040174417000265>

2. Freije WA, Thamotharan S, Lee R, Shin B, Devaskar SU (2015) The Hepatic Transcriptome of Young Suckling and Aging Intrauterine Growth Restricted Male Rats. *J Cell Biochem* 116: 566–579.
<https://doi.org/10.1002/jcb.25008>
3. Gibson LC, Shin B, Dai Y, Freije W, Kositamongkol S, Cho J, Devaskar SU (2015) Early leptin intervention reverses perturbed energy balance regulating hypothalamic neuropeptides in the pre- and postnatal calorie-restricted female rat offspring. *J Neurosci Res* 93: 902–912.
<https://doi.org/10.1002/jnr.23560>
4. Zanardo V, Visentin S, Trevisanuto D, Bertin M, Cavallin F, Cosmi E (2013) Fetal aortic wall thickness: a marker of hypertension in IUGR children? *Hypertens Res* 36: 440–443.
<https://doi.org/10.1038/hr.2012.219>
5. Visentin S, Grumolato F, Battista G, Di B, Grisan E, Cosmi E (2014) Early origins of adult disease : Low birth weight and vascular remodeling. *Atherosclerosis* 237: 391–399.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.027>
6. Victora CG, Adair L, Fall C, Hallal PC, Martorell R, Richter L, Sachdev HS (2008) Maternal and Child Undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet* 371: 340–357.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61692-4)
7. Torrens C, Brawley L, Anthony FW, Dance CS, Dunn R, Jackson AA, Poston L, Hanson MA (2006) Folate Supplementation During Pregnancy Improves Offspring Cardiovascular Dysfunction Induced by Protein Restriction. *Hypertension* 47: 982–987.
<https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000215580.43711.d1>
8. Franco M do C, Fortes ZB, Akamine EH, Kawamoto EM, Scavone C, De Britto LRG, Muscara MN, Teixeira SA, Tostes RCA, Carvalho MHC, Nigro D (2004) Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in microvessels of intrauterine undernourished rats. *J Physiol* 558: 239–248.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.064055>
9. Oliveira V, de Souza LV, Fernandes T, Junior SDS, de Carvalho MHC, Akamine EH, Michelini LC, de Oliveira EM, Franco M do C (2017) Intrauterine growth restriction-induced deleterious adaptations in endothelial progenitor cells: possible mechanism to impair endothelial function. *J Dev Orig Health Dis* 8: 665–673.
<https://doi.org/10.1017/S2040174417000484>
10. Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L, Hanson MA (2003) Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol* 547: 77–84.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.026120>
11. Rock CR, White TA, Piscopo BR, Sutherland AE, Pham Y, Camm EJ, Sehgal A, Polglase GR, Miller SL, Allison BJ (2023) Cardiovascular decline in offspring during the perinatal period in an ovine model of fetal growth restriction. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 325: H1266–H1278.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00495.2023>
12. Selivanova EK, Shvetsova AA, Shilova LD, Tarasova OS, Gaynullina DK (2021) Intrauterine growth restriction weakens anticontractile influence of NO in coronary arteries of adult rats. *Sci Rep* 11: 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-93491-3>
13. Gaynullina DK, Schubert R, Tarasova OS (2019) Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis – A key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system. *Int J Mol Sci* 20: 1–12.
<https://doi.org/10.3390/ijms20061421>
14. Gaynullina D, Lubomirov LT, Sofronova SI, Kalenchuk VU, Gloe T, Pfitzer G, Tarasova OS, Schubert R (2013) Functional remodelling of arterial endothelium during early postnatal development in rats. *Cardiovasc Res* 99: 612–621.
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvt138>
15. Sofronova SI, Borzykh AA, Gaynullina DK, Kuzmin IV, Shvetsova AA, Lukoshkova EV, Tarasova OS (2016) Endothelial nitric oxide weakens arterial contractile responses and reduces blood pressure during early postnatal development in rats. *Nitric Oxide – Biol Chem* 55–56: 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.005>
16. Puzdrova VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Mochalov SV, Aalkjaer C, Nilsson H, Vorotnikov AV, Schubert R, Tarasova OS (2014) Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca^{2+} sensitivity during early post-natal development in rats. *Acta Physiol* 212: 128–141.
<https://doi.org/10.1111/apha.12331>
17. Mochalov SV, Tarasova NV, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Kalenchuk VU, Borovik AS, Vorotnikov AV, Tarasova OS, Schubert R (2018) Higher Ca^{2+} -sensitivity of arterial contraction in 1-week-old rats is due to a greater Rho-kinase activity. *Acta Physiol* 223: 1–15.
<https://doi.org/10.1111/apha.13044>

18. Štulcová B (1977) Postnatal Development of Cardiac Output Distribution Measured by Radioactive Microspheres in Rats. *Neonatology* 32: 119–124.
<https://doi.org/10.1159/000241004>
19. Mulvany MJ, Halpern W (1977) Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res* 41: 19–26.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.41.1.19>
20. Тарасова ОС, Гайнуллина ДК (2017) Rho-киназа как ключевой участник регуляции тонуса сосудов в норме и при сосудистых расстройствах. *Артер гипертен* 23: 383–394. [Tarasova OS, Gainullina DK (2017) Rho-kinase as a key participant in the regulation of vascular tone in health and in vascular disorders. *Arter hyperten* 23: 383–394. (In Russ)].
<https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-5-383-394>
21. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Lagishetty V, Matveyenko AV, Lee WNP, Devaskar SU (2013) Glucose Intolerance and Lipid Metabolic Adaptations in Response to Intrauterine and Postnatal Calorie Restriction in Male Adult Rats. *Endocrinology* 154: 102–113.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1640>
22. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Thamotharan S, Shin B, Stout D, Devaskar SU (2012) Early Postnatal Caloric Restriction Protects Adult Male Intrauterine Growth – Restricted Offspring From Obesity. *Diabetes* 61: 1391–1398.
<https://doi.org/10.2337/db11-1347>
23. Thamotharan M, Shin B, Suddirikk DT, Thamotharan S, Garg M, Devaskar SU (2005) GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *Am J Physiol Metab* 288: E935–E947.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00342.2004>
24. Zamojska J, Niewiadomska-Jarosik K, Kierzkowska B, Gruca M, Wosiak A, Smolewska E (2023) Lipid Profile in Children Born Small for Gestational Age. *Nutrients* 15.
<https://doi.org/10.3390/nu15224781>
25. Brandes RP, Kim DY, Schmitz-Winnenthal FH, Amidi M, Gödecke A, Mülsch A, Busse R (2000) Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: Role of soluble guanylyl cyclase. *Hypertension* 35: 231–236.
<https://doi.org/10.1161/01.hyp.35.1.231>
26. Ohashi Y, Kawashima S, Hirata KI, Yamashita T, Ishida T, Inoue N, Sakoda T, Kurihara H, Yazaki Y, Yokoyama M (1998) Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 102: 2061–2071.
<https://doi.org/10.1172/JCI4394>
27. Krause BJ, Peñaloza E, Candia A, Cañas D, Hernández C, Arenas GA, Peralta-Scholz MJ, Valenzuela R, García-Herrera C, Herrera EA (2019) Adult vascular dysfunction in foetal growth-restricted guinea-pigs is associated with a neonate-adult switching in Nos3 DNA methylation. *Acta Physiol* 227: 1–13.
<https://doi.org/10.1111/apha.13328>
28. Akopov SE, Zhang L, Pearce WJ (1998) Regulation of Ca²⁺ sensitization by PKC and rho proteins in ovine cerebral arteries: Effects of artery size and age. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 275: 930–939.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.3.h930>
29. Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325–1358.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2003>

Intrauterine Growth Restriction does not Lead to Pronounced Changes in the Regulation of Arterial Contractile Responses in Rats in the Early Postnatal Period

**A. A. Shvetsova^a, E. K. Selivanova^{a, b}, L. D. Shilova^a, O. S. Tarasova^{a, c}
and D. K. Gaynullina^{a, *}**

^a*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*ChemRar Research and Development Institute, Khimki, Moscow Region, Russia*

^c*Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^{*}*e-mail: Dina.Gaynullina@gmail.com*

Intrauterine growth retardation (IUGR) is one of the most common pathologies of pregnancy. As a result of this pathology, the functioning of many systems, including the cardiovascular system, is disrupted. In adult animals who have suffered IUGR, the contribution of procontractile mechanisms regulating vascular tone (for example, the Rho-kinase signaling pathway) increases, and the contribution of anticontractile mechanisms (for example, endothelial NO), on the contrary, decreases, which can lead to vasospasm and impaired blood supply to organs. Since NO and Rho-kinase have a pronounced vasomotor role in early postnatal ontogenesis, the purpose of this work was to assess the influence of IUGR on the contribution of these mechanisms to the regulation of arterial contractile responses in early postnatal ontogenesis. IUGR was modeled by limiting the amount of food consumed by females (by 50%) from the 11th day of pregnancy until birth. In offspring aged 11 - 12 days, the reactions of the isolated saphenous artery were studied in isometric mode, and the content of mRNA and proteins of interest in this artery was also assessed. IUGR did not lead to a change in the reactivity of the arteries of the offspring to the $\alpha 1$ -adrenergic receptor agonist methoxamine. The increase in contractile responses to methoxamine in the presence of the NO-synthase inhibitor L-NNA, as well as the expression levels of eNOS (mRNA and protein) and arginase-2 (mRNA) were not changed in the arteries of IUGR rats, while the sensitivity of the arteries to the exogenous NO donor DEA /NO was higher in IUGR compared to control rat pups. Despite the relatively low content of RhoA and Rho-kinase II proteins in the arterial tissue of rat pups from the IUGR group, the decrease in contractile responses under the influence of the Rho-kinase inhibitor Y27632 was equally pronounced in the arteries of rat pups from two experimental groups. Thus, IUGR, caused by maternal nutritional restriction during pregnancy, does not lead to pronounced changes in the regulation of systemic vascular tone in the early postnatal period.

Keywords: intrauterine growth restriction, smooth muscle, endothelium, nitric oxide NO, Rho-kinase, early postnatal ontogenesis, artery