© Коллектив авторов, 2020
УДК 618.3-008.6+616.12-008.331.1:616-092.4
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15084>
ISSN – 2073-8137

ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У ПОТОМСТВА, РОЖДЕННОГО КРЫСАМИ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Е. А. Музыко, В. Н. Перфилова, М. В. Кустова, К. В. Суворин, И. Н. Тюренков, В. И. Петров
Волгоградский государственный медицинский университет, Российская Федерация

LONG-TERM CONSEQUENCES IN THE OFFSPRING BORN BY RATS WITH EXPERIMENTAL PREECLAMPSIA

Muzyko E. A., Perfilova V. N., Kustova M. V., Suvorin K. V., Tyurenkov I. N., Petrov V. I.

Volgograd State Medical University, Russian Federation

В возрасте 25 месяцев у потомства крыс с экспериментальной преэклампсией, смоделированной путем замены питьевой воды на 1,8 % раствор хлорида натрия с 1 по 21 день гестации, наблюдалась когнитивная дисфункция, проявляющаяся в ухудшении процессов обучения и памяти. В 27 месяцев у животных, рожденных самками с осложненной беременностью, были выявлены нарушения углеводного и липидного обменов, выделительной функции почек.

Ключевые слова: экспериментальная преэклампсия, потомство, отдаленные последствия

The offspring of rats with experimental preeclampsia modeled by replacing drinking water with a 1.8 % sodium chloride solution from 1 to 21 days of gestation had cognitive dysfunction, which manifests itself in a deterioration in learning and memory at the age of 25 months. At 27 months in animals born to females with complicated pregnancy, disorders of carbohydrate and lipid metabolism, renal excretory function were revealed.

Keywords: experimental preeclampsia, offspring, long-term consequences

Для цитирования: Музыко Е. А., Перфилова В. Н., Кустова М. В., Суворин К. В., Тюренков И. Н., Петров В. И. ОТДАЛЕННЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ У ПОТОМСТВА, РОЖДЕННОГО КРЫСАМИ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):355-359. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15084>

For citation: Muzyko E. A., Perfilova V. N., Kustova M. V., Suvorin K. V., Tyurenkov I. N., Petrov V. I. LONG-TERM CONSEQUENCES IN THE OFFSPRING BORN BY RATS WITH EXPERIMENTAL PREECLAMPSIA. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):355-359. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15084> (In Russ.)

АД – артериальное давление
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
Кд – коэффициент дискриминации
ОХ – общий холестерин

РНК – рибонуклеиновая кислота
ТГ – триглицериды
ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности
ЭП – экспериментальная преэклампсия

Преэклампсия – тяжелое специфичное для беременности мультисистемное заболевание, характеризующееся негативными последствиями для матери и ребенка. Гипоксическое повреждение, которое присуще данному осложнению беременности, возникает вследствие неполной инвазии трофобласта в спиральные артерии, изменения вазодилатирующей и антитромботической функций эндотелия и приводит к ацидозу и активации свободнорадикальных процессов у плода [1]. Последние способствуют разрушению клеток, внутриклеточных структур, ферментов различных органов и тканей организма, что может обусловить нарушения их функционирования на разных этапах жизни потомства [2].

Результаты многих исследований свидетельствуют, что у детей, рожденных матерями с преэклампсией, повышен риск возникновения расстройств со стороны нервной, сердечно-сосудистой, мочевыделительной и эндокринной систем, что клинически может проявляться такими синдромами и заболеваниями, как нарушение эмоционального, социального и когнитивного поведения, гипертония, инсульт, ожирение, гиперли-

пидемия и сахарный диабет на разных этапах онтогенеза [3–5]. Однако в литературе имеется небольшое количество данных о последствиях этого осложнения беременности у потомства в пожилом возрасте. Исследования такой направленности позволят разработать стратегию и тактику лечения подобных отклонений.

Цель исследования – оценить влияние экспериментальной преэклампсии (ЭП) на когнитивные функции, состояние липидного и углеводного обменов, выделительную систему и артериальное давление у потомства в отдаленные периоды онтогенеза.

Материал и методы. Эксперименты были выполнены на потомстве в возрасте 25 (n=51) и 27 месяцев (n=37), рожденном белыми беспородными крысами-самками с физиологической беременностью и ЭП, которую моделировали путем замены питьевой воды на 1,8 % раствор хлорида натрия с 1 по 21 день гестации.

Были сформированы группы: 1 – контрольная – самцы (n=11) и самки (n=11), рожденные здоровыми крысами; 2 – опытная – самцы (n=16) и самки (n=13), рожденные крысами с ЭП. В возрасте 25 месяцев у потомства изучали когнитивные функции в тестах «Распознавание нового объекта» и «Лабиринт Барнс».

В 27 месяцев у самцов и самок контрольной (n=6 и n=9) и опытной (n=11 и n=11) групп определяли артериальное давление (АД), состояние углеводного и липидного обменов, исследовали выделительную функцию почек.

Тест «Распознавание нового объекта» проводили в установке «Открытое поле». В качестве объектов использовали два металлических цилиндра белого и один цилиндр синего цвета одинакового размера (d=6 см, h=11 см) и веса (385 г). В фазу ознакомления крысы изучали два одинаковых незнакомых объекта (белые цилиндры) в течение 4 минут. Затем на 3 минуты крысу помещали в индивидуальную клетку. В тестовую фазу один белый цилиндр меняли на синий. После чего 4 минуты регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Перед началом теста для каждой последующей крысы установку и цилиндры протирали спиртом для уничтожения меток и запаха, оставленных предыдущим животным. Для оценки кратковременной рабочей памяти рассчитывали коэффициент дискриминации (Кд), увеличение которого оценивали как повышение когнитивных процессов:

$$K_d = \frac{\text{Время (объект новый)} - \text{Время (объект знакомый)}}{\text{Время (объект новый)} + \text{Время (объект знакомый)}}$$

Если крыса в тестовую фазу не проявляла интереса ни к одному объекту, то ее относили к животным с отсутствием исследовательской активности.

Тест «Лабиринт Барнс» позволяет оценить обучаемость и кратковременную пространственную память грызунов [6]. Лабиринт представляет собой круглую арену диаметром 122 см, расположенную на подставке на высоте 113 см от уровня пола, с 18 ложными норками диаметром 9,5 см, расположенными по периметру. Под одним отверстием было убежище («норка») размером 11×30 см. Тестирование проводили в течение 5 дней. Во время тренировки (в 1, 2, 3 и 4 день) крысы делали 4 побежки, на 5 день исследования памяти – одну. В том случае, если животное в дни тренировки в течение 3 минут не находило норку, ему показывали убежище и мягко подталкивали к нему.

Для определения состояния углеводного и липидного обменов у потомства проводили «Пероральный

глюкозотолерантный тест» (с помощью зонда вводили раствор глюкозы 4 г/кг и измеряли ее концентрацию в крови через 30, 60, 90 и 120 минут после нагрузки, набор реагентов «Оксохром Глюкоза С» (Erba Lachema, CZ)), измеряли уровень гликированного гемоглобина (набор реагентов «Гликогемоглобин» (High Technology, Inc., USA)) и определяли концентрации общего холестерина (ОХ), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) и триглицеридов (ТГ) (наборы реагентов «Холестерин общий», «Холестерин ЛПВП» и «Триглицериды» (Ольвекс диагностика, Россия)). Оптическую плотность образцов измеряли на спектрофотометре ПЭ-5400В (Экрос, Россия).

Исследование выделительной функции почек проводили в тесте «Водная нагрузка». Крысам через зонд в желудок вводили воду из расчета 2 мл/100 г веса после водной депривации в течение 3 часов. Животных сажали в метаболические камеры («Nalgene», Италия) и измеряли диурез через 10, 20, 30, 60, 90 и 120 минут.

Для измерения АД крысу помещали в пенал-держатель, на хвост надевали манжету со встроенным фотосенсором. Показатели автоматически фиксировались на персональном компьютере, подключенном к прибору для неинвазивного измерения артериального давления – CODA™ Non-Invasive Blood Pressure System («Kent Scientific Corporation», США).

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ STATISTICA v.12.5 (StatSoft Inc., США) по U-критерию Манна – Уитни и t-критерию Стьюдента с предварительной проверкой выборок на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. При исследовании кратковременной рабочей памяти в тесте «Распознавание нового объекта» у самцов и самок опытной группы Кд оказался меньше на 31,34 и 30 % ($p < 0,05$) соответственно, чем у потомства здоровых крыс. Среди животных, рожденных самками с ЭП, доля особей с отсутствием исследовательской активности была выше, чем в контрольной группе (табл.).

Таблица

Показатели обучаемости и памяти у потомства здоровых крыс и самок с экспериментальной преэклампсией ($M \pm m$)

Тест	Показатель		Группы животных			
			контрольная		опытная	
			Самцы	Самки	Самцы	Самки
«Распознавание нового объекта»	Коэффициент дискриминации		0,67±0,08	0,40±0,04	0,46±0,04*	0,28±0,03*
	Доля крыс с отсутствием исследовательской активности (%)		9,09	27,27	18,75	30,77
«Лабиринт Барнс»	1 день (Тренировка)	Латентный период, с	68,71±12,45	102,47±12,31	92,60±9,84	72,04±9,32
		Ошибки	2,75±0,55	6,33±1,21	5,40±0,96*	6,27±1,09
	2 день (Тренировка)	Латентный период, с	40,68±10,70	58,36±10,23	38,17±6,63	40,38±5,63
		Ошибки	2,68±0,88	5,83±1,04	4,42±0,66*	5,71±0,81
	3 день (Тренировка)	Латентный период, с	30,29±6,21	23,56±4,32	30,73±6,81	35,85±5,67*
		Ошибки	3,14±0,70	3,89±0,67	3,77±0,70	5,25±0,68
	4 день (Тренировка)	Латентный период, с	27,57±6,28	16,14±4,54	21,46±4,52	18,73±2,65*
		Ошибки	2,32±0,47	2,89±0,48	2,75±0,74	2,69±0,43
	5 день (Исследование памяти)	Латентный период, с	18,83±5,50	14,33±2,29	15,67±4,76	40,18±7,82#
		Ошибки	1,50±0,22	2,22±0,15	2,83±0,50*	4,73±0,81*

Примечание: * – $p < 0,05$ по U-критерию Манна – Уитни по сравнению с контрольной группой; # – $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контрольной группой.

В тесте «Лабиринт Барнс» самки от крыс с осложненной беременностью имели больший на 34,28 и 13,83 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой латентный период нахождения норки на 3 и 4 день тренировки и на 64,34 % ($p < 0,05$) – на 5 день исследования памяти. Количество ошибок у потомства опытной группы было значительно больше, чем у животных от здоровых самок: на 49,07 и 39,37 % ($p < 0,05$) в 1 и 2 день тренировки у самцов, на 49,99 и 53,07 % ($p < 0,05$) на 5 день теста – у самцов и самок (табл.).

Полученные данные свидетельствуют о снижении способности к обучению и ухудшении кратковременной памяти у потомства, рожденного крысами с ЭП.

При проведении «Перорального глюкозотолерантного теста» у самцов от крыс с ЭП наблюдался больший на 11,31 % ($p < 0,05$) прирост уровня глюкозы через 30 минут после ее введения по сравнению с контрольной группой, у самок – на 39,82; 54,92 и 64,33 % ($p < 0,05$) на 60, 90 и 120 минуте после введения соответственно (рис. 1А). Уровень гликированного гемоглобина у самцов и самок опытной группы был на 24,25 и 34,12 % ($p < 0,05$) больше, чем у животных, рожденных крысами с физиологической беременностью (рис. 1В), что свидетельствует о нарушении углеводного обмена у потомства самок с ЭП.

Рис. 1. Показатели углеводного (А, В) и липидного (С) обменов у потомства здоровых крыс и самок с экспериментальной преэклампсией ($M \pm m$) (* – $p < 0,05$ по U-критерию Манна – Уитни по сравнению с контрольной группой)

У самцов и самок опытной группы наблюдалось ухудшение показателей липидного обмена – уровень ХС ЛПВП у них был на 52,31 и 32,93 % ($p < 0,05$) меньше, чем в контрольной группе. Самцы, рожденные крысами с ЭП, имели более высокую концентрацию ОХ (на 31,27 %, $p < 0,05$), самки – больший уровень ТГ (на 22,82 %, $p < 0,05$), чем потомство от крыс без ЭП (рис. 1С).

Объем выделенной мочи в тесте «Водная нагрузка» у самцов опытной группы был на 74,08 % ($p < 0,05$) меньше на 90 минуте определения диуреза, у самок – на 88,37 и 56,68 % ($p < 0,05$) на 30 и 60 минуте по сравнению с аналогичным показателем у животных

от здоровых самок. Кроме того, общее количество выведенной из организма жидкости у самцов и самок, рожденных крысами с ЭП, было меньше на 23,34 и 56,59 % ($p < 0,05$), чем в контрольной группе, что указывает на нарушение функционирования почек (рис. 2).

В возрасте 27 месяцев у самцов и самок, рожденных крысами с ЭП, среднее АД имело тенденцию к увеличению по сравнению с потомством здоровых животных и составляло $112,91 \pm 4,65$ и $103,03 \pm 4,29$ мм рт. ст. соответственно, в то время как у самцов и самок контрольной группы АД было равно $108,03 \pm 6,02$ и $101,31 \pm 3,33$ мм рт. ст.

Рис. 2. Состояние выделительной функции почек в тесте «Водная нагрузка» у потомства здоровых крыс и самок с экспериментальной преэклампсией ($M \pm m$)

(* – $p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни по сравнению с контрольной группой;

– $p < 0,05$ по t-критерию Стьюдента по сравнению с контрольной группой)

Полученные данные свидетельствуют о негативном влиянии ЭП, вызванной заменой питьевой воды на 1,8 % раствор хлорида натрия с 1 по 21 день гестации, на когнитивные функции, липидный и углеводный обмены, мочевыделительную систему потомства в отдаленные периоды онтогенеза (25 и 27 месяцев).

Очевидно, подобное действие преэклампсии связано с уменьшением маточно-плацентарного кровообращения, которое способствует хроническому нарушению поступления питательных веществ и кислорода к плоду. Эти факторы во время критических периодов развития ребенка оказывают неблагоприятное влияние на формирование органов и тканей [2].

Гипоксические поражения центральной нервной системы выявляются у 20–50 % детей, рожденных матерями с преэклампсией и эклампсией различной степени тяжести. Было показано, что у детей 7–10 лет от женщин с этим осложнением беременности наблюдается абнормальное мозговое кровообращение: увеличение регионарного объема мозжечка, височной доли, ствола и миндаины сопровождается уменьшением радиусов сосудов в затылочной и теменной долях, что играет роль в нарушении функционирования головного мозга и увеличивает риск возникновения инсульта в отдаленные периоды онтогенеза [7, 8]. Преэклампсия у матери влияет на относительную толщину стенки и конечный диастолический объем левого желудочка [9], что может являться ранним признаком его концентрического ремоделирования и оказывает действие на функционирование сердца ребенка. Хроническая гипоксия и задержка внутриутробного развития при этом осложнении беременности способствуют сокращению числа нефронов у плода, приводя к возникновению гипертонии и почечных заболеваний в зрелом возрасте [10, 11], гибели β -клеток и уменьшению их площади в поджелудочной железе [12].

Причиной отрицательного влияния преэклампсии на здоровье ребенка в разные периоды жизни также могут служить эпигенетические механизмы, включающие метилирование ДНК, модификацию гистонов и экспрессию некодирующей РНК [13]. Изменение экспрессии импринтированных генов дельта-подобного неканонического Notch лиганда 1 DLK1 и экспрессируемого по материнской линии длинного некодирующего РНК-гена MEG3, вызванное гиперметилированием межгенной дифференциальной области метилирования IG-DMR в эндотелиальных клетках пупочной вены у детей от женщин с преэклампсией, сопровождается более низким образованием оксида азота и эндотелиального фактора роста сосудов VEGF, а также увеличением экспрессии эндотелина 1 по сравнению с контрольной группой, что может быть одной из причин повышенного риска развития сердечно-сосудистых заболеваний у потомства [14]. У детей от матерей с преэклампсией присутствует aberrантное метилирование дифференциально метилированных регионов генов инсулиноподобного фактора роста 2 IGF 2 и мезодерм-специфического транскрипта MEST. Это способствует формированию метаболических нарушений, ожирения и сахарного диабета в зрелом возрасте.

Заключение. Таким образом, в отдаленные периоды постнатального онтогенеза у потомства, рожденного крысами с ЭП, вызванной путем замены питьевой воды на 1,8 % раствор хлорида натрия с 1 по 21 день беременности, наблюдаются когнитивная дисфункция, ухудшение показателей углеводного и липидного обменов, нарушение экскреторной деятельности почек и тенденция к увеличению АД.

Информированное согласие: Содержание и уход за животными в условиях вивария осуществляли согласно рекомендациям национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р-33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Между-

народным рекомендациям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (The European Convention, 1986). Исследование было выполнено в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики» и директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европей-

ского Союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Протокол экспериментального исследования был одобрен Региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области: № 2044-2017 от 25 декабря 2017 г.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Phipps E. A., Thadhani R., Benzing T., Karumanchi S. A. Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nature Reviews Nephrology*. 2019;15(5):275-289. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0119-6>
2. Stojanovska V., Scherjon S. A., Plösch T. Preeclampsia as modulator of offspring health. *Biology of Reproduction*. 2016;94(3):53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135780>
3. Dachew B. A., Mamun A., Maravilla J. C., Alati R. Association between hypertensive disorders of pregnancy and the development of offspring mental and behavioural problems: a systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Research*. 2018;260:458-467. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.12.027>
4. Maher G. M., McCarthy F. P., McCarthy C. M., Kenny L. C., Kearney P. M. [et al.]. A perspective on pre-eclampsia and neurodevelopmental outcomes in the offspring: Does maternal inflammation play a role? *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2019;77:69-76. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.10.004>
5. Sacks K. N., Friger M., Shoham-Vardi I., Spiegel E., Serigienko R. [et al.]. Prenatal exposure to preeclampsia as an independent risk factor for long-term cardiovascular morbidity of the offspring. *Pregnancy Hypertension*. 2018;13:181-186. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.06.013>
6. Rosenfeld C. S., Ferguson S. A. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *JoVE Journal*. 2014;(84):e51194. <https://doi.org/10.3791/51194>
7. Dang F., Croy B. A., Stroman P. W., Figueiró-Filho E. A. Impacts of Preeclampsia on the Brain of the Offspring. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2016;38(8):416-422. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584515>
8. Rätsep M. T., Hickman A. F., Croy B. A. The Elsevier trophoblast research award lecture: impacts of placental growth factor and preeclampsia on brain development, behaviour, and cognition. *Placenta*. 2016;48(Suppl. 1):S40-S46. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.001>
9. Timpka S., Macdonald-Wallis C., Hughes A. D., Chaturvedi N., Franks P. W. [et al.]. Hypertensive disorders of pregnancy and offspring cardiac structure and function in adolescence. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(11):e003906. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003906>
10. Plank C., Ostreicher I., Hartner A., Marek I., Struwe F. G. [et al.]. Intrauterine growth retardation aggravates the course of acute mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat. *Kidney International*. 2006;70(11):1974-1982. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001966>
11. Herrera-Garcia G., Contag S. Maternal Preeclampsia and Risk for Cardiovascular Disease in Offspring. *Current Hypertension Reports*. 2014;16(9):475. <https://doi.org/10.1007/s11906-014-0475-3>
12. Akhaphong B., Lockridge A., Jo S., Mohan R., Wilcox J. A. [et al.]. Reduced uterine perfusion pressure causes loss of pancreatic β -cell area but normal function in fetal rat offspring. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2018;315(6):R1220-R1231. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00458.2017>
13. Peixoto A. B., Rolo L. C., Nardozza L., Araujo Júnior E. Epigenetics and Preeclampsia: Programming of Future Outcomes. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1710:73-83. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_6
14. Yu Y. C., Jiang Y., Yang M. M., He S. N., Xi X. [et al.]. Hypermethylation of delta-like homolog 1/maternally expressed gene 3 loci in human umbilical veins: Insights into offspring vascular dysfunction born after preeclampsia. *Journal of Hypertension*. 2019;37(3):581-589. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001942>

Сведения об авторах:

Музыка Елена Андреевна, аспирант; тел.: 89275302241; e-mail: muzyko.elena@mail.ru

Перфилова Валентина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры фармакологии и фармации; тел.: 89053945451; e-mail: vnperfilova@mail.ru

Кустова Маргарита Валерьевна, аспирант; тел.: 89044007615; e-mail: kustova13@gmail.com

Суворин Кирилл Витальевич, студент; тел.: 89610577450; e-mail: kvsuvorin1@mail.ru

Тюренков Иван Николаевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармации; тел.: 89033731941; e-mail: fibfuv@mail.ru

Петров Владимир Иванович, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и интенсивной терапии; тел.: 88442382454; e-mail: brain@sprintnet.ru