

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ ВЫЗЫВАЕТ НАРУШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *chrna4* И *chrna7* В МОЗГЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС, НЕ ВЛИЯЯ НА МЕТАБОЛИЗМ АЦЕТИЛХОЛИНА ВО ВРЕМЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

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

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: vov210292@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к публикации 03.06.2024

Предыдущие исследования показали, что совокупное воздействие гипоксии плода и материнских стрессорных гормонов предопределяет склонность к никотиновой зависимости во взрослом возрасте. Настоящее исследование на крысах было направлено на изучение влияния пренатальной гипоксии (ПГ) на метаболизм ацетилхолина в развивающемся мозге, а также на экспрессию генов рецепторов ацетилхолина *chrna4* и *chrna7* как в развивающемся мозге, так и в структурах головного мозга взрослых после потребления никотина. В развивающемся мозге ПГ крыс не обнаружено изменений активности холин-ацетилтрансферазы (ХАТ) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ), а также нарушений концентрации ацетилхолина. Однако снижение экспрессии *chrna4* было обнаружено на 15-й день беременности, тогда как повышение экспрессии *chrna7* наблюдалось на 15-й и 16-й дни эмбриогенеза. Во взрослом возрасте последствия ПГ проявлялись в снижении экспрессии *chrna4* в медиальной префронтальной коре (PFC), прилежащем ядре (NAcc) и гипоталамусе (HT), снижении экспрессии *chrna7* в PFC и гиппокампе (HPC). При этом потребление никотина у взрослых ПГ крыс не снижало уровни экспрессии *chrna4* и *chrna7* по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ПГ предрасполагает к нарушению экспрессии генов *chrna4* и *chrna7* у взрослых крыс, не влияя на метаболизм ацетилхолина в период эмбрионального развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: крысы, развитие мозга, пренатальная гипоксия, метаболизм ацетилхолина, *chrna4*, *chrna7*.

DOI: 10.31857/S0320972524110091 EDN: IKNPIS

ВВЕДЕНИЕ

Никотиновая зависимость представляет собой серьёзную общественную угрозу: ежегодно от неё умирает до 8 миллионов человек [1]. В современном понимании, наряду с генетической предрасположенностью к никотиновой зависимости [2, 3], большое значение имеют также эпигенетические изменения под влиянием факторов окружающей среды, особенно возникающих в период эмбрионального развития мозга [4, 5].

Таким образом, воздействие стрессоров окружающей среды во время пренатального периода, опосредованное эндокринной системой матери или изменением доступности кислорода у плода, увеличивает риск развития расстройств, связанных с употреблением психоактивных веществ [6, 7], особенно никотиновой зависимости, у потомков [8, 9].

Гипоксия плода, часто сопровождающаяся реакцией глюкокортикоидной системы матери на нарушение доставки кислорода, является одним

Принятые сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; ПГ – пренатальная гипоксия; ХАТ – холин-ацетилтрансфераза; AMG – амигдала; *chrna4* – альфа-4-субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора; *chrna7* – альфа-7-субъединица никотинового ацетилхолинового рецептора; HPC – гиппокамп; HT – гипоталамус; NAcc – прилежащее ядро стриатума; PFC – медиальная префронтальная кора; PVN – паравентрикулярное ядро таламуса; VTA – вентральная тегментальная область.

* Адресат для корреспонденции.

из наиболее значимых факторов, предопределяющих нарушения развития мезолимбической системы головного мозга. Это состояние приводит к повышенному потреблению никотина у взрослого потомства [9]. В частности, наши предыдущие исследования на крысах показали, что повышенный риск никотиновой зависимости у взрослых может быть связан с эпизодами тяжелой гипоксии на 14–16-й дни эмбриогенеза [10, 11], что соответствует 5–7-й неделям беременности у человека в плане формирования структур мозга [12]. В этот период дофаминергические нейроны вентральной тегментальной области (VTA) завершают аксональное наведение к прилежащему ядру стриатума (NAcc) [13], а гиппокамп (HPC) и другие корковые структуры, иннервирующие NAcc, только начинают формироваться [14]. В нашем предыдущем исследовании мы дополнительно сравнили эффекты внутриутробной ишемии плода и пренатальной гипобарической гипоксии, моделируемой в барокамере, в сочетании со стрессорной реакцией матери [11, 15]. Мы обнаружили, что ключевую роль в предрасположенности к никотиновой зависимости играет не только сама гипоксия, но и избыточное снабжение развивающегося мозга глюкокортикоидами [11]. Это приводило к aberrантному профилю экспрессии глюкокортикоидных рецепторов во внегипоталамических структурах головного мозга, вызывая нарушение циркадной динамики глюкокортикоидов, глюкокортикоид-зависимой экспрессии и, как следствие, нарушение глюкокортикоид-зависимых процессов на протяжении всей дальнейшей жизни [16–18]. Гипоксия и связанные со стрессом процессы могут влиять на созревание холинергической медиаторной системы мозга как через изменения экспрессии отдельных элементов [19], так и через недостаточность аэробного окислительного метаболизма для эффективного синтеза ацетилхолина [20–22].

Первичные механизмы, лежащие в основе влияния пренатальной гипоксии (ПГ) и материнских глюкокортикоидных стрессорных гормонов на развитие мозга плода, которое имеет решающее значение для формирования никотиновой зависимости, до сих пор остаются неясными. Поэтому в данной работе мы изучили динамику активности ключевых ферментов, участвующих в синтезе и деградации ацетилхолина, а именно холин-ацетилтрансферазы (ХАТ) и ацетилхолинэстеразы (АХЭ), а также колебания концентрации ацетилхолина на третьей неделе эмбрионального развития (e15, e16, e17, e20) и на 1-е сутки после рождения (p1) в мозге контрольных крыс и крыс, подвергшихся ПГ. Учитывая возможность нарушений экспрессии рецепторов ацетилхолина, мы также исследовали динамику транскрипции

субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора альфа-4 (*chrna4*) и альфа-7 (*chrna7*) как в развивающемся, так и во взрослом мозге под влиянием ПГ. Хроническая никотиновая зависимость возникает из-за снижения транскрипции рецепторов ацетилхолина в результате потребления никотина. Ранее нами было показано, что взрослые ПГ крысы проявляют повышенную склонность к потреблению никотина в условиях свободного выбора [10], а хроническое потребление никотина через осмотические мини-насосы вызывает у этих крыс более выраженные поведенческие признаки никотиновой зависимости по сравнению с контрольными животными [10, 11]. В этом исследовании мы также использовали осмотические мини-насосы для обеспечения непрерывной подачи никотина в течение двух недель и сравнивали влияние никотина на транскрипцию *chrna4* и *chrna7* в структурах мозга взрослых крыс в контрольной группе и группе ПГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. 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 вместе с их эмбриональным (e15, e16, e17, e20) и новорожденным (p1) потомством без определения пола и взрослым потомством – самцами в возрасте 3 месяца и массой 320–350 г. Все экспериментальные процедуры выполнены в соответствии с «Методическими указаниями по проведению исследований на животных» [23] и одобрены этическим комитетом по использованию животных Института физиологии им. Павлова РАН (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

Пренатальная гипоксия. Модель ПГ, описанная в наших предыдущих исследованиях, использовалась как модель гипоксии плода [10, 11, 16–18]. Для моделирования ПГ мы использовали барокамеру проточного типа с температурой от 20 °C до 25 °C, в которой атмосферное давление постепенно снижали до 180 мм.рт.ст., достигая 5%-ного содержания кислорода (что эквивалентно 11 000 м над уровнем моря) в течение 20 мин. Через 3 ч воздействия содержание кислорода нормализовалось в течение 20 мин. Беременных самок помещали в такие условия 3 дня подряд (14-й, 15-й и 16-й дни беременности) с интервалом между сеансами 24 ч. Летальность в барокамере составила около 15%. Интактных самок контрольной группы также помещали в барокамеру на 3 ч на 14-й, 15-й и 16-й дни беременности, не подвергая

гипоксическому воздействию. Срок беременности составил 22–23 дня.

Колориметрические методы. Для колориметрического анализа головной мозг эмбрионов (e15, e16, e17, e20) и новорожденных (p1) контрольных и ПГ крыс извлекали и замораживали в жидком азоте. Каждая группа крыс состояла из случайно выбранных эмбрионов или детёнышей от разных самок, чтобы минимизировать систематическую ошибку в помёте.

Измерение активности холин-ацетилтрансферазы. Активность ХАТ анализировали с использованием набора для колориметрического анализа (E-BC-K125-M; «Elabscience», США). Для выделения цитозольных белков образцы мозга промывали и гомогенизировали в PBS (0,01 M, pH 7,4) при +4 °C и центрифугировали при 10 000 g в течение 10 мин. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при длине волны 324 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech», Германия). Количество кофермента А, образовавшегося в ходе реакции, определяли с использованием стандартной кривой. Активность ХАТ рассчитывали в нмоль кофермента А, генерируемого в минуту в пересчёте на мг общего белка. Как здесь, так и в других биохимических тестах, приведённых ниже, концентрацию общего белка в образцах измеряли с использованием набора Pierce Rapid Gold BCA («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя.

Измерение активности ацетилхолинэстеразы. Активность АХЭ анализировали с использованием набора для колориметрического анализа (E-BC-K052-S; «Elabscience»). Образцы мозга промывали и гомогенизировали в 0,9%-ном растворе NaCl при +4 °C. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при длине волны 520 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). Количество ацетилхолина, оставшегося после реакции, определяли с использованием стандартной кривой. Активность АХЭ рассчитывали в нмоль гидролизованного ацетилхолина в минуту в пересчёте на мг общего белка.

Измерение концентрации ацетилхолина. Концентрацию ацетилхолина анализировали с использованием колориметрического набора ELISA (E-EL-0081; «Elabscience»). Образцы мозга промывали и гомогенизировали в PBS (0,01 M, pH 7,4) при +4 °C и центрифугировали при 5 000 g в течение 10 мин для выделения супернатанта, содержащего ацетилхолин. Процедуры анализа проводили в соответствии с протоколом производителя, а поглощение измеряли при 450 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). Концентрацию ацетилхо-

лина определяли с использованием стандартной кривой, рассчитывали и выражали в пг на мг общего белка.

Хроническое потребление никотина взрослыми крысами. Детёнышей крыс отсаживали от матерей в возрасте 30 дней, когда самки тратили на кормление не более 2 ч [24]. После отъёма крыс помещали в клетки размерами 60 × 30 × 20 см по 5–6 животных в каждой. Каждая группа состояла из случайно выбранных животных, рождённых от разных самок, чтобы минимизировать систематическую ошибку в помёте. Крысы находились в свободном доступе к воде и пище и содержались в режиме темноты и света 12 : 12 ч при комнатной температуре и постоянной влажности около 60%. Для проведения эксперимента использовали взрослых самцов с активным сперматогенезом из контрольной и ПГ групп в возрасте 3 месяца. В первый день крысам под изофлурановой анестезией подкожно имплантировали осмотические мини-насосы (2002W, «RWD Systems», Китай) со скоростью потока 0,5 мкл/ч, содержащие раствор тартрата никотина. Концентрацию никотина в насосах корректировали с учётом различий в массе тела крыс, что приводило к непрерывному подкожному вливанию тартрата никотина со скоростью 9 мг/кг в день. У контрольных и ПГ крыс, не принимавших никотин, мини-насосы заполняли физиологическим раствором. После двух недель потребления никотина или физиологического раствора крыс декапитировали гильотиной и собирали образцы структур головного мозга для ПЦР-анализа.

Количественная ПЦР РВ. Тотальную РНК из головного мозга эмбрионов (e15, e16, e17, e20) и новорожденных (p1) контрольных и ПГ крыс, а также из образцов гиппокампа (HPC), медиальной префронтальной коры (PFC), миндалы (AMG), прилежащего ядра (NAcc), паравентрикулярного ядра таламуса (PVN), гипоталамуса (HT) и вентральной тегментальной области (VTA) взрослых крыс (через две недели после потребления никотина или физиологического раствора) выделяли с помощью набора ExtractRNA Kit (BC032, «Евроген», Россия) и очищали с помощью DNaseI (SB-G3342, «Servicebio», Китай), согласно инструкциям производителя. Качество и концентрацию тотальной РНК определяли путём измерения оптической плотности при 260 и 280 нм с использованием планшетного ридера (CLARIOstar PLUS, «BMG Labtech»). кДНК синтезировали из 2 мкг тотальной РНК с использованием набора для обратной транскрипции MMLV (SK021, «Евроген», Россия). Количественную ПЦР РВ проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген») на термоциклере Gentier 96E («Tianlong», Китай). Уровни экспрессии генов альфа-4-субъединицы

рецептора ацетилхолина (*chrna4*) и альфа-7-субъединицы рецептора ацетилхолина (*chrna7*) оценивали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ с нормализацией по содержанию мРНК β -тубулина в качестве референсного гена. Использовали следующие последовательности праймеров:

- *chrna4*, прямая: GGTGAAGGAGGACTGGAA, обратная: AAGGCAGACAATGATGAACA (температура отжига +58 °C, продукт 78 п.н.);
- *chrna7*, прямая: CTCTTGGAATAACTGTCTT, обратная: CGAAGTATTGTGCTATCA (температура отжига +58 °C, продукт 105 п.н.);
- β -тубулин, прямая: TAGAGGAGATGCTACTTA, обратная: AATGGTGATAATACTGTAA (температура отжига +58 °C, продукт 147 п.н.).

Вестерн-блоттинг. Для подтверждения влияния изменений экспрессии мРНК *chrna7* на уровень белка CHRNA7 в структурах головного мозга взрослых контрольных и ПГ крыс мы использовали вестерн-блоттинг. Для получения суммарных белковых экстрактов для вестерн-блоттинга образцы HPC, PFC, AMG, NAcc, PVN, HT и VTA гомогенизировали в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 150 mM NaCl, 1%-ный Triton X-100 и коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (SB-G2006, SB-G2007, «Servicebio»). Гомогенаты инкубировали на шейкере в течение 30 мин при +4 °C, центрифугировали 10 мин при 14 000 *g* и собирали супернатанты. Образцы, содержащие равные количества общего белка, кипятили в течение 10 мин при +70 °C с 3-кратным буфером Лэммли.

Белки разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и затем переносили на мембраны из ПВДФ («Thermo Fisher Scientific», США). После блокирования в течение 1 ч в PBS, содержащем 5% обезжиренного молока, мембраны инкубировали в PBS с кроличьими первичными антителами против CHRNA7 (1 : 2000, DF13247, «Affinity Biosciences», США) и β -тубулина (1 : 5000, ab179513, «Abcam», Великобритания) в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем мембраны трижды промывали PBST (PBS с 0,1%-ным Tween-20) и инкубировали в PBS с HRP-конъюгированными антикроличьими вторичными антителами (1 : 5000, E-AV-1003, «Elabscience») в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембраны дважды промывали PBST. Визуализацию осуществляли с помощью набора Clarity ECL («Bio-Rad», США) и документирующей системы ChemiScope 6000 («Clinx Science Instruments», Китай). Содержание белка CHRNA7 определяли, нормируя данные на содержание β -тубулина, с использованием программного обеспечения ImageJ («NIH», США). Полные изображения результатов вестерн-блоттинга представлены на онлайн-ресурсе 1 (рис. П1 Приложения).

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием Prism 10 («GraphPad, Inc.»). Распределение данных оценивали на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка ($p > 0,05$) и QQ-графика. В качестве параметрического теста использовали одно- или двусторонний дисперсионный анализ. Апостериорные сравнения проводились с использованием теста Тьюки. Статистическая значимость была установлена на уровне $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для ПЦР РВ и вестерн-блоттинга среднее значение и стандартная ошибка среднего были пересчитаны как % от контроля соответствующего возраста, принятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние пренатальной гипоксии на метаболизм ацетилхолина в мозге крыс во время пренатального и раннего постнатального развития. Чтобы изучить влияние ПГ на метаболизм ацетилхолина, мы измерили активность ХАТ, фермента, синтезирующего этот нейромедиатор, а также активность АХЭ, фермента, расщепляющего ацетилхолин, в развивающемся мозге эмбрионов на третьей неделе беременности (e15, e16, e17, e20) и у новорожденных крысят (p1) (рис. 1, а, б). Нами не было обнаружено никаких изменений активности этих ферментов в мозге ПГ крыс по сравнению с контролем. Аналогичным образом не наблюдалось существенных изменений концентрации ацетилхолина во все исследованные периоды (рис. 1, в).

Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию мРНК рецепторов ацетилхолина в мозге крыс во время пренатального и раннего постнатального развития. Чтобы оценить влияние ПГ на рецепторную часть нейромедиаторной системы ацетилхолина, мы измерили относительное содержание мРНК альфа-4- (*chrna4*) и альфа-7 (*chrna7*)-субъединиц никотинового ацетилхолинового рецептора в эмбриональном мозге в течение третьей недели беременности (e15, e16, e17, e20) и в мозге новорожденных крысят (p1) (рис. 2, а, б). Снижение относительного количества мРНК *chrna4* было обнаружено в мозге крыс через сутки после первого сеанса ПГ (рис. 2, а, e15, ANOVA F (1, 9) = 10,2212, $p = 0,0127$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0126685$, тест Тьюки). В ходе дальнейшего пренатального развития и у новорожденных ПГ крыс не выявлено существенных изменений экспрессии *chrna4* в головном мозге. Кроме того, мы обнаружили увеличение относительного количества мРНК *chrna7* через 24 ч после первого сеанса ПГ (рис. 2, б, e15,

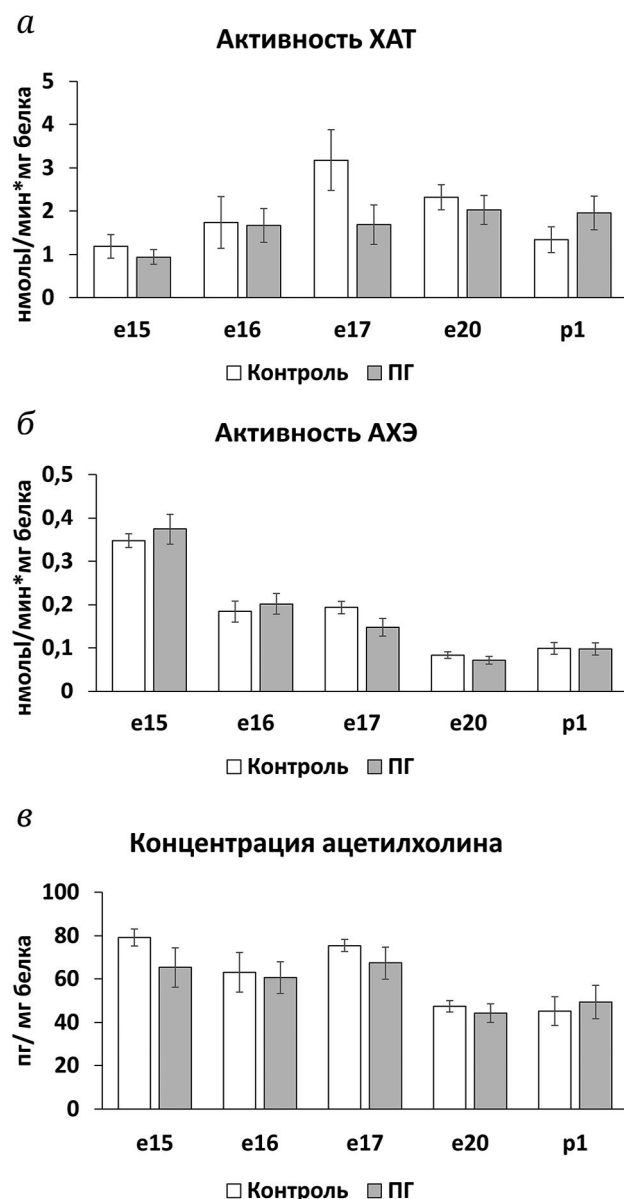


Рис. 1. Влияние ПГ на активность ХАТ (а), АХЭ (б) и концентрацию ацетилхолина (в) в мозге крыс во время пренатального (эмбриональные дни e15, e16, e17, e20) и раннего постнатального (постнатальный день p1) развития, выявленные колориметрическими методами. $n = 5$

ANOVA $F(1, 9) = 7,2211$, $p = 0,0276$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0276166$, тест Тьюки) и через день после второго сеанса ПГ (рис. 2, б, e16, ANOVA $F(1, 9) = 6,6590$, $p = 0,0326$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0325905$, тест Тьюки). На протяжении дальнейшего пренатального развития и у новорожденных ПГ крыс не выявлено существенных изменений экспрессии *chrna7* в головном мозге. Таким образом, несмотря на отсутствие влияния на метаболизм ацетилхолина, ПГ вызывает изменения экспрессии рецепторов ацетилхолина в развивающемся мозге.

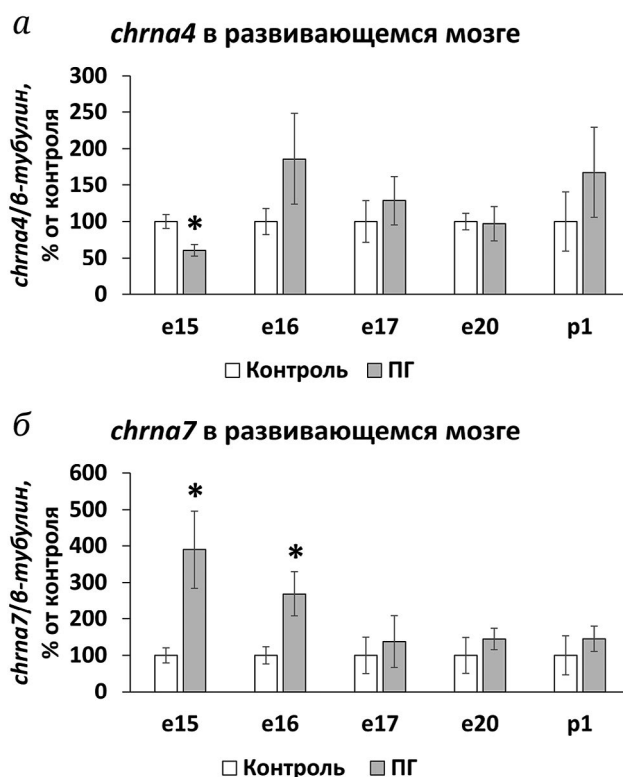


Рис. 2. Влияние ПГ на уровни экспрессии мРНК *chrna4* (а) и *chrna7* (б) в головном мозге крыс во время пренатального (эмбриональные дни e15, e16, e17, e20) и раннего постнатального (постнатальный день p1) развития, выявленное с помощью ПЦР РВ. * Различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки). $n = 5$

Влияние пренатальной гипоксии на экспрессию мРНК ацетилхолиновых рецепторов в структурах головного мозга интактных взрослых крыс и у животных, подвергшихся воздействию никотина. Для изучения отдалённых последствий ПГ для экспрессии ацетилхолиновых рецепторов в головном мозге мы измерили относительное содержание мРНК *chrna4* и *chrna7* в структурах лимбической системы (НРС, PFC, AMG, NAcc, PVN, HT, VTA) взрослых (3-месячных) контрольных и ПГ крыс как без, так и после двух недель стабильного потребления никотина, обеспечиваемого с помощью осмотических мини-насосов.

При оценке относительного количества мРНК у ПГ крыс наблюдалось значительное снижение экспрессии гена *chrna4* в PFC (рис. 3, б, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 9,872$, $p = 0,0063$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0399817$, тест Тьюки), NAcc (рис. 3, г, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 5,644$, $p = 0,0304$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0190$, тест Тьюки) и HT (рис. 3, е, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 9,673$, $p = 0,0067$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0061796$, тест Тьюки), но без влияния на НРС (рис. 3, а), AMG (рис. 3, в),

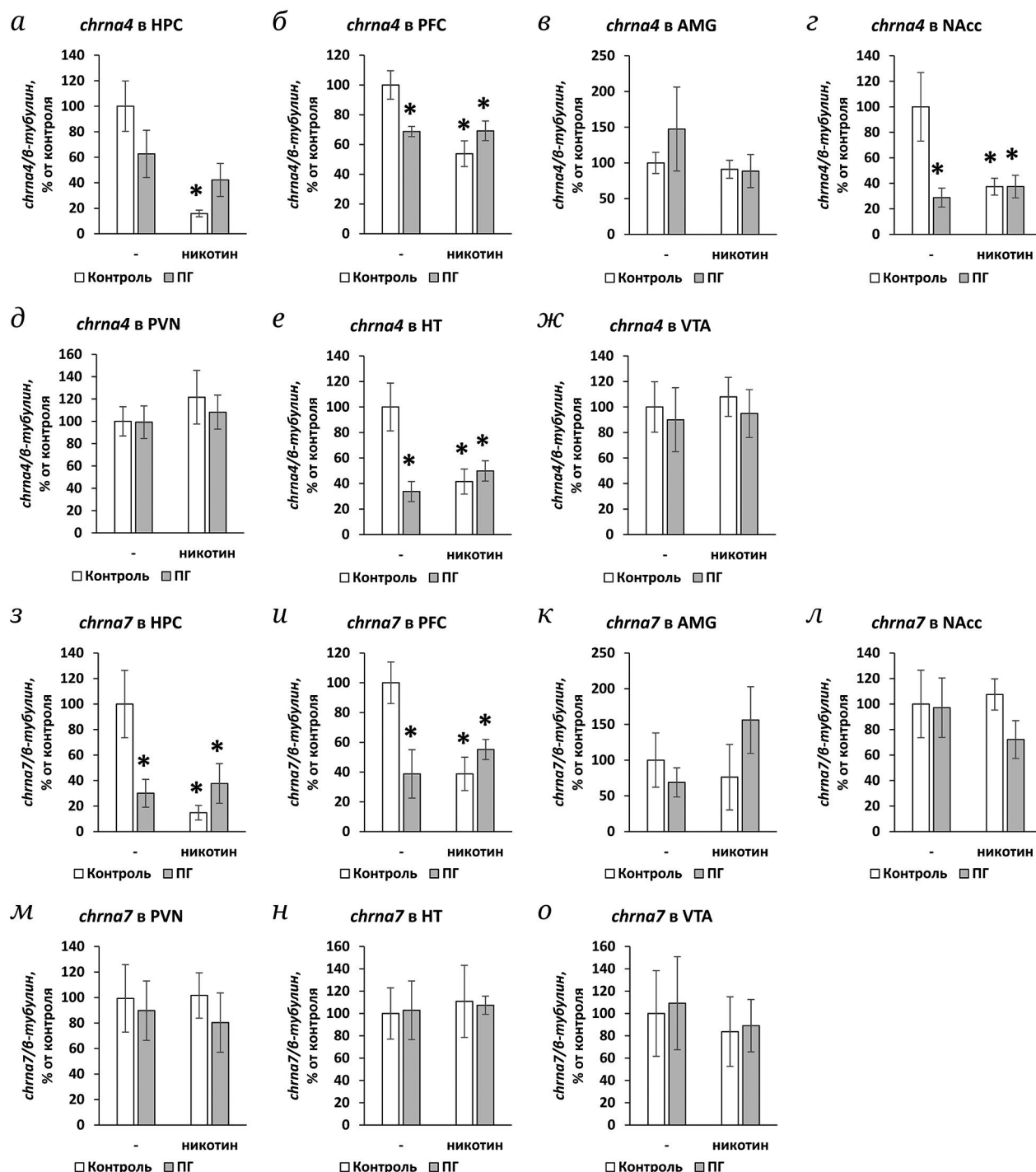


Рис. 3. Влияние ПГ и потребления никотина на уровни экспрессии мРНК *chRNA4* (а–ж) и *chRNA7* (з–о) в НРС (а, з), PFC (б, и), AMG (в, к), NAcc (г, л), PVN (д, м), HT (е, н), VTA (ж, о) взрослых крыс, выявленные методом ПЦР РВ. * Различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$ (двухфакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки). $n = 5$

PVN (рис. 3, д) и VTA (рис. 3, ж). Более того, через две недели потребления никотина количество мРНК *chRNA4* в мозге контрольных крыс значительно снизилось до значений, сопоставимых с таковыми у ПГ крыс в НРС (рис. 3, а, ANOVA Никотин F (1, 17) = 9,989, $p = 0,0057$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0057263$,

тест Тьюки), PFC (рис. 3, б, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 9,872, $p = 0,0234$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0022758$, тест Тьюки), NAcc (рис. 3, г, ANOVA Группа × Никотин F (1, 16) = 5,644, $p = 0,0304$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0421275$, тест Тьюки) и HT (рис. 3, е, ANOVA Группа × Нико-

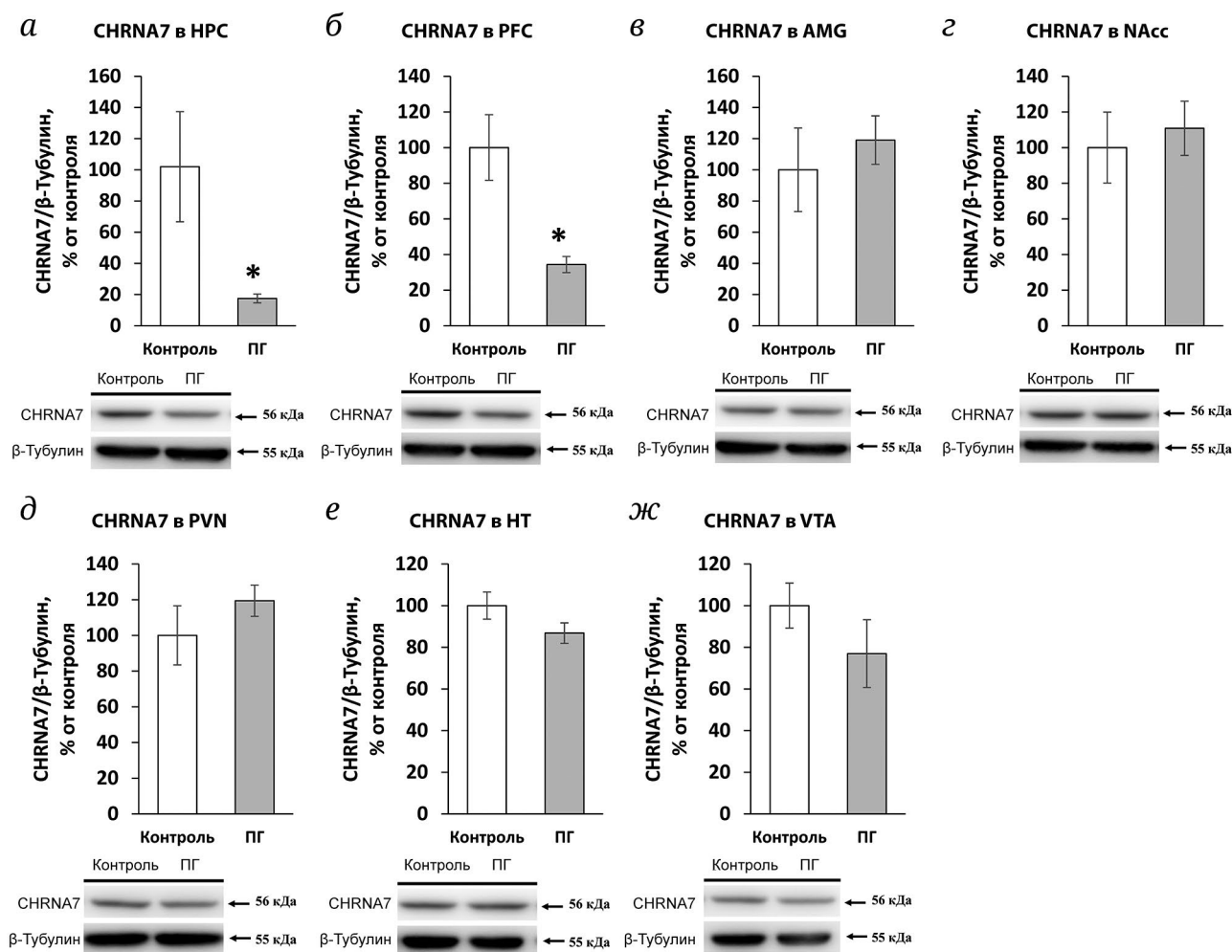


Рис. 4. Влияние ПГ на экспрессию белка CHRNA7 в HPC (а), PFC (б), AMG (в), NAcc (г), PVN (д), HT (е), VTA (ж) взрослых крыс, выявленную методом вестерн-блоттинга. * Различия по сравнению с контролем достоверны, $p < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, тест Тьюки). $n = 5$

тин $F(1, 16) = 9,673$, $p = 0,0067$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0157127$, тест Тьюки). Напротив, потребление никотина крысами ПГ не вызывало изменений в содержании мРНК *chrna4* во всех структурах мозга по сравнению с интактными ПГ крысами (рис. 3).

При оценке относительного количества мРНК *chrna7* в мозге взрослых крыс было обнаружено, что ПГ вызывает значительное снижение экспрессии гена в HPC (рис. 3, з, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 7,945$, $p = 0,0124$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,038$, тест Тьюки) и PFC (рис. 3, и, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 9,55$, $p = 0,00702$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0157$, тест Тьюки), не влияя на AMG (рис. 3, к), NAcc (рис. 3, л), PVN (рис. 3, м), HT (рис. 3, н) и VTA (рис. 3, о).

Влияние изменений уровней мРНК *chrna7* на экспрессию белка CHRNA7 в структурах мозга взрослых контрольных и ПГ крыс было проверено методом вестерн-блоттинга (рис. 4). Было

обнаружено, что ПГ вызывает снижение уровня белка CHRNA7 в HPC (рис. 4, а, ANOVA $F(1, 9) = 5,6864$, $p = 0,0442$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0442243$, тест Тьюки) и PFC (рис. 4, б, ANOVA $F(1, 9) = 11,9926$, $p = 0,0085$; контроль по сравнению с ПГ, $p = 0,0085305$, тест Тьюки), но не в AMG (рис. 4, в), NAcc (рис. 4, г), PVN (рис. 4, д), HT (рис. 4, е) и VTA (рис. 4, ж).

Кроме того, после двух недель потребления никотина количество мРНК *chrna7* в мозге контрольных крыс значительно снизилось до уровней, наблюдаемых в HPC ПГ крыс (рис. 3, з, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 7,945$, $p = 0,0124$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0103$, тест Тьюки) и PFC (рис. 3, и, ANOVA Группа × Никотин $F(1, 16) = 9,55$, $p = 0,00702$; контроль по сравнению с «контроль + никотин», $p = 0,0156$, тест Тьюки). В то же время в мозге ПГ крыс потребление никотина не вызывало изменений в уровнях мРНК *chrna7* по сравнению с интактными ПГ крысами (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Факторы внешней среды оказывают существенное влияние на развивающийся организм. Условия формирования отдельных органов и тканей плода передают информацию об условиях дальнейшей жизнедеятельности [25–27]. Нормальное протекание беременности подразумевает высокую эффективность поступления энергетических субстратов, необходимых для интенсивных процессов пролиферации, миграции и образования связей между клетками мозга [28], а также ограничение поступления стероидных гормонов до поздних сроков беременности, когда глюкокортикоиды вовлекаются в такие процессы, как терминальная дифференцировка нейрональных клеток и созревание лёгких [29–32]. Ограничение кислородного снабжения эмбриона вызывает существенное нарушение метаболизма, ведя к замедлению развития [25–27, 33, 34], в то время как избыточное поступление глюкокортикоидов способно нарушать формирование адекватного профиля тканеспецифической экспрессии, сохраняющейся на всю жизнь на эпигенетическом уровне [16, 17, 35, 36].

Гипоксия неизбежно сопровождается снижением аэробного энергетического метаболизма и приводит к снижению продукции АТФ, необходимого в том числе для синтеза ацетилхолина на фоне перехода клеток на анаэробный метаболизм, что регулируется гипоксия-индуцируемым фактором-1 (HIF1) [37–40]. Однако степени выраженности последствий гипоксии и стресса матери могут существенно отличаться в зависимости от времени воздействия на развивающийся мозг [12]. Так, при предъявлении ПГ на 14–16 сутки эмбрионального развития мы не обнаружили существенных изменений в активности как ХАТ, так и АХЭ, что, как следствие, не привело и к изменениям концентрации ацетилхолина в развивающемся эмбриональном и раннем постнатальном мозге крыс, несмотря на то что ранее нами и другими исследователями был подтверждён факт интенсификации гипоксия-зависимого сигналинга как во время эмбриогенеза, так и в постнатальном периоде [26, 41–45]. При этом на ранних этапах предъявления гипоксических эпизодов мы показали снижение транскрипции *chrna4* (e15) и, вероятно, глюкокортикоид-зависимое увеличение транскрипции *chrna7* (e15, e16) [11, 19]. В этот период развития мозга уже сформированы его структуры, обеспечивающие выброс ацетилхолина [12, 46], что может способствовать повышению устойчивости ацетилхолин-производящих нейронов к внешним стрессорам, однако ещё только начинается формирование рецептирующих ацетилхолин ГАМК-ергических

нейронов стриатума, а также нейронов НРС, префронтальной коры и AMG – корковых структур, регулирующих активность стриатума по отношению к выбросу дофамина VTA [12, 14, 47]. Как следствие, именно в этих структурах мозга наблюдаются наиболее яркие нарушения экспрессии ацетилхолиновых рецепторов, сохраняющиеся во взрослом мозге. Эти нарушения можно рассматривать либо как причину, либо как компенсаторную реакцию на повышенную возбудимость клеток головного мозга, о которой сообщают другие авторы [48].

Ранее нами было показано, что ПГ вызывает пожизненные изменения экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в НРС и префронтальной коре, что сопровождается снижением глюкокортикоид-зависимой транскрипции и нарушением глюкокортикоидной отрицательной обратной связи [11, 16, 17]. Более того, альфа-7-субъединица ацетилхолинового рецептора была идентифицирована как мишень транскрипционной активности глюкокортикоидных рецепторов [19, 49], а снижение экспрессии мРНК и белка CHRNA7 в результате ПГ выявлено нами именно в гиппокампе и префронтальной коре. Эти глутаматергические структуры мозга активируют ГАМК-ергические нейроны стриатума, что сопровождается усилением выброса дофамина нейронами VTA и вызывает эффект, известный как внутреннее подкрепление [50–52]. Снижение эффективности выброса глутамата из-за снижения экспрессии *chrna4* и *chrna7* в префронтальной коре и *chrna7* в НРС, так же как и снижение экспрессии *chrna4* в стриатуме взрослых крыс в результате ПГ, может объяснять описанную нами ранее склонность этих животных к потреблению никотина и выраженный синдром отмены [10, 11]. Более того, для нейронов AMG показано опосредованное ингибирование потенциалов действия в клетках вентрального стриатума [53, 54]. При этом в AMG нами не было показано изменений экспрессии *chrna4* и *chrna7*, что также может вносить вклад в несбалансированную активность лимбической системы в результате ПГ. И наконец, гипоталамические нейроны способны к усилению стимуляции дофаминовых нейронов VTA [55], однако в них также снижена относительная экспрессия *chrna4*.

В клинической практике хорошо известен процесс выработки резистентности к никотину, определяющей развитие зависимости от дальнейшего потребления. Известно, что одним из механизмов такой резистентности является снижение экспрессии ацетилхолиновых рецепторов, в том числе альфа-4- и альфа-7-субъединиц [56–61]. Интересно, что через неделю вынужденного потребления никотина снижение экспрессии *chrna4*

(НРС, PFC, NAcc, HT) и *chrna7* (НРС, PFC) было выявлено только у контрольных животных, в то время как изначально низкая экспрессия этих генов в мозге ПГ крыс оставалась на неизменно низком уровне.

Таким образом, ПГ не оказывает влияния на активность синтеза и деградации ацетилхолина в развивающемся мозге, но вызывает существенные нарушения экспрессии альфа-4- и альфа-7-субъединиц ацетилхолиновых рецепторов в структурах лимбической системы крыс, что может лежать в основе ранее показанной склонности к потреблению никотина и выраженного абстинентного синдрома при отмене.

Вклад авторов. О.В. Ветровой – концепция и руководство работой; О.В. Ветровой, С.С. Потапова, В.А. Стратиллов, Е.И. Тюлькова – проведение экспериментов; О.В. Ветровой, С.С. Потапова, В.А. Стра-

тилов, Е.И. Тюлькова – обсуждение результатов исследования; О.В. Ветровой и В.А. Стратиллов – написание текста; Е.И. Тюлькова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00003).

Благодарности. Авторы глубоко признательны Елене Аксеновой за прекрасную техническую помощь в экспериментах на животных.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эксперименты на животных проводились в соответствии с «Методическими указаниями по проведению исследований на животных». Протокол исследования рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Института физиологии им. И.П. Павлова (протокол № 08/02 от 02.08.2022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO global report on trends in prevalence of tobacco use 2000-2025, fourth edition, accessed October 27, 2023, URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240039322>.
2. Mineur, Y. S., and Picciotto, M. R. (2008) Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 323-33, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.010>.
3. Gorwood, P., Le Strat, Y., and Ramoz, N. (2017). Genetics of addictive behavior: the example of nicotine dependence, *Dialog. Clin. Neurosci.*, **19**, 237-245, <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.3/pgorwood>.
4. Nestler, E. J. (2014) Epigenetic mechanisms of drug addiction, *Neuropharmacology*, **76**, 259-268, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.004>.
5. Muenstermann, C., and Clemens, K. J. (2024) Epigenetic mechanisms of nicotine dependence, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **156**, 105505, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105505>.
6. Reynaert, M. L., Marrocco, J., Gatta, E., Mairesse, J., Van Camp, G., Fagioli, F., Maccari, S., Nicoletti, F., and Morley-Fletcher, S. (2015) A self-medication hypothesis for increased vulnerability to drug abuse in prenatally restraint stressed rats, *Adv. Neurobiol.*, **10**, 101-120, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1372-5_6.
7. Pastor, V., Antonelli, M. C., and Pallarés, M. E. (2016) Unravelling the link between prenatal stress, dopamine and substance use disorder, *Neurotox. Res.*, **31**, 169-186, <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9674-9>.
8. Said, N., Lakehayli, S., el Khachibi, M., el Ouahli, M., Nadifi, S., Hakkou, F., and Tazi, A. (2015) Prenatal stress induces vulnerability to nicotine addiction and alters D2 receptors' expression in the nucleus accumbens in adult rats, *Neuroscience*, **304**, 279-285, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.029>.
9. Stratilov, V. A., Tyulkova, E. I., and Vetrovoy, O. V. (2020) Prenatal stress as a factor of the development of addictive states, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **56**, 471-490, <https://doi.org/10.1134/S0022093020060010>.
10. Stratilov, V. A., Vetrovoy, O. V., and Tyulkova, E. I. (2022) Prenatal hypoxia affects nicotine consumption and withdrawal in adult rats via impairment of the glutamate system in the brain, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 4550-4561, <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02866-8>.
11. Stratilov, V., Vetrovoy, O., Potapova, S., and Tyulkova, E. (2024) The prenatal hypoxic pathology associated with maternal stress predisposes to dysregulated expression of the *chrna7* gene and the subsequent development of nicotine addiction in adult offspring, *Neuroendocrinology*, **114**, 423-438, <https://doi.org/10.1159/000536214>.
12. Golan, H., and Huleihel, M. (2006) The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models, *Dev. Sci.*, **9**, 338-349, <https://doi.org/10.1111/j.1467-7687.2006.00498.x>.
13. Prestoz, L., Jaber, M., and Gaillard, A. (2012) Dopaminergic axon guidance: which makes what? *Front. Cell. Neurosci.*, **6**, 32, <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00032>.
14. Bayer, S. A. (1980) Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life, *J. Comp. Neurol.*, **190**, 115-134, <https://doi.org/10.1002/cne.901900108>.
15. Tsuji, M., Coq, J. O., Ogawa, Y., Yamamoto, Y., and Ohshima, M. (2018) A rat model of mild intrauterine hypoperfusion with microcoil stenosis, *J. Vis. Exp.*, **7**, 56723, <https://doi.org/10.3791/56723>.

16. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Lomert, E., and 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>.
17. Vetrovoy, O., Tyulkova, E., Stratilov, V., Baranova, K., Nimiritsky, P., Makarevich, P., and Rybnikova, E. (2021) Long-term effects of prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats, *Dev. Neurosci.*, **42**, 145-158, <https://doi.org/10.1159/000512223>.
18. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Nimiritsky, P., Makarevich, P., and Tyulkova, E. (2021) Prenatal hypoxia induces premature aging accompanied by impaired function of the glutamatergic system in rat hippocampus, *Neurochem. Res.*, **46**, 550-563, <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03191-z>.
19. Carrasco-Serrano, C., and Criado, M. (2004) Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1, *FEBS Lett.*, **566**, 247-250, <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.049>.
20. Gibson, G. E., and Blass, J. P. (1976) Impaired synthesis of acetylcholine in brain accompanying mild hypoxia and hypoglycemia, *J. Neurochem.*, **27**, 37-42, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1976.tb01540.x>.
21. Gibson, G. E., Peterson, C., and Sansone, J. (1981) Decreases in amino acids and acetylcholine metabolism during hypoxia, *J. Neurochem.*, **37**, 192-201, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb05308.x>.
22. López-Pérez, S. J., Morales-Villagrán, A., Ventura-Valenzuela, J., and Medina-Ceja, L. (2012) Short- and long-term changes in extracellular glutamate and acetylcholine concentrations in the rat hippocampus following hypoxia, *Neurochem. Int.*, **61**, 258-265, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.03.009>.
23. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010) Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.*, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
24. Cramer, C. P., Thiels, E., and Alberts, J. R. (1990) Weaning in rats: I. Maternal behavior, *Dev. Psychobiol.*, **23**, 479-493, <https://doi.org/10.1002/dev.420230604>.
25. Ducsay, C. A., Goyal, R., Pearce, W. J., Wilson, S., Hu, X. Q., and Zhang, L. (2018) Gestational hypoxia and developmental plasticity, *Physiol. Rev.*, **98**, 1241-1334, <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2017>.
26. Nalivaeva, N. N., Turner, A. J., and Zhuravin, I. A. (2018) Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration, *Front. Neurosci.*, **12**, 825, <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00825>.
27. Piešová, M., and Mach, M. (2020) Impact of perinatal hypoxia on the developing brain, *Physiol. Res.*, **69**, 199-213, <https://doi.org/10.33549/physiolres.934198>.
28. Erecinska, M., Cherian, S., and Silver, I. A. (2004). Energy metabolism in mammalian brain during development, *Prog. Neurobiol.*, **73**, 397-445, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.06.003>.
29. Pofi, R., and Tomlinson, J. W. (2020) Glucocorticoids in pregnancy, *Obstet. Med.*, **13**, 62-69, <https://doi.org/10.1177/1753495X19847832>.
30. Grier, D. G., and Halliday, H. L. (2004) Effects of glucocorticoids on fetal and neonatal lung development, *Treat. Respir. Med.*, **3**, 295-306, <https://doi.org/10.2165/00151829-200403050-00004>.
31. Tsarli, M. A., Rudine, A., Kendall, N., Pratt, M. O., Krall, R., Thiels, E., DeFranco, D. B., and Monaghan, A. P. (2017) Antenatal dexamethasone exposure differentially affects distinct cortical neural progenitor cells and triggers long-term changes in murine cerebral architecture and behavior, *Transl. Psychiatry*, **7**, e1153, <https://doi.org/10.1038/tp.2017.65>.
32. Odaka, H., Adachi, N., and Numakawa, T. (2017) Impact of glucocorticoid on neurogenesis, *Neural Regen. Res.*, **12**, 1028-1035, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.211174>.
33. Barrett, R. D., Bennet, L., Davidson, J., Dean, J. M., George, S., Emerald, B. S., and Gunn, A. J. (2007) Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain, *Birth Defects Res. C Embryo Today*, **81**, 163-176, <https://doi.org/10.1002/bdrc.20095>.
34. Wang, B., Zeng, H., Liu, J., and Sun, M. (2021) Effects of prenatal hypoxia on nervous system development and related diseases, *Front. Neurosci.*, **25**, 755554, <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.755554>.
35. Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M. J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior, *Nat. Neurosci.*, **7**, 847-854, <https://doi.org/10.1038/nn1276>.
36. Abul, M., Al-Bader, M. D., and Mouihate, A. (2022) Prenatal activation of glucocorticoid receptors induces memory impairment in a sex-dependent manner: role of cyclooxygenase-2, *Mol. Neurobiol.*, **59**, 3767-3777, <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02820-8>.
37. Goda, N., and Kanai, M. (2012) Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism, *Int. J. Hematol.*, **95**, 457-463, <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1069-y>.
38. Watts, M. E., Pocock, R., and Claudianos, C. (2018) Brain energy and oxygen metabolism: emerging role in normal function and disease, *Front. Mol. Neurosci.*, **11**, 216, <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00216>.

39. Vetrovoy, O. V., Rybnikova, E. A., and Samoilov, M. O. (2017) Cerebral mechanisms of hypoxic/ischemic postconditioning, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 392-400, <https://doi.org/10.1134/S000629791703018X>.
40. Sha, D., Jin, H., Kopke, R. D., and Wu, J. Y. (2004) Choline acetyltransferase: regulation and coupling with protein kinase and vesicular acetylcholine transporter on synaptic vesicles, *Neurochem. Res.*, **29**, 199-207, <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000010449.05927.f9>.
41. Vetrovoy, O. V., Nimiritsky, P. P., Tyulkova, E. I., and Rybnikova, E. A. (2020) The content and activity of hypoxia-inducible factor HIF1 α increased in the hippocampus of newborn rats that were subjected to prenatal hypoxia on days 14-16 of embryogenesis, *Neurochem. J.*, **14**, 286-289, <https://doi.org/10.1134/S1819712420030125>.
42. Potapova, S. S., Zachepilo, T. G., Stratilov, V. A., Tyulkova, E. I., and Vetrovoy, O. V. (2023) Prenatal hypoxia causes an increase in the content and transcriptional activity of the hypoxia-inducible factor HIF1 α in the hippocampus of adult and aging rats, *Neurochem. J.*, **17**, 751-754, <https://doi.org/10.1134/S1819712423330012>.
43. Vetrovoy, O., Stratilov, V., Potapova, S., and Tyulkova, E. (2023) Oxidative stress accompanies HIF1-dependent impairment of glucose metabolism in the hippocampus of adult rats survived prenatal severe hypoxia, *Dev. Neurosci.*, <https://doi.org/10.1159/000535326>.
44. Trollmann, R., and Gassmann, M. (2009) The role of hypoxia-inducible transcription factors in the hypoxic neonatal brain, *Brain Dev.*, **31**, 503-509, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.03.007>.
45. Gonzalez-Rodriguez, P. J., Xiong, F., Li, Y., Zhou, J., and Zhang, L. (2014) Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors, *Neurobiol. Dis.*, **65**, 172-179, <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.020>.
46. Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C. C., and Manhães, A. C. (2011) Developmental aspects of the cholinergic system, *Behav. Brain Res.*, **221**, 367-378, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.049>.
47. Van Eden, C. G., Kros, J. M., and Uylings, H. B. (1990) The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas, *Prog. Brain Res.*, **85**, 169-183, [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62680-1](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62680-1).
48. Amakhin, D. V., Soboleva, E. B., Postnikova, T. Y., Tumanova, N. L., Dubrovskaya, N. M., Kalinina, D. S., Vasilev, D. S., and Zaitsev, A. V. (2022) Maternal hypoxia increases the excitability of neurons in the entorhinal cortex and dorsal hippocampus of rat offspring, *Front. Neurosci.*, **16**, 867120, <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.867120>.
49. Hunter, R. G. (2012) Stress and the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor, *Curr. Drug Targets*, **13**, 607-612, <https://doi.org/10.2174/138945012800398982>.
50. Cho, Y. H., and Jeantet, Y. (2010) Differential involvement of prefrontal cortex, striatum, and hippocampus in DRL performance in mice, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **93**, 85-91, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.08.007>.
51. Wang, J. X., Kurth-Nelson, Z., Kumaran, D., Tirumala, D., Soyer, H., Leibo, J. Z., Hassabis, D., and Botvinick, M. (2018) Prefrontal cortex as a meta-reinforcement learning system, *Nat. Neurosci.*, **21**, 860-868, <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0147-8>.
52. Ballard, I. C., Wagner, A. D., and McClure, S. M. (2019) Hippocampal pattern separation supports reinforcement learning, *Nat. Commun.*, **10**, 1073, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08998-1>.
53. Costa, V. D., Dal Monte, O., Lucas, D. R., Murray, E. A., and Averbeck, B. B. (2016) Amygdala and ventral striatum make distinct contributions to reinforcement learning, *Neuron*, **92**, 505-517, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.025>.
54. Everitt, B. J., Parkinson, J. A., Olmstead, M. C., Arroyo, M., Robledo, P., and Robbins, T. W. (1999) Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems, *Ann. N Y Acad. Sci.*, **877**, 412-438, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb09280.x>.
55. Douma, E. H., and de Kloet, E. R. (2020) Stress-induced plasticity and functioning of ventral tegmental dopamine neurons, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **108**, 48-77, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.015>.
56. Hutchison, K. E., Allen, D. L., Filbey, F. M., Jepson, C., Lerman, C., Benowitz, N. L., Stitzel, J., Bryan, A., McGeary, J., and Haughey, H. M. (2007) CHRNA4 and tobacco dependence: from gene regulation to treatment outcome, *Arch. Gen. Psychiatry*, **64**, 1078-1086, <https://doi.org/10.1001/archpsyc.64.9.1078>.
57. Mexal, S., Berger, R., Logel, J., Ross, R. G., Freedman, R., and Leonard, S. (2010) Differential regulation of $\alpha 7$ nicotinic receptor gene (CHRNA7) expression in schizophrenic smokers, *J. Mol. Neurosci.*, **40**, 185-195, <https://doi.org/10.1007/s12031-009-9233-4>.
58. Liu, X. (2014) Effects of blockade of $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors on cue-induced reinstatement of nicotine-seeking behaviour in rats, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **17**, 105-116, <https://doi.org/10.1017/S1461145713000874>.
59. O'Connor, E. C., Parker, D., Rollema, H., and Mead, A. N. (2010) The $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine-receptor partial agonist varenicline inhibits both nicotine self-administration following repeated dosing and reinstatement of nicotine seeking in rats, *Psychopharmacology*, **208**, 365-376, <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1739-5>.

60. McGranahan, T. M., Patzlaff, N. E., Grady, S. R., Heinemann, S. F., and Booker, T. K. (2011) $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic neurons mediate nicotine reward and anxiety relief, *J. Neurosci.*, **31**, 10891-10902, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0937-11.2011>.
61. Ramachandran, N. L., and Liu, X. (2019) Targeting the $\alpha 4\beta 2$ - and $\alpha 7$ -subtypes of nicotinic acetylcholine receptors for smoking cessation medication development, *J. Addict. Res. Ther.*, **10**, 381.

PRENATAL HYPOXIA PREDISPOSES TO IMPAIRED EXPRESSION OF THE *chrna4* AND *chrna7* GENES IN ADULT RATS WITHOUT AFFECTING ACETYLCHOLINE METABOLISM DURING EMBRYONIC DEVELOPMENT

O. V. Vetrovoy*, S. S. Potapova, V. A. Stratilov, and E. I. Tyulkova

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,
199034 Saint Petersburg, Russia; e-mail: vov210292@yandex.ru*

Previous studies have shown that the combined effect of fetal hypoxia and maternal stress hormones predetermines tendency to nicotine addiction in adulthood. This study in rats aimed to investigate the effect of prenatal severe hypoxia (PSH) on acetylcholine metabolism in the developing brain, as well as on expression of acetylcholine receptors *chrna4* and *chrna7* in both the developing brain and adult brain structures following nicotine consumption. In the developing brain of PSH rats, no changes were found in the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) or disturbances in the acetylcholine levels. However, decreased *chrna4* expression was detected on the day 15 of pregnancy, while elevation in the *chrna7* expression was observed on the days 15 and 16 of embryogenesis. In adulthood, the consequences of PSH were manifested as decreased expression of *chrna4* in the medial prefrontal cortex (PFC), nucleus accumbens (NAcc), and hypothalamus (HT), decreased expression of *chrna7* in the PFC and hippocampus (HPC). Whereas, nicotine consumption did not decrease the expression levels of *chrna4* and *chrna7* compared to the control group in the adult PSH rats. Thus, prenatal hypoxia predisposes to impaired expression of the *chrna4* and *chrna7* genes in adult rats without affecting acetylcholine metabolism during embryonic development.

Keywords: rat, brain development, prenatal hypoxia, acetylcholine metabolism, *chrna4*, *chrna7*