

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И РЕПРОДУКТОЛОГИИ ИМ. Д.О. ОТТА»

На правах рукописи

Милютина Юлия Павловна

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА СИСТЕМУ
«МАТЬ-ПЛАЦЕНТА-ПЛОД» И РАЗВИТИЕ МОЗГА ПОТОМСТВА

1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:

З.д.н. РФ, доктор биологических наук, профессор
Арутюнян Александр Варганович

Санкт-Петербург, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	18
1.1. Современные представления о нейротоксических эффектах гипергомоцистеинемии	18
1.2. Пренатальная ГГЦ и ее последствия, связанные с нарушением развития плаценты, нервной системы плода и новорожденного	24
1.3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии на процессы эпигенетической регуляции в мозге плода и плаценте	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	84
3.1. Влияние модели гипергомоцистеинемии на показатели репродуктивной и когнитивной функций взрослых половозрелых самок крыс	84
3.1.1. Динамика содержания гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста в норме и при однократной метиониновой нагрузке	84
3.1.2. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке.....	85
3.1.3. Содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса и гиппокампе самок крыс разного возраста в норме и при хронической метиониновой нагрузке	86
3.1.4. Исследование поведенческой активности и когнитивного статуса у половозрелых самок крыс после хронической метиониновой нагрузки	93
3.1.5. Показатели окислительного стресса в норме и при метиониновой нагрузке у половозрелых самок крыс в сыворотке крови и гипоталамусе.....	96
3.1.6. Факторный анализ взаимосвязи содержания биогенных аминов и показателей окислительного стресса в гипоталамусе с возрастом и уровнем гомоцистеина в сыворотке крови	100
3.2. Влияние хронической гипергомоцистеинемии на беременных самок крыс.....	102

3.2.1. Динамика содержания гомоцистеина в сыворотке крови беременных самок крыс в норме и при однократной метиониновой нагрузке.....	102
3.2.2. Динамика содержания гомоцистеина в различных структурах мозга беременных самок крыс в норме и при однократной метиониновой нагрузке.....	103
3.2.3. Содержание нейротрофинов и DNMT1 в структурах мозга беременных самок крыс	104
3.2.4. Содержание S-аденозилгомоцистеина и S-аденозилметионина в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии	107
3.2.5. Содержание цитокинов в сыворотке крови и плаценте беременных самок крыс при гипергомоцистеинемии	108
3.2.6. Особенности изменения показателей окислительного стресса в сыворотке крови, мозге и плаценте беременных самок крыс при гипергомоцистеинемии	112
3.2.7. Содержание маркеров апоптоза в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии	116
3.2.8. Особенности морфологии плаценты на 14-ый и 20-ый день беременности при гипергомоцистеинемии	119
3.2.9. Содержание и экспрессия нейротрофинов и их рецепторов в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии	123
3.2.10. Активность матриксной металлопротеиназы-2 и содержание VEGFA в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии	127
3.2.11. Содержание NRG1 в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии	131
3.2.12. Активность моноаминоксидазы в плаценте на 20-й день беременности при гипергомоцистеинемии	132
3.3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии во время беременности на развитие плода.....	133
3.3.1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови, ткани мозга и амниотической жидкости плода при гипергомоцистеинемии матери	133

3.3.2. Морфометрические данные плодов и плаценты на фоне пренатальной гипергомоцистеинемии	135
3.3.3. Содержание цитокинов в ткани мозга плодов при пренатальной гипергомоцистеинемии	136
3.3.4. Изменение показателей окислительного стресса в сыворотке крови и ткани мозга плодов при пренатальной гипергомоцистеинемии.....	136
3.3.5. Содержание маркеров апоптоза в ткани мозга плода при пренатальной гипергомоцистеинемии	139
3.3.6. Содержание и экспрессия нейротрофинов в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии.....	141
3.3.7. Активность матриксной металлопротеиназы-2 в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии.....	143
3.3.8. Содержание NRG1 в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии	144
3.3.9. Содержание биогенных аминов и их внутривезикулярных транспортеров в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии.....	144
3.4. Влияние перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии на нервную систему потомства в раннем и позднем постнатальном периоде развития	146
3.4.1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови и мозге крыс разного возраста после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии.....	146
3.4.2. Изменений показателей окислительного стресса в сыворотке крови и мозге потомства в постнатальном периоде после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	149
3.4.3. Содержание цитокинов в гиппокампе и коре потомства в раннем онтогенезе после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии.....	151
3.4.4. Изменение маркеров апоптоза в гиппокампе и коре потомства после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	154
3.4.5. Количество нейрональных и глиальных клеток в гиппокампе потомства после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	158

3.4.6. Содержание нейротрофинов в коре и гиппокампе потомства в раннем онтогенезе после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии.....	160
3.4.7. Показатели окислительного стресса в сыворотке крови самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	162
3.4.8. Содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса и гиппокампе половозрелых самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	163
3.4.9. Исследование поведенческой активности и когнитивного статуса у половозрелых самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии	166
3.5. Сравнительная характеристика влияния на половозрелых самок крыс хронической гипергомоцистеинемии взрослых животных и, перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии.....	169
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	175
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	248
ВЫВОДЫ	253
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	255
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	256
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	258

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность.

В настоящее время широко распространена гипотеза о том, что неблагоприятные условия развития плода во время беременности могут служить фактором риска развития ряда комплексных неинфекционных заболеваний в постнатальном периоде. Предполагается, что предрасположенность к некоторым заболеваниям закладывается еще в период эмбрионального развития, эта теория получила название «первопричин здоровья и болезней на ранних периодах развития» (англ. Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD) или пренатального программирования (программирования плода, англ. fetal programming). Хотя точные биохимические механизмы, лежащие в ее основе, пока неизвестны, существует корреляция между внутриутробным стрессом и неблагоприятными последствиями для потомства при ряде заболеваний, таких как метаболическая дисфункция, сердечно-сосудистые заболевания и рак [Ojeda ML et al., 2021]. В настоящее время, также используют термин «программирование развития» [Reynolds LP et al., 2019], поскольку из данной концепции также следует, что факторы, влияющие на рост и развитие плода, приводят к долгосрочным изменениям в структуре и/или функции органов в более позднем возрасте [Fernandez-Twinn DS et al., 2015; Ojeda ML et al., 2021]. Таким образом, в позднем постнатальном периоде может развиваться ряд хронических патологий, включая метаболический синдром, нарушение иммунитета, нейрогенеза, репродуктивной и когнитивных функций [Fedorchak AV, Miller MW, 2019; Reynolds LP et al., 2019]. Известно, что наличие стрессоров во время беременности, таких как избыток или недостаток потребления питательных веществ, эндокринные материнские изменения, такие как резистентность к инсулину, возраст матери, генетические дефекты матери или эмбриона, стресс окружающей среды, включая воздействия ксенобиотиков, а также стрессовые социальные факторы наподобие употребления алкоголя, могут серьезно повлиять на постнатальное развитие плода [Reynolds LP et al., 2019].

Несмотря на наличие сведений о том, что материнская гипергомоцистеинемия (ГГЦ) может играть существенную роль в развитии таких осложнений беременности, как преэклампсия (ПЭ), задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР), а также нарушений развития ЦНС плода (врожденные дефекты нервной трубки (ДНТ) и др.) [Hague WM, 2003; Chen Y-Y et al., 2018; Gaiday AN et al., 2018; Dai C et al., 2021b; Memon SI, Acharya NS, 2022; Thakur P, Bhalerao A, 2023], механизмы, которые могут вызывать последствия подобной патологии у потомства, особенно в отдаленном будущем [Baydas G et al., 2007b; Blaise SA et al., 2007; Koz ST et al., 2010; D'Souza SW, Glazier JD, 2022], остаются недостаточно изученными. Актуальность изучения негативного воздействия ГГЦ на организм матери и плода подчеркивается многообразием причин развития данной патологии [Kim J et al., 2018], а также фактом достаточно широкой распространенности ГГЦ среди европейского населения (около 10%) [de Bree A et al., 2005].

Известно, что ГЦ относится к соединениям, обладающим нейротоксическими свойствами [Troen AM, 2005; Boldyrev AA, 2009; Poddar R, Paul S, 2013; Curro M et al., 2014]. При этом установлена возможность использования нейрохимических показателей, таких как содержание НА, 5-ОТ и ДА и их метаболитов в различных областях мозга, в качестве универсальных биохимических индикаторов нейротоксичности [Del Pino J et al., 2011], что предполагает перспективу их изучения также при ее оценке в период развития нервной системы в пренатальном и постнатальном периоде развития в условиях воздействия неблагоприятных факторов. Нарушения метаболизма нейромедиаторов, в том числе биогенных аминов, которым придают ключевое значение в механизмах, определяющих изменения в нейроэндокринной системе, ведущих, например, к выключению репродуктивной функции, носят неспецифический характер [Арутюнян А.В., и др., 2003], и подобные эффекты можно наблюдать при воздействии ряда нейротоксических ксенобиотиков [Arutjunyan AV et al., 2005; Arutyunyan AV, Korenevskii AV, 2014; Korenevskii AV, Arutyunyan AV, 2016]. Однако, особенности зависимости метаболизма биогенных аминов от эффективности работы метионинового цикла [Zhu BT, 2002; Lee ES et al., 2005; Miller AL, 2008; Shafqat N

et al., 2013; Kumar P et al., 2017; Gao J et al., 2018a; Becker M et al., 2023] указывают на возможность выявления специфических прямых нейротоксических эффектов воздействия ГГЦ на моноаминергические системы и выполняемые ими функции.

В настоящее время в исследованиях с использованием экспериментальных моделей изучается преимущественно влияние хронической ГГЦ на головной мозг взрослых животных. Показаны его различные нейрохимические и морфологические нарушения, что рассматривается как причины, лежащие в основе ухудшения когнитивных функций [Streck EL et al., 2002; Streck EL et al., 2004; Matte C et al., 2009a; Scherer EB et al., 2011; da Cunha AA et al., 2012a; Moreira DS et al., 2018; Dos Santos TM et al., 2019a; Wyse ATS et al., 2020; Dos Santos TM et al., 2021], однако, практически отсутствуют данные по влиянию ГГЦ на репродуктивную функцию. Исследуется воздействие ГГЦ на нервные и сосудистые клетки головного мозга, приводящее к нейродегенерации, нарушению гематоэнцефалического барьера и нейроваскулярной дисфункции [Kalani A et al., 2014b; Kamat PK et al., 2015c; Kumar M, Sandhir R, 2022].

Гораздо меньше исследований посвящено влиянию ГГЦ в пренатальный период на развитие мозга потомства и контролируемые им функции. На модели экспериментальной ГГЦ у беременных самок крыс показано негативное воздействие ГГЦ на раннее физическое развитие потомства и формирование сенсомоторных рефлексов, уровень локомоторной активности и тревожности [Gerasimova E et al., 2017; Yakovleva OV et al., 2018; Яковлева ОВ et al., 2019; Yakovleva O et al., 2020].

Вместе с тем, воздействию повышенного уровня ГЦ на плаценту, как фактору, способному вносить вклад в обнаруженные нарушения развития мозга и снижение когнитивных способностей у потомства матерей с ГГЦ, внимания практически не уделялось. В настоящее время выдвинуто несколько интересных гипотез, которые, впрочем, требуют дальнейшего подтверждения. В частности, предполагается, что повышенный уровень ГЦ в крови матери путем индукции ОС и изменения экспрессии ангиогенных факторов в плаценте может приводить к повышению уровня апоптоза и нарушению процессов плацентарного ангиогенеза, что в

конечном итоге выражается в нарушениях плацентарных функций при таких патологиях, как ПЭ [Kasture VV et al., 2018]. Также предполагается, что материнская ГГЦ посредством изменения степени метилирования генов NTs BDNF и NGF в плаценте может влиять на уровень экспрессии белков BDNF и NGF, играющих в плаценте роль трофических и проангиогенных факторов, что, в свою очередь, может приводить к плацентарным нарушениям, влияющим на рост и развитие плода [Dhobale MV et al., 2013; Dhobale M, 2014; 2017]. Поскольку, по крайней мере в отношении BDNF, установлена возможность их переноса от матери к плоду, нейротрофические факторы, поступающие с кровью от матери и/или синтезируемые в плаценте, могут участвовать в развитии плода [Sahay AS et al., 2017]. Воздействие ГГЦ на трансплацентарный перенос NTs и, возможно, ряда других факторов, связывающих плаценту и мозг плода в единую функциональную систему, может служить одним из важных механизмов задержки развития мозга плода при материнской ГГЦ.

Таким образом, остается неясным, посредством каких механизмов экспериментальная ГГЦ влияет на функциональные показатели в ткани мозга развивающегося плода, не определена роль плаценты в данном воздействии, а также отсутствует информация о том, приводит ли пренатальная ГГЦ к нарушению метаболизма биогенных аминов и других сигнальных молекул в различных структурах мозга в постнатальном периоде развития, и какие это может иметь последствия. Актуальность исследования обусловлена не только научной значимостью, но и практической необходимостью выявления, профилактики и лечения тех факторов, наличие которых во время беременности может приводить к стойким отдаленным негативным последствиям для развития нервной системы потомства.

Цель: выявить закономерности использования моделей хронического воздействия гипергомоцистеинемии на крыс различного возраста и пренатальной гипергомоцистеинемии и изучить молекулярные механизмы ее влияния на систему «мать-плацента-плод» и развитие мозга потомства.

Задачи:

1. Выявить особенности предложенных нами экспериментальных моделей хронической гипергомоцистеинемии взрослых животных и пренатальной гипергомоцистеинемии, вызванных введением метионина небеременным и беременным самкам крыс соответственно.

2. Оценить влияние экспериментальной гипергомоцистеинемии во время беременности на показатели окислительного стресса и апоптоза, уровень провоспалительных цитокинов, факторов роста и активность матриксной металлопротеиназы 2 в плаценте и мозге плодов.

3. Исследовать влияние метиониновой нагрузки на содержание норадреналина и везикулярного транспортера моноаминов (VMAT) в мозге плода, а также уровень удельной активности моноаминоксидазы в плаценте на 20-й день беременности

4. Исследовать влияние метиониновой нагрузки на особенности морфологии плаценты на 14-ый и 20-ый день беременности

5. Сопоставить особенности структурной организации гиппокампа и коры в раннем постнатальном периоде с показателями в них окислительного стресса и апоптоза, уровнем цитокинов и нейротрофинов после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии.

6. Сопоставить маркеры окислительного стресса и уровни биогенных аминов в гипоталамусе и гиппокампе самок крыс после перенесенной пренатальной и хронической гипергомоцистеинемии.

7. Исследовать влияние метиониновой нагрузки беременных крыс на показатели окислительного стресса в сыворотке крови, а также в мозге крысят на 1-й, 30-й и 90-й дни постнатального развития.

8. Проанализировать характер эстральных циклов и изучить поведенческие реакции крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию и хроническую метиониновую нагрузку в постнатальном периоде.

Научная новизна

В работе детально проанализирована динамика изменения уровня ГЦ в сыворотке крови и в ткани мозга при создании модели ГГЦ у взрослых животных с дозированным ежедневным пероральным введением метионина. Установленный факт повышения уровня ГЦ в сыворотке крови и мозге плода при введении метионина в период беременности явился основой разработки модели пренатальной ГГЦ. Впервые исследован ряд механизмов токсического воздействия ГГЦ в системе «плацента-плод», а также продемонстрирован характер отдаленных последствий в системе моноаминергической регуляции репродуктивной и когнитивной функций. При этом использован комплексный подход, включающий в себя анализ воздействия ГГЦ на небеременных и беременных крыс, плаценту, плод, а также потомство в раннем и позднем постнатальном периоде. Представлены экспериментальные доказательства того, что материнская ГГЦ оказывает воздействие на ряд проангиогенных и ростовых факторов в плаценте (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF и NGF), что может привести к недостаточному формированию плацентарной сосудистой сети, снижению транспорта кислорода и необходимых питательных веществ к плоду, и, как следствие, вносить дополнительный вклад в задержку и нарушения формирования мозга плода. Обнаруженное нарушение метаболизма метионина в плаценте при ГГЦ во время беременности, характеризующееся дисбалансом содержания SAM и SAH, может указывать на нарушение процессов метилирования в плаценте на фоне ГГЦ. Установлено, что эффекты ГГЦ варьируют в зависимости от отдела плаценты и срока ее развития. При этом впервые показано, что NTs в плаценте крыс и мозге плода являются непосредственной мишенью воздействия пренатальной ГГЦ, что подтверждается отсутствием изменения содержания их изоформ в коре и гиппокампе в ранний постнатальный период, при отсутствии повышенного содержания ГЦ. Обнаружено, что накопление про-форм NTs в плаценте в условиях ГГЦ связано преимущественно с нарушением их процессинга до зрелых форм, тогда как в мозге плода отмечено также увеличение экспрессии гена *bdnf*. Впервые продемонстрированы различия в развитии окислительного стресса и активации

апоптоза при ГГЦ в отдельных частях плаценты. Обнаруженное снижение активности МАО в плаценте и увеличение уровня VMAT в мозге плода при ГГЦ, указывают на нарушение обмена моноаминов в системе «плацента-плод». При анализе течения раннего постнатального периода получены результаты гистологического и биохимического исследования коры и гиппокампа, которые подтверждают гипотезу о том, что нейровоспаление и активация глии могут быть вовлечены в изменение их клеточного состава после ПГГЦ, и эти изменения могут быть связаны с когнитивными расстройствами в более позднем возрасте. Впервые показано изменение уровня биогенных аминов в гиппокампе и в структурах гипоталамуса, связанных с реализацией репродуктивной функции половозрелых самок крыс после ГГЦ и пренатальной ГГЦ. При этом продемонстрированы сходные физиологические эффекты воздействия на обеих моделях ГГЦ, что, однако, имеет существенные различия в нарушении их моноаминергической регуляции.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе выполнения работы получены принципиально новые экспериментальные данные, которые позволяют предложить концептуальную модель механизма воздействия фолат-независимой ГГЦ в системе «мать-плацента-плод», что указывает на необходимость контроля уровня ГЦ на этапе прегравидарной подготовки, установления точной причины его повышения и соответствующей коррекции, исключающей бесконтрольный прием препаратов фолиевой кислоты.

Полученные данные расширяют представления о фундаментальных биохимических механизмах токсического действия ГЦ на взрослый организм, а также раскрывают роль пренатальной ГГЦ и повреждения плаценты в нарушении развития нервной системы плода и потомства в постнатальной жизни, в частности, моноаминергической регуляции репродуктивной и когнитивной функций.

Методология исследования

Поставленные в работе задачи решены с помощью комплексного подхода исследования лабораторных животных в динамике двух поколений, с

использованием современных биохимических методов исследования, а также привлечением гистологических (микроскопия) и физиологических (поведенческих тестов) методов. Для разработки модели гипергомоцистеинемии оценивалась динамика уровня гомоцистеина в тканях самок крыс, их плодов и потомства при однократном и хроническом введении метионина в дозе 0,6 г/кг массы крысы. Для исследования уровня моноаминов использовали метод ВЭЖХ с электрохимическим детектированием, содержание белков определяли методом иммуноблоттинга, либо использовали иммуноферментный анализ. Экспрессия генов ростовых факторов и их рецепторов оценивалась с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Активность ферментов определяли с помощью использования специфических субстратов, для оценки активности матриксной металлопротеиназы-2 применяли метод зимографии.

Положения, выносимые на защиту

1. Хроническое ежедневное введение метионина небеременным и беременным самкам крыс, также как и его однократное введение, приводит к повышению уровня ГЦ в сыворотке крови. При беременности наблюдается также повышение содержания ГЦ в мозге плода. Метиониновая нагрузка индуцирует окислительный стресс, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов в сыворотке крови беременных крыс.

2. В структурах гипоталамуса и гиппокампе самок крыс при хронической ГГЦ отмечаются разнонаправленные сдвиги в уровне содержания биогенных аминов, нейротрофинов, ДНК-метилтрансферазной активности и окислительной модификации белков.

3. Следствием нарушения баланса проангиогенных и ростовых факторов в плаценте под влиянием ГГЦ является недостаточное развитие плацентарной сосудистой сети, что может привести к ее функциональным изменениям, в частности снижению поступления питательных веществ и кислорода от матери к плоду и быть одной из причин, наблюдаемых при материнской ГГЦ нарушений развития мозга плода и потомства.

4. Пренатальная гипергомоцистеинемия, вызванная метиониновой нагрузкой животных при беременности, приводит к развитию апоптотических и нейровоспалительных процессов в различных отделах мозга в раннем постнатальном периоде, которые могут быть вовлечены в изменение клеточного состава с последующим дисбалансом работы нейромедиаторных систем и нарушением когнитивной функции потомства.

Степень достоверности результатов и апробация работы

Достоверность и обоснованность научных положений определяется соответствием дизайна, поставленной цели и задачам исследования, достаточным объемом проведенных исследований, числом независимых экспериментов, выбором адекватных методических подходов, статистической достоверностью полученных данных, их объективным анализом и аргументацией. Результаты исследования представлены в рецензируемых научных журналах, входящих в РИНЦ и международные базы данных (Web of Sciences, Scopus, PubMed и др.).

В работу вошли исследования, выполненные при поддержке грантов РФФИ «Механизмы нарушения регуляции репродуктивной функции женского организма при гипергомоцистеинемии». (10-04-00749-а 2010-2012 гг.), «Гипергомоцистеинемия как фактор возрастных изменений гипоталамической регуляции репродуктивных циклов» (14-04-00776 А) (2014-2016); «Изучение нейротрофических факторов плаценты и мозга плодов при экспериментальной пренатальной гипергомоцистеинемии» (18-015-00099 А 2018-2020 гг.) и гранта РФФИ «Молекулярно-клеточные механизмы воздействия гипергомоцистеинемии матери на функциональное состояние плаценты и развитие нервной системы плода» (22-15-00393 2022-2024 гг.).

Результаты исследований были представлены на международных и отечественных мероприятиях: VIII Всероссийской конференции с международным участием, посвященная 220-летию со дня рождения акад. К.М. Бэра (Санкт-Петербург, 2012 г.); XXXVIII Международном конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, 2013 г.); Научно-практической конференции посвященной памяти академика В.В. Фролькиса (Киев, 2013г.);

Всероссийской конференции с международным участием «Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патологических состояний мозга» (Санкт-Петербург–Колтуши, 2014 г.); X юбилейной международной конференции «Окислительный стресс и свободнорадикальные патологии» (Пицунда, 2014 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы физиологии высшей нервной деятельности, сенсорных и висцеральных систем» (Санкт-Петербург - Колтуши, 2015 г.); XV Всероссийском Совещании с международным участием и VIII Школе по Эволюционной Физиологии (Санкт-Петербург, 2016 г.); Национальном конгрессе «Дискуссионные вопросы современного акушерства» (Санкт-Петербург, 2017 г.); VI международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2017 г.); ISN-ESN meeting (Paris, France, 2017); FENS regional meeting (Pécs, Hungary, 2017); 25th International "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference, (St.Petersburg, Russia, 2018); FENS Forum 2018 (Berlin, Germany, 2018); XXVI European Congress of Perinatal Medicine (St. Petersburg, 2018); II Объединенном научном форуме, VI Съезде физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки И Пептиды» (Сочи – Дагомыс, 2019 г.); 23rd ESN biennial meeting, (Milan, Italy 2019); FENS Regional meeting (Belgrade, Serbia, 2019); 3rd Nordic Neuroscience Meeting (Helsinki, Finland 2019); VII International symposium “Interaction of the nervous and immune systems in health and disease” (St. Petersburg, 2019); 2nd world congress on maternal fetal neonatal medicine (London, United Kingdom 2019); XIII Международном конгрессе по репродуктивной медицине (Москва, 2019 г.); FENS Virtual Forum of Neuroscience (Glasgow, 2020); ESN Mini-Conference «Molecular Mechanisms of Cognitive Impairment and Intellectual Disability» (2020); ESCI Virtual Meeting 2020; Global Summit on Neuroscience and Neuroimmunology (Paris, France, 2020); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2020 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Совещание по эволюционной физиологии имени академика Л.А. Орбели» (Санкт-Петербург, 2020 г.); Всероссийской конференции с международным участием

«Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии» (Казань, 2021г.); ESN virtual conference 2021; First ESN Advanced School «From Neurodegeneration to Neural Carcinogenesis: Mechanisms and Common Biologies» (Athens, Greece, 2021); International conference on neuro and brain disorders, 2021; IX Всероссийской конференции с международным участием «Клиническая нейрофизиология и нейрореабилитация» (Санкт-Петербург, 2021 г.); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология» (Санкт-Петербург, 2021 г.); V Всероссийской конференции с международным участием «Гемостаз, тромбоз и репродукция» (Санкт-Петербург, 2021 г.); Всероссийской с международным участием конференции Российского нейрохимического общества (Санкт-Петербург, 2022 г.); XXIV съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023 г.); XXI Межрегиональной научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Обмен веществ при адаптации и повреждении – Дни клинической лабораторной диагностики на Дону» (24 мая 2022 г.); Cluster Meeting of Gala Technology: 12th Annual World Congress of Neurotalk-2023, (Lisbon, Portugal, 2023)

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие в разработке концепции о ведущей роли плаценты в нарушении процессов формирования нервной системы плода и новорожденного при гипергомоцистеинемии матери, самостоятельно планировал эксперименты и выполнял биохимические исследования, а также участвовал в обработке данных, полученных с помощью гистологических и физиологических методов исследования, полностью осуществлял статистическую обработку всех полученных данных, участвовал в написании статей и неоднократно представлял результаты проведенных исследований на международных и российских конференциях и съездах.

Публикации

Представленный в работе материал в достаточном объеме изложен в 21 статье, из которых 20 статей опубликовано в научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 318 страницах и состоит из введения, обзора литературы, использованных материалов и методов исследования, полученных результатов экспериментов, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 765 источников. Работа содержит 10 таблиц и иллюстрирована 67 рисунками.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Современные представления о нейротоксических эффектах гипергомоцистеинемии

Содержание ГЦ в плазме крови здоровых людей составляет 10-12 мкМ, до пубертатного периода его уровень в крови детей, независимо от пола, равен примерно 5 мкМ, в дальнейшем он возрастает, достигая нормы, характерной для взрослых, которая у женщин несколько ниже, чем у мужчин. Гомоцистеин участвует в окислительно-восстановительных реакциях, легко окисляется в гомоцистеиновую кислоту (ГЦК), а также аккумулируется в крови в связанном с белками состоянии. Избыток ГЦ в крови (уровень содержания ГЦ свыше 15 мкМ), называемый гипергомоцистеинемией (ГГЦ), служит фактором риска развития различных патологических состояний организма. Принято считать, что повышение содержания ГЦ, наблюдаемое в диапазоне 15-30 мкМ относится к слабой ГГЦ, 30-100 мкМ ГЦ соответствует умеренной ГГЦ, а свыше 100 мкМ ГЦ характеризует ее тяжелую форму [Макацария А.Д. и др., 2005].

О нейротоксичности ГГЦ стало известно в конце прошлого столетия, когда появились первые экспериментальные работы о токсическом действии ГЦ и ГЦК на нейрональные клетки [Lipton SA et al., 1997; Parsons RB et al., 1998]. У животных, подвергнутых воздействию тяжелой ГГЦ, ослабевают проявления нервной пластичности; они отстают в росте и развитии, проявляют повышенную склонность к нейродегенерации, преждевременному старению и ранней смерти. Впоследствии были проведены многочисленные клинические исследования, в которых было установлено, что уровень ГЦ в крови и спинномозговой жидкости людей значительно повышен при тяжелых формах различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП) и старческие деменции [Regland B et al., 2004]. У этих же больных обнаруживается, как правило, дефицит витаминов группы В (фолатов, витамина В12 и/или витамина В6), тесно связанных с метаболизмом ГЦ, что также как ГГЦ способствует развитию когнитивных расстройств, причем повышенный уровень содержания ГЦ, является более показательным, по сравнению с витаминами предиктором

психических нарушений [Isobe C et al., 2005]. Связь между ГЦ и заболеваниями НС была впервые описана у пациентов с выраженным дефицитом цистатионин бета-синтазы (CBS), у которых отмечались умственное отставание, церебральная атрофия и судороги [Sachdev PS et al., 2002]. Во многих исследованиях представлены данные о реметилировании ГЦ в метионин, катализируемый метионин синтазой с участием витамина В12, донатором метильных групп в которой служит 5-метилтетрагидрофолат, но в то же самое время подчеркивается, что альтернативный путь реметилирования ГЦ при участии бетаин-гомоцистеин метилтрансферазы в мозгу отсутствует. Установлено, что в норме нейроны способны накапливать синтезируемый ГЦ [Ho PI et al., 2003], но его концентрация заметно возрастает в мозгу и СМЖ при таких неврологических заболеваниях, как БА и БП [Eto K et al., 2002].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе нейродегенеративных процессов, обусловленных ГГЦ, связаны с нейрональной гибелью вследствие окислительного стресса, гиперактивацией рецепторов глутамата, дисфункцией митохондрий, апоптозом и активацией каспаз. Окислительный стресс (ОС) является одним из важнейших механизмов цитотоксического действия ГЦ и гомоцистеиновой кислоты (ГЦК), образующейся из него путем аутоокисления, на нейрональные клетки [Zou CG, Banerjee R, 2005]

Известно также, что ГГЦ стимулирует в клетках эндотелия образование тромбина, являющегося потенциальным активатором протеаза-активируемых рецепторов (PARs), участвующих в процессах ремоделирования, ответственных за процессы увеличения сосудистого резерва [Barnes JA et al., 2004].

ГГЦ способствует аккумуляции ассиметричного диметиларгинина (ADMA), являющегося эндогенным ингибитором эндотелиальной и индуцибельной NO – синтазы [Torral G et al., 2004]. Ингибирующий эффект ADMA может быть устранен диметиларгинин-диметиламиногидролазой, которая преобразует ADMA в аргинин, цитруллин и диметиламин [Tran CT et al., 2003]. Одним из механизмов развития ОС при ГГЦ при участии PARs является стимулирование продукции АФК при повышении активности НАДФН-оксидазы и ингибирование тиреодоксина,

следствием чего служит усиление экспрессии индуцибельной NO – синтазы и последующего образования нитротирозина. ГЦ не прямым образом подавляет активность диметиларгинин-диметиламиногидролазы, способствуя накоплению ADMA, а также непосредственно, продуцируя АФК, что приводит к снижению биодоступности оксида азота [Tuagi N et al., 2005]. Регуляция этого процесса, являющегося важнейшей функцией эндотелиальных клеток, зависит также от синтеза NO из аргинина, осуществляемой эндотелиальной NO – синтазой, и его дальнейшей инактивацией супероксидным радикалом. В экспериментах *in vitro*, выполненных на эндотелиоцитах, выделенных из пуповинной вены человека, было показано, что ингибирование этого пути при ГЦ не зависит от уровня внеклеточного аргинина и ADMA, а обусловлено окислением кофактора NO – синтазы тетрагидробиоптерина [Tuagi N et al., 2005].

Усиление продукции АФК и снижение биодоступности оксида азота при ГЦ связано с каскадом воспалительных реакций. В экспериментальных исследованиях установлено, что ГЦ стимулирует образование в плазме крови провоспалительных цитокинов интерлейкин-1 бета и фактора некроза опухолей- α , что можно предотвратить путем воздействия таких антиоксидантов как N-ацетилцистеин, витамин С или витамин Е. Предполагается, что одним из механизмов провоспалительного эффекта ГЦ является его воздействие на макрофаги, приводящее к усилению ими синтеза и секреции провоспалительных цитокинов. Важная роль в активации этой секреции отводится повышению уровня образования АФК макрофагами и клетками эндотелия сосудов в ответ на повышение уровня ГЦ в крови [da Cunha AA et al., 2010; da Cunha AA et al., 2012b].

Метаболизм ГЦ регулируется редокс-потенциалом, поскольку активность основных ферментов, участвующих в метаболических превращениях ГЦ, таких как метионинсинтаза и цистатионин- β -синтаза (CBS), связана с окислительным статусом мозга. Например, активность CBS повышается при ОС, превращая, таким образом, больше гомоцистеина в цистеин и глутатион [Vitvitsky V et al., 2004], а активность метионинсинтазы, напротив, в этих условиях снижается [Baydas G et al., 2005a]. Осуществляемое CBS транссульфирование представляет собой

метаболическую связь между антиоксидантной системой и процессами метилирования. Установлена антиоксидантная роль S-аденозилметионина (SAM), в частности, показано, что SAM вызывает повышение продукции глутатиона, снижает на 65% перекисидацию липидов и предотвращает нейрональную гибель в экспериментальной модели ишемии. ГГЦ приводит к повышению уровня содержания S-аденозилгомоцистеина (SAH), обладающего высоким сродством к ДНК-метилтрансферазе, вследствие чего нарушается процесс метилирования ДНК, что неизбежно приводит к ее повреждению, изменению экспрессии кодирующего ДНК-метилтрансферазу гена и клеточной гибели.

Сравнительно недавно была обнаружена интересная взаимосвязь между дефицитом фолата и пониженной продукцией мелатонина [Fournier I et al., 2002]. Продуцируемый пинеальной железой гормон индольной природы мелатонин, образующийся из серотонина при участии гидрокси-индол-*O*-метилтрансферазы, утилизирует SAM в качестве донора метильных групп. Мелатонин, помимо регуляции циркадных ритмов организма, обладает выраженными антиоксидантными свойствами благодаря способности устранять свободные радикалы и стимулировать экспрессию антиоксидантных ферментов [Allegra M et al., 2002; Rodriguez C et al., 2003; Reiter RJ et al., 2006]. Наряду с мелатонином, нейропротекторным действием при ГГЦ обладает полифенольное соединение ресвератол, содержащийся в красном вине, фруктах, орехах и коре многих растений. Ресвератол препятствует гибели нейронов в коре и гиппокампе, стимулирует двигательную активность, пространственную память и повышает уровень антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы, каталазы и пероксидазы.

ГЦ легко окисляется с образованием еще более токсичной ГЦК, что влияет на редокс-зависимые сигнальные пути в сосудистых и нервных клетках [Zou CG, Banerjee R, 2005]. ГЦ и ГЦК вызывают неврологические нарушения, индуцируя ОС, что связано с повышением продукции АФК и снижением биодоступности оксида азота. ОС рассматривается как одно из наиболее ранних проявлений реализации патологического механизма, лежащего в основе нейродегенеративных

процессов при ГГЦ. Установлено, что в ткани мозга при ГГЦ, вызванной метиониновой нагрузкой, обнаруживается высокий уровень содержания продуктов перекисного окисления липидов и нитритов, а также снижение концентрации одного из основных низкомолекулярных антиоксидантов глутатиона [Kalani A et al., 2014b]. Наряду с этим, показано, что ГГЦ приводит к снижению антиокислительного потенциала и каталазной активности в гиппокампе [Wyse AT et al., 2002] и активности каталазы и глутатионпероксидазы теменной коры мозга крыс [Matte C et al., 2009a]. Ранее было описано ингибирование экспрессии глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы при повышении уровня ГЦ в крови [Hankey GJ, Eikelboom JW, 1999], однако по данным ряда авторов активность супероксиддисмутазы крови в этих условиях возрастает на фоне увеличения продукции АФК [Wyse AT et al., 2002; Matte C et al., 2009a], что, по мнению некоторых авторов, является компенсаторной реакцией в ответ на ОС. Установлено также, что ГЦ аккумулируется в клетках нейробластомы человека SH-SY-5Y при БА, способствуя генерации АФК, сопровождающейся поступлением кальция в клетки и апоптозом, между тем как такие антиоксиданты, как N-ацетилцистеин и витамины E и C устраняют нейротоксичность ГЦ [Ho PI et al., 2003].

Важное значение в токсических эффектах ГГЦ, придается взаимодействию ГЦ с рецепторами глутамата вследствие структурного сходства этих соединений. Обладая более высоким по сравнению с глутаматом сродством к NMDA-рецепторам глутамата ГЦ способен оказывать на них эксайтотоксическое воздействие, вызывать их суперэкспрессию и гиперактивность, что приводит к повреждению мозга. ГЦ взаимодействует с глутамат-связывающим центром NMDA-рецепторов в нейронах и астроцитах, являющихся наиболее важными структурными элементами нервной ткани. Астроциты участвуют в регуляции различных подтипов NMDA-рецепторов, повышая чувствительность нейронов к глутамату. ГЦ индуцирует каспазы-зависимый апоптоз в дофаминергических нейронах, а также стимулирует его в других нейрональных клетках, вызывая повреждение ДНК и митохондриальную дисфункцию. Кроме того, повышенные концентрации ГЦ способны вызывать каспазы-независимую клеточную гибель в

гранулярных клетках мозжечка и нарушать синаптическую передачу и пластичность в гиппокампе [Petras M et al., 2014]. Исследование молекулярных свойств NMDA-рецепторов при формировании нервной системы в условиях ГГЦ позволило определить чувствительность нейронов, полученных от животных исследуемых групп, к лигандам. Данные по действию NMDA, ГЦ и ГЦК на NMDA-рецепторы гранулярных клеток, выделенных из мозжечка контрольных животных, соответствуют результатам, полученным ранее при моделировании ОС *in vitro* на интактных животных [Makhro AV et al., 2007]. Таким образом, нейроны контрольных животных чувствительны как к NMDA, так и к ГЦ и ГЦК, а также, собственно, к глутамату. Установлено также подавляющее действие специфических антагонистов в случае активации исследуемыми лигандами ионотропных NMDA-рецепторов (МК-801, неконкурентного антагониста, блокирующего ионный канал рецепторов; D-AP5, высокоселективного конкурентного антагониста, препятствующего взаимодействию агонистов с лиганд-связывающим участком NMDA-рецептора). Эти данные являются важной характеристикой действия ГЦ и ГЦК на ионотропные рецепторы – они показывают, что токсические аналоги глутамата способны не только связываться с NMDA-рецепторами, но и индуцировать активацию связанного с рецептором ионного канала. Кроме того, в экспериментах с использованием антагонистов метаботропных рецепторов глутамата первого типа было установлено, что ГЦ и ГЦК могут также взаимодействовать с ними в условиях десенситизации NMDA-рецепторов, что сопровождается повышением содержания внутриклеточного кальция

Первые сведения о том, что ГГЦ относится к числу важных факторов, обуславливающих когнитивные дисфункции, появились относительно недавно, когда было показано, что хроническое введение метионина приводит к ухудшению кратковременной и долговременной памяти у крыс. Было высказано предположение, что это вызвано усилением ОС в этих условиях [Baydas G et al., 2005a], так как было обнаружено, что ГЦ подавляет экспрессию антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы) в нервной ткани.

Наряду с этим, клиническими наблюдениями было установлено, что повышение уровня ГЦ в крови вносит значительный вклад в развитие болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний [White AR et al., 2001; Gao J et al., 2006; Obeid R, Herrmann W, 2006]. Рядом исследователей была описана прямая зависимость между повышенным содержанием ГЦ и β -амилоида в мозгу *post mortem* и высказано предположение о том, что ГЦ способна индуцировать и даже потенцировать внутри- и внеклеточную аккумуляцию A β 42. Кроме этого, растворимые олигомеры β -амилоида, в свою очередь, нарушают процессы метилирования, вызывая гипометилирование ДНК и ГЦ, что приводит к повышенному образованию гиперфосфорилированной формы tau-протеина, являющегося еще одним белком, напрямую участвующим в нейродегенеративных процессах в микротрубочках. Показано, что чрезмерное фосфорилирование tau-протеинов приводит к их трансформации в спаренные спиральные филаменты и нейрофибриллярные белки, нарушает аксональный транспорт, способствуя клеточной смерти [Moretti R, Caruso P, 2019].

1.2. Пренатальная ГЦ и ее последствия, связанные с нарушением развития плаценты, нервной системы плода и новорожденного

Ключевую роль в модуляции сигналов, поступающих от матери к плоду, играет плацента [Bilbo SD, Schwarz JM, 2009; Bale TL et al., 2010; Gueant JL et al., 2013; Bolton JL, Bilbo SD, 2014; Burton GJ et al., 2016; Rosario FJ et al., 2017a]. Вместе с тем, сложной и пока нерешенной задачей остается установление причинно-следственной связи между плацентарными изменениями и нарушениями развития плода, по крайней мере, в отношении воздействия соединений, способных проходить через плацентарный барьер. В этом случае плацентарные изменения могут оказаться просто параллельной реакцией на одно и то же воздействие, независимой от прямого влияния соединения на развитие плода, или даже вторичными по отношению к его воздействию на программирование развития эмбриона/плода [Burton GJ et al., 2016]. Поэтому актуальной является задача изучения воздействия таких соединений как на плаценту, так и на развивающийся плод [Charest PL et al., 2018].

Онтогенез мозга значительно продолжительнее, чем у других органов, он простирается от эмбрионального периода жизни до неонатального, младенческого, детского и подросткового возраста. Согласно одному из принципов программирования развития организма, мозг, как орган, претерпевающий изменения на протяжении длительного времени, особенно уязвим к неблагоприятным воздействиям условий окружающей среды. Пренатальный период развития мозга исключительно важен, потому что на его протяжении формируются основные мозговые структуры [Bolton JL, Vilbo SD, 2014], под влиянием эндокринных и иммунных механизмов происходит миграция и дифференцировка нейронов и клеток глии, созревание синапсов и многие другие процессы нейрогенеза [Buss C et al., 2012].

Несмотря на то, что от своевременной и адекватной реакции плаценты на изменения внутриутробного окружения и выработки ею факторов, способствующих росту плода, зависит развитие всех его органов, мозг плода особенно уязвим к последствиям плацентарных нарушений. Предполагается, что исходная причина многих нейроповеденческих расстройств у потомства может заключаться в патофизиологических изменениях в плаценте матери во время внутриутробного развития. Наличие такой тесной связи между плацентой и мозгом плода привело к появлению термина "ось плацента – мозг плода" [Behura SK et al., 2019; Shallie PD, Naicker T, 2019a; Rosenfeld CS, 2021]. Значение этой оси видится в том, что, с одной стороны, выработка плацентой определенных факторов или регуляция их трансплацентарного транспорта может являться механизмом регуляции развития мозга плода. С другой стороны, нарушение синтеза в плаценте, а также поступления через плаценту от матери к мозгу плода факторов, участвующих в нейрогенезе, могут являться одним из механизмов внутриутробного программирования нейроповеденческих расстройств и открыть новые возможности для их ранней диагностики и лечения [Rosenfeld CS, 2021].

Неблагоприятные факторы могут действовать через различные механизмы, но общим конечным итогом их воздействия является, как правило, недостаточное кровоснабжение плаценты [Burton GJ et al., 2016]. Снижение кровотока вызывает в

плаценте состояние гипоксии, окислительного и стресса эндоплазматического ретикулума, снижение пролиферативной активности и увеличение клеточной гибели в различных ее отделах, задержку роста плаценты и уменьшение площади поверхности обмена между матерью и плодом, приводящие в итоге к нарушению транспортной и других плацентарных функций [Roberts JM, Escudero C, 2012]. Конечным результатом развития этих патологических процессов в плаценте могут стать осложнения беременности, такие, как преэклампсия (ПЭ) [Kasture VV et al., 2018] и задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР) [Burton GJ, Jauniaux E, 2018].

Отмечено, что риск развития ПЭ и ЗВУР, а также нарушений развития ЦНС плода (врожденные дефекты нервной трубки и др.), в ряде случаев ассоциируется с повышением в крови матерей уровня ГЦ [Hague WM, 2003; Chen YY et al., 2018; Gaiday AN et al., 2018]. Вместе с тем, механизмы, посредством которых ГЦ может вызывать нарушения развития плода и потомства, остаются во многом невыясненными [Hannibal L, Blom HJ, 2017].

Как отмечалось, ГЦ является соединением, обладающим выраженными нейротоксическими свойствами [Troen AM, 2005; Boldyrev AA, 2009; Poddar R, Paul S, 2013; Curro M et al., 2014]. Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) матери относится к числу патологических факторов, способных нарушать процессы развития мозга плода и вызывать стойкие отдаленные последствия в различных функциональных системах растущего организма в постнатальном периоде [Baydas G et al., 2007b; Blaise SA et al., 2007; Koz ST et al., 2010; Arutjunyan A et al., 2012]. В опытах на животных показано, что повышенный уровень ГЦ в крови самок во время беременности связан с появлением у потомства когнитивных нарушений [Baydas G et al., 2007b; Arutjunyan A et al., 2012].

Вызываемые материнской ГГЦ долгосрочные когнитивные нарушения у потомства могут быть следствием как прямого воздействия ГЦ и его метаболитов на ЦНС плода, так и результатом изменения под влиянием ГЦ функционального состояния плаценты [Furukawa S et al., 2011]. К наиболее вероятным мишеням воздействия различных токсических соединений, в том числе ГЦ, в плаценте

являются процессы ангиогенеза [Oosterbaan AM et al., 2012; Li Y et al., 2015; Kasture VV et al., 2018]. В этом аспекте достаточно хорошо изучено негативное воздействие повышенных концентраций ГЦ на эндотелиальные клетки, приводящее к их повреждению и дисфункции [Lai WK, Kan MY, 2015]. Одним из косвенных доказательств воздействия ГГЦ на ангиогенез в плаценте служит тот факт, что ГГЦ рассматривается в качестве фактора риска развития ПЭ и ЗВУР [Hague WM, 2003; Chen YY et al., 2018; Gaiday AN et al., 2018], причиной которых при их плацентарной этиологии считается недостаточное ремоделирование спиральных артерий плаценты [Burton GJ, Jauniaux E, 2018; Burton GJ et al., 2019]. Нарушение ангиогенеза в плаценте само по себе может привести к множественным изменениям ее транспортных и прочих функций. Решающее значение для морфогенеза плаценты и обеспечения потребностей растущего плода в питательных веществах и кислороде имеет формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети, которое зависит от факторов, участвующих в регуляции роста и ветвления кровеносных сосудов, основную роль среди которых играет фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). К основным проангиогенным плацентарным факторам относят также плацентарный фактор роста (PlGF), ангиопоэтины (Ang-1/2), оксид азота (NO) и матриксные металлопротеиназы (MMP), к антиангиогенным – sFlt-1 (растворимый рецептор VEGFR-1 –инактиватор VEGF и PlGF) и sEng (растворимый эндоглин, рецептор-инактиватор TGFbeta). Дисбаланс этих факторов может привести к aberrантному развитию плацентарных сосудов. Следует отметить, что про- и антиангиогенные факторы sFlt-1, sEng и PlGF, продуцируемые синцитиотрофобластом (СТБ), имеющим непосредственный контакт с кровью матери, секретируются главным образом в материнский кровоток, где они могут оказывать воздействие на системную сосудистую сеть. Эти же и прочие ангиогенные факторы (VEGF, Ang-1, Ang-2 и др.), продуцируемые другими клетками плаценты, действуют в первую очередь местно, в пределах плацентарного кровообращения, способствуя развитию плацентарных сосудов [Umarathy A et al., 2020].

Плацентарная экспрессия ангиогенных факторов и их соотношение в различных отделах плаценты изменяется в зависимости от срока беременности, что необходимо для координации по времени различных стадий плацентарного васкулогенеза и ангиогенеза. В первом триместре беременности формирование сосудистой сети плаценты инициируется секрецией VEGF, что приводит к усилению пролиферации эндотелиальных клеток и васкулогенезу [Geva E et al., 2002]. Секреция Ang-1 стабилизирует эти новообразованные сосуды и поддерживает целостность эндотелия. Совместное действие VEGF и Ang-1 обеспечивает успешное формирование плацентарной сосудистой сети на ранних сроках беременности, закладывая фундамент, на котором впоследствии путем разветвляющего ангиогенеза формируется густо разветвленная сосудистая сеть. Дисрегуляция соотношения этих факторов может приводить к неполноценному развитию плацентарной сосудистой сети, что наблюдается при патологиях беременности.

Как только первичная плацентарная сосудистая сеть сформировалась, плацентарные эндотелиальные клетки и периваскулярные клетки выделяют Ang-2, антагонист Ang-1, который способствует разветвлению кровеносных сосудов, дестабилизируя кончики новообразованных сосудов. Это позволяет сосудам реагировать на индуцируемый VEGF разветвляющий ангиогенез путем увеличения миграции эндотелиальных клеток и разрушения эндотелиальной базальной мембраны. Наконец, в последнем триместре беременности неразветвляющий ангиогенез вновь становится доминирующим механизмом роста сосудов плаценты, обеспечивая удлинение концевых петлевых капилляров для максимального обмена питательными веществами между матерью и плодом. Этот процесс частично опосредуется PlGF, который вызывает увеличение пролиферации эндотелиальных клеток, в то время как повышенные уровни sFlt-1 блокируют стимулированное VEGF их ветвление [Chappell JC et al., 2009].

Оксид азота NO является вазоактивным и ангиогенным фактором, участвующим в сигнальных путях, обеспечивающих нормальное развитие сосудов. В плаценте NO продуцируется через окисление L-аргинина двумя изоформами

синтазы оксида азота (NOS): эндотелиальной (eNOS, NOS1) и индуцибельной (iNOS, NOS2) [Krause BJ et al., 2011].

Основные молекулярные медиаторы ангиогенеза, VEGF и Ang-1, находятся с фактором NO в реципрокных отношениях. С одной стороны, VEGF и Ang-1 способны индуцировать экспрессию/активность eNOS в эндотелиальных клетках, благодаря чему NO опосредует эффекты этих факторов в процессе васкуло- и ангиогенеза. С другой стороны, уровень NO имеет решающее значение для экспрессии VEGF в условиях нормоксии и гипоксии [Gualdoni GS et al., 2021b]. В эндотелиальных клетках VEGF индуцирует eNOS-зависимый синтез NO посредством активации своих специфических рецепторов VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR, Flk1) [Krause BJ et al., 2011]. Было показано, что индуцированные VEGF миграция эндотелиальных клеток и ангиогенез требует активности eNOS и синтеза NO. Фактор Ang-1 через свой рецептор и Tie-2 повышает активность и уровень экспрессии eNOS, что приводит к усилению миграции клеток эндотелия и ангиогенеза. Более того, путь Ang-1/eNOS способствует созреванию и стабилизации сосудов. У мышей с нокаутом *eNOS* наблюдается снижение развития плаценты с уменьшением васкуляризации. В свою очередь, NO способен усиливать синтез VEGF и Ang-1 в эндотелии. Все эти данные показывают, что NO является не только эффектором ангиогенных путей, но и индуктором и сигналом положительной обратной связи для ангиогенеза, индуцированного Ang-1 и VEGF.

Представления о необходимости пространственно-временных изменений уровней ангиогенных факторов для нормального развития плаценты нашли экспериментальные подтверждения при изучении плаценты грызунов. В период активной инвазии трофобласта на 14 день беременности (E14) в плаценте крыс наблюдалась более высокая экспрессия *Vegf*, его рецептора *Flk1* (VEGFR-2), а также *Plgf*, *sFlt1*, *Mmp9*, *Mif* и *Nos2* по сравнению с E10 и/или E19 [Silva JF et al., 2017]. VEGF и PlGF считаются основными проангиогенными факторами в развитии сосудов на границе раздела матери и плода, поскольку они способствуют неоваскуляризации и увеличивают проницаемость сосудов. Высокая экспрессия этих факторов совпадает с началом периода экспоненциального роста плода у крыс

между 14 и 18 днями беременности, что, вероятно, способствует правильному переносу питательных веществ и метаболитов через плаценту к развивающемуся плоду. Характерно, что значительное повышение уровня белков Flk1 и iNOS (NOS2) на E14 по сравнению с E19 наблюдалось исключительно в зоне плацентарного лабиринта, ответственной за обмен между матерью и плодом, и отсутствовало в эндокринном слое спонгиозотрофобласта [Silva JF et al., 2017].

Экспрессия изоформ NOS (eNOS и iNOS) в плаценте также динамически регулируется в зависимости от срока беременности и морфологического отдела плаценты [Krause BJ et al., 2011]. Изоформа iNOS на ранних сроках беременности экспрессируется в основном на границе матери и плода. С увеличением срока беременности наблюдается повышение активности iNOS в плаценте, пик которой приходится на середину беременности. С другой стороны, в плаценте человека в первом триместре экспрессируется и eNOS, внося вклад в общую продукцию NO на этой стадии. По мере продолжения беременности происходит увеличение и перераспределение экспрессии eNOS, в основном, на СТБ и эндотелиальные клетки.

Развитие плаценты человека требует координации процессов ангиогенеза и миграции трофобласта, которая нарушается при таких патологиях беременности, как ПЭ и ЗВУР [Dunk C et al., 2000; Mesiano S, 2019]. Предполагают, что снижение инвазии трофобласта в материнские спиральные артерии на ранних сроках беременности, лежащее в основе этиологии ПЭ, приводит к нарушению плацентарной перфузии и гипоксии плаценты на поздних сроках. Одним из компенсаторных механизмов для увеличения плацентарной перфузии в условиях гипоксии может являться повышение экспрессии в плаценте VEGF, который через рецептор KDR (VEGFR-2) увеличивает экспрессию sFLT1 трофобластом. Синтезированный в плаценте sFLT1 высвобождается в материнский кровоток и, будучи рецептором-инактиватором, снижает там уровни свободных VEGF и PlGF, что, в свою очередь, приводит к развитию системной эндотелиальной дисфункции и других симптомов, характерных для ПЭ [Mesiano S, 2019]. Отмечено, что при ПЭ и ЗВУР уровни VEGF и PlGF в плаценте и крови матери являются сниженными.

Соотношение sFlt-1/PlGF в материнской сыворотке обычно используется в качестве биомаркера для прогнозирования и/или диагностики ПЭ, причем повышение этого показателя (высокий уровень sFlt-1 и низкий уровень PlGF) коррелирует со степенью тяжести заболевания. В сочетании с данными доплерографии соотношение sFlt-1/PlGF может также использоваться для прогнозирования развития ЗВУР [Umapathy A et al., 2020]. Полагают, что некоторые ангиогенные факторы, синтезируемые в плаценте, могут поступать в кровеносную систему плода и стимулировать процессы ангиогенеза в его мозге [Sautreuil C et al., 2019; Savage DD et al., 2020]. В частности, было показано, что PlGF, основным источником которого во время беременности является плацента, достигает мозгового кровообращения плода, взаимодействует в мозге со своим специфическим рецептором VEGFR-1 и оказывает влияние на ангиогенез мозга. Ингибирование синтеза PlGF в плаценте сопровождалось снижением экспрессии VEGFR-1 в мозге плода и нарушениями ангиогенеза в нем. В то же время индуцированная сверхэкспрессия гена *PGF* в плаценте оказывала защитный эффект в отношении нарушений мозгового ангиогенеза, вызванных воздействием алкоголя [Lecuyer M et al., 2017].

В отношении влияния ПЭ и ЗВУР на уровень экспрессии eNOS в эндотелии плаценты пока не было получено данных, однозначно коррелирующих с наблюдаемым повышением уровня NO и дисфункцией сосудов. Повышение уровней метаболитов NO совместно с увеличением сопротивления сосудов плаценты при ПЭ и ЗВУР могло быть связано с более высокой экспрессией iNOS [Krause BJ et al., 2011]. Воздействие окислительного стресса на клетки HUVEC вызывало снижение экспрессии eNOS и повышение экспрессии iNOS, что приводило к нитрозативному стрессу и апоптозу клеток [Jacobi J et al., 2005]. Повышенная экспрессия эндотелиального iNOS была сопряжена с сосудистой дисфункцией в моделях диабета, атеросклероза и старения у животных [Krause BJ et al., 2011]. Таким образом, уровни NO и NO-метаболитов не обязательно связаны с улучшением функции эндотелия плаценты, и необходимы дальнейшие исследования для определения источника NO (т.е. eNOS или iNOS) при

заболеваниях во время беременности, характеризующихся дисфункцией сосудов плаценты.

Одним из факторов, стимулирующим экспрессию VEGF, является гипоксия, вызывающая повышение экспрессии трофобластами индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора (HIF), являющегося первичным молекулярным датчиком парциального давления кислорода [Gualdoni GS et al., 2021b]. Фактор HIF-1 α является положительным регулятором экспрессии VEGF и его рецептора VEGFR1 (Flt-1) клетками трофобласта [Macklin PS et al., 2017; Mitsui T et al., 2018], внося важный вклад в осуществление процессов ангиогенеза, пролиферации и дифференциации трофобласта на ранних сроках беременности, когда плацента развивается в условиях физиологической гипоксии [Cowden Dahl KD et al., 2005; Yu N et al., 2019]. В опытах *in vitro* показано, что гипоксия, сопровождающаяся увеличением уровня HIF-1 α и VEGF, приводит к повышению инвазивных и ангиогенных свойств клеток трофобласта, что может играть важную роль в ремоделировании материнских спиральных артерий [Yu N et al., 2019]. Обнаружено также, что в условиях пониженного содержания кислорода при накоплении белка HIF-1 высокие концентрации NO могут ингибировать гипоксическую активацию гена VEGF [Kimura H et al., 2000]. Влияние ГГЦ на содержание HIF-1 α в ткани плаценты до сих пор не было изучено. На возможность такого влияния указывает наличие снижения в условиях ГГЦ уровня VEGF и его положительного регулятора HIF-1 α в модели пост-ишемического васкуло- и ангиогенеза в волокнах скелетных мышц [Veeranki S et al., 2014].

Предполагается, что плацентарный васкулогенез и ангиогенез относятся к возможным мишеням воздействия материнской ГГЦ [Oosterbaan AM et al., 2012; Li Y et al., 2015; Kasture VV et al., 2018], однако исследования, в которых изучалось бы непосредственное воздействие ГГЦ на эти процессы в плаценте, немногочисленны. Вместе с тем, достаточно хорошо изучено негативное воздействие повышенных концентраций ГЦ на эндотелиальные клетки различного происхождения, приводящее к их повреждению и дисфункции [Lai WK, Kan MY, 2015]. Одним из косвенных доказательств воздействия повышенного уровня ГЦ в

крови матери на ангиогенез в плаценте служит тот факт, что ГЦ рассматривается в качестве фактора риска ЗВУР и ПЭ [Hague WM, 2003; Chen YY et al., 2018], причиной которых при их плацентарной этиологии считается нарушение ремоделирования (расширения вследствие замены клетками трофобласта эндотелиальных и гладкомышечных клеток) спиральных артерий плаценты [Burton GJ, Jauniaux E, 2018; Burton GJ et al., 2019].

На модели экстраэмбриональной сосудистой сети куриного эмбриона было показано, что ингибирующее воздействие ГЦ на развитие сосудистой сети, васкулогенез и ангиогенез, сопровождается снижением экспрессии *VEGF-A* и его рецептора *VEGFR-2* [Oosterbaan AM et al., 2012]. ГЦ снижает индуцируемую *VEGF* пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, ингибирует ангиогенез в моделях *in vitro* и *in vivo* [Pan L et al., 2017]. Под влиянием ГЦ наблюдается снижение экспрессии в эндотелиальных клетках ключевых ангиогенных факторов *VEGF* [Wang XJ et al., 2019], *VEGFR-1/2* [Pan L et al., 2017] и *MMP-2* [Rodriguez-Nieto S et al., 2002].

Влиянию ГЦ на ангиогенез в плаценте посвящено незначительное число работ. Среди них можно отметить две работы, выполненные на беременных самках мышей. В одной из них после введения высоких доз ГЦ отмечалось снижение экспрессии фактора *VEGF-A* и его корецептора нейропилина-1 (*NRP-1*) в цельной плаценте (E17.5), а также появление у животных симптомов, сходных с наблюдающимися у женщин при развитии ПЭ (повышение давления и протеинурия) [Xu X et al., 2016]. В другой работе в условиях безфолатной диеты, сопровождавшейся повышением уровня ГЦ в крови, в децидуальной оболочке на ранних сроках беременности (E6-E8) были отмечены аномалии в строении сосудов, а также снижение уровня экспрессии проангиогенных факторов *VEGF-A*, *VEGFR-2* и *PLGF*, показано снижение экспрессии фермента диметиларгинин диметиламиногидролазы, приводящее к повышению уровня ассиметричного диметиларгинина, являющегося ингибитором эндотелиальной *NO*-синтазы (*eNOS*) [Li Y et al., 2015], что рассматривается в качестве одного из механизмов возникновения эндотелиальной дисфункции под влиянием ГЦ при ПЭ [Demir B et

al., 2012; Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S, 2019]. Нарушение баланса проангиогенных и ростовых факторов в плаценте при материнской ГГЦ, вследствие изменений процессов васкуло- и ангиогенеза, пролиферации и миграции клеток трофобласта, может привести к недостаточному развитию плацентарной сосудистой сети, что наблюдается при заболеваниях и осложнениях беременности, для которых высокий уровень ГЦ является фактором риска (ПЭ, ЗВУР). Снижение поступления питательных веществ и кислорода от матери к плоду вследствие недостаточно сформированной зоны обмена между кровообращением матери и плода может являться одной из причин нарушений развития мозга плода и снижения когнитивных функций потомства. Проведенные к настоящему моменту исследования единичны и не дают целостной картины влияния материнской ГГЦ на сигнальные пути и морфологические процессы, ведущие к формированию сосудистого аппарата, обеспечивающего плацентарный транспорт жизненно важных соединений к плоду, что диктует необходимость дальнейших интенсивных исследований в данном направлении.

Сравнительно недавно появились данные о том, что аминокислота ГЦ в результате конкуренции за аминокислотные транспортеры может ингибировать перенос других аминокислот через плаценту [Jansson T, 2009; Tsitsiou E et al., 2011]. Угнетение транспорта к плоду необходимых питательных веществ при воздействии материнской ГГЦ может быть одной из причин снижения роста плода и нарушения развития его органов, в частности, мозга.

Плацента является автономным и временным органом, многочисленные эндокринные, иммуномодулирующие и транспортные функции которого обеспечивают развитие плода. Регулирование транспорта питательных веществ через плаценту значительно влияет на рост и развитие плода, его нарушение может приводить к ограничению роста плода и плаценты, а также развитию различных заболеваний в раннем и позднем постнатальном периоде. Транспортная способность плаценты, как известно, модулируется экспрессией и активностью переносчиков макромолекул, маточно-плацентарным кровотоком, плацентарной обменной поверхностью, метаболизмом веществ, а также множественными

регуляторными факторами, такими как гипоксия, гормоны, факторы роста, цитокины и окислительный стресс.

Плацента представляет собой зону контакта между плодом и децидуализированным эндометрием матки, который действует как барьер и как место обмена, необходимого для роста плода. В плаценте человека главную структурную и функциональную единицу составляют ворсинки хориона. Они состоят из мезенхимальной оси, включающей капилляры плода и макрофаги, и наружного слоя клеток ворсинчатого цитотрофобласта, которые, сливаясь, образуют многоядерный и поляризованный слой – СТБ [Burton GJ et al., 2016]. Дисквидная гемохориальная плацента грызунов по своей общей морфологии похожа на человеческую. Однако во внутреннем строении имеются существенные различия, наиболее значительным из которых является то, что плодная часть плаценты грызунов разделена на две морфологически и функционально различные зоны: лабиринтную область, которая отвечает в первую очередь за обмен питательных веществ и кислорода, и базальную губчатую часть (спонгиотрофобласт), выполняющую эндокринную функцию [Burton et al., 2016]. Соотношение этих двух зон варьирует в пределах нормального помета в зависимости от общего размера плаценты, а также изменяется под воздействием пищевых и других воздействий. Материнская часть плаценты грызунов, формирующаяся из эндометрия матки, включает децидуальную оболочку и т.н. метриальную железу. Лабиринтная зона плодной части представляет собой собственно гемато-плацентарный барьер, участвующий в трансплацентарном обмене между кровью матери и плода. Эта зона, сходная с хорионической пластинкой человека, состоит из плотной сети взаимосвязанных узких пластинок трофобласта. Внутри пластинок находятся капилляры плода, в то время как между ними расположено пространство синусов, заполненное материнской кровью. Внутри лабиринтной области различают три слоя [Furukawa S et al., 2011]. Внешний слой (слой I), соприкасающийся с материнской кровью в просветах синусов, образован одноядерными клетками, экспрессирующими плацентарный лактоген, что предполагает наличие у них эндокринной функции. Под этими

клетками находятся два слоя СТБ (слои II и III), которые тесно сближены друг с другом и связаны многочисленными щелевыми контактами. Существует предположение, что два слоя СТБ функционируют как один, поскольку наличие щелевых соединений позволяет небольшим молекулам легко проникать между ними. Об этом же свидетельствует тот факт, что белки-переносчики глюкозы GLUT1 локализованы только на апикальной поверхности слоя II и базальной поверхности слоя III, причем ни один из них не расположен на границе раздела между двумя слоями или в слое I [Furukawa S et al., 2019]. Таким образом, организация трофобласта у грызунов во многом аналогична однослойному СТБ плаценты человека. По-видимому, именно транспортеры глюкозы и различные переносчики аминокислот ответственны за изменение соотношения размеров плаценты и плода под влиянием измененного питания матери и генетических манипуляций.

Благодаря своему уникальному положению в области контакта между организмами матери и плода, СТБ является наиболее важным компонентом маточно-плацентарного барьера и выполняет барьерную, обменную, гуморальную функции, а также участвует в формировании иммунологической толерантности организма матери в отношении полуаллогенного организма плода. Через СТБ происходит транспорт питательных веществ от матери к плоду, газообмен, удаление продуктов метаболизма плода, в нем синтезируется ряд белков, стероидных и белковых гормонов, сигнальных и иммуномодулирующих молекул, являющихся жизненно необходимыми для физиологического протекания беременности [Burton GJ, Fowden AL, 2015].

Необходимость изучения транспорта питательных веществ через обращенную к матери апикальную микроворсинчатую мембрану (МВМ) и обращенную в сторону плода базальную мембрану (БМ) СТБ, как первичные зоны обмена между кровообращением матери и плода, давно стала осознаваться исследователями. Важный вклад в развитие методики выделения МВМ и БМ из плацент человека и грызунов путем сочетания методов дифференциального центрифугирования и специфического выделения МВМ, благодаря осаждению при

помощи ионов Mg^{2+} прочих мембран, внесли работы Джослин Глейзер с соавторами из Манчестерского Университета (UK) [Glazier JD et al., 1988; 1990; Kusinski LC et al., 2010]. Работы Николаса Илсли и соавторов позволили наладить метод выделения БМ из фракции СТБ, осажденной при помощи ионов Mg^{2+} [Hlsley NP et al., 1990]. Было показано, что выделенные фрагменты МВМ и БМ образуют микровезикулы, содержащие на своей поверхности различные системы трансплацентарного транспорта, в частности, интактные переносчики аминокислот [Kusinski LC et al., 2010] и глюкозы [Jansson T et al., 1993; Hlsley NP, 2000], способные осуществлять активный транспорт этих соединений внутрь микровезикул. Подобные свойства выделяемых мембран СТБ позволили наладить методы изучения трансплацентарного транспорта в норме и при различных неблагоприятных воздействиях, на основе измерения переноса питательных веществ внутрь микровезикул МВМ и БМ [Glazier JD, Sibley CP, 2006], а также оценки уровня экспрессии на них различных транспортеров [Jansson T et al., 1993].

Многочисленными исследованиями было установлено наличие влияния недостатка или избытка поступающих от организма матери питательных веществ [Jones HN et al., 2009; Rosario FJ et al., 2011; Kavitha JV et al., 2014; Rosario FJ et al., 2015; Pantham P et al., 2016], а также недостатка фолатов [Rosario FJ et al., 2017a], на активность и уровень экспрессии транспортных систем переноса нейтральных аминокислот (А и L) и глюкозы в составе микровезикул мембран СТБ. Препараты МВМ и БМ в настоящее время активно используются для изучения влияния таких осложнений беременности, как ЗВУР, сахарный диабет 2-го типа, на трансплацентарный перенос питательных веществ [Castillo-Castrejon M et al., 2021; Rosario FJ et al., 2021].

В плаценте человека и грызунов перенос нейтральных аминокислот осуществляется транспортными системами А (SNAT), L (LAT) и y^+L (y^+LAT). Транспортная система А представляет собой универсальный Na^+ -зависимый переносчик, который активно транспортирует небольшие цвиттер-ионные нейтральные аминокислоты с короткими неразветвленными боковыми цепями, такие как аланин, глицин, серин и глутамин. Система А кодируется тремя

различными членами семейства генов SLC38 (Slc38a1, Slc38a2 и Slc38a4), что дает начало трем подтипам этого натрий-связанного переносчика нейтральных аминокислот (SNAT): SNAT1, SNAT2 и SNAT4, которые экспрессируются в плаценте человека и крысы [Novak D et al., 2006; Desforges M et al., 2010]. Система L состоит из двух субъединиц: каталитической легкой цепи (переносчика больших нейтральных аминокислот LAT1 или LAT2) и тяжелой цепи CD98, которая имеет решающее значение для транспортировки легкой цепи к плазматической мембране. LAT1 и LAT2, кодируемые генами Slc7a5 и Slc7a8, также экспрессируются в плаценте человека и грызунов [Kudo Y, Boyd CA, 2001; Chrostowski MK et al., 2009; Owaydhah WH et al., 2020]. Система y⁺L включает гетеродимерный комплекс с тяжелой цепью CD98, связанной с легкой цепью y⁺LAT1 (SLC7A7) или y⁺LAT2 (SLC7A6), которая придает комплексу функциональную активность и субстратную специфичность. Обе легкие цепи y⁺LAT экспрессируются в плаценте человека на уровне мРНК [Dye JF et al., 2004].

Известно, что плацентарный транспорт нейтральных аминокислот у грызунов во многом зависит от активности системы A [Cramer S et al., 2002; Novak D et al., 2006], торможение которой приводит к снижению веса плода [Cramer S et al., 2002]. Во время нормальной беременности экспрессия мРНК SNAT1 и SNAT2 увеличивается с E14 до E20 [Novak D et al., 2006; Nusken E et al., 2016], что, вероятно, связано с более высокой потребностью плода в аминокислотах на более поздних сроках беременности. У крыс, получавших диету с низким содержанием белка, снижение активности системы A наблюдалось, начиная с E19 [Jansson N et al., 2006]. Механизмы, участвующие в регуляции активности системы A, которые имеют отношение к внутриутробному ограничению роста плода, включают путь mTor [Roos S et al., 2007] и доступность IGF-1 [Jones H et al., 2014].

Показано, что быстрый перенос нейтральных аминокислот через плаценту требует не только Na-зависимого транспорта на обращенной к матери апикальной поверхности СТБ, но и средства к высокообратимым Na-независимым переносчикам, локализованным на обращенной к плоду его БМ [Bell AW, Ehrhardt RA, 2002]. В зрелой плаценте человека LAT1 присутствует как на материнской, так

и на плодной поверхности СТБ [Ohgaki R et al., 2017], в то время, как LAT2 локализован преимущественно на БМ СТБ. Что позволяет осуществлять обмен между заменимыми аминокислотами в компартменте плода и незаменимыми аминокислотами в цитоплазме слоя СТБ. Таким образом, LAT2 играет ключевую роль в обеспечении переноса незаменимых аминокислот к развивающемуся плоду, и снижение его уровня в плаценте может привести к развитию ЗВУР плода [Thamotharan S et al., 2017].

Несмотря на обнаруженную взаимосвязь между повышенным уровнем ГЦ в крови матери и ЗВУР, механизмы влияния ГЦ на рост плода остаются неизученными. Согласно одной из гипотез, таким механизмом может являться конкуренция ГЦ с другими аминокислотами за аминокислотные транспортеры, в результате чего перенос необходимых аминокислот через плаценту оказывается сниженным [Jansson T, 2009; Tsitsiou E et al., 2011]. Недостаток необходимых аминокислот в крови плода приводит к снижению синтеза белка в его тканях и задержке его роста. Для проверки этой гипотезы был исследован транспорт ГЦ через мембрану СТБ в модели микровезикул МВМ плаценты человека. Было показано, что трансплацентарный транспорт ГЦ от матери к плоду осуществляется теми же транспортными системами переноса нейтральных аминокислот (А, L и у+L), что и транспорт к плоду метионина, и отмечено, что активность изученных транспортных систем в отношении переноса их субстратов снижается в присутствии ГЦ [Tsitsiou E et al., 2009; 2011]. Ограничение этой работы состоит в том, что из интактных аминокислот исследовался только перенос метионина (Met) и аргинина. При этом было отмечено, что Met, уровень которого при ГЦ обычно также повышен, в свою очередь может ингибировать перенос ГЦ. Кроме того, не было исследовано влияние ГЦ на уровень экспрессии отдельных переносчиков аминокислот в СТБ плаценты. Поэтому полученные *in vitro* результаты не позволяют с уверенностью прогнозировать поведение плацентарных транспортных систем переноса аминокислот в условиях ГЦ *in vivo*. В отдельных исследованиях было показано, что введение Met беременным самкам крыс, приводящее к состоянию ГЦ, вызывает скорее увеличение уровня самого Met и некоторых

других аминокислот как в крови самок, так и в мозге их плодов [Matsueda S, Niiyama Y, 1982; Mori M et al., 1999]. Поскольку сравнения профиля свободных аминокислот в крови матери и плода в условиях материнской ГЦ до сих пор не было проведено, вопрос об ингибировании переноса отдельных аминокислот через плаценту под воздействием ГЦ остается на уровне гипотезы. Однако, недавно нами были получены данные о том, что дисбаланс уровней аминокислот в крови матери и плода в условиях ГЦ может быть обусловлен конкуренцией ГЦ с другими аминокислотами за общие транспортеры, а также уменьшением площади поверхности зоны обмена и снижением скорости кровотока в лабиринтной области плаценты. Повышение экспрессии транспортеров аминокислот в лабиринтной части плаценты, возможно, является компенсаторным ответом на недостаточное поступление аминокислот к плоду и снижение его роста [Tsitsiou E et al., 2009; 2011].

Глюкоза является основным субстратом для энергетического метаболизма плода, и в отсутствие заметного глюконеогенеза плацентарный транспорт является единственным ее источником для питания плода [Jansson T et al., 1993]. Транспорт глюкозы через плаценту человека происходит за счет облегченной диффузии, опосредованной переносчиками глюкозы (GLUT), расположенными как на обращенной к матери микроворсинчатой апикальной мембране (МВМ), так и на обращенной к плоду базальной мембране (БМ) СТБ.

В плаценте человека обнаружены изоформы переносчика глюкозы GLUT1 и GLUT3. Переносчик глюкозы GLUT1, присутствующий в большом количестве на МВМ и БМ СТБ, является у человека основной изоформой, участвующей в трансплацентарном транспорте глюкозы [Hillsley NP, 2000]. Экспрессия GLUT1 в обращенной к матери МВМ человека в три раза выше, чем в БМ, обращенной к плоду [James-Allan LB et al., 2019]. Асимметричное распределение GLUT1 позволяет полагать, что уровень и активность GLUT1 в БМ является лимитирующим звеном в процессе трансплацентарного переноса глюкозы [Hillsley NP, 2000]. Наиболее выраженное снижение GLUT1 в плаценте отмечается при маточно-плацентарной недостаточности [Nusken E et al., 2016].

Белок GLUT3 в плаценте человека локализован в эндотелии артериальных сосудов и не экспрессируется в зоне СТБ. У человека особенно высокая экспрессия GLUT3 отмечена на ранних сроках беременности, с увеличением срока беременности его экспрессия снижается [Brown K et al., 2011]. У других млекопитающих (мышей, крыс и овец) GLUT3 не только присутствует в эпителиальных клетках, осуществляющих трансплацентарный транспорт, но и становится все более заметной изоформой по мере прогрессирования беременности [Hsley NP, 2000]. Так, в плаценте крыс GLUT1 и GLUT3 коэкспрессируются в слое СТБ лабиринта, тогда как в соединительной зоне экспрессируется, в основном, GLUT1. При этом экспрессия GLUT3 сохраняется в течение беременности на постоянном уровне, а экспрессия GLUT1 снижается к моменту родов [Jansson T et al., 1993]. Отмечено, что GLUT3, расположенный преимущественно на обращенной к матери поверхности СТБ, обладает более низкой K_m и легко захватывает материнскую глюкозу, в то время как базолатеральный GLUT1 с более высокой K_m способствует ее внутриклеточному транспорту и передаче плоду [Das UG et al., 2000]. Благодаря этому регуляция трансплацентарного транспорта глюкозы осуществляется в основном через изменения экспрессии и активности транспортера GLUT1 [Nusken E et al., 2016].

Показано, что изменение в переносе через плаценту молекул одного из типов питательных веществ ведет к изменению транспорта других соединений. Так, снижение транспорта глюкозы через плаценту инициирует компенсаторное увеличение в системе L и системе A трансплацентарного транспорта аминокислот [Ganguly A et al., 2012]. При ограничении калорийности питания во время беременности у мышей происходит снижение внутри- и трансплацентарного транспорта глюкозы и лейцина, но усиливается транспорт аминокислот системы A. При этом происходит снижение экспрессии плацентарных GLUT3 и LAT2, повышение SNAT1 и SNAT2, без изменения GLUT1 и LAT1. Напротив, у плода наблюдается компенсаторное увеличение экспрессии GLUT1. В ряде исследований показано, что ограничение питания матери приводит к снижению экспрессии белков GLUT1, SNAT2 и LAT1/2 на МВМ СТБ [Kavitha JV et al., 2014].

Показано влияние различных неблагоприятных воздействий на экспрессию транспортеров глюкозы в плаценте. Нарушение васкуляризации плаценты, отмеченное у мышей со сверхэкспрессией sFLT1, сопровождалось снижением экспрессии *Glut-1*, *Glut-3*, переносчиков аминокислот и жирных кислот (FABP, CD36) [Vogtmann R et al., 2019]. Индукция гипоксии у мышей в период с середины беременности и до ее окончания приводила к уменьшению экспрессии мРНК и белка GLUT1 и увеличению экспрессии мРНК SNAT1 в плаценте плодов женского пола; экспрессия мРНК SNAT2 в плаценте при гипоксии была снижена у обоих полов [Cuffe JS et al., 2014].

В литературе имеются убедительные доказательства того, что плацента человека чувствительна к инсулину, показана экспрессия рецепторов инсулина в плаценте, [Westermeyer F et al., 2016], в частности, в слое СТБ [Acosta O et al., 2015; James-Allan LB et al., 2019]. Инсулин увеличивает транспорт глюкозы в плаценте на ранних сроках беременности [Acevedo CG et al., 2005; Ericsson A et al., 2005]. Кроме того, хорошо известно, что инсулин стимулирует транспорт аминокислот в клетках трофобласта [Jones HN et al., 2010; Jansson N et al., 2013]. Показано, что ГЦ у пациентов с диабетом может повышать резистентность к инсулину за счет развития стресса ER [Li Y et al., 2013] и активации провоспалительных цитокинов [Feng X, Xu Y, 2017]. Этими авторами установлено, что с уровнем ГЦ коррелируют такие показатели углеводного обмена, такие как уровень глюкозы и инсулина и индекс НОМА. Тиолактон ГЦ подавляет передачу сигналов инсулина за счет повышения ОС [Najib S, Sanchez-Margalet V, 2001]. ГЦ, индуцированная диетой с добавлением ГЦ, уже через 2 недели приводит к снижению экспрессии белка GLUT1 в мозге крыс [Lee H et al., 2005]. Эти результаты позволяют предположить, что ГЦ может играть значительную роль в регуляции метаболизма глюкозы, транспорта глюкозы и аминокислот в плаценте.

Однако, в настоящее время отсутствуют данные по влиянию ГЦ на экспрессию транспортеров глюкозы (как и транспортеров прочих питательных веществ) в плаценте, что указывает на необходимость исследований в данной области.

Показано, что позитивным регулятором работы транспортеров аминокислот в плаценте является комплекс киназ mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) (mTORC) [Roos S et al., 2009; Rosario FJ et al., 2013; Rosario FJ et al., 2017b], активность которого изменяется при патологиях беременности, вызванных ожирением [Rosario FJ et al., 2016b] или низкобелковой диетой [Rosario FJ et al., 2011; Kavitha JV et al., 2014]. mTOR представляет собой эволюционно консервативную серин-треониновую протеинкиназу, ответственную за передачу сигналов таких молекул, как ростовые факторы, факторы гипоксии, аминокислоты, глюкоза и других. mTOR образует два комплекса (mTORC1 и mTORC2), которые обладают специфичностью к разным субстратам и поэтому регулируют разные сигнальные пути в клетке.

Активирующий киназу mTOR каскад передачи сигнала от гормонов или факторов роста начинается с активации рецепторной тирозинкиназы на плазматической мембране, которая включает ось PI3K-Akt, что в свою очередь приводит к ингибированию комплекса туберозного склероза (TSC). TSC, как известно, интегрирует входные данные от таких клеточных стрессоров, как гипоксия и ограничение уровня АТФ, и является белком, активирующим ГТФазу Rheb [Deleyto-Seldas N, Efeyan A, 2021]. При связывании с ГТФ Rheb вызывает конформационные изменения в mTORC1, что приводит к активации киназы [Anandaradamanaban M et al., 2019]. Важно отметить, что Rheb, закрепленный на внешней поверхности лизосомы, может взаимодействовать с mTORC1 и активировать его только когда mTORC1 также локализован на внешней поверхности лизомы, что происходит в зависимости от наличия питательных веществ в клетке [Sancak Y et al., 2008]. Сигналы об изменении уровня питательных веществ (аминокислот, глюкозы, некоторых липидов и, вероятно, других метаболитов) в клетке воспринимаются большим количеством белков-сенсоров и передаются на белки семейства Rag ГТФаз, которые в свою очередь взаимодействуют с mTORC1 и рекрутируют его на внешнюю поверхность лизосом, где происходит взаимодействие Rheb-mTORC1 и активация mTORC1 [Kim E et al., 2008]. Следовательно, текущая парадигма регуляции mTORC1 состоит в том, что

максимальная активность mTORC1 имеет место, когда присутствуют оба сигнала: (1) от клеточных питательных веществ для рекрутинга mTORC1 и (2) от гормонов или факторов роста для активации киназы [Deleyto-Seldas N, Efeyan A, 2021]. Последующие эффекты mTORC1 опосредуются фосфорилированием киназы p70 S6 (P70S6K), активирующей инициацию трансляции, и eIF4E-связывающего белка 1 (4EBP1), который обеспечивает 5'-кэп-зависимую трансляцию. Сигналинг же mTORC2 изучен не так подробно, но известно, что он способствует пролиферации и выживанию клеток за счет фосфорилирования Akt, PKC α , сывороточной и регулируемой глюкокортикоидами киназы 1 (SGK1), которые регулируют ремоделирование цитоскелета и миграцию клеток.

Обнаружено, что mTOR регулирует активность L-системы транспортеров аминокислот, при этом ингибирование mTOR не приводило к изменению активности системы A и транспортеров таурина в эксплантах ворсин плаценты человека, что по мнению авторов работы говорит о способности комплекса mTOR регулировать работу только определенных переносчиков аминокислот [Roos S et al., 2007]. Показано также, что подавление активности комплекса mTORC1 в культивируемых первичных клетках трофобласта человека сопровождается активацией убиквитинлигазы NEDD4-2, что приводит к усилению убиквитинирования и удалению транспортеров аминокислот SNAT-2 (система A) и LAT-1 (система L) с плазматической мембраны [Rosario FJ et al., 2016a]. Под контролем mTORC1 находятся LAT1 и LAT2, которые играют решающую роль в переносе через плаценту больших нейтральных молекул незаменимых аминокислот, подобных лейцину и метионину [Jansson T et al., 2012].

mTOR является одним из ключевых компонентов, регулирующих баланс между ростом клеток и аутофагией при физиологических условиях и в ответ на стресс-стимулы [Kim YC, Guan KL, 2015]. Обилие питательных веществ обычно активирует комплекс mTOR, что препятствует образованию аутофагосом, тогда как недостаток питательных веществ и стрессорные факторы ингибируют mTOR и приводят к активации аутофагии. Аутофагия рассматривается как процесс избирательной деградации макромолекул и поврежденных органелл с помощью

лизосом и является одним из важнейших механизмов поддержания гомеостаза в живых клетках. Было показано, что сразу после рождения уровни аминокислот и глюкозы в крови резко падают из-за прерывания трансплацентарного снабжения, и активность mTORC1 в тканях мышечной ткани подавляется в течение 1 часа после рождения. Такое быстрое и сильное торможение приводит к активации процесса аутофагии, что, в свою очередь, повышает уровень свободных аминокислот для поддержания уровня глюкозы в крови с помощью глюконеогенеза и является ключом к выживанию в первые часы жизни до момента поступления материнского молока в организм. Интересно отметить, что у новорожденных мышечной ткани с мутацией, которая делает mTORC1 конститутивно активным независимо от уровней питательных веществ, аутофагия не запускается после рождения. Такое потомство страдает от глубокого гипогликемического состояния и, наконец, умирает в течение суток после рождения [Efeyan A et al., 2012].

mTORC1 инактивирует иницирующий аутофагию комплекс ULC за счет фосфорилирования его компонентов. Так, mTORC1 фосфорилирует Ser758 в молекуле протеинкиназы ULK1, тем самым препятствуя взаимодействию и фосфорилированию ULK1 со стороны АМФ-активируемой протеинкиназы АМПК, необходимой для активации ULK1 [Jung CH et al., 2009; Kim J et al., 2011]. Кроме того, был предложен еще один механизм регуляции ULK1 с помощью mTORC1, в котором последний ингибирует ULK1 путем фосфорилирования регулятора активации Beclin-1-зависимой аутофагии АМВРА1 [Nazio F et al., 2013].

Зачастую в качестве маркеров аутофагии используются белки LC3В-II, локализующийся в мембране аутофагосомы, Beclin1 – ключевой сигнальный компонент, необходимый для образования аутофагосом, и p62, функционирующий как селективный рецептор аутофагии для деградации убиквитинированных субстратов. Сложность оценки аутофагии состоит в том, чтобы точно рассчитать скорость ее «потока». Оценить аутофагию одним методом невозможно, ввиду неоднозначности результатов. Например, несмотря на то, что при иммунофлуоресцентном анализе количество меченных белков MAP1LC3 равно количеству аутофагосом, увеличение числа MAP1LC3 может быть результатом

нарушения слияния аутофагосомы и лизосомы, а также активации аутофагии. Поэтому для подтверждения развития аутофагии в современной литературе рекомендуется использовать анализ маркеров различных стадий образования аутофаголизосом [Nakashima A et al., 2019]. Этап формирования аутофаголизосом зачастую выявляют за счет анализа колокализации MAP1LC3 и связанного с лизосомами мембранного белка LAMP. В фиксированных тканях также рекомендуется использовать отношение аутофаголизосом к аутофагосомам для оценки процесса аутофагии.

Регуляция активности mTORC с помощью вышестоящих сигнальных молекул была хорошо проиллюстрирована биохимическими, молекулярно-клеточными и структурными подходами, однако механизм, посредством которого контроль активности mTORC1 приводит к выполнению согласованной, многогранной метаболической программы в реальных органах и тканях в присутствии многочисленных физиологических факторов, а также при патологических колебаниях уровня питательных веществ и гормонов, остается недостаточно изученным.

В плаценте передача сигналов mTORC1 модулируется при осложнениях беременности, связанных с изменением роста плода, и в моделях на животных, в которых доступность питательных веществ для матери была изменена экспериментально. В плаценте человека, где mTOR экспрессируется преимущественно в зоне СТБ, при ЗВУР отмечено снижение содержания как общего mTOR, так и его фосфорилированной формы (Ser2448) по сравнению с нормальным исходом беременности. Анализ содержания фосфорилированных форм белков-эффекторов mTOR также используется для оценки активации данного комплекса [Roos S et al., 2007]. Так, уровень фосфорилированных форм 4EBP1 и p70S6K также был снижен в плацентах при ЗВУР [Hung TH et al., 2017]. На животной модели задержки роста плода, вызванной гипоксией матери, было обнаружено увеличение экспрессии мРНК mTOR и VEGF-C в плаценте при неизменном уровне мРНК 4EBP1 и p70S6K, однако уровень фосфорилированного белка mTOR был существенно снижен в группе с гипоксией [Kimball R et al., 2015].

Хроническое введение беременным крысам дексаметазона, которое, как известно, также является причиной нарушения нормального развития плода, приводило к снижению мРНК VEGF и его рецепторов, сопровождавшемуся уменьшением содержания фосфо-форм p70S6K и 4EBP1 в плаценте [Ozmen A et al., 2015]. Таким образом, можно предположить, что обнаруженное в плаценте при ЗВУР снижение активности комплекса mTOR может приводить к изменению транспорта аминокислот и, как следствие, к нарушению роста плода. При этом в плаценте при ЗВУР также отмечается значительное повышение уровня маркеров аутофагии LC3B-II и Beclin1 совместно со снижением содержания белка p62 [Hung TH et al., 2017; Zhang QX et al., 2017].

В экспериментальных моделях показано, что различные неблагоприятные воздействия со стороны организма матери могут изменять активность комплекса mTOR в мозге плодов. Гипоксия, вызванная ишемией и последующей реперфузией маточной артерии и артерии яичника, вызывала снижение фосфорилирования Akt, mTOR и p70S6K в мозге плода мыши, что, по мнению авторов, свидетельствовало о нарушении биосинтеза белка [Dong Y et al., 2014]. Такие же изменения активации комплекса mTOR другими авторами были ассоциированы с развитием аутофагии, которая регистрировалась на основании повышения уровней LC3B-II, Beclin1 и снижения содержания белка Sqstrm1 (p62) в культуре клеток нейробластомы человека (SH-SY5Y) при добавлении этанола, а также в коре и мозжечке семидневных мышей при введении им этанола [Chen G et al., 2012]. Потребление алкоголя матерью в период, аналогичный третьему триместру беременности человека, также вызывало снижение отношения фосфорилированных mTOR, p70S6K, 4EBP1 к общему содержанию данных белков в мозжечке плодов овец [Sawant OB et al., 2020]. В гиппокампе плодов крыс с хронической алкогольной интоксикацией обнаружено увеличение фосфорилирования p70S6K и 4EBP1 параллельно с повышением уровня белка DEPTOR [Lee J et al., 2020], гиперэкспрессия которого по данным литературы приводит к ингибированию сигналинга комплекса mTORC1 [Catena V, Fanciulli M, 2017]. На модели с введением беременным мышам липополисахарида был показан время-зависимый

эффект активации комплекса mTOR. Так, в мозге плода через 2 часа после инъекции отмечено повышение содержания p70S6K, 4EBP1 и их активированных форм, однако через 24 часа обнаружено снижение уровня фосфорилированных mTOR, p70S6K и 4EBP1, при этом исследование маркера аутофагии LC3B-I/II не выявило достоверных отличий [Dong J et al., 2020]. Использование 3,5% севофлурана в качестве анестезии способствовало угнетению сигналинга PTEN, p-Akt/Akt и mTOR в мозге плодов крыс и активации аутофагии, однако введение ингибитора PTEN у таких крысят приводило к увеличению содержания p-Akt и mTOR, которое сопровождалось снижением уровня LC3B-II и Beclin-1, числа TUNEL-позитивных клеток и увеличением количества Ki67-иммунореактивных клеток, что свидетельствует о том, что аутофагия может быть вовлечена в регуляцию апоптоза и пролиферации [Li X et al., 2017].

Вместе с тем, влияние ГГЦ матери на систему mTOR в плаценте и мозге плода остается мало изученным. Эффекты ГЦ на передачу сигналов mTOR изучались преимущественно в постнатальный период у грызунов или на клеточных культурах, при этом результаты таких исследований немногочисленны и неоднозначны. Так, инкубация *in vitro* культуры плюрипотентных стволовых клеток переднего мозга человека с ГЦ приводила к увеличению фосфорилирования субстратов mTORC1 (p-P70S6K, p-4EBP1 и p-TFEB), что сопровождалось снижением активации аутофагии, сходный эффект на систему mTOR наблюдался в мозге мышей с дефектом гена цистатионин- β -синтазы *in vivo* [Khayati K et al., 2017]. Эффект ГЦ в первичной культуре астроцитов мыши был дозозависим, при этом активация комплекса mTOR сопровождалась фосфорилированием его эффекторных молекул (P70S6K, 4EBP1) и снижением экспрессии белков, ассоциированных с лизосомами (Lamp2, Cttd) и аутофагией (LC3B, Sqstrm1, Atg12) [Tripathi M et al., 2016]. В нейрональных стволовых клетках, полученных из субвентрикулярной зоны крысы, ГЦ за счет снижения активации ERK1/2 и PI3K-AKT ингибировал комплекс mTOR, при этом отношение LC3 II/LC3 I и уровень Beclin-1 были повышены, что свидетельствует о более активном образовании аутофагосом [Wang M et al., 2019]. Также показано, что ГГЦ значительно усиливает

экспрессию маркеров аутофагии в нейронах коры головного мозга крыс после окклюзии и последующей реперфузии средней мозговой артерии [Zhao Y et al., 2016]. Культивирование клеток трофобласта при различных концентрациях ГЦ не оказывало никакого эффекта на сигналинг mTOR [Silva E et al., 2017], несмотря на то, что было показано, что сигналинг mTORC1 и mTORC2 вовлечен в регуляцию переноса к плазматической мембране определенных изоформ транспортеров аминокислот (SNAT1 и LAT1). Этими же авторами обнаружено, что дефицит фолиевой кислоты у мышей *in vivo* специфически снижает содержание белков этих двух изоформ переносчиков в МВМ СТБ [Rosario FJ et al., 2013]. В связи с этим, предполагается, что подавление плацентарного транспорта аминокислот у самок с дефицитом фолиевой кислоты является результатом ингибирования mTORC1 и 2.

Таким образом, mTORC1 координирует процессы анаболизма и катаболизма, чтобы обеспечить потребности растущих и дифференцирующихся клеток. В таких клетках высокая активность mTORC1 способствует синтезу биомолекул и одновременно подавляет аутофагию. mTORC1 жестко регулирует аутофагию через ингибирование ULK1/2, а также предотвращение экспрессии генов лизосом и аутофагии посредством фосфорилирования транскрипционных факторов. При этом, исследования роли комплекса mTOR в опосредовании эффектов материнской ГГЦ, при которой наблюдается повышение уровня ГЦ в организме матери и плода, на функциональное состояние плаценты до настоящего времени не проводились.

1.3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии на процессы эпигенетической регуляции в мозге плода и плаценте

Известно, что ГЦ, будучи вовлеченным в пути метаболизма одноуглеродных фрагментов, способен влиять на процессы метилирования в клетках, в частности, на уровень ДНК-метилирования, считающийся основным механизмом эпигенетической регуляции. Воздействие материнской ГГЦ на процессы эпигенетической регуляции в тканях плаценты и плода, приводящее к множественным изменениям экспрессии различных генов, также может вносить свой вклад в дезорганизацию программы развития мозга плода [Kim JM et al., 2009;

Kim KC et al., 2009; Gueant JL et al., 2013; McGee M et al., 2018; Li W et al., 2019; Naninck EFG et al., 2019; Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019; Liu HY et al., 2020].

Путем воздействия на эпигенетические механизмы или другие сигнальные пути материнская ГГЦ может также влиять на выработку плацентой различных ростовых и ангиогенных факторов, в том числе тех, которые, проходя через трансплацентарный барьер, оказывают регуляторное воздействие на развитие мозга плода [Lecuycr M et al., 2017].

Эпигенетическая регуляция играет важную роль как при нормальных, так и при патологических состояниях организма и находится под влиянием различных экзогенных и эндогенных факторов. Предполагается, что ГГЦ, как фактор риска различных патологических состояний, влияющих на здоровье матери и плода, способна изменять эпигенетический профиль плаценты и нервной ткани плода, что, в свою очередь, может сделать их более чувствительными к различным повреждениям.

Важную роль в регуляции транскрипции генов, отвечающих за развитие организма в норме и в условиях воздействия неблагоприятных факторов, играют эпигенетические механизмы, к которым относятся метилирование ДНК, ковалентные посттрансляционные модификации гистонов (их метилирование, ацетилирование и др.), а также регуляция активности генов при помощи микроРНК. Изменение уровня метилирования ДНК является одним из главных эпигенетических механизмов регуляции активности генов [Bhutani N et al., 2011], при этом считается, что метилирование приводит к ингибированию, а деметилирование – к активации транскрипции генов [Freitag M, Selker EU, 2005; Weber M et al., 2007]. В свою очередь, метилирование гистонов изменяет структуру хроматина, что определяет доступ транскрипционных факторов к регуляторным сайтам ДНК [Suganuma T, Workman JL, 2011].

В период эмбрионального развития каждая клетка, ткань и орган приобретают характерные только для них паттерны экспрессии генов, которые, как считается, опосредуются эпигенетическими модификациями, в частности, метилированием ДНК [Kim KC et al., 2009]. Количество и состав поступающих от матери к плоду

питательных веществ, прежде всего тех, что участвуют в метаболизме метильных групп, могут оказывать воздействие на этот важный эпигенетический процесс, влияя тем самым на развитие плода и даже на состояние потомства в его дальнейшей жизни [Gueant JL et al., 2013].

Предполагается, что нарушения формирования нервной системы плода, в том числе врожденные дефекты развития нервной трубки, фактором риска которых является снижение уровня фолатов и повышение содержания ГЦ в крови матери, могут быть связаны с эпигенетическими регуляторными механизмами, контролирующими пролиферацию и дифференцировку нейронов [Kim KC et al., 2009; Liu HY et al., 2020].

Паттерн метилирования устанавливается во время эмбриогенеза семейством ДНК-метилтрансфераз (DNMT) [Fan G, Hutnick L, 2005]. DNMT1 осуществляет метилирование в процессе репликации ДНК, тогда как другие члены семейства DNMT (DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L) экспрессируются только в период эмбрионального развития и ответственны за метилирование ДНК *de novo* [Newell-Price J et al., 2000; Feng J et al., 2005; Martins-Taylor K et al., 2012]. ДНК-метилирование осуществляется DNMT путем присоединения метильной группы к остатку цитозина в динуклеотиде CpG. Поэтому для оценки уровня ДНК-метилирования в целом чаще всего используют подход, основанный на определении общего содержания 5-метилцитозина. У позвоночных животных метилирование цитозина ДНК является одним из основных эпигенетических факторов, который регулирует многие клеточные события, включая регуляцию онтогенетических генов, инактивацию X-хромосомы, защиту генома и геномный импринтинг [Jaenisch R, Bird A, 2003].

Исследование процесса метилирования ДНК в мозге плода представляет особый интерес для понимания причин возникновения нарушений его развития. Мыши с мозгом, состоящим из 95% гипометилированных клеток (в результате условного нокаута гена DNMT1), умирали при рождении из-за дыхательной недостаточности, что указывает на жизненно важную функцию метилирования ДНК в ЦНС. Животные с более низким содержанием гипометилированных клеток

в мозге (30%) выживали, однако гипометилированные клетки претерпевали интенсивную клеточную гибель в течение первых 3-х недель постнатальной жизни, подтверждая то, что метилирование ДНК имеет решающее значение для выживания нейронов в постнатальный период [Fan G et al., 2001]. Показано, что в развивающемся мозге мыши снижение экспрессии DNMT1 в клетках-предшественниках негативно влияет на созревание и выживание нейронов и вызывает преждевременную астроглиальную дифференцировку [Hutnick LK et al., 2009].

В ходе метионинового цикла под действием метионин аденозилтрансферазы метионин превращается в S-аденозилметионин (SAM), который служит донором метильных групп для метилирования ДНК, РНК, гистонов, фосфолипидов, катехоламинов и других субстратов. В результате реакций метилирования, катализируемых метилтрансферазами, SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH), гидролизующийся затем до ГЦ под действием S-аденозилгомоцистеингидролазы. Реакция гидролиза SAH обратима, ее равновесие смещено в обратном направлении, так что для того протекания этой реакции в сторону образования ГЦ необходимо постоянное его удаление из клеток в кровь. Поэтому повышенный уровень общего ГЦ в плазме может рассматриваться как косвенный показатель повышенного внутриклеточного уровня SAH [James SJ et al., 2002].

Поскольку SAH является ингибитором метилтрансфераз, внутриклеточное соотношение SAM/SAH рассматривается как показатель потенциальной способности клетки к метилированию [James SJ et al., 2002; Gueant JL et al., 2013]. Однако это упрощенное представление не всегда находит подкрепление в экспериментальных данных [Esse R et al., 2014; Lee HO et al., 2017], поскольку в нем не учитывается, является ли недостаточность субстрата SAM, либо накопление продукта SAH, либо и то и другое фактором, отрицательно влияющим на процесс метилирования. Высказаны предположения, что повышенный уровень SAH сам по себе является более информативным показателем потенциала метилирования по сравнению с соотношением SAM/SAH [Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019].

Поскольку ГГЦ приводит к повышению внутриклеточного уровня SAH, являющегося ингибитором активности ДНК-метилтрансфераз, закономерно предположить, что общим следствием ГГЦ является снижение ДНК-метилирования в клетках, приводящее к увеличению экспрессии специфических генов, вызывающее нарушения программы развития организма. Вместе с тем, данные о нарушении механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов при ГГЦ, полученные в экспериментальных исследованиях, не всегда соответствуют этой схеме [Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019]. То, каким образом ГГЦ влияет на экспрессию генов у экспериментальных животных, зависит от многих факторов, включая пол, тип диеты или мутации в генах, участвующих в метаболизме ГЦ. Зачастую обнаруживается, что некоторые гены по-разному экспрессируются в результате как генетических, так и диетических факторов, тогда как другие специфичны для определенного типа ГГЦ [DiBello PM et al., 2010; Suszynska-Zajczyk J, Jakubowski H, 2014; Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019].

Изучением влияния изменений в соотношении SAM/SAH на уровни метилирования в различных органах и тканях более 20 лет занимается группа ученых (S. Jill James, Stepan Melnyk, Igor Pogribny и др.), работающих в Отделении педиатрии Арканзасского Медицинского Университета (Department of Pediatrics, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, USA) и Отделении биохимической токсикологии Национального центра токсикологических исследований (Division of Biochemical Toxicology, National Center for Toxicological Research, Jefferson, Arkansas, USA). В их ранних исследованиях было установлено, что хроническое повышение уровня ГЦ приводит к параллельному увеличению внутриклеточного содержания SAH и значительному снижению активности ДНК-метилтрансфераз путем ингибирования продуктом реакции]Было высказано предположение, что SAH-опосредованное гипометилирование ДНК и связанные с ним изменения в экспрессии генов и структуре хроматина могут участвовать в патогенезе заболеваний, связанных с ГГЦ. В дальнейших исследованиях эта гипотеза нашла подтверждение в части того, что ГГЦ оказывала влияние на процессы метилирования ДНК. Однако, характер этого влияния в различных

моделях ГГЦ не всегда соответствовал предложенной схеме [Pogribny IP et al., 2008b]. В настоящее время этой группой исследователей изучается возможная связь развития аутизма с нарушениями метаболизма фолатов и одноуглеродных групп (изменения уровней SAH, SAM и ГЦ) у больных детей и их матерей [James SJ et al., 2010; Zhu Y et al., 2021].

Значительное число исследований посвящено изучению воздействия ГГЦ на процессы метилирования в мозге взрослых животных, как модели нейродегенеративных нарушений во взрослом и старческом возрасте. Полученные данные свидетельствуют об изменениях под влиянием хронической ГГЦ содержания ДНК-метилтрансфераз, общего метилирования ДНК, метилирования CpG-богатых регуляторных областей и промоторов отдельных генов в мозге, что, по мнению авторов, может приводить к нейродегенеративным нарушениям [Pogribny IP et al., 2008b; Kalani A et al., 2014a; Kalani A et al., 2014b; Li JG et al., 2017]. Установлено, что ГЦ может вызывать дисфункцию гематоэнцефалического барьера, влияя на метилирование ДНК и гистонов, а также на уровни микроРНК. ГГЦ индуцировала увеличение в несколько раз 20 микроРНК в клетках эндотелия мозга мыши, с наибольшим повышением членов семейства miR29. Увеличение количества miR29b в мозге мышей сопровождалось изменением уровня DNMT3b и повышением уровня белка и активности металлопротеиназы MMP-9, что может являться причиной нарушения целостности гематоэнцефалического барьера [Kalani A et al., 2014a]

Вместе с тем, влияние пренатальной ГГЦ на уровень метилирования ДНК в мозге плодов/новорожденных в экспериментальных моделях изучено недостаточно. В частности, показано, что недостаток или избыток фолатов в пище беременных мышей не изменяет уровень общего метилирования ДНК в мозге их новорожденного потомства, что указывает на наличие гомеостатических механизмов, поддерживающих относительную стабильность этого показателя в развивающемся мозге, возможно, за счет использования других доноров метильных групп [Harlan De Crescenzo A et al., 2020]. При более выраженном недостатке в пище метильных доноров (фолатов, витамина B₁₂ и холина) у самок

крыс развивается ГГЦ, сопровождавшаяся снижением в мозге плодов (E20) общего уровня метилирования ДНК, а также отношения SAM/SAH [Geoffroy A et al., 2017].

Помимо воздействия на мозг плода, материнская ГГЦ посредством изменения паттернов метилирования ДНК и экспрессии генов, может также негативно влиять на функциональное состояние плаценты [Kim JM et al., 2009; Li B et al., 2019; Liu NY et al., 2020]. В настоящее время ввиду ограниченного числа исследований, посвященных изучению роли ДНК-метилирования в плаценте, и неоднородного характера полученных результатов трудно представить себе, насколько изменения в этом процессе соотносятся с осложнениями беременности, которые могут приводить к нарушениям развития плода и новорожденного. Показано, что геном плаценты гипометилирован по сравнению с тканями плода [Fuke C et al., 2004], что может быть обусловлено гетерогенностью плацентарной ткани и неодинаковым профилем ДНК-метилирования имеющихся в ней различных клеточных популяций [Bianco-Miotto T et al., 2016]. Уровень метилирования ДНК в плаценте крыс при ГГЦ, вызванной диетой с избытком ГЦ и дефицитом фолатов, был снижен и имел положительную корреляцию с уровнем фолатов и обратную корреляцию с уровнем ГЦ в сыворотке крови [Kim JM et al., 2009; Kim KC et al., 2009]. У женщин наблюдалась сходная негативная ассоциация между уровнем метилирования ДНК в плаценте и содержанием ГЦ в крови [Park BH et al., 2005].

Влияние ГГЦ на эпигенетическую регуляцию активности генов NTs, в частности, BDNF и NGF, пока остается малоизученным, хотя подобные гипотезы были высказаны [Dhobale MV et al., 2013; Dhobale M, 2017]. В покоящихся/недеполяризованных нейронах мыши промотор гена *Bdnf* сильно метилирован и ассоциирован с метил-СрG-связывающим белком MeCP2, являющимся репрессором транскрипции [Fan G, Hutnick L, 2005]. Поскольку снижение уровня метилирования ДНК может приводить к диссоциации MeCP2 от промотора *Bdnf*, активному ремоделированию хроматина и активации гена *Bdnf* [Chen WG et al., 2003; Martinowich K et al., 2003], теоретически это может быть одним из механизмов воздействия ГГЦ на уровень его экспрессии. Показано влияние введения метионина на метилирование гена *Bdnf* в гиппокампе взрослых

крыс [Parrish RR et al., 2015], а также избытка фолиевой кислоты в пище беременных самок мышей на уровень метилирования и экспрессию этого гена в гиппокампе потомства [Yan Z et al., 2017].

Следует отметить, что в процессе физиологического развития общий уровень метилирования ДНК, а также степень метилирования отдельных генов претерпевают изменения, динамика которых в различных отделах мозга плода и плаценты, а также роль в процессах морфологического и функционального созревания этих органов пока недостаточно исследованы [Liu HY et al., 2020]. Это делает невозможным в настоящее время выдвигать чёткие предположения о функциональных последствиях изменений под влиянием пренатальной ГГЦ уровня общего метилирования ДНК и метилирования отдельных генов в отдельных областях мозга и плаценты в определенный период их развития. Анализ отмеченных в исследованиях *in vitro* и *in vivo* изменений в экспрессии генов под влиянием ГГЦ показывает, что затрагивается широкий спектр важных метаболических процессов, таких как метаболизм глюкозы, аминокислот и белков, реакция на окислительный стресс и др. При текущем уровне знаний по данному вопросу можно только констатировать, что пренатальная ГГЦ путём воздействия на уровень метилирования ДНК может приводить к изменению программы развития плода [Geoffroy A et al., 2019].

Вышеизложенное диктует целесообразность дальнейшего исследования влияния экспериментальной пренатальной ГГЦ на процессы метилирования ДНК и эпигенетической регуляции активности отдельных генов в плаценте и мозге плода.

Гипометилирование ДНК ассоциировано с гиперацетилированием гистонов и деконденсированием хроматина из-за снижения связывания белков-репрессоров транскрипции, таких как метил-СрG-связывающий белок 2 и гистондеацетилазы (HDAC) [Nan X et al., 1998]. До сих пор нет прямых доказательств участия ГЦ в ацетилировании гистонов, но предполагается, что посредством снижения уровней метилирования и изменения активности метил-СрG-связывающих белков ГЦ может снижать рекрутирование HDAC. Это, в свою очередь, вызывает накопление

ацетилированных по остаткам лизина гистонов H3 и H4. Гипометилирование ДНК и ацетилирование гистонов усиливают деконденсацию хроматина и доступность ДНК, вызывая активацию транскрипции [Lu Y et al., 2016]. Таким образом, индуцированное ГЦ гипометилирование промоторных областей генов может приводить к их несвоевременной активации, что может сделать ткани более чувствительным к различным повреждениям [Tothova B et al., 2018].

Все больше данных указывает на дисбаланс ацетилирования/деацетилирования гистонов при различных патологиях, влияющих на центральную нервную систему. В модели ГЦ совмещенной с глобальной ишемией переднего мозга у крыс было показано повышение уровня ацетилирования гистона H4 по лизину 12 (H4K12ac) при воздействии ГЦ, что может быть связано с индуцируемыми ГЦ нейровоспалительными процессами [Tothova B et al., 2018].

В отдельных исследованиях показано, что в печени крыс с задержкой внутриутробного развития, вызванной гипоксией вследствие плацентарной недостаточности, совместно с увеличением уровня ГЦ и других участников метионинового цикла наблюдалось гипометилирование ДНК, снижение экспрессии DNMT1 и существенное увеличение содержания ацетилированного гистона H3 [MacLennan NK et al., 2004]. У потомства самок крыс, потреблявших во время беременности соевый белок, наблюдалось повышение уровня ГЦ в сыворотке крови, сопровождавшееся увеличением ацетилирования гистона H3K9 и гипометилированием ДНК в печени [Won SB et al., 2017].

Важная роль в эпигенетической регуляции в плаценте и мозге плода принадлежит метилированию гистонов. Метилирование гистонов происходит по остаткам аргинина или лизина и, повышая гидрофобность гистонов, влияет на связывание белков, регулирующих экспрессию генов. Поскольку SAM является субстратом для всех ферментов, метилирующих гистоны, а SAH – их ингибитором, уровень ГЦ может влиять на эту модификацию гистонов [Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019].

В настоящее время активно изучается деметилаза гистонов PHF8 (plant homeodomain finger protein 8), предполагаемым результатом изменения активности гена, которой являются эпигеномные нарушения, выражающиеся в снижении нейрональной пластичности и когнитивном дефиците [Chen X et al., 2018]. Предыдущие исследования показали, что PHF8 удаляет в основном моно- и диметильные группы на остатке 9-го лизина гистона H3 (H3K9me1/2) и моно- и триметильные группы на остатке 20-го лизина гистона H4 (H4K20me1/3) [Pasobucci S et al., 2021].

У мышей с нокаутом *Phf8* обнаружены нарушения обучения и памяти, а также гиперактивация сигнального пути RSKs-mTOR-S6K в гиппокампе, при этом ингибирование сигналинга mTOR рапамицином восстанавливало нарушенные когнитивные функции. Предполагается, что PHF8 регулирует сигнальный путь mTOR через деметилирование гистона H4K20me1, приводящее к снижению транскрипции гена *RSK1* [Chen X et al., 2018]. Показано также, что PHF8 участвует в процессах дифференциации астроцитов и синаптогенеза в мозге плода [Pasobucci S et al., 2021].

Недавно появились данные о том, что опосредованная PHF8 эпигенетическая дисрегуляция сигнальных путей mTOR и аутофагии вносит вклад в развитие когнитивного дефицита у мышей с ГГЦ [Witucki L, 2021]. Под воздействием пищевого дефицита метионина и других доноров метильных групп в печени крыс отмечены изменения уровней метилированных гистонов H3K9me1 и H4K20me3 [Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019], являющихся мишенями PHF8 [Pogribny IP et al., 2006]. Однако, влияние ГЦ на активность деметилазы PHF8 и уровень метилирования ее мишеней-гистонов в системах *in vitro* или *in vivo* до сих пор не было изучено.

Помимо влияния на уровень метилирования ДНК и ацетилирования гистонов, материнская ГГЦ может также оказывать воздействие на функции плаценты и мозга плода через эпигенетические механизмы, связанные с изменением экспрессии специфических микроРНК в этих органах. В плаценте это влияние может быть опосредовано изменением уровней микроРНК, мишенями которых

являются транспортеры аминокислот и глюкозы, а также датчики уровня доступных питательных веществ, такие как mTOR [Ganguly A et al., 2016; Thamotharan S et al., 2017; Sedlmeier EM et al., 2021].

Активные формы кислорода и гипоксия являются важными регуляторами экспрессии плацентарных микроРНК. Индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) является главным транскрипционным фактором, уровень которого повышается в ответ на гипоксию. Среди множества генов-мишеней фактора HIF-1 α находится ген, кодирующий miR-210. MiR-210 является ключевым фактором ответа на гипоксию как в норме, так и в условиях болезни, что лежит в основе его признания главной индуцируемой гипоксией микроРНК [Chan SY, Loscalzo J, 2010]. ОС также опосредует экспрессию miR-210, что подчеркивает наличие независимых от гипоксии механизмов, вносящих свой вклад в регуляцию miR-210 [Rudov A et al., 2014].

Наибольшее число исследований уровней микроРНК в плаценте проведено в аспекте изучения патогенеза ПЭ. Во многих исследованиях обнаружено, что активность miR-210 конститутивно повышена в плаценте и плазме при ПЭ, вследствие чего ее, наряду с miR-155, рассматривают в качестве одного из предикторов развития ПЭ [Cai M et al., 2017; Lv Y et al., 2019]. Это согласуется с представлениями о том, что одной причин развития ПЭ служит аномалии плацентарного ангиогенеза (регулируется miR-155), приводящие к состоянию гипоксии. Предполагается, что изменение спектра и уровня микроРНК при ПЭ может вызывать снижение пролиферации и инвазии трофобласта, а также нарушения ангиогенеза, наблюдаемые при данной патологии [Chen DB, Wang W, 2013; Fu G et al., 2013; Escudero CA et al., 2016]. Помимо повышения уровня miR-210 и miR-155, при ПЭ в плаценте наблюдается активация еще более 10 связанных с окислительным стрессом микроРНК, в том числе miR-29b [Rudov A et al., 2014]. Отмечено, что повышение уровня miR-29b усиливает процессы апоптоза в культуре клеток трофобласта, снижает их способности к инвазии и ангиогенезу [Fu G et al., 2013]. С другой стороны, снижение уровня miR-29b в клетках трофобласта приводит к значительному повышению экспрессии генов ДНК-метилтрансфераз

(*DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*), сиртуина *SIRT1*, сопровождающемуся повышением общего метилирования ДНК и снижением общего ацетилирования белков [Sonkar R et al., 2019].

При плацентарной недостаточности, приводящей к ЗВУР, отмечено нарушение экспрессии генов, влияющих на перенос питательных веществ от матери к плоду [Thamotharan S et al., 2017]. Чтобы понять посттранскрипционные механизмы, лежащие в основе подобных изменений экспрессии генов в плаценте, необходимо идентифицировать ключевые некодирующие микроРНК, которые имеют выраженные биологические функции. В этом отношении особый интерес представляет исследование изменения экспрессии в плаценте нескольких специфических микроРНК: miR-363 (гены-мишени – *SNAT1*, *SNAT2*, *GLUT3*, рецептор инсулина), miR-149 (ген-мишень – *LAT2*) и miR-122 (ген-мишень – *GLUT3*). В модели ограничения калорийности питания у беременных мышей, сопровождаемым нарушением трансплацентарного транспорта глюкозы и лейцина [Ganguly A et al., 2012], было показано, что снижение в плаценте уровня изоформы переносчика глюкозы GLUT3 и переносчика аминокислот LAT2 сопровождается увеличением экспрессии miR-122 (ген-мишень – *GLUT3*) и miR-149 (ген-мишень – *LAT2*), без заметного изменения экспрессии miR-363 (гены-мишени – *SNAT1* и *SNAT2*) [Ganguly A et al., 2016]. Уровень miR-363 и miR-149 повышался в плацентах женщин, плоды которых были маловесны для гестационного возраста или страдали ЗВУР. Ограничение питательных веществ *in vitro* в культуре клеток трофобласта, используемое в качестве модели ЗВУР, выявило повышение уровня miR-149. Ингибирование в этой же модели miR-363 и miR-149 при помощи антисмысловых последовательностей приводило к соответственному увеличению экспрессии их генов-мишеней, которое транслировалось в аналогичное повышение уровней кодируемых ими белков [Thamotharan S et al., 2017].

Избыток некоторых питательных веществ в крови матери также может влиять на активность трансплацентарного транспорта путем воздействия на уровень плацентарных микроРНК. Преобладание омега-6 длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот (LCPUFA) над омега-3 LCPUFA в крови

матерей в период беременности может приводит к развитию ожирения у потомства. Отмечено, что изменение соотношения омега-6/омега-3 LCPUFA в крови матерей влияет на плацентарную экспрессию miR-99a и ее предполагаемых генов-мишеней *mTOR*, *SLC7A5* (кодирует транспортер аминокислот LAT1) и *SLC6A6* (кодирует транспортер таурина TauT). При этом наблюдается изменение уровня субстрата переносчика LAT1 триптофана и субстрата TauT таурина как в крови матерей, так и в пуповинной крови плодов. Авторы предполагают, что плацентарные уровни miR-99, мРНК *SLC7A5* (LAT1), а также уровни таурина и триптофана в плазме матери и плода являются потенциальными предикторами возможного развития ожирения у потомства [Sedlmeier EM et al., 2021].

Были предприняты отдельные попытки изучения влияния дефицита в пище матерей во время беременности метильных доноров (приводящего к материнской ГГЦ) на уровень некоторых микроРНК в мозге их плодов. В этой модели показано повышение в мозге плодов (E20) уровня микроРНК let-7a и miR-34a [Geoffroy A et al., 2017]. Let-7 оказывает воздействие на регуляторные пути, контролирующие пролиферацию и дифференцировку нервных клеток, тесно связанные с возникновением дефектов нервной трубки. Гены-мишени, на которые воздействует miR-34a, вовлечены в регуляцию клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки и поддержания функций нейронов. Повышение уровня miR-34a в мозге новорожденных крысят, матери которых получали пищу с дефицитом фолатов, сопровождалось усилением апоптоза в коре и гиппокампе [Li W et al., 2019]. К моменту отнятия от груди (P21) у потомства матерей с пищевым дефицитом метильных доноров наблюдалось снижение содержания в мозге miR-34a, а также miR-23, являющейся, помимо регуляции клеточной пролиферация и апоптоза, ключевым фактором миелинизации [Geoffroy A et al., 2019].

Вместе с тем, до сих пор нет сведений об изучении непосредственного влияния ГЦ на уровни микроРНК в клетках трофобласта *in vitro* или в плаценте *in vivo*, что обуславливает необходимость проведения подобных исследований.

Таким образом, обзор современных направлений исследований ГГЦ показывает, что лишь малая в процентном отношении их часть касается экспериментального изучения влияния ГГЦ матери на развитие плода. При этом в поле зрения практически всех исследований пренатальной ГГЦ попадает развивающийся мозг плода, как один из наиболее уязвимых к различным неблагоприятным воздействиям орган. Воздействие же материнской ГГЦ на плаценту, ее развитие, созревание, формирование сосудистой сети, необходимой для отвечающего потребностям плода транспорта питательных веществ и кислорода, практически не изучено. Не исследованным остается и возможное влияние материнской ГГЦ на синтез и/или транспорт плацентой соединений, способных проходить через трансплацентарный барьер и участвовать в регуляции развития мозга плода. Потенциальными, но не изученными, мишенями воздействия ГГЦ на транспортную функцию плаценты могут являться контролируемые комплексом mTORC сигнальные пути, ответственные за регуляцию транспорта питательных веществ к плоду в зависимости от его потребностей и уровня питательных веществ в организме матери. Несмотря на то, что воздействие ГГЦ на процессы эпигенетической регуляции в последние годы интенсивно изучается, такое влияние в отношении плаценты и мозга плода и его функциональные последствия остаются слабо изученными. Этот пробел в имеющихся знаниях диктует необходимость исследований влияния ГГЦ на плаценту и поиска новых мишеней воздействия ГЦ, через которые может осуществляться его негативное влияние на внутриутробный рост и развитие плода, в первую очередь, на формирование его мозга, следствием нарушения которого могут явиться различные неврологические нарушения у потомства.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Крысы линии Wistar были получены из Питомника лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл., Россия. Животных содержали в виварии с искусственной вентиляцией при постоянной комнатной температуре с контролируемым 12-часовым циклом света и темноты, и они получали стандартный лабораторный корм (полнорационный комбикорм рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных, ГОСТ 34566-2019, ООО «Провими», Россия) и фильтрованную водопроводную воду *ad libitum*.

Однократное введение метионина для анализа суточной динамики изменения уровня ГЦ в сыворотке крови небеременных самок крыс разного возраста в норме и при однократной метиониновой нагрузке

В данной серии экспериментов исследовались половозрелые самки крыс 6-7 мес. и возрастные самки крыс 20-22 мес., у которых уже отсутствуют эстральные циклы. В каждой возрастной группе животные были разделены на две подгруппы: первая – самки, которым однократно *per os* вводили 0,15%-й водный раствор L-метионина (0,6 г/кг массы животного); вторая – контрольная, которым однократно *per os* вводили воду. Всем животным проводили забор крови из десны [Зильфян В.Н., 1970] до введения метионина/воды (для оценки фонового уровня ГЦ в сыворотке крови), через 1, 3, 6 и 24 ч после введения. Пробы центрифугировали 2000g в течение 10 мин.

Введение метионина для создания модели хронической гипергомоцистеинемии у небеременных самок крыс различного возраста.

Экспериментальные животные были разделены на три возрастные группы:

1-ую группу составили молодые половозрелые самки крыс 6-7 мес., которые имели регулярные нормальные эстральные циклы – наличие трех последовательных четырехдневных эстральных цикла;

2-ую группу составили самки крыс с преобладающими иррегулярными эстральными циклами 13-14 мес., у которых наблюдается нарушение эстральных циклов, характеризуемое удлинением стадий диэструса или эструса;

3-ю группу составили самки крыс 20-22 мес., половая цикличность у которых полностью прекращается, вследствие чего наблюдается стадия постоянного диэструса.

В каждой возрастной группе животные были разделены на две подгруппы: контроль – самки крыс, которым ежедневно, в течение 30 дней, перорально через зонд вводили воду; подопытные животные с ГГЦ – самки, которым создавали экспериментальную ГГЦ путем ежедневного, однократного, в течение 30 дней перорального введения 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,6 г/кг массы животного).

Декапитацию животных проводили на стадии проэструса и диэструса. Самки крыс были разделены также на контрольную группу (104 животных разного возраста) и подопытную, получавшую метиониновую нагрузку (106 животных разного возраста).

Стадии эстрального цикла определяли ежедневно по соотношению различных типов клеток во влагалищных мазках [Marcondes FK et al., 2002].

Однократное введение метионина для анализа суточной динамики изменения уровня ГЦ в различных структурах мозга самок крыс

В данном эксперименте использовали однократное пероральное введение 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,6 г/кг массы животного) на 4-й день беременности. Исследование выполнено на 30 самках крыс. Уровень ГЦ оценивали в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке до введения метионина, через 1, 3, 6 и 24 ч после его введения. Образцы тканей структур мозга были гомогенизированы на льду в соотношении 1:1 (w/v) в 0,01М буфере PBS, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 16000 g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса. Концентрирование супернатантов проводили с использованием вакуумного концентратора Labconco (США).

Хроническое введение метионина беременным самкам крыс для создания модели пренатальной гипергомоцистеинемии плода

В эксперименте использовали хроническое ежедневное пероральное введение раствора L-метионина. Животные были разделены на две группы. Первая группа

(контрольная, n=150) состояла из самок крыс, находившихся на стандартном рационе с дополнительным ежедневным пероральным введением питьевой воды с 4-го по 14-й или 20-й день беременности, либо до родоразрешения. Вторую группу (n=150) составили самки, которым также в эти периоды беременности на фоне стандартного корма и воды ежедневно, один раз в сутки, перорально вводили 0,15%-й водный раствор L-метионина (0,6 г/кг массы животного).

Подсадку самцов к самкам проводили на стадии проэструса, с этой целью предварительно определяли стадии эстрального цикла по влагалищным мазкам. Факт наступления беременности констатировали по наличию сперматозоидов во влагалищном мазке на следующий день.

На 14-й или 20-й день беременности, через 24 часа после последнего введения метионина/воды часть самок обеих групп декапитировали. Были проанализированы классические параметры развития, такие как вес плаценты, масса тела мозга плода на E14 и E20. Кровь беременных самок на 14-й и 20-й день беременности, а также пулированную кровь плодов на E20 (с плодов одного рога матки) центрифугировали 2000g в течение 10 мин. Для дальнейших биохимических исследований сыворотка крови, образцы ткани плацент, мозга плодов и беременных самок крыс хранили при -80°C до времени анализа. Плаценты на E14 и E20 для морфологического анализа – фиксировали в течение недели в растворе 10%-ого формалина.

У когорты экспериментальных и контрольных беременных самок крыс на 3-й день беременности (E3), то есть до начала введения метионина/воды, на 7-й (E7), 12-й (E12) дни у них забирали кровь из десныⁱ, а на 20-й (E20) после декапитации для отслеживания суточной динамики уровня ГЦ в сыворотке крови. Забор крови происходил через 1, 6, 18 и 24 часа после введения метионина/воды.

Самки обеих групп, которые не были выведены из эксперимента во время беременности, после родоразрешения прекращали дополнительно получать метионин/воду. Таким образом, далее, в период лактации, матери находились исключительно на стандартном корме. Потомство выводили из эксперимента на P1 (новорожденные, 1-ый день жизни), P3, P5, P20, P30, P75, P90. После декапитации

потомства определяли их массу мозга, проводили забор крови. Мозг на P5 и P20 на биохимические исследования – замораживали при -80°C , на морфологические исследования – фиксировали в течение недели в растворе 10%-ого формалина. У половозрелого потомства (самок) на P75 перед выведением из эксперимента отслеживалась нормализация эстрального цикла, после чего проводилась оценка их памяти с помощью поведенческих тестов. Декапитация половозрелых самок проводилась в стадии проэструса для нивелирования возможного влияния гормонального фона на биохимические показатели.

Методы исследования

Количественное определение общего белка в пробе

В зависимости от количества белка, использованных буферов для приготовления гомогенатов, объема полученного материала в различных сериях экспериментов использовали различные методы определения общего белка.

Для количественного определения общего белка в образце с помощью метода Лоури [Lowry OH et al., 1951] использовали часть гомогената, предназначенного для анализа содержания биогенных аминов в мозге и плаценте. В основе метода лежит способность ионов двухвалентной меди образовывать окрашенный комплекс с химическими группами пептидных связей. Применение реактива Фолина-Чокальтеу (кислый фосфорно-молибденово-фосфорновольфрамный реактив) позволило повысить чувствительность метода благодаря взаимодействию реактива с остатками ароматических аминокислот. Белки с реактивом Фолина-Чокальтеу в присутствии сернокислой меди и щелочи дают нестабильный продукт, переходящий в молибденовую синь с максимумом поглощения при 750 нм. Увеличение поглощения при 750 нм пропорционально концентрации белка. Для количественного расчета белка в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА, Sigma Aldrich). Метод характеризуется высокой чувствительностью (10-100 мкг белка в пробе).

Содержание общего белка в реакционной смеси, в которой оценивали активность MAO, определяли после окончания инкубации. При этом широко используемый метод Лоури [Lowry OH et al., 1951] не позволяет исследовать

содержание белка в реакционной смеси по причине взаимодействия кинурамина с реактивами, применяемыми в вышеупомянутом методе, с развитием синего окрашивания. В данном случае использовали метод Vera, регистрируя оптическую плотность при 500 нм вместо 340 нм во избежание влияния присутствия кинурамина при более коротких длинах волн.

В основу метода положено измерение при 340 нм оптической плотности, развивающейся в результате добавления к щелочному раствору белка равного объема 30%-ного раствора трихлоруксусной кислоты [Vera JC, 1988]. Показатель точности опыта R при четырех параллельных определениях составлял 0,49%. Поскольку эмпирическое значение R значительно меньше 2%, определения выполнялись при помощи данного метода с высокой точностью [Матюшичев В.Б., 1990].

Количественное определение общего белка в пробах по методу Бредфорда [Bradford MM, 1976] на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) применяли с целью проведения последующего анализа белков-интереса методом иммуноблоттинга. В кислой среде Coomassie Brilliant Blue G-250 вступает в электростатические и гидрофобные взаимодействия с аминокруппами белков. Реактив Бредфорда (0,05 г Кумасси бриллиантового синего G-250, Bio-Rad, 25 мл 95% этанола, 50 мл 85% H₃PO₄, 425 мл H₂O) имеет темный кирпичный цвет. В результате образования комплекса белка и красителя раствор приобретает голубой цвет. Величина поглощения при 595 нм пропорциональна концентрации белка. Метод характеризуется высокой чувствительностью (5 мкг/мл белка в пробе). Для построения калибровочного графика в качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma Aldrich).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием

Количественное определение нейромедиаторов норадреналина (НА), дофамина (ДА), серотонина (5-ОТ) и его метаболита 5-оксииндолуксусной кислота (5-ОИУК) в структурах гипоталамуса (медиальная преоптическая область (МПО) и срединное возвышение с аркуатными ядрами (СВ-Арк)) и гиппокампе проводили

методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. Хроматографическая система состояла из изократического насоса модели Maraphone-2 (SSI, США), инжектора петлевого ввода типа Rheodyne (НПП «Биохром», Россия), дегазатора подвижной фазы SDU 2006 (Швеция) и устройства для термостатирования хроматографических колонок (ООО «Элсико», Россия). Хроматографическое разделение биогенных аминов и их метаболитов осуществляли на колонке Reprosil 80 ODS-2 (1004 мм, 3 мкм; Dr. Maisch GmbH, Германия) при температуре +30 °С. Детектирование проводили на аналитической ячейке модели 5100A Coulochem II (ESA, США) при потенциале +0,65 В. Подвижная фаза содержала 6 мМ цитратного буфера, 2 мМ натрия этилендиаминтетраацетата, 1,1 мМ натрия октилсульфоната и 7% ацетонитрила (v/v), pH 5,1. Расход элюента – 0,75 мл/мин. Ткани структур мозга гомогенизировали в 0,1 М хлорной кислоты, содержащей 0,05% калия метабисульфита, гомогенизировали 20 мин 7000g при +4°C, супернатант фильтровали через капроновый фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Образцы анализировали в тот же день. В качестве внутреннего стандарта использовали 3,4-диоксибензиламин в 0,1 М хлорной кислоты, содержащей 0,05% калия метабисульфита.

Для построения калибровочных кривых использовали стандарты биогенных аминов: L-Norepinephrine hydrochloride (Sigma-Aldrich, США) Dopamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, США), 5-Hydroxytryptamine hydrochloride (Sigma-Aldrich, США), 5-Hydroxyindole-3-acetic acid (Sigma-Aldrich, США), 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (Sigma-Aldrich, США) и, к качестве внутреннего стандарта 3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide (Sigma-Aldrich, США). Нижний предел чувствительности детектирования анализируемых соединений составил 0,05 нг. Количественные характеристики хроматографических пиков измерялись автоматически системой регистрации и обработки спектрометрической информации UniChrom 4.4 (ООО «Новые Аналитические Системы», Беларусь). Содержание определяемых веществ рассчитывали в нанограммах на миллиграмм общего белка.

Иммуноферментный и колориметрический анализ

Для подтверждения развития экспериментальной ГЦ в сыворотке крови и тканях мозга определяли содержание ГЦ иммуноферментным методом с использованием тест-системы AxisShield (Великобритания) либо иммунохемилюминесцентным методом на анализаторе Architect i1000 (Abbott, США).

Метод определения содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-тест) позволяет измерить содержание вторичных продуктов ПОЛ по определению концентрации окрашенного комплекса – ТБК-АП, образующегося в результате взаимодействия МДА с двумя молекулами ТБК в кислой среде при температуре 90-100°С. Максимум поглощения образовавшегося комплекса находится в области 532-535 нм. В ходе данной методики к пробам добавляют раствор ортофосфорной кислоты, что обеспечивает оптимальное значение рН и препятствует осаждению ТБК-АП в составе липид-белковых комплексов [Uchiyama, Mihara, 1978]. Для повышения точности измерения учитывают вклад неспецифического поглощения, который оценивают по величине оптической плотности при 600 нм [Гаврилов и др., 1987]. Ткань мозга плодов, МЧП или ПЧП гомогенизировали в 30 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 100 мМ КСl из расчета 1 мозг в 1100 мл буфера (2 параллели пробы гомогената мозга по 500 мкл каждая + 100 мкл гомогената на общий белок). Для проведения цветной реакции к 500 мкл смеси цельного гомогената добавляли 500 мкл 1 %-ного раствора H_3PO_4 и 1 мл 0,5%-ной ТБК. Пробы нагревали на кипящей водяной бане в течение 25 минут. Затем охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали пробы при 3500 об/мин 15 минут. Затем охлаждали до комнатной температуры, добавляли бутанол в объеме 2 мл в каждую пробирку для экстракции липидной фракции, далее центрифугировали пробы при 3500 об/мин 15 минут. Полученный супернатант фотометрировали при 535 нм и 600 нм.

Содержание МДА оценивали с использованием молярного коэффициента экстинкции и выражали в нмоль ТБК-активных продуктов на 1 мг белка. Расчет концентрации ТБК-АП производился по следующей формуле:

$$C = (\Delta E_{535-600} * V) / (K * l * C_{\text{белок}})$$

где:

C – содержание ТБК-АП, нмоль/мг белка;

C_{белок} – содержание белка в пробе, мг;

$\Delta E_{535-600}$ – разница оптических плотностей при двух длинах волн;

K – коэффициент молярной экстинкции, равный $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

V – объём пробы, мл;

l – длина светового пути, см.

При исследовании сыворотки крови, к 200 мкл прибавляли 3000 мкл 2%-го раствора H_3PO_4 и 1 мл 0,8% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Пробы выдерживали в течение 45 мин. при +100 0С. Затем смесь охлаждали и экстрагировали окрашенный продукт 3 мл бутанола. Разделения водной и органической фаз достигали центрифугированием (1 000 g, 10 мин.). Затем, чтобы избежать мутности образцов, измеряли оптическую плотность бутанольных экстрактов при двух длинах волн (535 нм и 580 нм) на спектрофотометре DU-65 (Beckman, США). Бутанольный экстракт контрольной пробы готовили аналогично опытным пробам, используя вместо сыворотки крови 200 мкл дистиллированной воды. Для расчета содержания продуктов перекисного окисления липидов использовали формулу:

$$C = \Delta E_{535-580} K l, \text{ где:}$$

$\Delta E_{535-580}$ – разница оптических плотностей бутанольных экстрактов при двух длинах волн;

$$K = 1,8810^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1};$$

l – длина светового пути, см.

Для определения окислительной модификации нуклеиновых кислот использовали иммуноферментный метод определения 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (8-OHdG), поскольку из 4 оснований, входящих в структуру ДНК, гуанин является наиболее окисляемым (тест- система DNA Damage (8hydroxy2'deoxyguanosine), Enzo Life Sciences, США). Для оценки количества продуктов окисления белков (Advanced oxidation protein products) использовали

тест-систему AOPP Immunodiagnostik (Германия). Для иммуноферментного определения концентрации нитротирозина, являющегося продуктом нитрования аминокислоты L-тирозина, осуществляемого с участием активных метаболитов NO, таких как OONO⁻ и NO₂ •, использовали тест-систему Nitrotyrosine (Hycult Biotech, Нидерланды). Аскорбиновую кислоту (АК) определяли с помощью тест системы Vitamin C (Immunodiagnostik, Германия). В сыворотке витамин С находится в двух формах – в виде собственно аскорбиновой кислоты или в окисленной форме, в виде дегидроаскорбата. Обе формы биологически активны. Используемый в исследовании колориметрический метод позволяет определять суммарную концентрацию обеих форм. Тест система Antioxidant фирмы Cayman Chemical Company (США) позволяет оценить общую антиоксидантную активность (ОАА), включая активность всех ее компонентов (витаминов, белков, липидов, тиолов и глутатиона, мочевой кислоты и др.). Метод основан на способности антиоксидантов, присутствующих в образце, ингибировать окисление ABTS (2,2'-Azinodi[3ethylbenzthiazoline sulphonate]) при участии метмиоглобина.

Уровни TNF- α , IL-1 β и IL-6 определяли с помощью ИФА с использованием имеющихся наборов в соответствии с инструкциями производителя (R&D Systems, США). Содержание этих цитокинов измеряли при 450 нм в микропланшетовом ридере (ELx800, BioTek Instruments, США).

Иммуноблотинг

Образцы тканей мозга, МЧП, ПЧП гомогенизировали на льду в соотношении 1:2 (w/v) в 0,01М буфере PBS, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 16000g и +4°C в течение 20 мин. для удаления нерастворенных белков и клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в супернатантах оценивали по методу Бредфорда. Образцы с равным содержанием белка (50 мкг) смешивали с 2x буфером для образцов (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 25% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий, 5% β -меркаптоэтанол) (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, США), инкубировали 5 мин при 98°C. Электрофорез проводили в денатурирующих условиях по методу Laemmli в 10%-м SDS-полиакриламидном геле (TGS Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, Bio-Rad,

США), в трис-глициновом буфере (10x Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad, США) в течение 60 минут при силе тока 3А и напряжении 170В. Белки визуализировали с использованием технологии stain-free в системе гель-документации ChemiDoc™ Touch Imaging system (Bio-Rad, США) и переносили на PVDF-мембрану в трансфер-буфере (Bio-Rad, США), содержащем 20% этанола в течение 7 мин при силе тока 2,5А и напряжении 25В с использованием прибора Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Мембраны в течение 90 минут на качалке при комнатной температуре блокировали раствором 2%-го бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich Chem. Co., США) в растворе буфера TBST (50 мМ Трис-НСl; 150 мМ NaCl; 0,1% Tween 20; рН7,5). Относительное содержание белков интереса выявляли с помощью специфичных первичных антител, инкубацию с которыми проводили в течение ночи при +4°С. После инкубации с HRP-конъюгированными козьими антителами против кролика или мыши (1:1000, Bio-Rad, США), сигналы регистрировали с помощью усиленной хемилюминесценции (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблотинга, определяли с помощью программного обеспечения ImageLab. Полученные данные, были нормализованы по β-актину (β-Actin, rabbit Ab, 1:1000, #4967, Cell Signaling, США) и GAPDH или глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH (14C10), rabbit Ab, Cell Signaling, 1:1000), либо, руководствуясь существующими рекомендациями по процедуре нормализации содержания белка-мишени [Bass JJ et al., 2017], полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле, определяемого с применением технологии stain-free (BioRad, США) согласно инструкции производителя. Содержание показателей в группе животных с ГГЦ оценивали относительно его содержания в соответствующих структурах в группе контроля.

Об активации каспаз в клетках Jeg-3 судили, согласно описанному в литературе методу [Zhang Y et al., 2011]. Активацию каспазы-3 оценивали как отношение обнаруженного активного фрагмента каспазы-3 (p17), полученного в результате расщепления, к эндогенному уровню неактивного профермента каспазы-3 (p35). Активацию каспазы-8 рассчитывали, как отношение ее активного

фрагмента (p18) и промежуточного фрагмента (p43/p41) к прокаспазе-8 (p57) и выражали в условных единицах.

Содержание белков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к VEGF (Anti-VEGF rabbit Ab, ab46154, 1:1000, Abcam, США), NGF (Anti-NGF rabbit Ab [EP1320Y], 1:1000, Abcam, США), BDNF (Anti-BDNF rabbit Ab [EPR1292], 1:1000, Abcam, США), каспазе-3 (Caspase-3 rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling, США) и каспазе-8 (Caspase-8 (1C12) mouse Ab 1:1000, Cell Signaling, США), DNMT1 (DNMT1 (D63A6) rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling, США), p38 MAPK (p38 MAPK (D13E1) 8690, rabbit mAb, Cell Signaling, 1:1000), фосфо-p38 MAPK (phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (28B10), 9216, mouse mAb 1:1000, Cell Signaling, США), VMAT1 (Anti-VMAT1 rabbit antibody [EPR6476], ab168347, 1:3000, Abcam, США), VMAT2 (Anti-VMAT2 rabbit antibody, ab70808, 1:1000, Abcam, США).

Количественная ПЦР в реальном времени

Выделение тотальной РНК из клеток плаценты производили с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя с модификациями. Для удаления возможной примеси геномной ДНК образцы РНК дополнительно подвергали ДНКазной обработке с использованием свободной от РНКаз RQ1-ДНКазы (Promega, США). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию выполняли с использованием 1 мкг РНК, смеси случайных 9-мерных и олиго dT-праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и MMLV-обратной транскриптазы («Евроген», Россия). Определение мРНК *VEGFA*, *VEGFB*, *KDR (VEGFR-2)*, *BDNF*, *NGF*, *TrkA (NTRK1)*, *TrkB (NTRK2)* и *p75NTR (NGFR)*, а также генов домашнего хозяйства *YWHAZ* (Tyrosine 3-monooxygenase tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide) и *PGK1* (phosphoglycerate kinase 1) было проведено методом ПЦР в реальном времени. Для количественной ПЦР в реальном времени готовили реакционную смесь, содержащую 0,8 мкл образца кДНК, 0,75 единиц TaqM-полимеразы (Алкор-Био, Санкт-Петербург, Россия), 200 нМ специфических

прямых и обратных праймеров, 100 нМ зонды TaqMan, 3,5 мМ MgCl₂ и 250 мкМ dATP/dTTP/dCTP/dGTP в 6 мкл общего объема 1×TaqM-реакционного буфера. Для анализа генов были использованы мультиплексные системы: *VEGFA* + *KDR*, *TRKB* + *P75NTR*, *YWHAZ* + *PGK1*. В случае анализа экспрессии *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* вместо зондов использовали интеркалирующий краситель 50X SYBR Green I («Евроген», Россия). Также для *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* проводился анализ кривых плавления. Последовательности праймеров и зондов представлены в Таблице 1. Нуклеотиды были синтезированы компанией «ДНК-Синтез», Россия. Реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler с детектирующей системой CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Каждую пробу ставили в трех параллелях. Дополнительно в качестве контролей были использованы образцы РНК, с которыми не проводили обратную транскрипцию, а также отрицательный контроль ПЦР без добавления кДНК. Относительная продукция мРНК рассчитывалась по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Livak KJ, Schmittgen TD, 2001]. Данные, полученные для генов интереса, нормировали по среднему геометрическому значений двух генов домашнего хозяйства. Выбор референсных генов был обусловлен их участием в различных звеньях клеточного гомеостаза, а также тем, что их экспрессия достаточно стабильна в плаценте.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использовавшихся праймеров и зондов

Ген	Прямой праймер (5'→3') Обратный праймер (5'→3') Зонд (5'→3')
<i>VEGFA</i> NM_031836.3	AGGGTCAAAAACGAAAGCGC CGCGAGTCTGTGTTTTTGCA ROX-CCTGGAGCGTTCACGTGAGCCT-BHQ2
<i>VEGFB</i> NM_053549.1	TGGTACCTCTGAGCATGGAA GAGGATCTGCATTCGGAATT
<i>KDR (VEGFR-2)</i>	TTCCCGTCCTCAAAGCATCA

NM_013062.2	TGTACGCTGTGCAGGTGTAT FAM-CCCTTCCTGGGACTGTGGCAAAGA-BHQ1
<i>BDNF</i> NM_001270638.1	CAGGTCGATTAGGTGGCTTCA CATAAACCACCGACATGGAGC
<i>NGF</i> NM_001277055.1	TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG CTGTGTCAAGGGAATGCTGAA
<i>TRKA (NTRK1)</i> NM_021589.1	GACCCCATCCCTGTCTCCTT CCACAGAGACCCCAAAAGGT
<i>TRKB (NTRK2)</i> NM_012731.3	GACAGTCCTCTGTGGCCAGG TGGCTCTCCCTGGACTCTTT ROX-CCCCAGCCCTGAGGTGCGCA-BHQ2
<i>P75NTR (NGFR)</i> NM_012610.2	AGAGGGCACATACTCAGACG TCGACCAGGGATCTCTTCGC FAM-TGCACGCCCTGGGCTGATGCTGAA-BHQ1
<i>YWHAZ</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACTTG GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ2
<i>PGK1</i> NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTTTC HEX-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2

Определение окислительной модификации белков

Анализ осуществляли с использованием набора OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Merck Millipore, США) согласно протоколу производителя, в основе которого лежит метод дериватизации окисленных карбонильных групп белков при помощи 2,4-динитрофенилгидразина в течение 15 минут при комнатной температуре с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов белков [Levine RL et al., 1990]. Для этого к 5 мкл супернатанта, полученного способом, описанным выше, содержащего 15 мкг общего белка добавляли 5 мкл 12% SDS и 10 мкл раствора 2,4-

динитрофенилгидразина и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 7,5 мкл нейтрализующего буфера. После добавления 1,5 мкл β -меркаптоэтанола, 25 мкл образца, содержащего 13 мкг общего белка загружали в лунки 10%-го SDS-полиакриламидного геля (TGS Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, Bio-Rad, США). Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (10x Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad, США). Белки визуализировали с использованием технологии *stain-free* в системе гель-документации ChemiDoc™ Touch Imaging system (Bio-Rad, США) для последующей нормализации результатов, и переносили на PVDF-мембрану в трансфер-буфере (Bio-Rad, США), содержащем 20% этанола. Мембрану блокировали в 1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина на TBS-буфере (pH 7,5), содержащем 0,1% Tween-20, в течение 90 минут и инкубировали с первичными антителами, специфичными к модифицированным карбонильным группам белков (Anti-DNP Rabbit Ab, 1:150, Merck Millipore, США). Далее, после инкубации с соответствующими HRP-конъюгированными козьими моноклональными антителами (Goat Anti-Rabbit Ig (H+L)-HRP, 1:1000, BioRad, США) сигналы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (Clarity Western ECL Substrate BioRad, США). Денситометрическую интенсивность зоны разделения белков каждого образца, полученных в результате иммуноблотинга, анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). На основании существующих рекомендаций по нормализации содержания белка [Bass JJ et al., 2017] полученные данные, которые оценивались как суммарная денситометрия всей зоны разделения белков каждого образца, были нормализованы по содержанию общего белка в геле, определяемого с помощью технологии *stain-free* (BioRad, США) согласно инструкции производителя с использованием программы ImageLab (Bio-Rad, США).

Зимография

Оценку протеолитической активности MMP-2 (желатиназы) проводили методом зимографии [Chandru H et al., 2007; Voronkina IV et al., 2011; Toth M et al., 2012] с собственными модификациями. Полученные супернатанты после

определения содержания белка смешивали с 4x Laemmli (Laemmli Sample Buffer, BioRad, США). При приготовлении 10%-го полиакриламидного геля (TGS Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, BioRad, США) в него дополнительно вносили желатин (Gelatin, Sigma Aldrich, США) в концентрации 1мг/мл. Желатиназа MMP-2, присутствующая в тканевых образцах, деградирует желатин, сополимеризованный с ПААГ, оставляя четкую полосу после окраски геля. В каждую лунку вносили 28 мкг белка. Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (10x Tris/Glycine/SDS Buffer, BioRad, США) по методу Laemmli в течение 120 минут, при силе тока 3А, напряжении 90В. После электрофореза гели отмывали сначала dH₂O, затем тёплым (37°C) буфером (50мМ Трис (рН 7,6), 3,78мМ CaCl₂, 2.5% Тритон X-100) 3 раза по 30 минут для удаления SDS и ренатурации MMP в геле. После ещё двух промывок dH₂O гели заливали буфером (50мМ Трис-HCl (рН 7,6), 0,2М NaCl, 5мМ CaCl₂, 0.02% Brij-35, 1мкМ ZnCl₂) для индукции лизиса желатина и инкубировали при 37°C в течение 18 часов в термостате. Далее снова промывали dH₂O, а затем производили окраску гелей 0,5% кумасси бриллиантовым синим R-250 (BioRad, США) и обесцвечивали в 30% растворе этанола, содержащем 10% уксусной кислоты. Визуализация исследуемого белка была проведена на приборе ChemiDoc™ Touch Imaging system (Bio-Rad, США). Для каждого образца вычисляли отношение площади неокрашенной зоны, образовавшейся в результате ферментативной активности белка интереса к общему белку, полученному на неокрашенном геле с помощью системы stain free.

Анализ активности ферментов

Анализ ферментативной активности каспазы-3 проводили с использованием в качестве субстрата синтетического пептида Ac-DEVD-pNA (ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-p-нитроанилид, Enzo Life Sciences, Швейцария). Реакционная смесь состояла из реакционного буфера (20 мМ HEPES, 0,1% CHAPS, 2 мМ EDTA, 5 мМ DTT, рН 7.4), 0,2мМ субстрата и супернатанта исследуемых образцов, общее количество вносимого белка составило 120 мкг, инкубировали при 37°C. Прирост продукта реакции pNA оценивали каждые 5 мин в течение 35 мин колориметрически при длине волны 405 нм с помощью микропланшет-ридера Bio-Tek ELx800 (Bio-Tek

Instruments, США), после чего рассчитывали каспазную активность $(OD_t - OD_0)/(t \cdot \epsilon \cdot c)$, где t – время реакции в минутах; OD_0 – абсорбция, измеренная перед добавлением субстрата; OD_t – абсорбция, измеренная через t мин после добавления субстрата; ϵ – молярная экстинкция продукта ($\epsilon^{\text{mM}} \text{pNA} = 10.5$); c – содержание белка в пробе (мкг). Каспазная активность выражалась в мкмоль pNA/мин/мкг белка.

Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД) использовали набор Superoxide Dismutase (Cayman Chemical Company, США). Данная тест-система позволяет с помощью соли тетразолия определять радикалы, образуемые при участии ксантиноксидазы и гипоксантина.

Анализ активности MAO оценивали спектрофотометрическим методом, основанном на реакции окисления кинурамина [Разыграев А.В., 2006]. Ткань мозга или плаценты гомогенизировали в 4-х объемах 0,32М сахарозы на 0,05М фосфатном буфере (рН 7,8). Образцы центрифугировали 10 мин при 1000g для удаления клеточного дебриса в осадке. Реакционная смесь состояла из 0,05М PBS (рН 7,4), 0,19мМ кинурамина и супернатанта исследуемых образцов, содержащего фракцию митохондрий, в которой и локализована активность MAO. Инкубировали в индивидуальных кюветах объемом 1 мл и длиной оптического пути 1 см. при 37°C. Определение удельной активности моноаминоксидазы (MAO) проводили, измеряя прирост концентрации 4-гидроксихинолина, продукта окислительного дезаминирования кинурамина при длине волны 327 нм, включая серию измерений через равные промежутки времени до выхода измеряемых значений на плато. Результаты определения активности MAO выражали в мкмоль превращенного субстрата (кинурамина) за единицу времени, отнесенную к содержанию белка (мкмоль кинурамина / мкг белка * час). Для этого применяли соотношение между приростом оптической плотности при 327 нм (увеличением концентрации продукта) и одновременной убылью оптической плотности при 360 нм (снижением концентрации субстрата), $\Delta OD_{327}/\Delta OD_{360}=1,88$.

Гистологический анализ плацент

После 24-часовой фиксации в 10% нейтральном забуференном формалине каждую из исследуемых плацент разрезали на 3 фрагмента и осуществляли гистологическую проводку с применением гистологического процессора SAKURA TISSUE-TEK VIP 5. Далее при помощи модульной системы заливки парафином Medite TES 99 формировали парафиновые блоки, из которых методом микромирования получали срезы толщиной 3-4 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином. При гистологическом анализе были исследованы лабиринтная часть плаценты, базальная часть (спонгиозотрофобласт) и слой гигантских клеток трофобласта на сроках E14 и E20.

Иммунохимия

Определяли количество клеток, маркированных нейрональными (белок NeuN) и глиальным (Iba1) маркерными белками. Для этого случайным образом отбирали последовательность срезов (10 срезов на животное с расстоянием между ними 80 мкм) и использовали для иммуномечения. Срезы инкубировали в течение ночи при 37 °C в PBS, содержащем 2% бычьего сывороточного альбумина, 0,3% Triton X-100 (Merck, Германия) и одно из двух антител: кроличьи поликлональные анти-Fox3/NeuN (ab104224; Abcam, Великобритания; 1:1000) или кроличьи антитела к Iba1 (ионизированная кальций-связывающая адапторная молекула, ab178846, Abcam, 1:100). Также использовали фоновую окраску неспецифическим ядерным красителем DAPI (Sigma Германия). После тщательной промывки срезы инкубировали в течение 1 ч при 37 °C во вторичных антителах, меченных флуоресцентной меткой: FITC-конъюгированных (ab97050, Abcam, 1:200) вторичных антител против кроличьей IgG, разведенные в блокирующей сыворотке. Микроскопию проводили на микроскопе Leica DMR, соединенном с конфокальным сканером Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения FITC использовали He/Ar-лазер с длиной волны 488 нм, Излучения FITC наблюдались в и 430–461 нм. Яркость клеточных тел и ядер измеряли с помощью программы «Видео Тест-Морфология» (Видео Тест, Санкт-Петербург,

Россия). Иммуноположительный сигнал анализировали, если он превышал 300% фона.

Клетки гиппокампа анализировали на срезе СА3 шириной 400 мкм. Количество NeuN-позитивных нейронов и Iba1-позитивных клеток микроглии подсчитывали в одном и том же поле зрения для каждого среза мозга. Кроме того, анализировали суммарную площадь иммунопозитивных (более 300% от фонового уровня) структур на анализируемую площадь.

Поведенческие тесты

Тест «Открытое поле» позволяет оценить выраженность и динамику элементарных поведенческих актов у грызунов в стрессогенных условиях, возникающих в ответ на помещение лабораторного животного в установку, имеющую большую площадь и интенсивность освещения, чем бокс его повседневного содержания.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) выполняли по методике [Курьянова Е.В. и др., 2013]. Время экспозиции каждой особи в «открытом поле» составляло 3 минуты. Животные тестировались однократно. Крыса помещалась в центр «открытого поля», представляющего собой квадратную арену с полом, размеченным на сектора квадратами; высокие окружающие стены препятствуют побегу, ограниченную по окружности непрозрачными высокими бортами, препятствующими побегу. По всей площади открытого поля равномерно расположены 16 отверстий (норок), диаметром 3 см каждая, предназначенных для выявления норкового рефлекса крыс. Освещенность открытого поля равнялась 100 люкс.

При этом регистрировались следующие поведенческие показатели: горизонтальная и вертикальная двигательная активность, количество пересеченных центральных (ЦК) и периферических (ПК) квадратов, количество стоек (С), число отряхиваний и актов умывания, число заглядываний в норку. Основная активность (ОА) каждой особи определялась по формуле: $ОА = ПК + ЦК + С$, где ОА – основная активность, шт.; ПК – число пересеченных периферических квадратов, шт.; ЦК – число пересеченных центральных квадратов,

шт.; С – число стоек, шт. Грызуны, естественно, предпочитают периферию открытого поля и демонстрируют поведение, связанное с оценкой риска, по направлению к центральной зоне [Blanchard RJ, Blanchard DC, 1989] из-за врожденного страха перед потенциальным хищничеством. Таким образом, во время тестирования грызуны проявляют высокий уровень периферической активности и обычно проявляют тигмотаксис (прижимание к стене) — поведение, при котором животное остается близко к вертикальным стенам [Pentkowski NS et al., 2021].

После тестирования животное возвращалось в клетку, а арена тщательно очищалась 5% спиртом перед помещением следующей крысы.

Оценка кратковременной и долговременной памяти проводили в модифицированном тесте «Распознавание новых объектов» - novel object recognition test [Ennaceur A, Delacour J, 1988; Mello PB et al., 2008] на стадии диэструса. Адаптацию половозрелых самок крыс к условиям эксперимента проводили перед началом тестирования в течение 5 мин. На это время крыса помещалась на специальную площадку 100x100 см, с непрозрачными стенками h=20 см. Через 2 ч после адаптации, также, в течение 5 мин, на экспериментальной площадке проводили обучение с помощью тренировочного предъявления животному двух предметов (O1 и O2). При последующих тестированиях объект O1 оставался неизменным, меняли только место его расположения, тогда как объект O2 в каждой серии эксперимента заменяли новым предметом. Так, для анализа кратковременной памяти, через 10 мин после тренировочного предъявления, крысе для исследования предлагали известный объект O1 и новый предмет O3. Для оценки долговременной памяти через 1 час и 24 часа после обучения совместно с объектом O1 животным предъявляли предметы O4 и O5 соответственно. Все предметы были сделаны из одного материала – толстого стекла, имели различную форму. После каждого анализа предметы и экспериментальная площадка протирались 50%-м раствором этанола. Во время нахождения животного на площадке проводилась регистрация времени, которое было затрачено на

исследование (непосредственный тактильный или обонятельный контакт) каждого объекта. Данные выражали как коэффициент дискриминации (DR), который рассчитывался путем деления разницы времени, проведенного на новом объекте (НО) и известном объекте (ИО), на общее время исследования: $DR = (НО - ИО) / (НО + ИО)$. DR может варьироваться от +1 до -1. Значения выше 0 указывают на предпочтение нового объекта, значения ниже 0 — на предпочтение известного объекта [Feldmann M et al., 2019]. Для каждого животного рассчитывали индекс распознавания (RI) и выражали как отношение: $(НО \times 100\%) / (НО + ИО)$. RI около 50% указывает на то, что животное не запомнило известный объект (поскольку время ИО и время НО сопоставимы), а RI выше 50% указывает на то, что крыса запомнила известный объект, поскольку время НО больше времени ИО [Bialuk I et al., 2019].

Пространственную память оценивали при тестировании поведения животного в двухуровневом радиальном 8-лучевом лабиринте [Wenk GL, 2004]. С целью формирования у крыс пищевой мотивации за 2-е суток до эксперимента и далее, в течение всего периода испытания, животным ограничивали объем суточного питания до 65-70%. Крысу помещали на середину центральной платформы, к стенке которой прикреплены пронумерованные рукава (лучи). Время, прошедшее с начала сеанса, учитывается, чтобы определить, насколько быстро крыса делает выбор и находит пищевое вознаграждение. Что также является косвенным признаком мотивации. Посещение ранее выбранной руки считается ошибкой рабочей памяти. Тестирование заканчивалось, когда животное осуществляло все 8 правильных побегов (посещений рукава с подкреплением), после чего вычисляли процент правильных побегов по отношению к общему количеству посещений рукавов. После каждого животного центральную платформу протирали 50% раствором этанола. Тестирование самок начинали в стадии первого диэструса и продолжали 6 дней. Тестирование проводили в первой половине дня, так как в это время достигается стабильный уровень кортизола.

Статистическая обработка результатов

Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для проверки равенства дисперсий использовали критерий Левена. Статистический анализ был выполнен с помощью программы STATISTICA 10.0. Статистическая обработка полученных данных, в зависимости от характера распределения, проведена с использованием параметрического t-критерия Стьюдента либо непараметрического U-критерия Манна–Уитни для независимых выборок. При проведении множественного сравнения использован критерий Тьюки, либо непараметрический H-критерий Крускала-Уоллиса. Взаимосвязь показателей оценивали по силе связи с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для всестороннего и компактного описания объектов исследования был применен многомерный факторный анализ, который позволяет наилучшим образом охарактеризовать реальное поведение исследуемой совокупности признаков и оценить надежность и точность выводов, сделанных на основании полученных данных. Проведено вычисление факторных нагрузок (a), которые интерпретируются как корреляции между соответствующими исследуемыми показателями и отдельными факторами (гипотетические, непосредственно не измеряемые, скрытые признаки, в той или иной мере связанные с измеряемыми показателями). Чем нагрузка выше по модулю, тем сильнее связь переменной с фактором, тем больше данная переменная обусловлена действием соответствующего фактора. Количество выделяемых факторов определяли по критерию «каменистой осыпи» [Ledesma RD et al., 2015]. Метод выделения факторов — метод главных компонент, полученные данные для анализа были нормализованы.

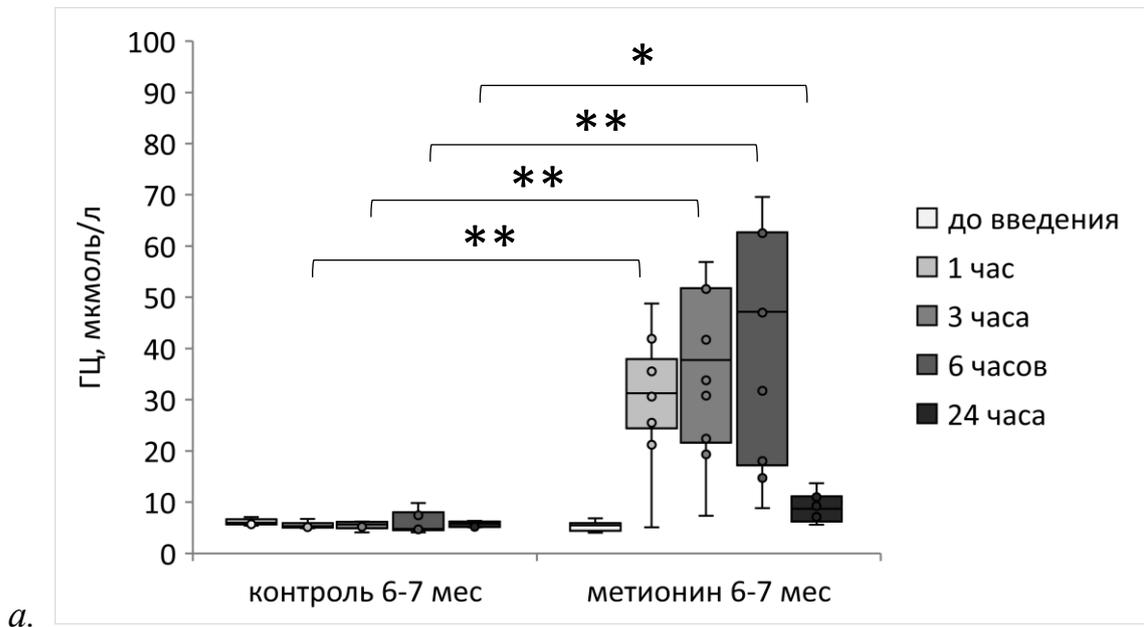
Непрерывные переменные с нормальным распределением представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm se$). Медианы [25-ая – 75-ая перцентили] использовались, когда нормальное распределение отсутствовало. Различия при $p < 0,05$ считались статистически значимыми.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние модели гипергомоцистеинемии на показатели репродуктивной и когнитивной функций взрослых половозрелых самок крыс

3.1.1. Динамика содержания гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста в норме и при однократной метиониновой нагрузке

Показано, что как у молодых половозрелых самок крыс, так и крыс в возрасте 20-22 месяца однократная метиониновая нагрузка уже через час приводит к повышению уровня ГЦ в сыворотке крови (Рис. 1). Максимальная концентрация ГЦ у большинства животных достигается через 3 часа либо 6 часов после введения. При этом у обеих групп животных уровень ГЦ в сыворотке крови остается повышенным по сравнению с группой контроля также и через 24 часа после метиониновой нагрузки. Однако у молодых животных, отмечено более значимое его снижение. В соответствующих контрольных группах животных суточных изменений уровня ГЦ в сыворотке крови отмечено не было.



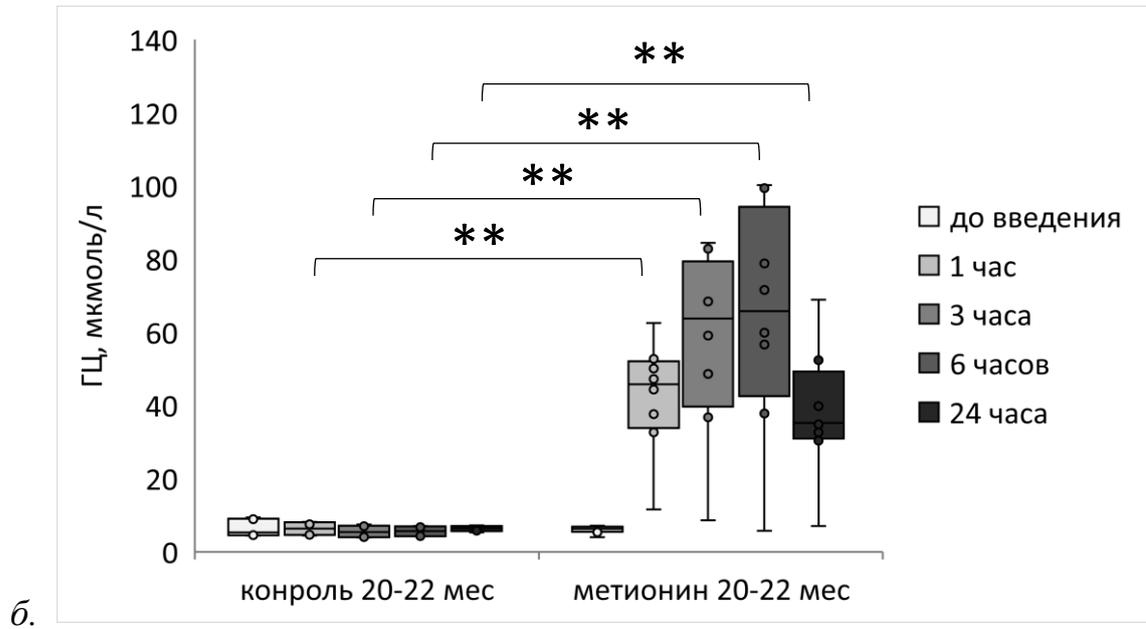


Рис. 1 Суточная динамика изменения ГЦ в сыворотке крови крыс различного возраста после однократного введения метионина ($n=5-6$). *a* – Изменение содержания ГЦ в сыворотке крови молодых половозрелых самок крыс до введения воды (контроль) либо метионина, а также через 1 час, 3 часа, 6 часов и 24 часа после введения ($n=6$ в группе контроля и $n=10$ – в опытной группе); *б* - Изменение содержания ГЦ в сыворотке крови старых 20-22 месячных самок крыс ($n=6$ в группе контроля, $n=8$ – в опытной группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ – отличие от контроля

3.1.2. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке

В результате хронической метиониновой нагрузки в течение 30-ти дней повышенный уровень ГЦ отмечен как у 6-7 месячных половозрелых самок крыс, у 12-13 месячных половозрелых самок крыс с нарушением эстрального цикла, так и у 20-22 месячных старых нециклирующих крыс (Рис.2). Продемонстрировано, что потребление метионина, согласно выбранной схеме введения, приводит к развитию ГГЦ — состоянию, характеризующемуся повышением в сыворотке крови содержания ГЦ. При этом у старых крыс, у которых уже отсутствует эстральный цикл, отмечено более выраженное повышение ГЦ, чем у половозрелых животных. Медиана уровня ГЦ у данных животных повышена по сравнению с контролем в

10,48 раз ($p < 0,001$), тогда как у половозрелых 6-7 месячных и 12-13 месячных животных он отличается от контроля по медиане в 1,61 раза и 1,63 раза соответственно ($p < 0,001$). При этом контрольные группы животных различного возраста не имели отличий по данному показателю. Уровень ГЦ в самой молодой контрольной группе животных составил 6,20 [5,00-7,30] мкмоль/л, в группе 12-13-месячных крыс – 6,30 [6,00-6,35] мкмоль/л, у старых животных – 6,00 [5,40-7,25] мкмоль/л соответственно. Таким образом показано, что с возрастом в норме у крыс не происходит изменения уровня ГЦ в сыворотке крови.

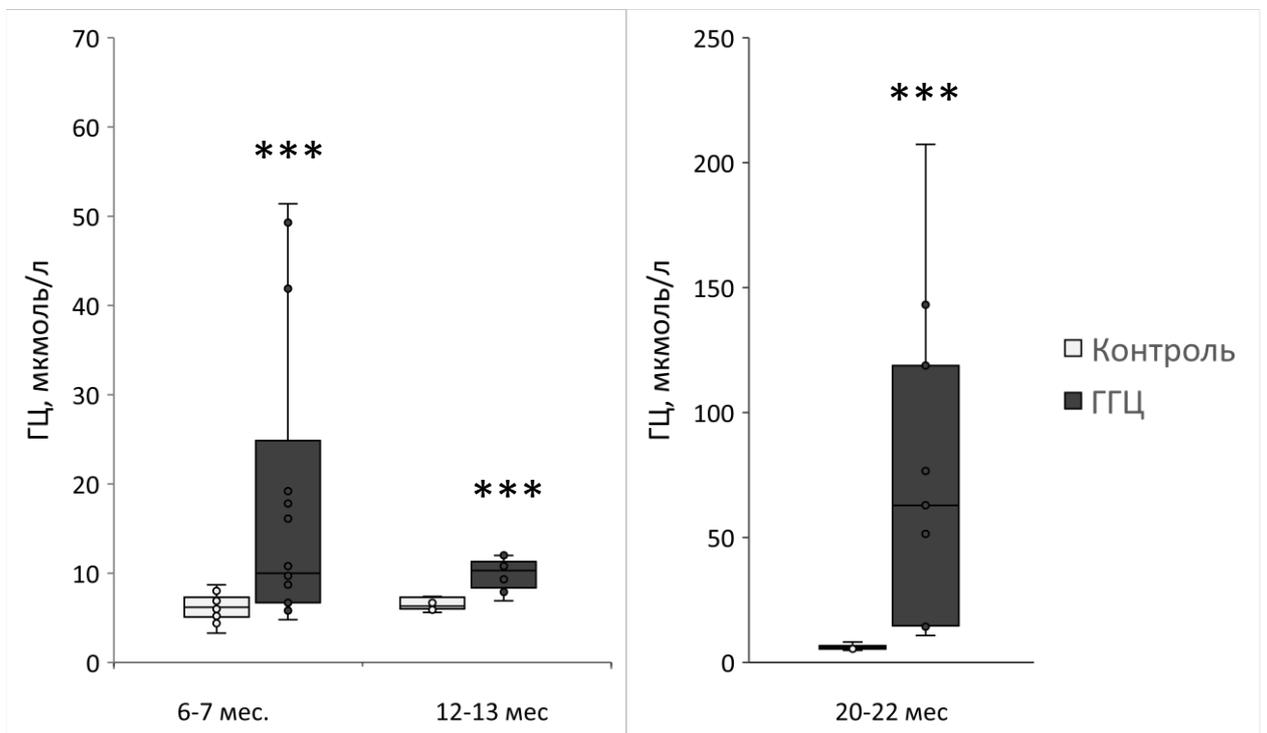
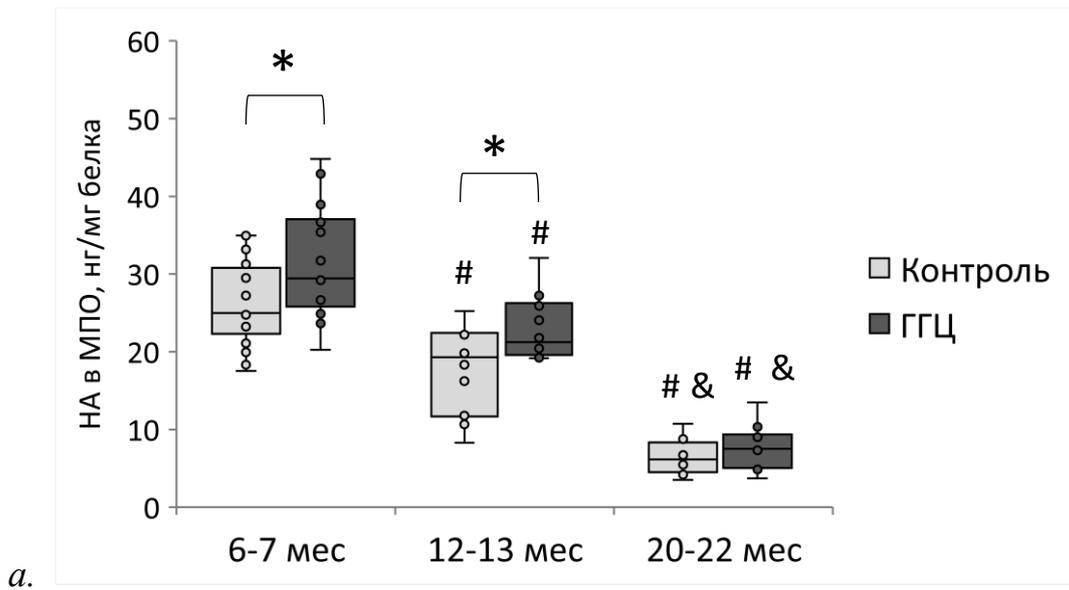


Рис.2. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке ($n=10-23$ в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; *** - $p < 0,001$ – достоверные различия между самками крыс с ГГЦ и контрольными животными

3.1.3. Содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса и гиппокампе самок крыс разного возраста в норме и при хронической метиониновой нагрузке

Анализ содержания биогенных аминов и их метаболитов в структурах гипоталамуса ответственных за синтез гонадолиберина (медиальная преоптическая область (МПО)) и его секрецию (срединное возвышение с аркуатными ядрами (СВ-Арк)) показал повышение уровня НА в МПО у половозрелых самок крыс 6-7 месяцев и 12-13 месяцев после хронической метиониновой нагрузки. При этом, у старых животных подобных изменений обнаружено не было. Отмечено, однако снижение данного показателя с возрастом как у контрольных животных, так и у крыс с ГГЦ (Рис.3а). Также установлено, что ГГЦ, в отличие от возраста, не приводит к изменению содержания 5-ОИУК и ДА в данной структуре гипоталамуса (Рис. 3б,в).



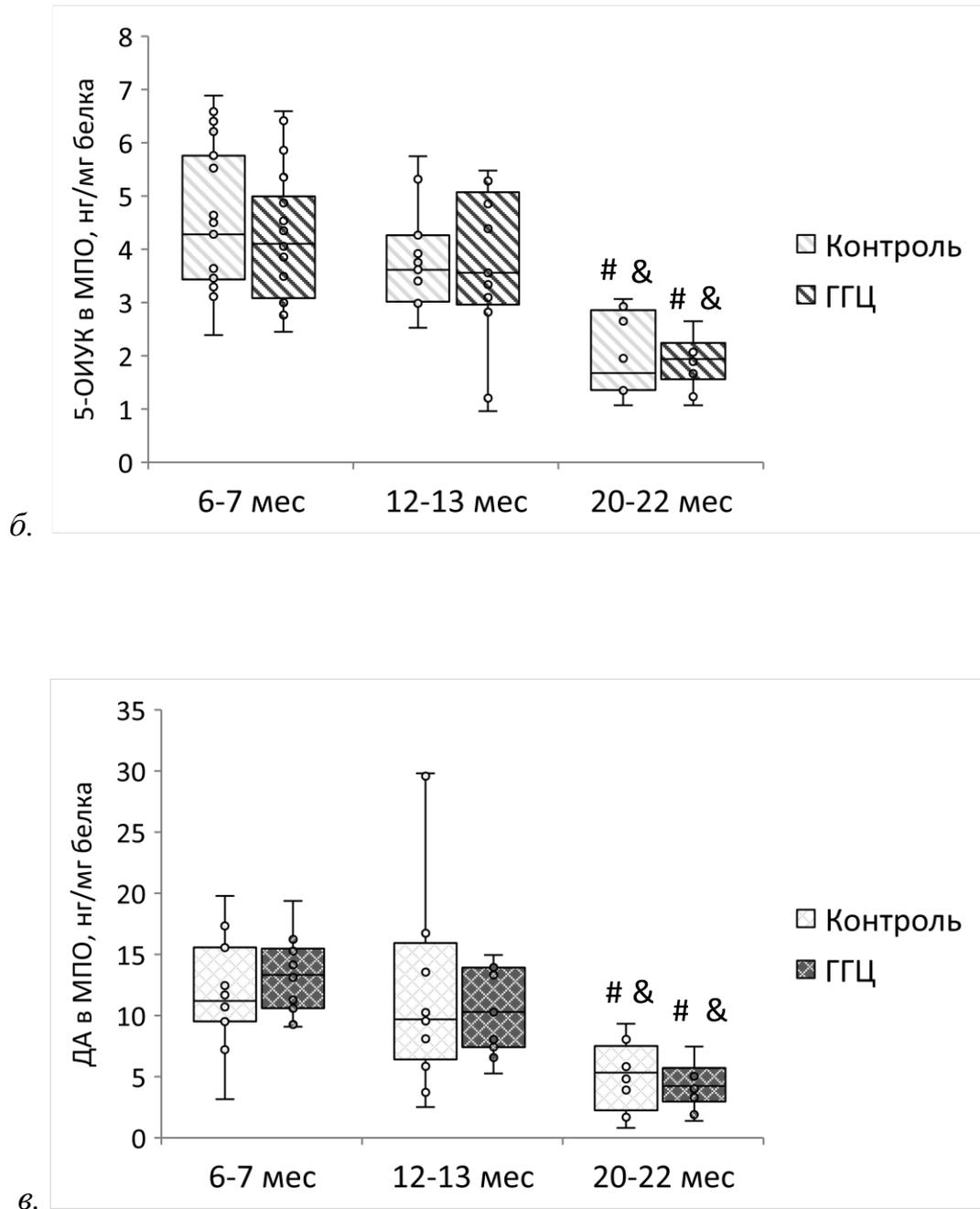
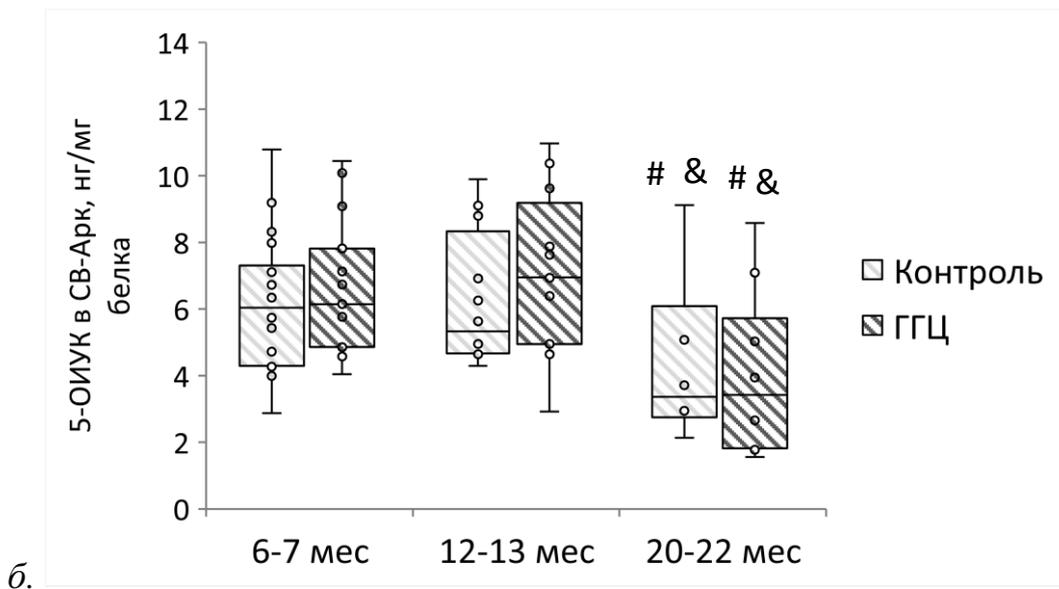
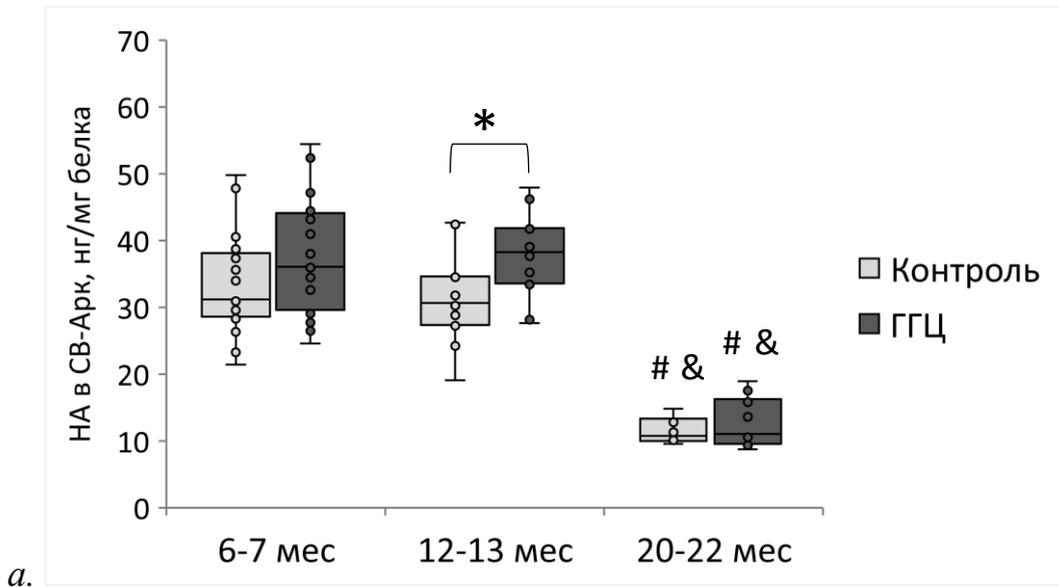


Рис 3. Изменение содержания биогенных аминов в МПО гипоталамуса самок крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке.

а – содержание НА, *б* – содержание 5-ОИУК, *в* – содержание ДА в МПО гипоталамуса у крыс с наличием и отсутствием ГГЦ в возрасте 6-7 месяцев ($n=21-23$ в каждой группе), 12-13 месяцев ($n=14$ в каждой группе) и 20-22 месяца ($n=10$ в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p<0,05$ – различия между самками крыс с ГГЦ и контрольными животными, # - $p<0,001$ – отличие от молодых самок 6-7 месяцев; & - $p<0,001$ – отличие от самок 12-13 месяцев.

Обнаружено, что содержание НА в СВ-Арк при ГГЦ повышается только в группе 12-14 месяцев (Рис. 4а). При анализе данных определения ДА и 5-ОИУК в данной структуре гипоталамуса установлено, что введение метионина не приводит к их достоверным изменениям по сравнению с животными контрольной группы того же возраста (Рис. 4б,в). Однако все исследуемые биогенные амины достоверно снижались с возрастом — как при физиологическом старении, так и на фоне введения метионина.



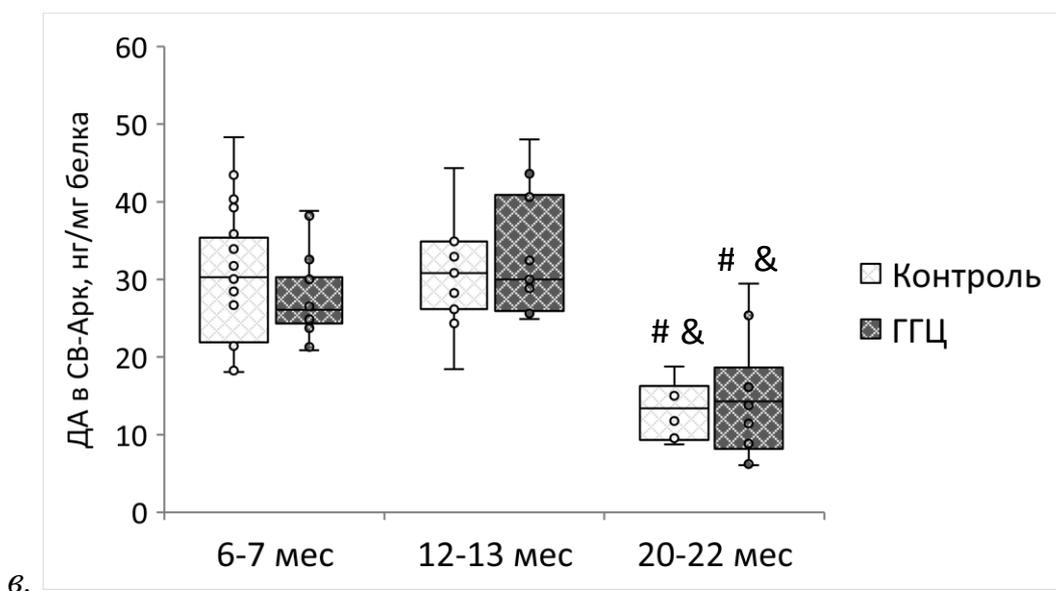
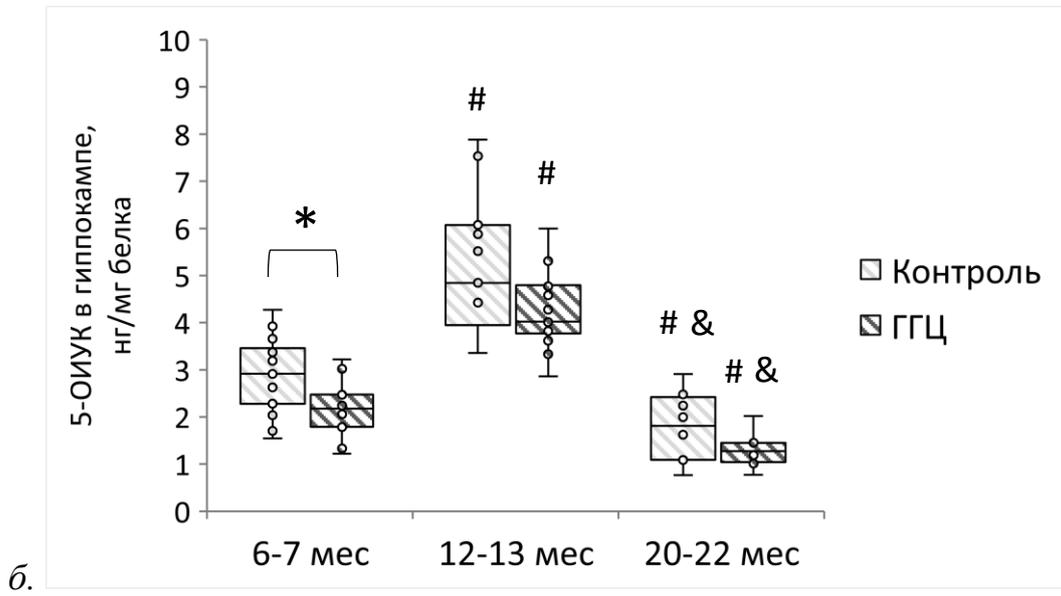
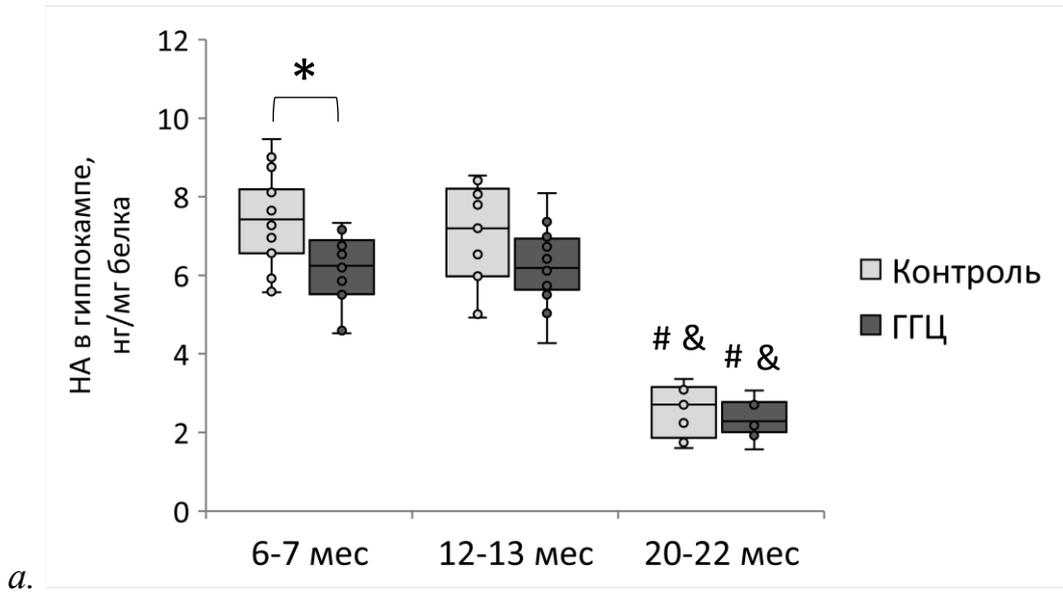
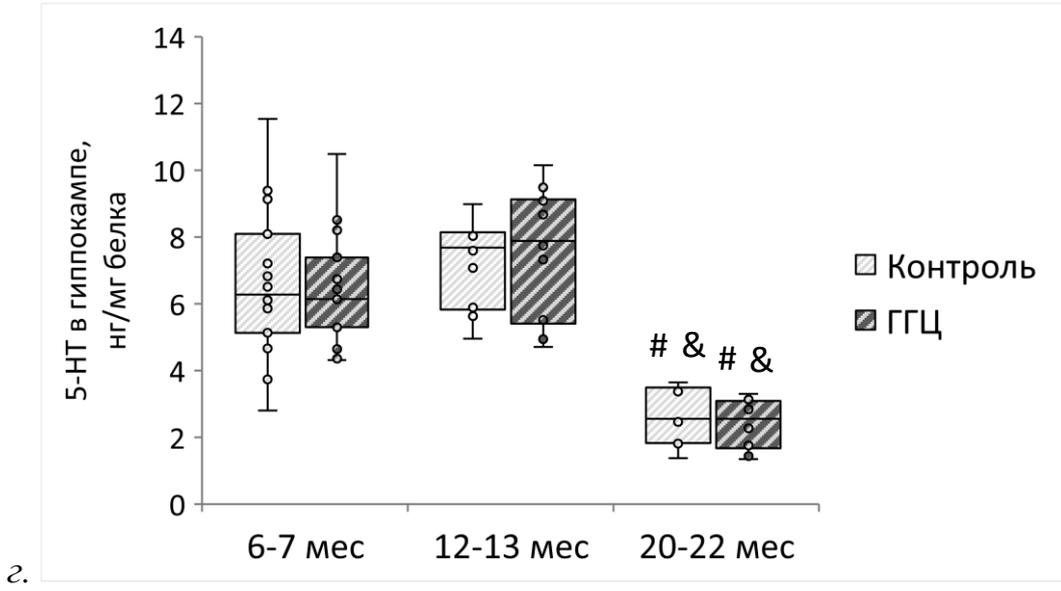
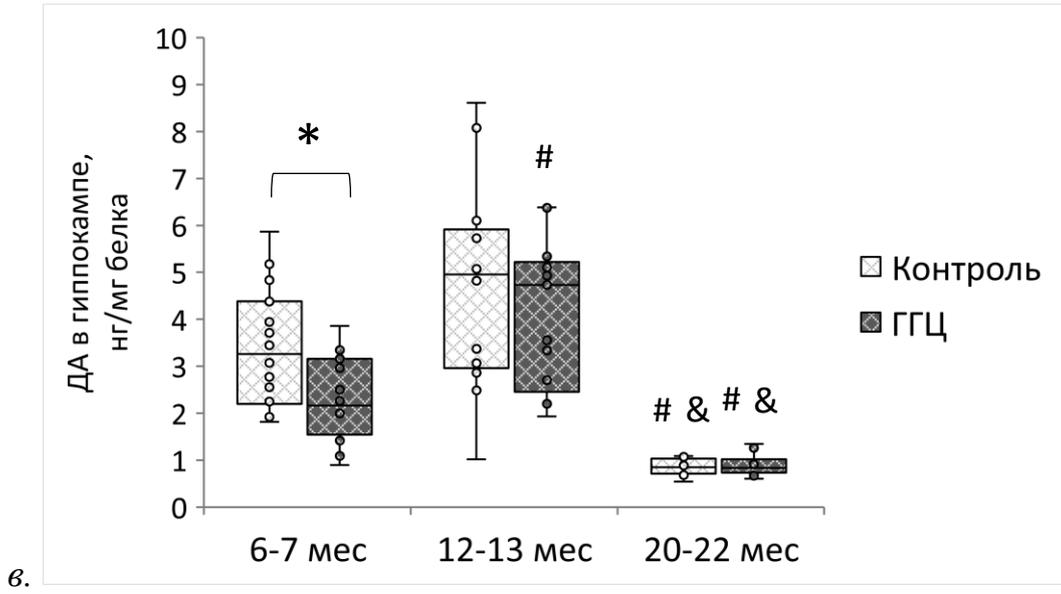


Рис 4. Изменение содержания биогенных аминов в СВ-Арк гипоталамуса самок крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке.

a – содержание НА, *б* – содержание 5-ОИУК, *в* – содержание ДА в СВ-Арк гипоталамуса у крыс с наличием и отсутствием ГГЦ в возрасте 6-7 месяцев ($n=21-23$ в каждой группе), 12-13 месяцев ($n=14$ в каждой группе) и 20-22 месяца ($n=10$ в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p<0,05$ – различия между самками крыс с ГГЦ и контрольными животными, # - $p<0,001$ – отличие от молодых самок 6-7 месяцев; & - $p<0,001$ – отличие от самок 12-13 месяцев.

Исследование биогенных аминов в гиппокампе также показало их снижение в возрасте 20-22 месяца, при этом в данной структуре у молодых половозрелых самок крыс в группе с ГГЦ по сравнению с контрольными животными отмечено снижение содержания НА, 5-ОИУК и ДА (Рис. 5а-в). Кроме того, ГГЦ не приводила к изменению содержания в гиппокампе 5-ОТ (Рис. 5г). В результате, обнаружено снижение соотношения 5-ОИУК/5-ОТ у молодых и средневозрастных половозрелых самок крыс с ГГЦ по сравнению с соответствующими контрольными животными без ГГЦ (Рис. 5д).





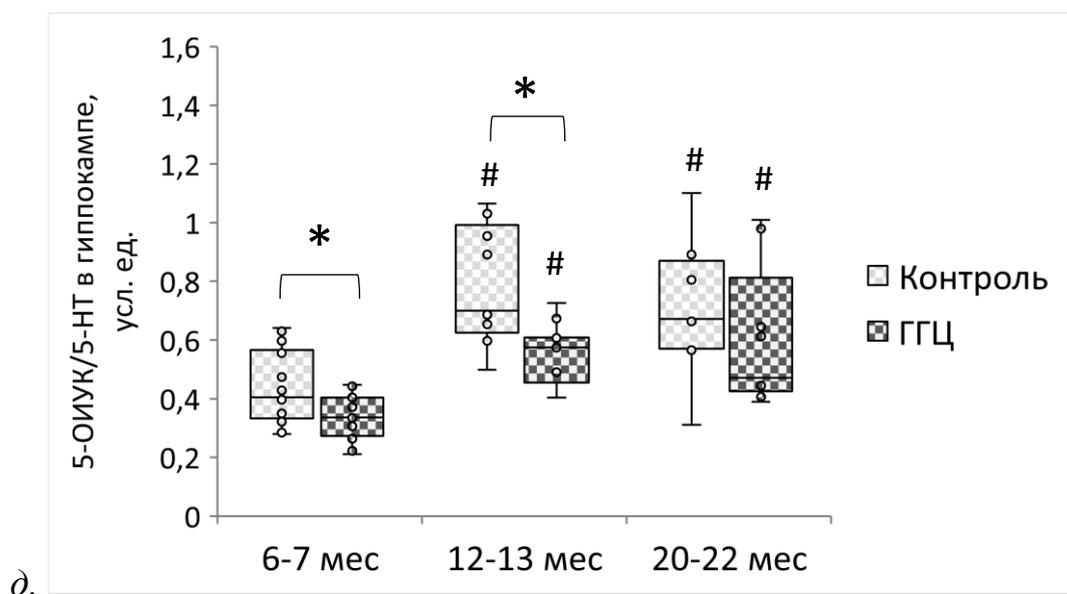


Рис 5. Изменение содержания биогенных аминов в гиппокампе самок крыс разного возраста при хронической метиониновой нагрузке. *а* – содержание НА, *б* – содержание 5-ОИУК, *в* – содержание ДА, *г* – содержание 5-ОТ, *д* – соотношение 5-ОИУК/5-ОТ в гиппокампе крыс с наличием и отсутствием ГГЦ в возрасте 6-7 месяцев ($n=21-23$ в каждой группе), 12-13 месяцев ($n=14$ в каждой группе) и 20-22 месяца ($n=10$ в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p<0,05$ – различия между самками крыс с ГГЦ и контрольными животными, # - $p<0,001$ – отличие от молодых самок 6-7 месяцев; & - $p<0,001$ – отличие от самок 12-13 месяцев.

3.1.4. Исследование поведенческой активности и когнитивного статуса у половозрелых самок крыс после хронической метиониновой нагрузки

Анализ параметров ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП) оценивали в тесте «Открытое поле» (табл. 1). Основными проявлениями ОИП были побежки (горизонтальные локомоции) по поверхности поля, оцениваемые по числу пересеченных квадратов. От общего числа проявлений ОИП они составляли в контрольной группе $61,6 \pm 5,33\%$, что значимо не отличалось от самок в группе с ГГЦ, в которой данный процент горизонтальной двигательной активности составил $64,2 \pm 3,94\%$. При этом значимой разницы между группами по показателю общей активности (ОА), в которую помимо горизонтальной входит, и вертикальная подвижность (стойки) также не обнаружено. В целом, хроническая ГГЦ

половозрелых самок крыс не приводила к изменению параметров, оцениваемых в тесте «открытое поле». Продемонстрирована лишь тенденция к снижению у них ряда показателей (Табл. 2).

Таблица 2. Показатели ориентировочно-исследовательского поведения половозрелых самок крыс перенесших ГГЦ и контрольных животных в стадию диэструса (Me (25-75 перцентили)).

Показатели ОИП	Контроль (n=11)	ПГГЦ (n=12)
Число пересеченных центральных квадратов, шт.	5,00 [3,00-7,00]	4,00 [2,25-6,75]
Число пересеченных периферических квадратов, шт.	59,00 [31,00-88,00]	45,00 [33,50-69,75]
Число стоек, шт.	17,00 [12,00-22,00]	15,5 [8,75-24,75]
Заглядывание в норки, шт.	1,00 [0,00-2,00]	1,50 [0,00-4,50]
Число отряхиваний, шт.	1,00 [0,00-2,00]	1,00 [0,00-1,75]
Число актов умываний, шт.	9,0 [5,0-26,0]	4,0 [2,0-18,5]
Заглядывание в центральную норку, шт.	0,0 [0,0-1,0]	0,0 [0,0-0,0]
Общая активность (ОА), шт.	80,0 [48,0-119,0]	66,0 [44,0-111,0]

В тесте на распознавание объектов проверяется способность запоминать сам объект (Рис.6). Во время фазы обучения (0 мин) животные разных групп не проявляли предпочтения объекта. По сравнению с крысами с ГГЦ, контрольные крысы продемонстрировали повышенное предпочтение нового объекта как через 10 мин, 60 мин, так и через 24 часа ($p < 0,001$) Так показано, что контрольные самки продемонстрировали значительно более высокий индекс распознавания нового объекта, чем известного объекта, в всех тестах не менее 66% времени они уделяли новому объекту. Половозрелые самки крыс с ГГЦ ни в одном из тестов не показали значительного предпочтения между новым и известным объектом.

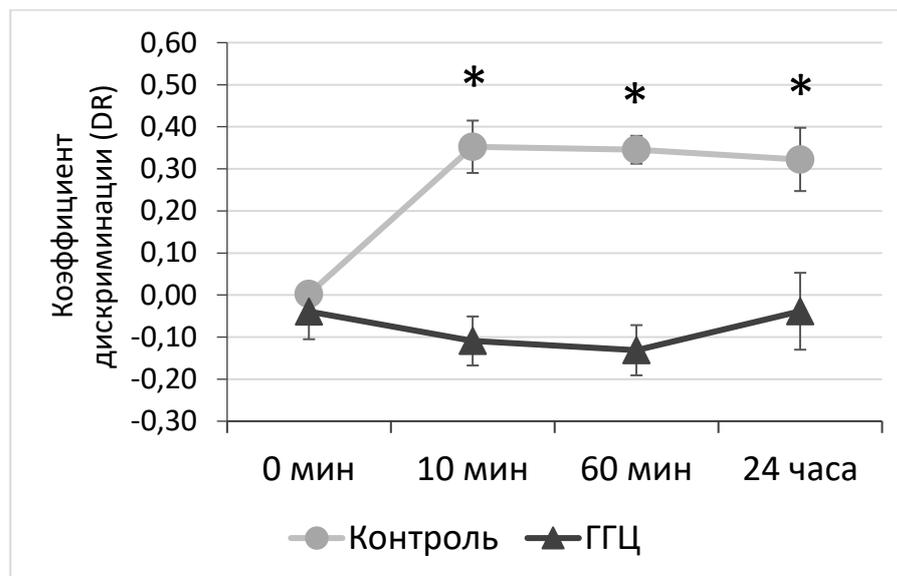


Рис.6 Распознавание новых и известных объектов через 10 мин, 60 мин и 24 часа после тренировочного предъявления пары объектов (0 мин). На линейном графике показаны коэффициенты дискриминации контрольных крыс и крыс перенесших ГГЦ во время задачи распознавания объектов. Коэффициент дискриминации (DR) рассчитывался путем деления разницы времени, проведенного на новом объекте (НО) и известном объекте (ИО), на общее время исследования: $DR = (НО - ИО) / (НО + ИО)$. Значения выше 0 указывают на предпочтение нового объекта, значения ниже 0 — на предпочтение известного объекта. ($M \pm se$, $n=12-13$ в каждой группе). * - $p < 0,001$ – достоверные различия коэффициентов дискриминации контрольных животных и крыс, перенесших хроническую ГГЦ.

В восьмилучевом лабиринте при исследовании рабочей памяти было показано, что среднее время нахождения контрольных крыс внутри рукава $16,06 \pm 1,92$ секунд достоверно не отличалось от времени, выявленного у крыс экспериментальной группы $18,27 \pm 2,36$ секунд на 6-й день тестирования, что позволяет говорить об отсутствии нарушений общей двигательной активности у самок с ГГЦ. При этом процент правильных посещений кормушек у экспериментальных животных был ниже чем у контрольных животных на протяжении всех шести дней тестирования ($p < 0,05$) (Рис.7).

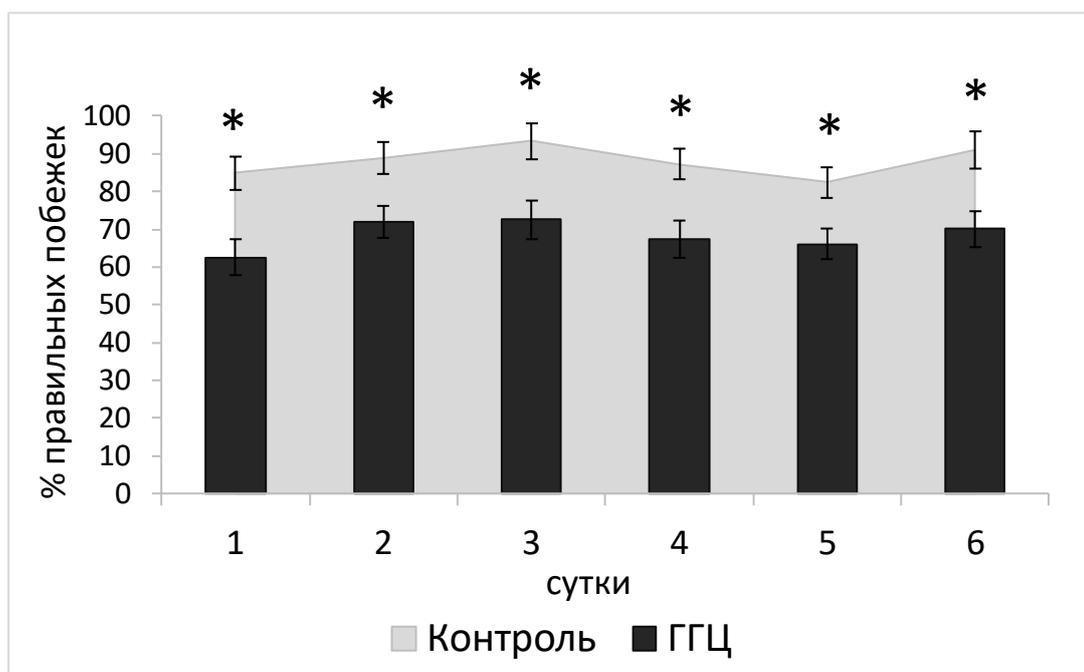


Рис. 7. Влияние метиониновой нагрузки на поведение крыс в восьмилучевом радиальном лабиринте. Ордината: среднее значение правильных посещений рукавов восьмилучевого лабиринта, выраженное в процентах от общего числа посещений для контрольных и перенесших метиониновую нагрузку крыс ($M \pm se$, $n=12-13$ в каждой группе). * - $p < 0,05$ достоверные различия между средними значениями правильных посещений рукавов половозрелыми самками крыс с ГГЦ и контрольными животными.

3.1.5. Показатели окислительного стресса в норме и при метиониновой нагрузке у половозрелых самок крыс в сыворотке крови и гипоталамусе

Показатели, являющиеся маркерами повреждения нуклеиновых кислот (8-OHdG) и окислительной модификации белков (нитротирозин) в гипоталамусе самок контрольной группы и животных с ГГЦ не имели достоверных отличий, также как и не различались у молодых и старых животных (Табл.3). Показано, что у старых животных контрольной группы 22–24 мес по сравнению с крысами 6–7 мес достоверно снижено содержание в гипоталамусе аскорбиновой кислоты. Ее тенденция к снижению была отмечена также у крыс, подвергнутых принудительному хроническому введению метионина. Установлено, что активность СОД в гипоталамусе у молодых животных контрольной группы достоверно выше, чем у животных с экспериментальной ГГЦ. Однако к 22–24 мес у крыс без ГГЦ происходит снижение ее интенсивности, и достоверная разница

между контрольными и экспериментальными животными исчезает, сохраняя лишь характер тенденции. В результате анализа сыворотки крови были отмечены признаки развития ОС у половозрелых животных с ГГЦ, в частности, показано повышение уровня 8-OHdG и 3-нитротирозина. На фоне отсутствия изменения содержания в сыворотке крови у этих животных аскорбиновой кислоты, отмечено, также как и в гипоталамусе, значительное снижение активности СОД. При этом значимых различий между контрольной и экспериментальной группами, как и отличий от молодых самок, у старых животных по исследуемым показателям обнаружено не было.

Таблица 3. Изменение показателей окислительного стресса в гипоталамусе и сыворотке крови молодых и старых самок крыс, перенесших хроническую ГГЦ

Объект	Показатель	Молодые крысы 6–7 мес, <i>n</i> =41		Старые крысы 22–24 мес, <i>n</i> =19	
		Контроль	ГГЦ	Контроль	ГГЦ
Гипоталамус	8-OHdG, нг/мг белка	8,8 [7,8–9,1]	8,4 [8,2–9,1]	8,8 [8,7–9,1]	8,6 [8,3–9,1]
	Нитротирозин, нмоль/мг белка	13,2 [12,8–14,1]	12,5 [11,6–13,5]	13,7 [13,6–13,9]	13,6 [12,5–15,1]
	Аскорбиновая к- та, нг/мг белка	36,3 [34,6–40,4]	38,7 [36,6–39,5]	32,0 [26,8–35,0]#	31,6 [27,7–37,6]
	СОД, Ед/мг белка	0,98 [0,58–1,13]	0,36 [0,26–0,52]***	0,51 [0,40–0,68]#	0,30 [0,19–0,60]
Сыворотка крови	8-OHdG, нг/мл	24,6 [20,8-28,3]	28,8 [25,9-32,1]**	24,9 [23,2-30,1]	28,5 [25,5-31,9]
	Нитротирозин, нмоль/мл	46,2 [7,4-72,0]	92,0 [53,4-130,3]**	86,4 [57,7-136,9]	46,4 [22,7-83,2]
	Аскорбиновая кислота, нг/мл	8,4 [9,9-9,7]	8,2 [7,1-9,3]	7,5 [6,2-9,5]	8,7 [7,1-9,0]
	СОД, Ед/мл	1,22 [0,98-1,61]	0,90 [0,65-1,14]**	1,01 [1,17-1,50]	0,93 [0,17-1,12]

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – достоверность отличий группы с ГГЦ от контрольной группы

При оценке взаимосвязи исследованных показателей с помощью ранговой корреляции Пирсона было показано, что у молодых животных только содержание аскорбиновой кислоты в гипоталамусе коррелирует с уровнем ГЦ в сыворотке крови ($r=0,75$; $p<0,01$). При этом у старых животных достоверные корреляции между изучаемыми показателями в гипоталамусе и содержанием ГЦ в сыворотке крови вообще отсутствуют. Однако отмечена как низкая, например между НА и 5-ОИУК в СВ-Арк, так и относительно высокая — между НА в МПО и НА в СВ-Арк, достоверная корреляция между различными нейромедиаторами (табл. 4), а также слабая, но достоверная корреляция этих показателей с содержанием аскорбиновой кислоты в гипоталамусе (табл. 5). Достоверных связей между содержанием биогенных аминов и показателями, характеризующими окислительную модификацию макромолекул и СОД, а также между отдельными показателями ОС выявлено не было (табл. 5).

Таблица 4 Матрица коэффициентов корреляции (r_s) содержания биогенных аминов в структурах гипоталамуса, ответственных за регуляцию репродуктивных функций

Показатели	НА в СВ-Арк	5-ОИУК в СВ-Арк	ДА в СВ-Арк	НА в МПО	5-ОИУК в МПО	ДА в МПО
НА в СВ	1,00	0,65*	0,74*	0,88*	0,78*	0,74*
5-ОИУК в СВ	0,65*	1,00	0,73*	0,49*	0,66*	0,37
ДА в СВ	0,74*	0,73*	1,00	0,63*	0,75*	0,30
НА в МПО	0,88*	0,49*	0,63*	1,00	0,76*	0,64*
5-ОИУК в МПО	0,78*	0,66*	0,75*	0,76*	1,00	0,54*
ДА в МПО	0,74*	0,37	0,30	0,64*	0,54*	1,00

* $p < 0,01$ – достоверность корреляций

Таблица 5. Коэффициенты корреляции (rs) содержания биогенных аминов в МПО и СВ-Арк гипоталамуса и показателей ОС в гипоталамусе

Показатели	СОД, Ед/мг белка	Аскорбиновая кислота, нг/мг белка	8-OHdG, нг/мг белка	Нитротирозин нмоль/мг белка
НА в СВ-Арк, нг/мг белка	0,26	0,62*	0,10	-0,13
5-ОИУК в СВ- Арк, нг/мг белка	0,37	0,44	0,24	0,10
ДА в СВ-Арк, нг/мг белка	0,30	0,46*	-0,01	0,17
НА в МПО, нг/мг белка	0,29	0,63*	-0,16	-0,20
5-ОИУК в МПО, нг/мг белка	0,50	0,49*	-0,04	-0,27
ДА в МПО, нг/мг белка	0,12	0,61*	0,38	-0,28

* $p < 0,01$ – достоверность корреляций

В связи с тем, что при повышении концентрации ГЦ в крови большинство своих токсических эффектов он реализует прямо в сосудах, влияя на клетки эндотелия, пролиферацию гладкомышечных клеток сосуда и форменные элементы крови [Boldyrev AA, 2009; Ganguly P, Alam SF, 2015; Gurda D et al., 2015], мы проанализировали в нашей работе взаимосвязь его уровня в сыворотке крови с показателями ОС. Показано наличие прямой положительной корреляции уровня ГЦ в сыворотке крови половозрелых самок крыс с маркерами, характеризующими окислительную модификацию макромолекул (Рис.8а,б), при этом, конкретной взаимосвязи содержания ГЦ с изменением исследованных показателей в сыворотке крови неферментативного и ферментативного звеньев АОЗ обнаружено не было (Рис. 8в,г).

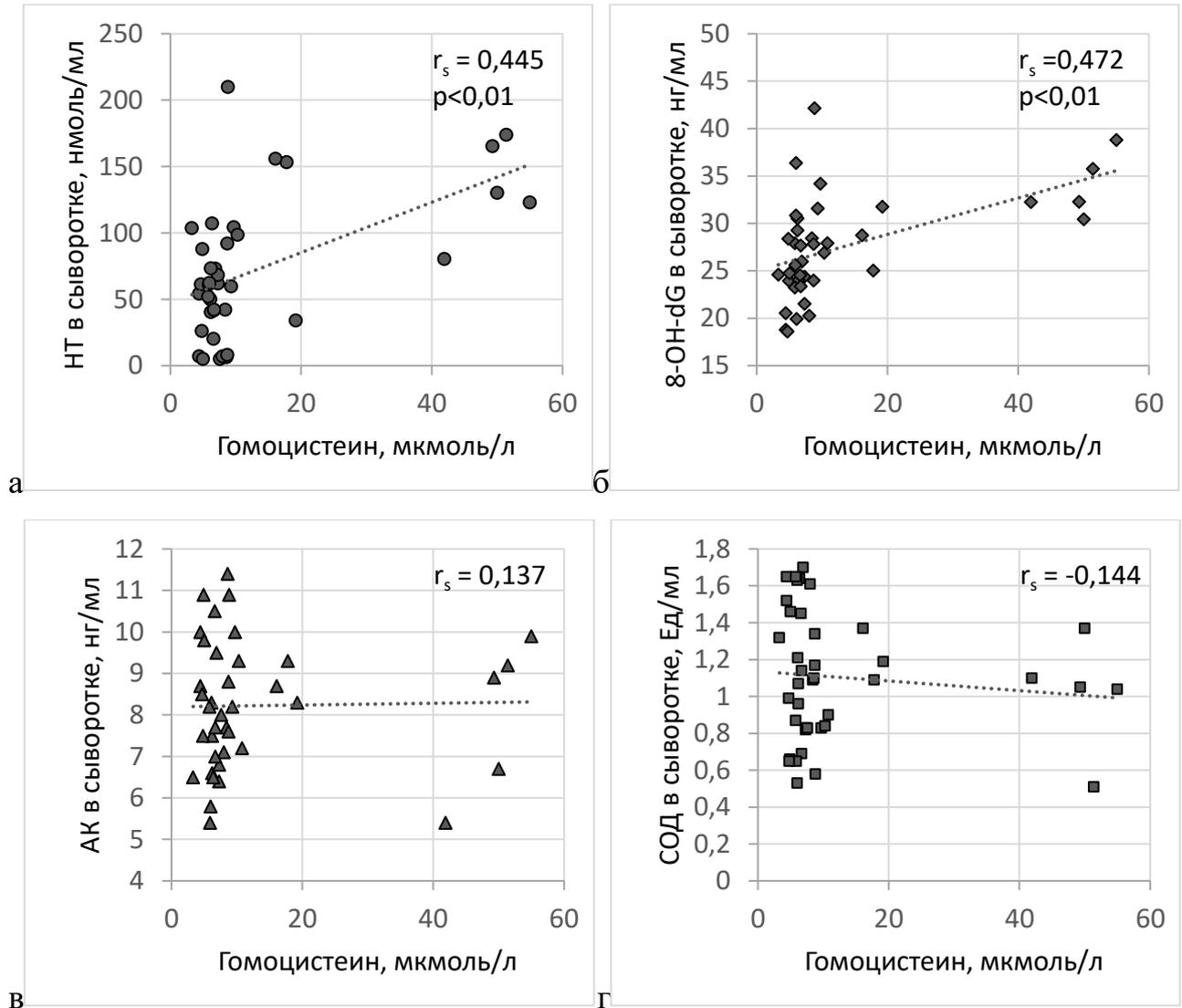


Рис 8. Корреляционная зависимость уровня ГЦ и показателей ОС в сыворотке крови молодых самок крыс, выраженная с помощью ранговой корреляции Спирмена (r_s). *а* – взаимосвязь с уровнем нитротирозина, *б* – взаимосвязь с содержанием 8-ОНдG, *в* – корреляция с содержанием аскорбиновой кислоты, *г* – взаимосвязь с активностью СОД.

3.1.6. Факторный анализ взаимосвязи содержания биогенных аминов и показателей окислительного стресса в гипоталамусе с возрастом и уровнем гомоцистеина в сыворотке крови

Для получения обобщенной информации о структуре связей между исследованными показателями и выборе наиболее значимых из них, для описания

влияния разных условий в проведенном эксперименте провели факторный анализ (Рис. 9), в результате которого установили, что, оценивая нагрузки, первый фактор теснее всего связан с возрастом животного ($a=-0,93$), а также НА в СВ ($a=0,92$), 5-ОИУК в МПО ($a=0,91$), НА в МПО ($a=0,90$), ДА в СВ ($a=0,81$). Кроме того, значительно слабее данный фактор связан с изменением таких показателей, как 5-ОИУК в СВ ($a=0,72$), ДА в МПО ($a=0,67$) и аскорбиновой кислоты в гипоталамусе ($a=0,66$). Изменение содержания ГЦ в сыворотке крови в слабой степени также обусловлено действием выделенного фактора ($a=-0,52$). Изменение показателя 8-ОНdG связано со вторым фактором, не связанным с ГГЦ ($a=-0,76$), который также незначительно влияет на изменение таких показателей, как СОД ($a=0,54$), нитротирозин в гипоталамусе ($a=0,54$) и ДА в МПО ($-0,59$) (Рис. 10).

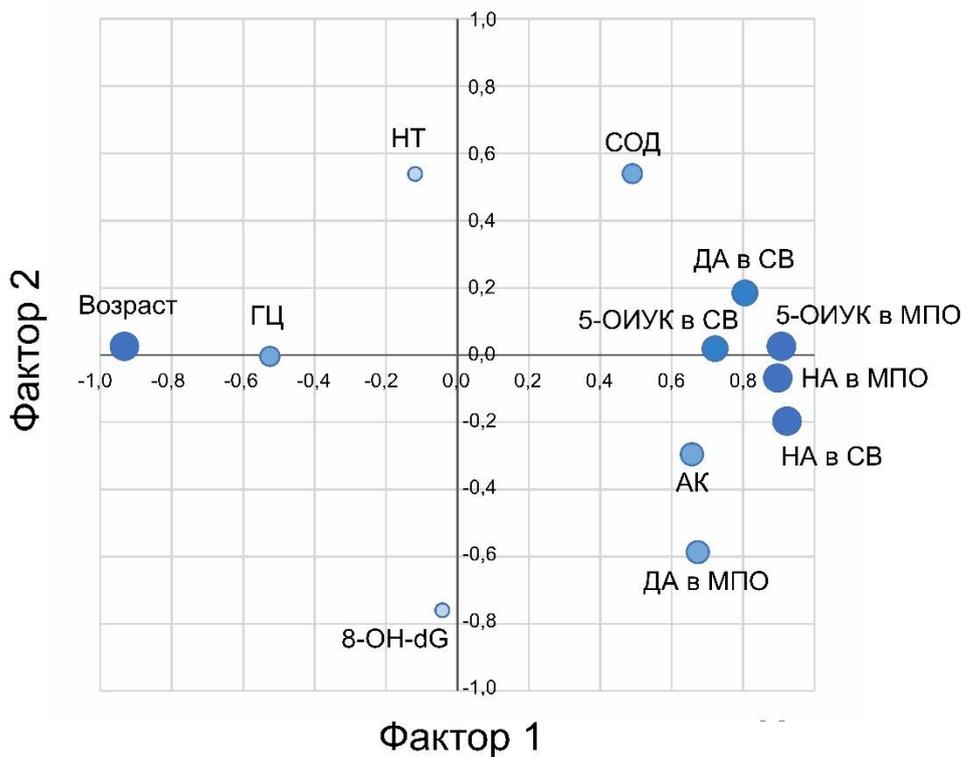


Рис. 9. Двухмерный график факторных нагрузок исследованных показателей.

ДА в СВ — дофамин в срединном возвышении с аркуатными ядрами; 5-ОИУК в СВ — 5-оксииндолуксусная кислота в срединном возвышении с аркуатными ядрами; НА в СВ — норадреналин в срединном возвышении с аркуатными ядрами; ДА в МПО — дофамин в медиальной преоптической области; 5-ОИУК в МПО — 5-оксииндолуксусная кислота в медиальной преоптической области; НА в МПО — норадреналин в медиальной преоптической

области; АК — аскорбиновая кислота; ГЦ — гомоцистеин; НТ — нитротирозин; 8-OHdG — 8-гидрокси-2-дезоксигуанозин

3.2. Влияние хронической гипергомоцистеинемии на беременных самок крыс

3.2.1. Динамика содержания гомоцистеина в сыворотке крови беременных самок крыс в норме и при однократной метиониновой нагрузке

Динамика изменения ГЦ в сыворотке крови беременных самок крыс в течение суток после введения метионина сходна с полученными нами ранее данными на небеременных молодых половозрелых самках крыс. Так, подъем его уровня отмечен уже через 1 час после метиониновой нагрузки, и сохраняется повышенным до 6 часов как на 7-ой и 12-ый, так и на 20-ый день беременности (Рис. 10). Однако, в отличие от хронической метиониновой нагрузки небеременных самок крыс, у которых уровень ГЦ остается повышенным и через 24 часа после введения метионина, при беременности, через сутки его уровень значительно снижается практически до нормальных значений и его отличие от контроля становится недостоверным и носит уже лишь характер тенденции, что указывает на более высокую скорость метаболизма ГЦ при беременности. В связи с этим, мы дополнительно проанализировали его содержание у этих же животных через 18 часов после введения метионина. Достоверно повышенный уровень ГЦ в сыворотке крови в это время мы обнаружили как на 12-ый, так и на 20-ый день беременности, тогда как на 7-ой день отмечена тенденция к его повышению, что вероятно связано с тем, что в эксперименте ежедневная метиониновая нагрузка начинается с 3-го дня беременности (Рис. 10). На основании полученных нами данных, можно сделать заключение, что беременные самки крыс при введении метионина большую часть суток, находятся в состоянии повышенного уровня ГЦ. Принимая во внимание тот факт, что метиониновая нагрузка осуществлялась ежедневно, каждые 24 часа, можно сделать вывод о том, что беременность протекала в условиях ГЦ.

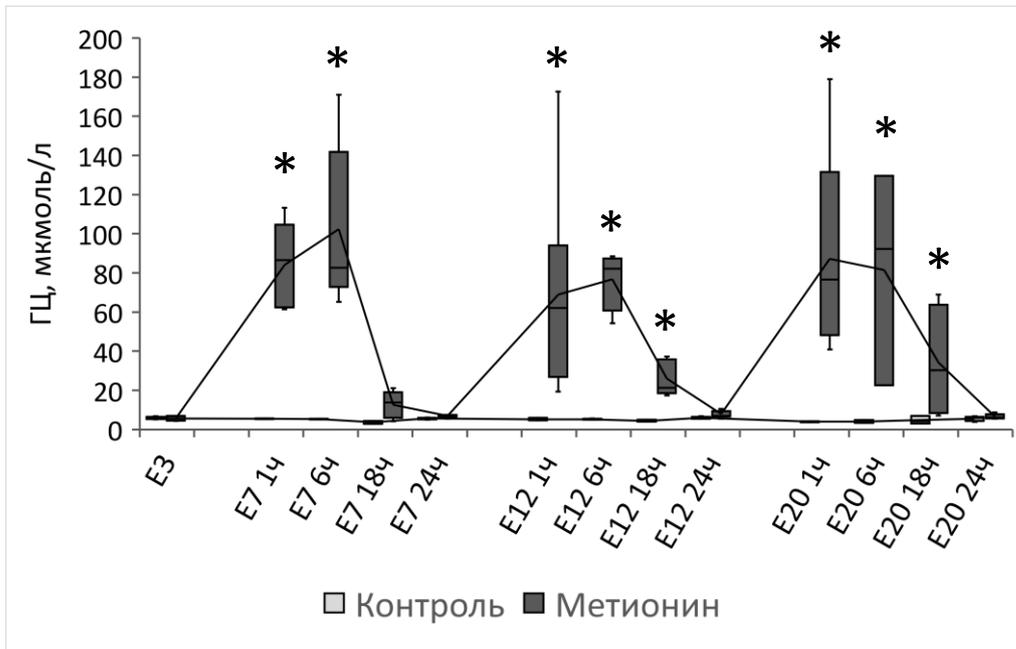


Рис. 10 Содержание гомоцистеина в крови беременных самок крыс на 3-й день беременности (контроль, E3), а также на 7-й (E7), 12-й (E12) и 20-й (E20) дни беременности при материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина. (n=5-6 – в каждой группе), Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - $p < 0,01$ – достоверное отличие подопытной группы, которым вводили метионин, от контроля, беременных самок, получавших воду.

3.2.2. Динамика содержания гомоцистеина в различных структурах мозга беременных самок крыс в норме и при однократной метиониновой нагрузке

В различных отделах головного мозга при однократной метиониновой нагрузке на 4-ый день беременности также происходит повышение уровня ГЦ (Рис. 11). Показано, что в норме у молодых крыс, до введения метионина, содержание ГЦ в мозжечке и гиппокампе выше его уровня в коре и гипоталамусе. При этом значимое повышение его отмечено в трех исследованных отделах. Так в гиппокампе максимальный его подъем показан через 6 часов после введения метионина, тогда как в коре и гипоталамусе – через 3 часа. При этом через 24 часа

содержание ГЦ в них не отличается от значения данного показателя до введения метионина.

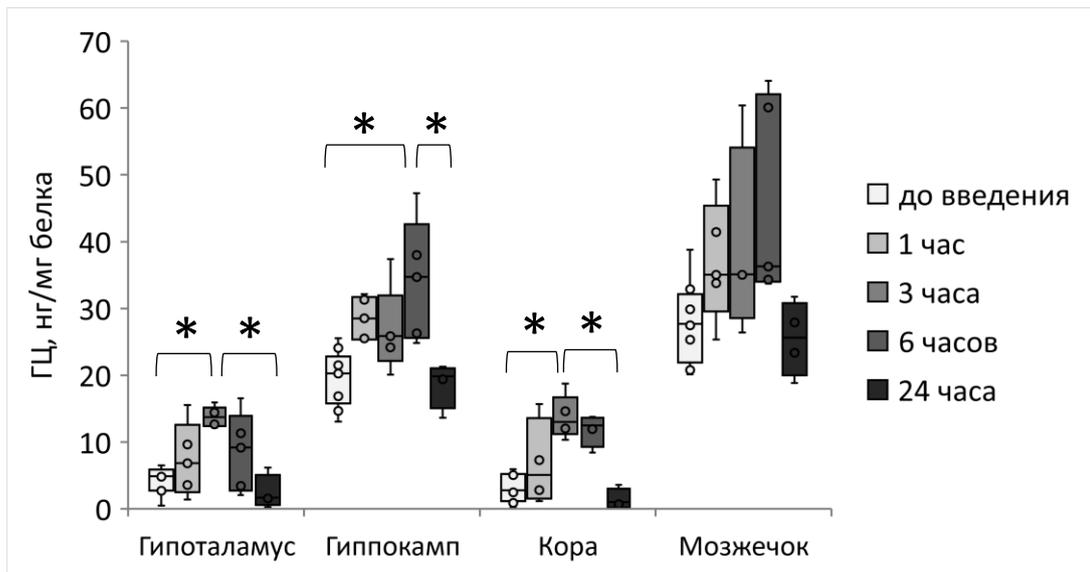


Рис 11. Суточная динамика изменения ГЦ в различных отделах мозга половозрелых самок крыс после однократного введения метионина (n=4-8). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - $p < 0,05$

3.2.3. Содержание нейротрофинов и DNMT1 в структурах мозга беременных самок крыс

При анализе содержания BDNF методом иммуноблотинга у взрослых животных мы выявили 3 изоформы BDNF (39 кДа, 29 кДа и 14 кДа) (Рис. 12а). Анализ содержания NTs в различных отделах мозга беременных самок крыс на 20-ый день беременности показал, что в коре и гипоталамусе на фоне ГЦ снижается содержание изоформы BDNF с молекулярной массой 14 кДа, что соответствует его зрелой форме (Рис. 12б,г). В коре также отмечено снижение содержание его проформы 29 кДа. При этом в гиппокампе и мозжечке содержание различных изоформ BDNF у беременных самок крыс при ГЦ не отличалось от их уровня у контрольных беременных животных (Рис. 12в,д). Также, ни в одной из исследованных областях мозга беременных самок крыс не было показано изменения под влиянием ГЦ уровня NGF (Рис. 13). У животных при ГЦ было обнаружено повышение содержания DNMT1 в растворимой фракции коры, гипоталамуса и мозжечка по сравнению с контрольными животными. При этом в

гиппокампе оно значимо не отличалось в группе контрольных животных с нормальной физиологической беременностью без ГГЦ, и в группе беременных самок с ГГЦ (Рис.14).

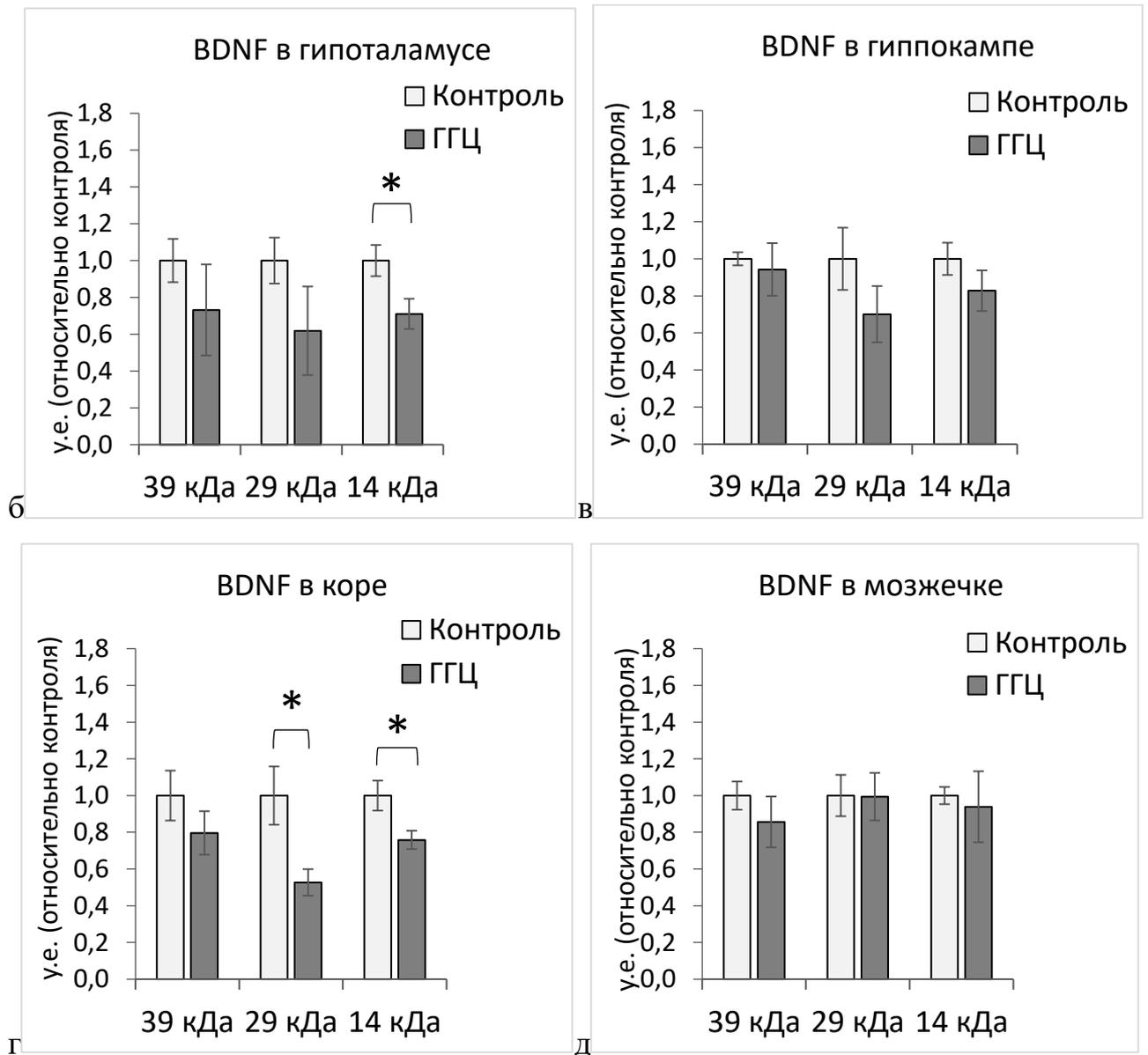
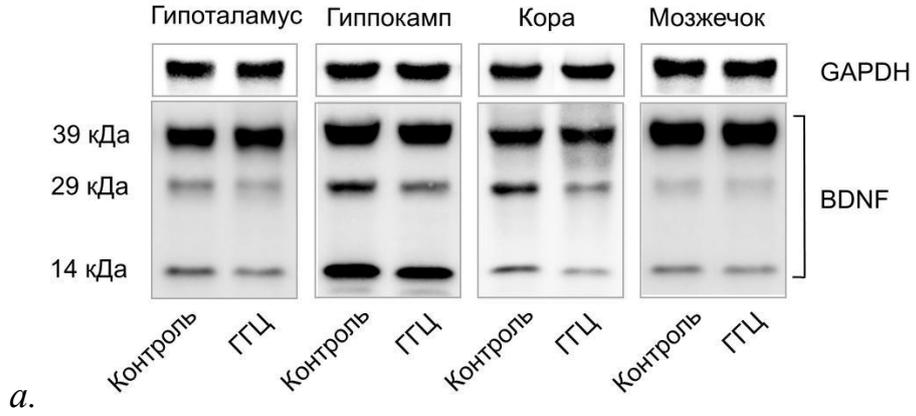


Рис. 12 Содержание различных изоформ BDNF в мозге беременных самок крыс на 20-ый день беременности в норме и при ГГЦ. а – репрезентативный иммуноблот содержания трех изоформ BDNF в различных отделах мозга самок крыс на 20-ый день беременности; влияние ГГЦ на содержание BDNF в гипоталамусе (б), гиппокампе (в), коре (г) и мозжечке (д) беременных самок крыс. Значения изоформ в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по их содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$, ($n=6$ в каждой группе). * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

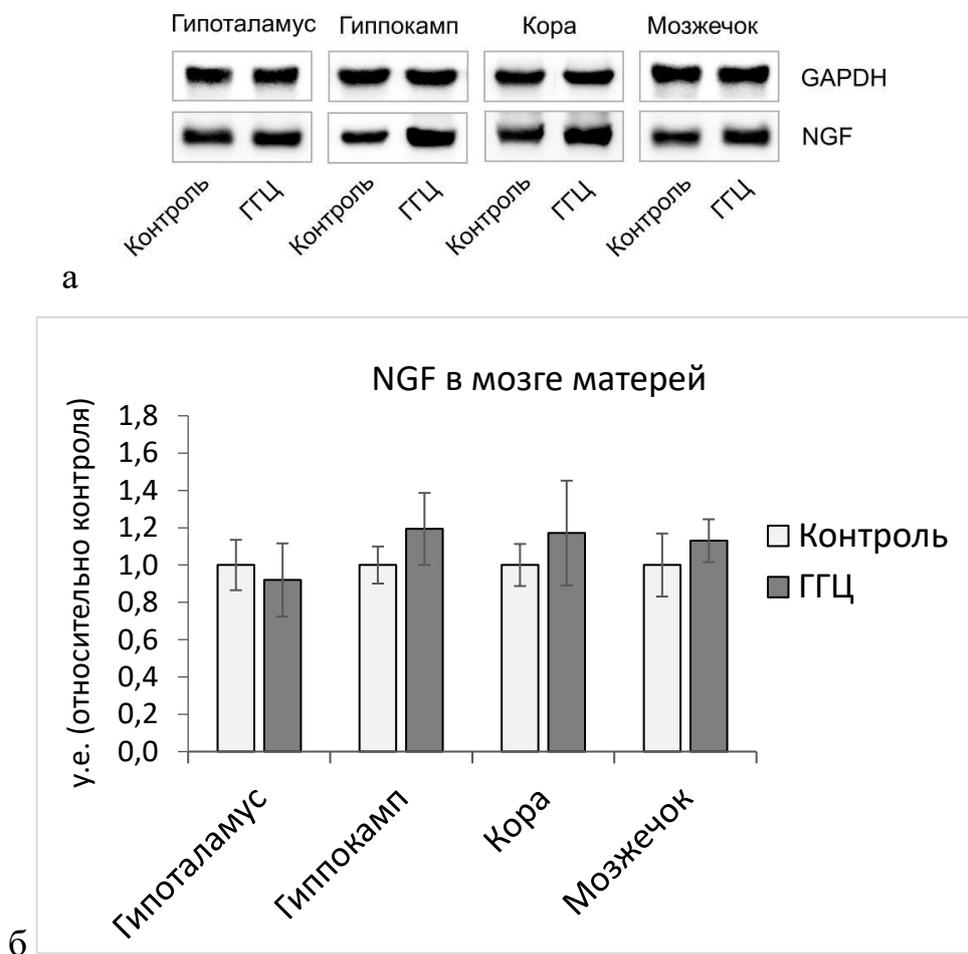


Рис. 13 Содержание NGF в мозге беременных самок крыс на 20-ый день беременности в норме и при гипергомоцистеинемии. а – репрезентативный иммуноблот содержания NGF в различных отделах мозга самок крыс на 20-ый день беременности; б – влияние ГГЦ на содержание NGF в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке беременных самок крыс. Значения NGF каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$, ($n=6$ в каждой группе).

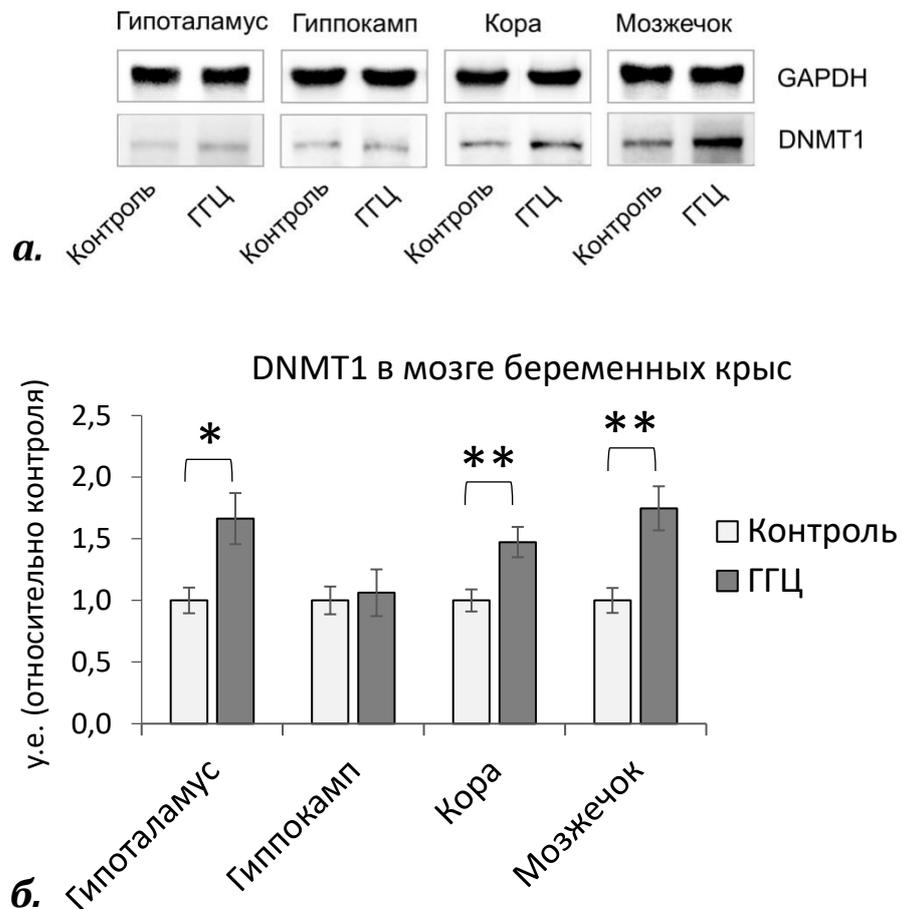


Рис. 14 Содержание DNMT1 в мозге беременных самок крыс на 20-й день беременности в норме и при гипергомоцистеинемии. а – репрезентативный иммуноблот содержания DNMT1 в различных отделах мозга самок крыс на 20-й день беременности; б – влияние ГГЦ на содержание DNMT1 в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке беременных самок крыс. Значения DNMT1 каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$, ($n=6$ в каждой группе). * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверные различия между группой беременных самок с ГГЦ и контролем.

3.2.4. Содержание S-аденозилгомоцистеина и S-аденозилметионина в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии

Для оценки потенциала клеточного метилирования в плаценте после пренатальной ГГЦ методом иммуноферментного анализа исследовали содержание S-аденозилгомоцистеина (SAH) и S-аденозилметионина (SAM) на E20.

Установлено, что на фоне хронической ГГЦ во время беременности к концу срока беременности при ГГЦ происходит увеличение содержания SAH в МЧП и снижение уровня SAM в ПЧП (Рис. 15). Кроме того, эти изменения взаимосвязаны, так-как между данными показателями выявлена обратная корреляционная зависимость ($r=-0,491$; $p<0,05$). В связи с тем, что соотношение SAM/SAH рассматривается как показатель потенциальной способности клеток к метилированию, оно было высчитано для каждой рассмотренной структуры. Показано, что на фоне ГГЦ происходит снижение данного показателя в ПЧП (Рис. 10 в). Предположение об ингибирующем влиянии ГГЦ во время беременности на процессы метилирования в ПЧП подтверждаются также данными о наличии обратной корреляции между содержанием SAM в ПЧП и уровнем ГЦ в сыворотке крови ($r=-0,721$; $p<0,05$).

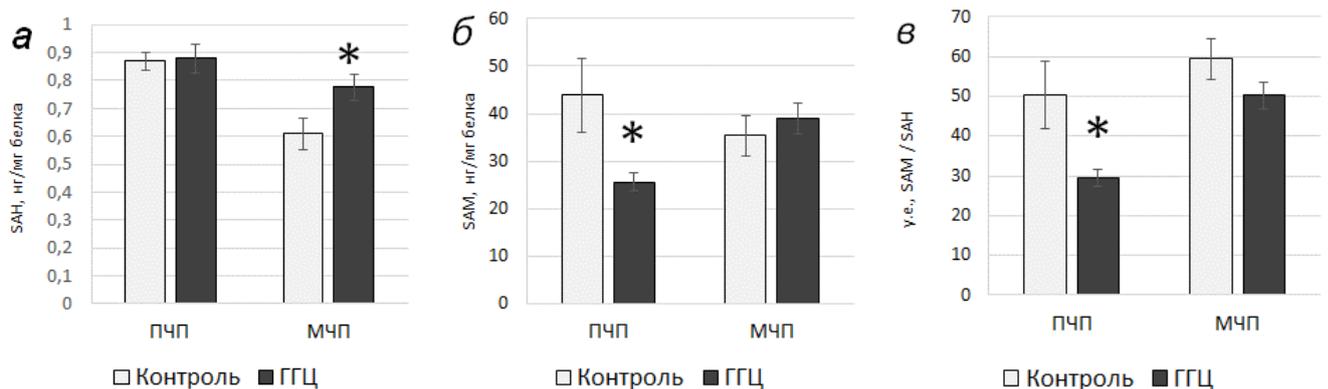
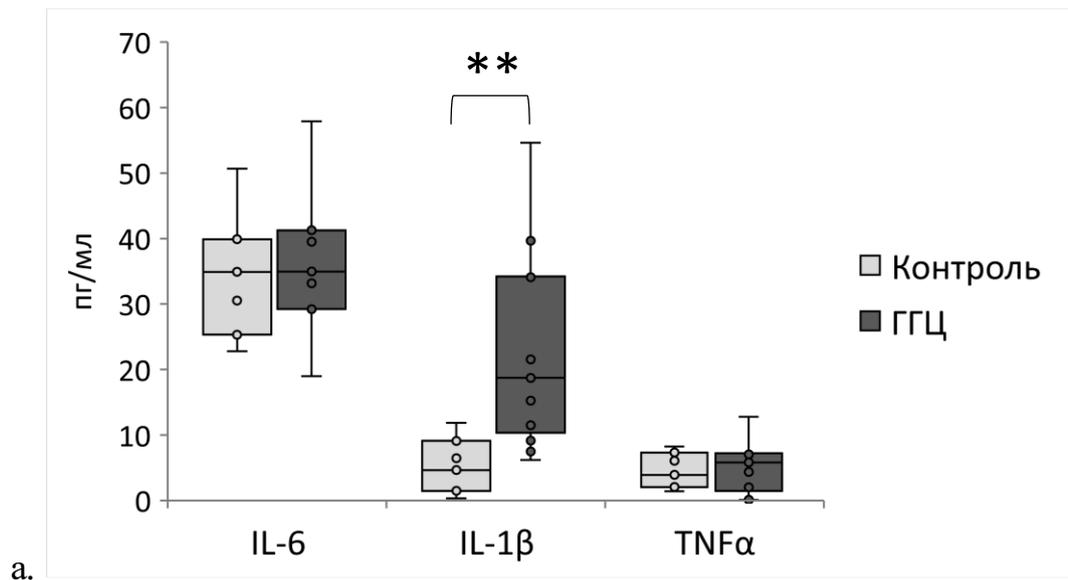


Рис. 15. Влияние экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание SAH и SAM в плаценте и в мозге плода на 20-ый день беременности. Содержание SAH (а) и SAM (б) и их отношение (SAM/SAH) (в) в плодной (ПЧП) и материнской части плаценты (МЧП) крыс. Данные представлены как $M \pm SEM$; ($n = 9$ самок в группе контроля и ГГЦ на E20); * $p < 0,05$, t -критерий Стьюдента.

3.2.5. Содержание цитокинов в сыворотке крови и плаценте беременных самок крыс при гипергомоцистеинемии

При определении влияния ГГЦ во время беременности на содержание провоспалительных цитокинов было установлено повышение содержания IL-1 β в крови самок крыс (Рис.16а) и в ПЧП на 20-ый день беременности (Рис.16в). Его

содержание в сыворотке крови подопытных животных по сравнению с контролем возросло в 4 раза ($p < 0,01$), в то время, как в ПЧП уровень IL-1 β оказался повышенным только в 2 раза ($p < 0,05$). При этом в МЧП значимого изменения данного цитокина обнаружено не было. Кроме того, ГГЦ беременных крыс не приводила к изменению содержания IL-6 и TNF- α ни в сыворотке крови самок, ни в обеих исследованных частях плаценты. В МЧП и ПЧП был также проанализирован уровень IL-10, содержание которого в группе с ГГЦ не отличается от его уровня в соответствующих частях плаценты контрольных животных (Рис. 16 б,в). При этом показано, что уровень IL-1 β в сыворотке крови беременных самок крыс без ГГЦ имеет высокую степень корреляции с провосполительными цитокинами в МЧП, в частности с IL-6 и IL-1 β , а также с TNF- α в ПЧП. При этом при воздействии ГГЦ, имеющиеся взаимосвязи исчезают и повышенное содержание IL-1 β в сыворотке крови не приводит к повышению цитокинов в плаценте, что возможно связано с включением в ней дополнительных механизмов регуляции цитокинового профиля (Табл. 6).



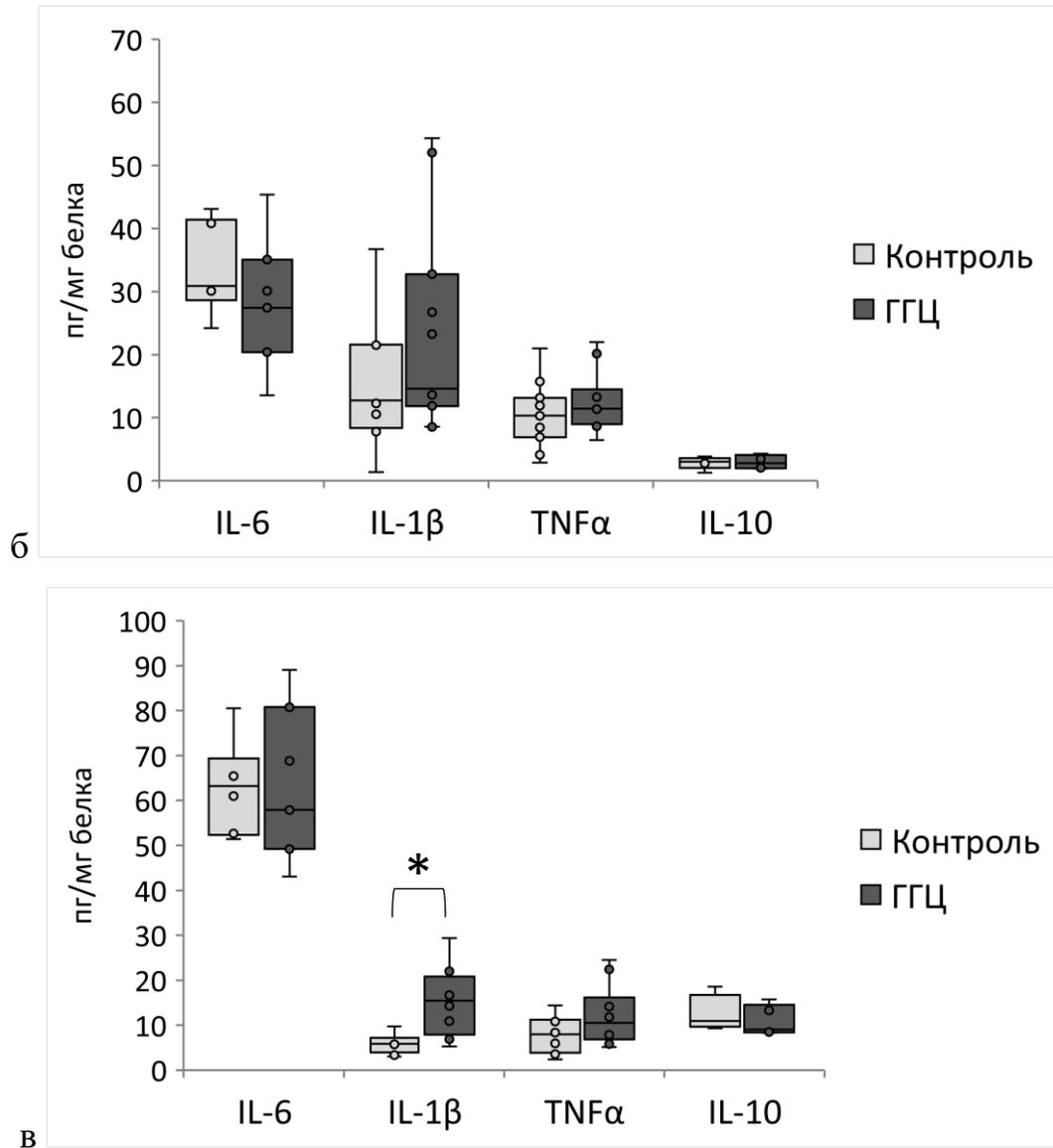


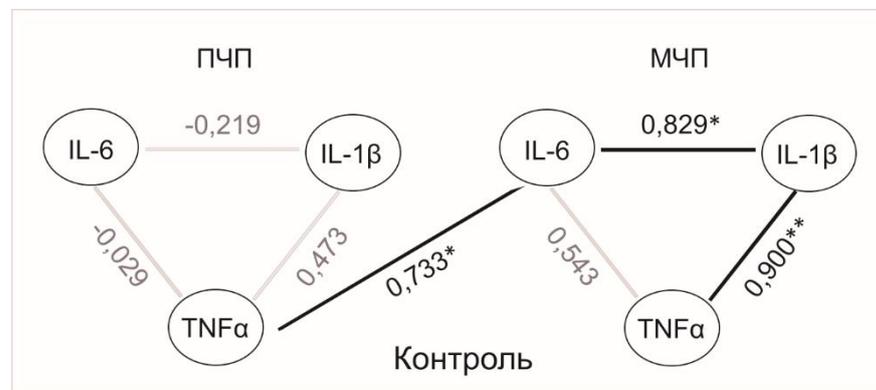
Рис. 16 Содержание цитокинов в сыворотке крови беременных самок крыс и различных частях плаценты при материнской гипергомоцистеинемии на 20-й день беременности. а - содержание провоспалительных цитокинов в крови беременных самок крыс при материнской гипергомоцистеинемии (n=7 – контрольная группа животных, n=13 – группа с ГГЦ); б – влияние ГГЦ на содержание цитокинов в материнской части плаценты; в - влияние ГГЦ на содержание цитокинов в плодной части плаценты (n=6-11 – контрольная группа животных, n=6-12 – группа с ГГЦ); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - p<0,05; ** - p<0,01 – достоверное отличие подопытной группы от контроля.

Таблица 6. Корреляционная зависимость (r_s) между содержанием IL-1 β в сыворотке крови беременных самок крыс и уровнем провосполительных цитокинов в плаценте при нормально протекающей беременности и в условия ГГЦ

Показатель	IL-1 β в сыворотке, пг/мл	
	Контроль	ГГЦ
IL-6 в МЧП, пг/мг белка	0,900*	-0,238
IL-1 β в МЧП, пг/мг белка	0,943**	0,048
TNF α в МЧП, пг/мг белка	0,657	-0,105
IL-6 в ПЧП, пг/мг белка	0,143	-0,357
IL-1 β в ПЧП, пг/мг белка	0,314	-0,329
TNF α в ПЧП, пг/мг белка	0,867*	-0,071

* - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверность корреляций

Показано, что как в норме, так и при ГГЦ уровень IL-1 β в МЧП коррелирует с содержанием в ней IL-6 и TNF- α . В ПЧП взаимосвязи между данными цитокинами в норме обнаружено не было, а при сопоставлении содержания цитокинов в МЧП и в ПЧП показана корреляция между содержанием IL-6 в МЧП и TNF- α в ПЧП. Однако при ГГЦ, несмотря на то что в ПЧП значимо повышен относительно контроля только уровень IL-1 β , показана его зависимость от уровня TNF- α в МЧП, а также корреляция с данным цитокином в самом ПЧП (Рис. 17).



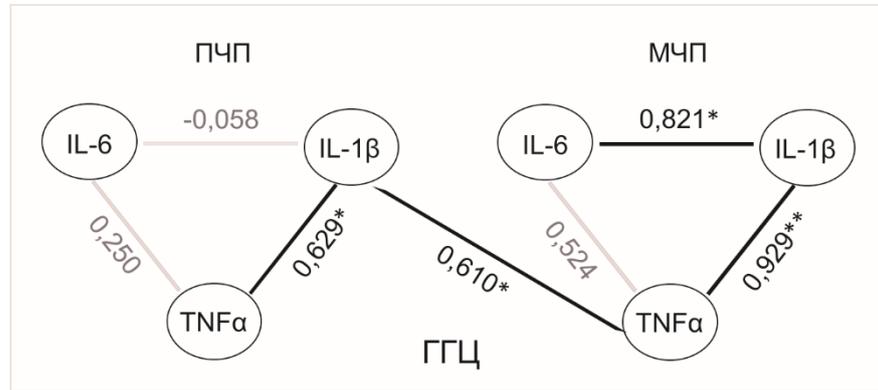


Рис. 17. Корреляции цитокинов в материнской и плодной частях плаценты на 20-ый день беременности в норме и при гипергомоцистеинемии. МЧП – материнская часть плаценты; ПЧП – плодная часть плаценты. Представлены значения ранговых корреляций Спирмена (r_s), значимые корреляционные связи представлены темными линиями, светлые линии указывают на отсутствие достоверных корреляций. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – значимость корреляционной взаимосвязи.

3.2.6. Особенности изменения показателей окислительного стресса в сыворотке крови, мозге и плаценте беременных самок крыс при гипергомоцистеинемии

Согласно полученным данным по оценке показателей, характеризующих развитие ОС, установлено повышение уровня маркера перекисного окисления липидов малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови самок крыс при ГГЦ на 20-ый день беременности (Рис. 18а). При этом значимого снижения активности СОД в сыворотке крови у этих животных не обнаружено, и оно носит лишь характер тенденции (Рис. 18б). Однако, мы подтвердили наличие в нашем исследовании обратной корреляционной связи между наличием МДА и активностью СОД (Рис. 20а).

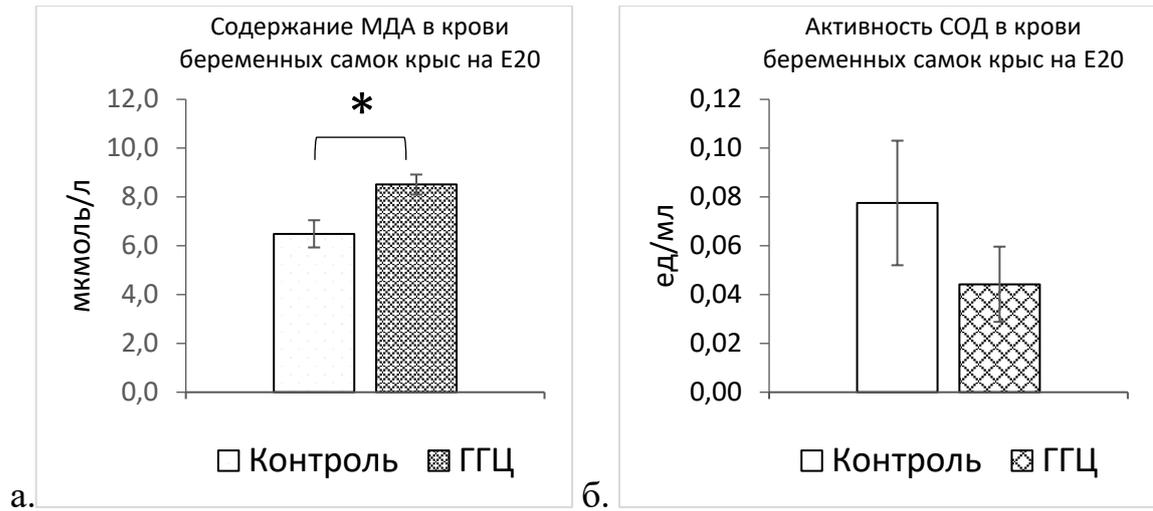


Рис. 18. Влияние гипергомоцистеинемии на изменение показателей окислительного стресса в сыворотке крови беременных самок крыс. а. – содержание малонового диальдегида (МДА) ($n=10$ в каждой группе); б – активность СОД в крови, самок крыс на 20-й день беременности в контрольной группе и в группе животных с ГГЦ ($n=7$ в каждой группе). Данные представлены как $M \pm se$; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и в группе контроля

При анализе показателей ОС в плаценте показано, что при ГГЦ повышение содержания МДА наблюдается только в ПЧП (Рис. 19а), при этом, несмотря на то, что в МЧП изменение данного показателя носят только характер тенденции, в ней отмечено значимое снижение активности СОД (Рис. 19б) и повышение продуктов окислительной модификации белков (ОМБ), определяемых методом OxyBlot™ Protein Oxidation Detection (Рис. 19в,г). Повышенное значение ОМБ в МЧП наблюдается преимущественно у беременных животных, у которых также обнаружено высокое содержание IL-1 β в сыворотке крови, что подтверждается анализом корреляций этих показателей (Рис. 20б)

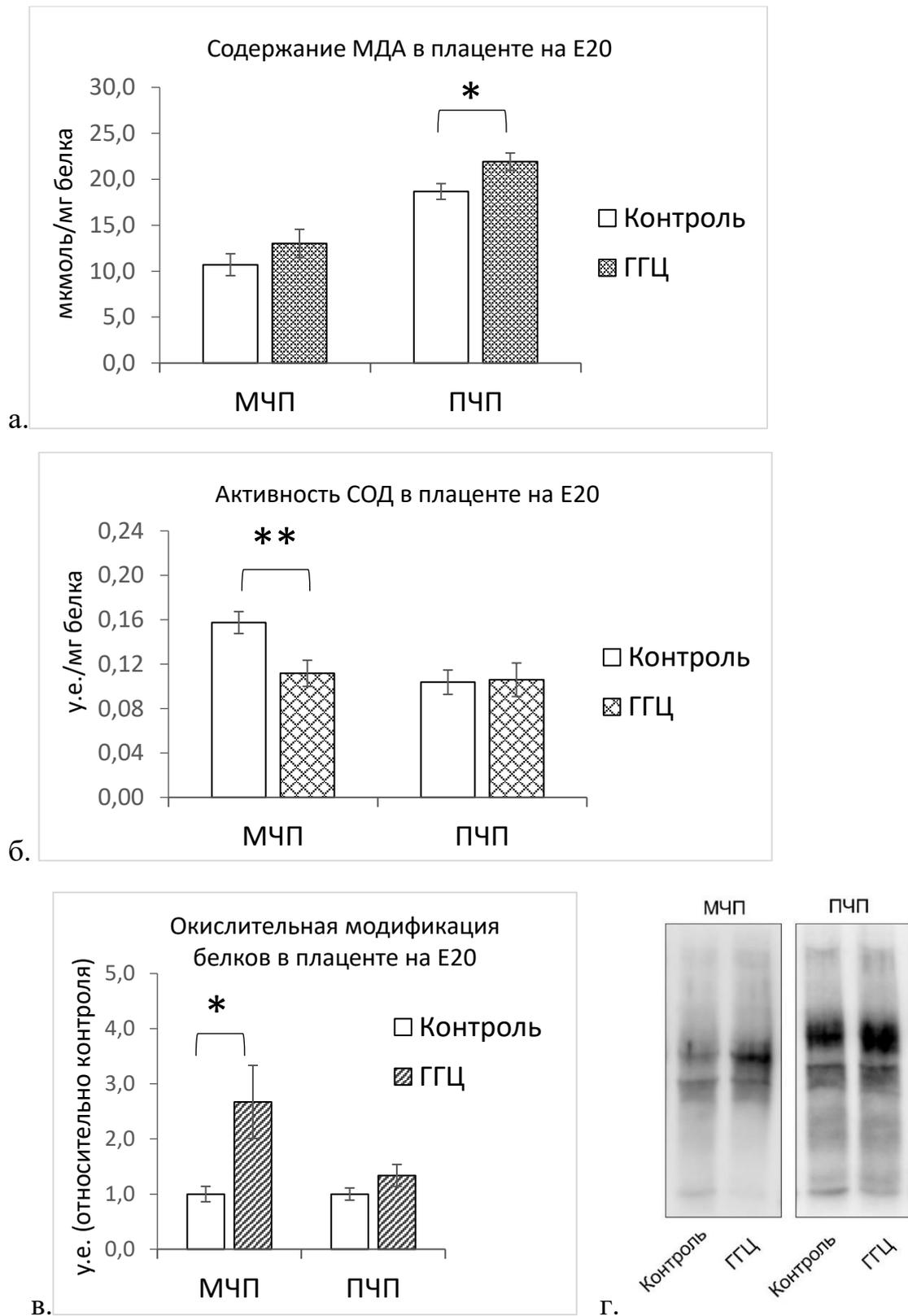


Рис. 19. Влияние гипергомоцистеинемии на изменение показателей окислительного стресса в различных частях плаценты самок крыс на 20-ый день беременности. а. – содержание малонового диальдегида (МДА) (n=14-16 в каждой группе); б – активность СОД (n=8 в каждой группе); в – относительный уровень окислительной

модификации белков в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе и в группе животных с ГГЦ (n=10 в каждой группе); г. – репрезентативный Oxyblot содержания окисленных форм белков в МЧП и ПЧП. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и в группе контроля

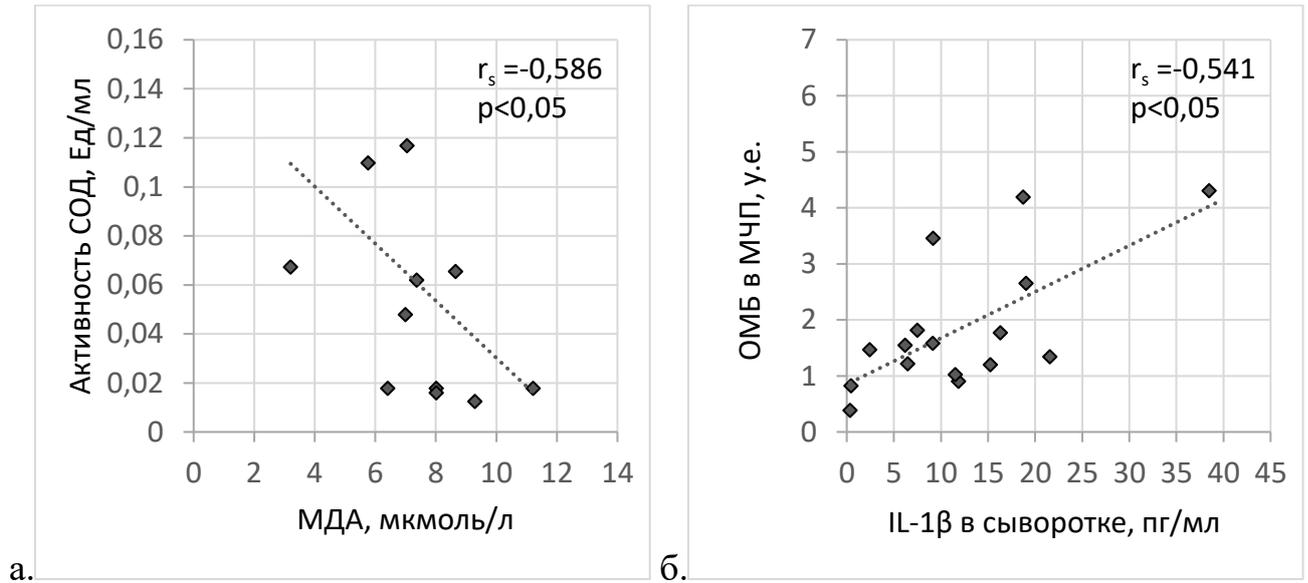


Рис 20. Корреляционная зависимость показателей окислительного стресса на 20-ый день беременности, выраженная с помощью ранговой корреляции Спирмена (r_s). *а* – взаимосвязь содержания МДА и активности СОД в сыворотке крови, *б* – взаимосвязь уровня окислительной модификации белков в МЧП с содержанием IL-1β в сыворотке крови самок крыс на 20-ый день беременности.

Анализ белков с применением метода OxyBlot™ Protein Oxidation Detection показал увеличение степени окислительной модификации белков в растворимой фракции коры мозга самок крыс с ГГЦ на 20-й день беременности по сравнению с контрольными беременными самками ($p < 0,05$). При этом, содержание продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе у животных, находящихся на хронической метиониновой нагрузке, значимо не отличалось от его уровня в гиппокампе контрольных животных, и повышение данного показателя носило лишь характер тенденции (рис. 21).

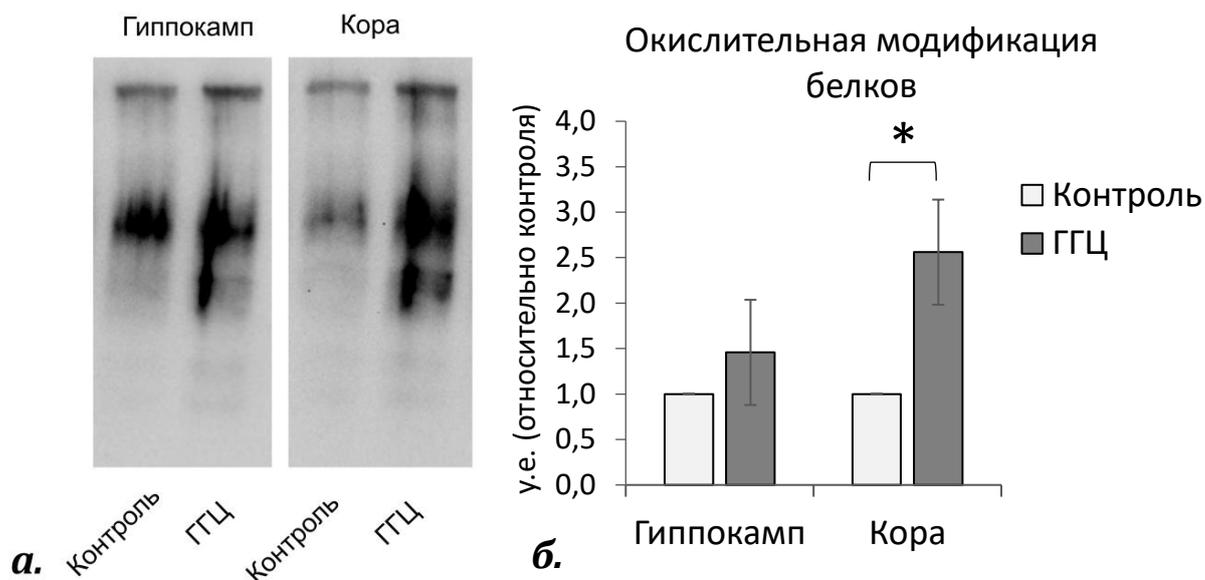
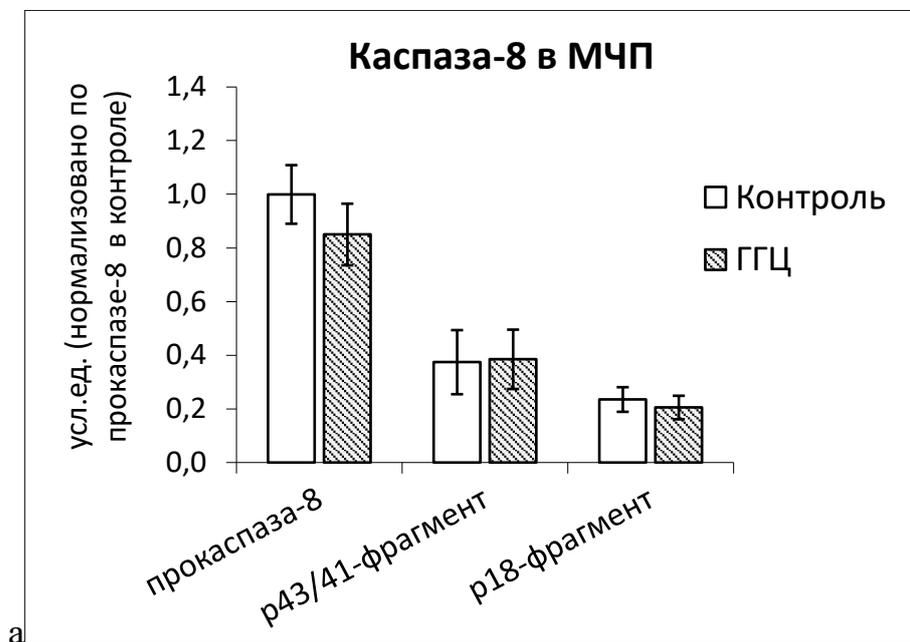


Рис. 21 Относительный уровень окислительной модификации белков (OxyBlot™) в растворимой фракции гиппокампа и коры на 20-ый день беременности в норме и при ГГЦ. а – репрезентативный oxyblot содержания продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе и коре мозга самок крыс на 20-ый день беременности; б – количественный анализ влияния ГГЦ на содержание продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе и коре беременных самок крыс. Значения в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью. Данные представлены как $M \pm se$, ($n=4$ в каждой группе). * - $p < 0,05$; – достоверные различия показателей в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

3.2.7. Содержание маркеров апоптоза в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии

Методом иммуноблотинга в исследуемых структурах выявлено три изоформы инициаторной каспазы-8. ГГЦ во время беременности не вызывала активацию каспазы-8 в МЧП, так показано, что содержание прокаспазы-8 в данной структуре не изменяется, кроме того, относительно контрольных животных, отсутствует усиление ее расщепления с образованием промежуточного фрагмента p41/p43 и конечного расщепления до активной каспазы-8 (p18) (Рис. 21а). В ПЧП уровни расщепленных фрагментов каспазы-8 под действием ГГЦ также не претерпевали изменений, однако в данной структуре, в отличие от МЧП отмечено повышение

содержания нерасщепленной прокаспазы-8 ($p < 0,05$) (Рис. 21б), что указывает на устойчивость ПЧП к контакт-зависимому апоптозу. При этом, часть неапоптотических функций каспазы-8, в частности, связанные с развитием воспаления, предполагают ее участие в нерасщепленной форме [Gurung P, Kanneganti TD, 2015]. В МЧП содержание эффекторной прокаспазы-3 и формы активной каспазы-3 (p17-фрагмент) было сопоставимо, под действием ГГЦ содержание активной изоформы достоверно повышалось (Рис. 21в). В результате, отношение каспаза-3/прокаспаза-3, которое отражает степень активации данной каспазы, в МЧП беременных самок крыс с ГГЦ было равным $1,30 \pm 0,218$, что значимо выше ($p < 0,05$), чем в контрольной группе животных, у которых данный показатель составил $0,71 \pm 0,084$. В ПЧП наблюдалось значительное преобладание неактивной прокаспазы-3 над ее активной расщепленной формой, как в контрольной, так и в экспериментальной группе, с отсутствием изменений содержания обеих изоформ при воздействии ГГЦ (Рис. 21г).



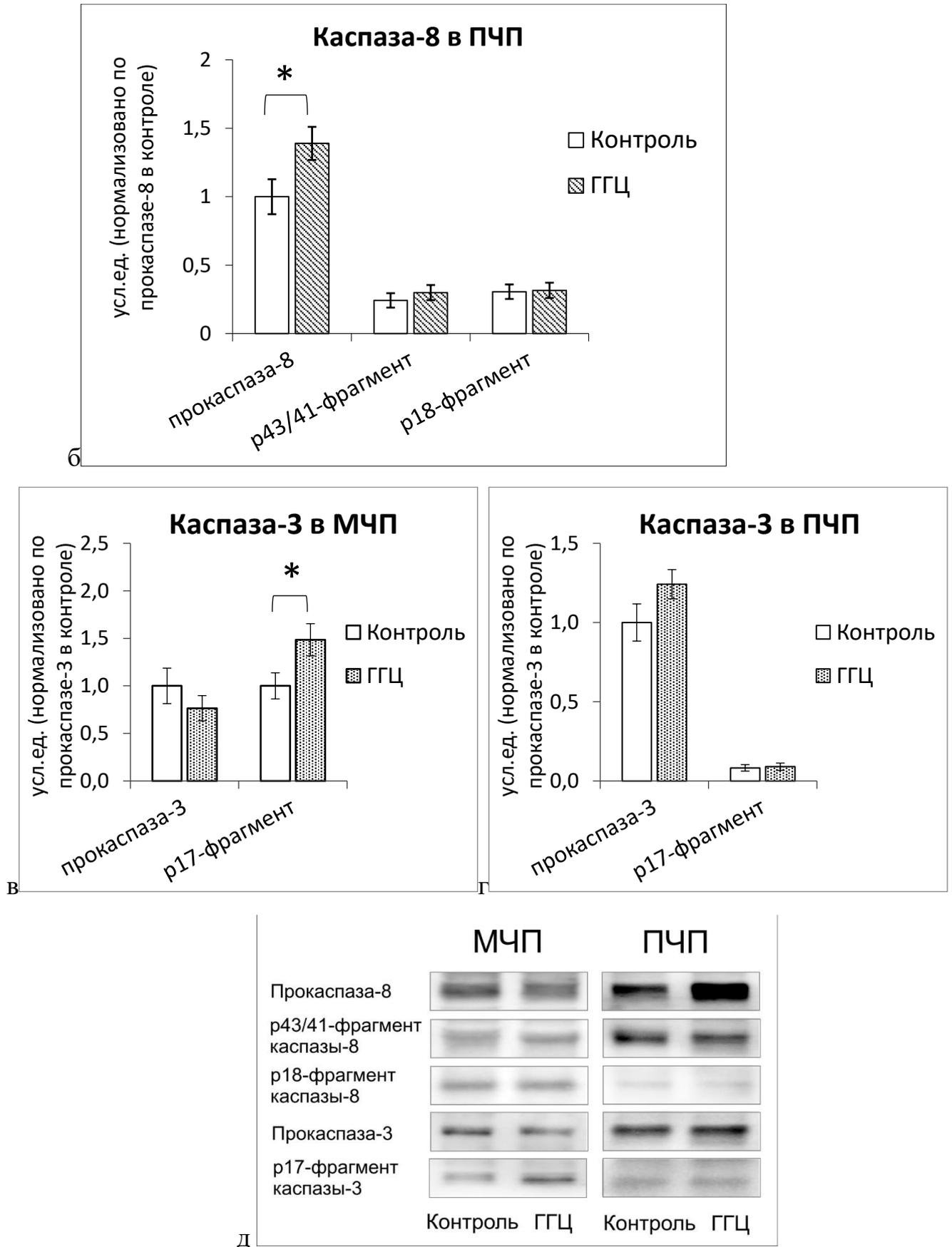


Рис. 21 Влияние гипергомоцистеинемии на содержание прокаспаз и их расщепленных фрагментов в различных частях плаценты самок крыс на 20-ый день

беременности. а – содержание прокаспазы-8, ее промежуточного фрагмента расщепления (p43/p41- фрагмент) и активной формы (p18-фрагмент) каспазы-8 в МЧП (n=10 в каждой группе) б – содержание прокаспазы-8, ее промежуточного фрагмента расщепления (p43/p41- фрагмент) и активной формы (p18-фрагмент) каспазы-8 в ПЧП крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ (n=10 в каждой группе). в – содержание прокаспазы-3 и ее активной формы (p17-фрагмент) в МЧП (n=10 в каждой группе); г – содержание прокаспазы-3, и ее активной формы (p17-фрагмент) в ПЧП (n=10 в каждой группе); д – репрезентативный вестерн-блот изоформ исследованных каспаз. Изоформы каспазы-3: прокаспаза-3 – 35 кДа, p17-фрагмент – 17 кДа. Изоформы каспазы-8: прокаспаза-8 – 57 кДа, промежуточный фрагмент расщепления p43/p41 – 40-45 кДа, p18-фрагмент – 18 кДа. Значения изоформ нерасщепленных прокаспаз и их расщепленных фрагментов контрольных и экспериментальных беременных самок крыс нормализованы по содержанию соответствующих прокаспаз в группе контрольных животных с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля

3.2.8. Особенности морфологии плаценты на 14-ый и 20-ый день беременности при гипергомоцистеинемии

Соотношение ширины лабиринтной и базальной части на сроке E14 в контроле и при ГГЦ было примерно одинаковым (1:1). На сроке E20 в результате развития лабиринтной области ее ширина значительно превосходила ширину базальной части. В группе с воздействием ГГЦ на сроке E20 наблюдалось более слабое развитие зоны лабиринта с уменьшением ее ширины (рис. 22г). В группе крыс с материнской ГГЦ на сроке E14 в зоне лабиринта наблюдалось очаговое утолщение трофобластических балок, сопровождавшееся сужением синусоидального пространства. На сроке E20 в контрольной группе просветы сосудистого русла лабиринтной области плаценты были умеренно эктазированы, умеренно кровенаполнены (рис. 22а). В группе с материнской ГГЦ на этом же сроке в лабиринтной области плаценты отмечалось обилие трофобластических клеток с сужением синусоидального пространства (рис. 22б, в), во всех образцах отмечалось нарушение циркуляции с очаговой эктазией просвета, застоем и расслоением крови на жидкую и клеточные фракции (рис. 22б). Базальная часть (спонгиотрофобласт)

на сроке E14 в контроле характеризовалась гнездным строением с преимущественно равномерной толщиной трофобластических колонн и относительно равномерным распределением умеренного количества гликогеновых клеток в гнездах (рис. 23а). Под действием ГГЦ наблюдалось очаговое утолщение трофобластических колонн и сужение гнездного пространства с наличием умеренного числа неравномерно распределенных гликогеновых клеток (рис. 23б,в). На сроке E20 в контроле спонгиотрофобласт характеризовался неравномерно выраженным гнездным строением и небольшим количеством гликогеновых клеток в гнездах. У подопытных животных на сроке E20 гнездные пространства с наличием гликогеновых клеток определялись только в 3 образцах, в остальных определялись только единичные гликогеновые клетки или же они отсутствовали полностью. Гигантские клетки трофобласта на сроке E14 в группе контроля формировали слой в 3-4 клетки, преимущественно с равномерной оксифильной цитоплазмой, округло-овальным ядром и равномерным распределением хроматина. В группе с воздействием ГГЦ на сроке E14 гигантские клетки трофобласта располагались слоем в 1-2 клетки, в большинстве гигантских клеток наблюдалась мелковакуолярная и крупновакуолярная дистрофия цитоплазмы, в отдельных клетках отмечался кариолизис (рис. 22и). На сроке E20 в контрольной группе гигантские клетки трофобласта формировали слой в 2-3 клетки с оксифильной цитоплазмой (рис. 24а). В группе с материнской ГГЦ слой гигантских клеток трофобласта составлял 1-2 клетки, округло-овальной и полигональной формы, ядра клеток не прослеживались в 9 образцах, в 3 образцах отмечалась мелковакуолярная дистрофия цитоплазмы и полиморфизм ядер (рис. 24б,в).

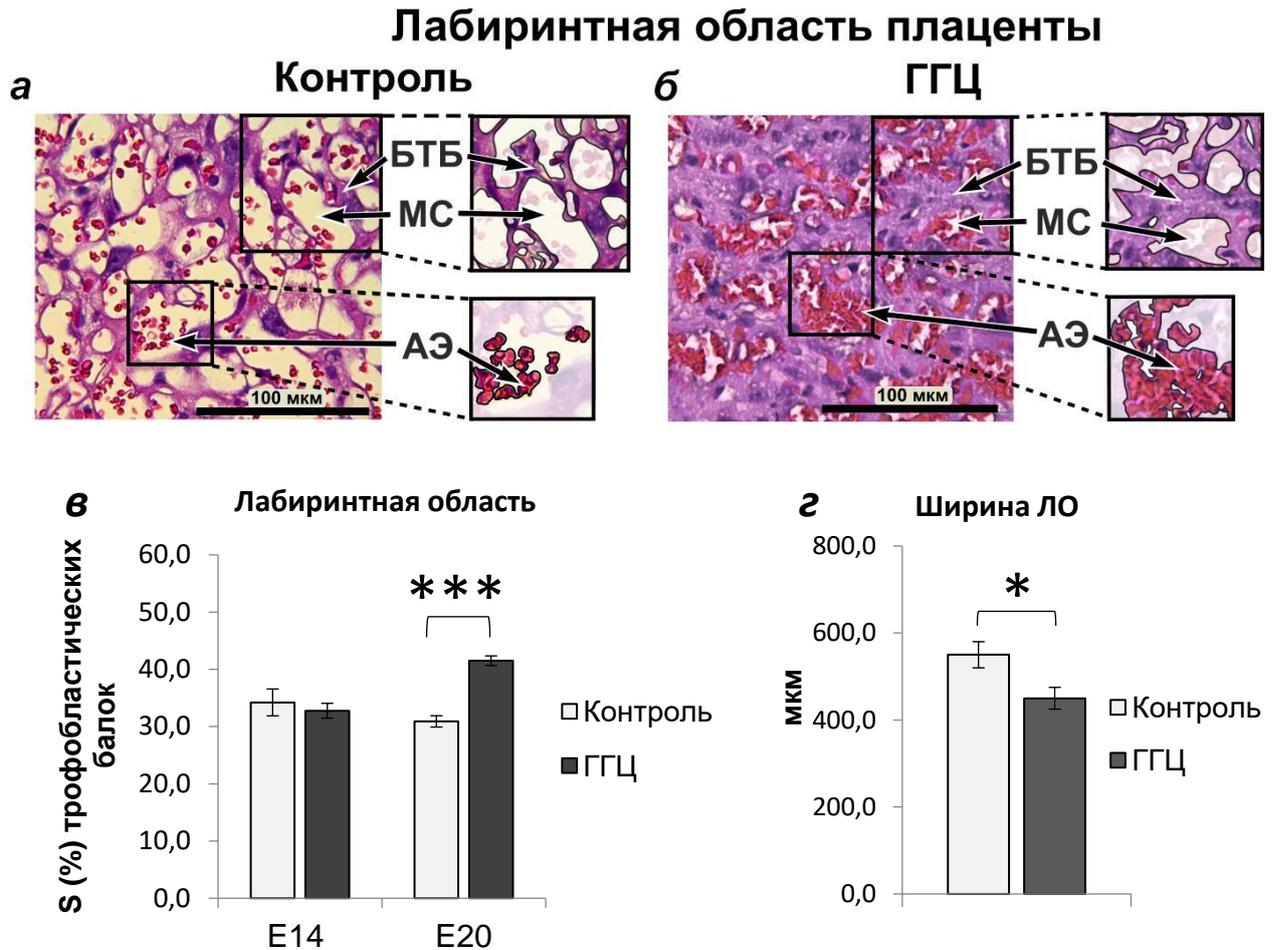


Рис. 22. Морфологические изменения в ПЧП плаценты крыс под влиянием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ). а,б – лабиринтная область плаценты с балками трофобласта (БТБ) и материнскими синусоидами (МС) в контрольной (а) и подопытной (б) группе на 20-ый день беременности. Г-Э, $\times 200$; в – относительная площадь (S%) трофобластических балок от общей площади области лабиринта в контрольной и подопытной группах на 14-ый и 20-ый день беременности ($n=3-14$ в каждой группе); г – ширина лабиринтной области (ЛЮ) в контрольной ($n = 9$) и подопытной ($n = 18$) группе на E20. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем, t-критерий Стьюдента.

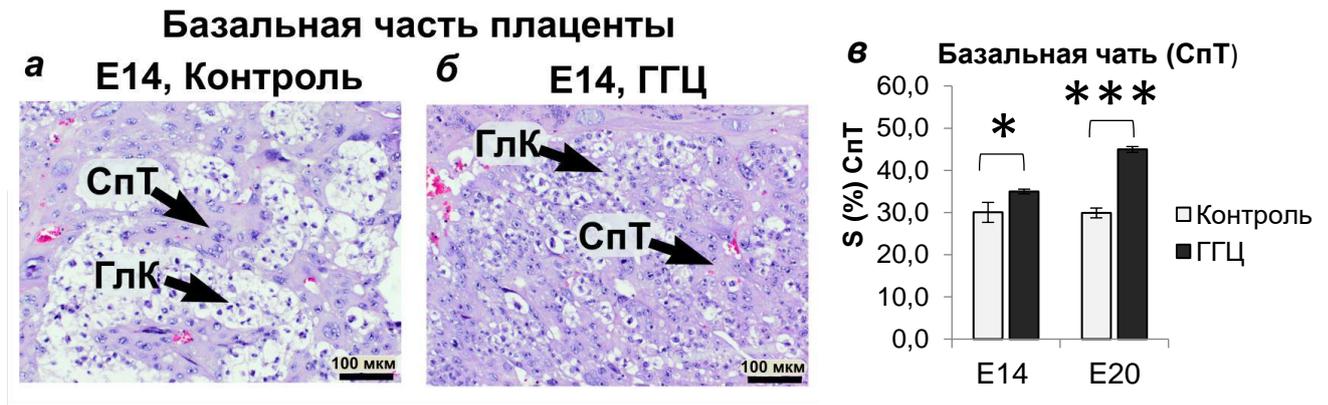


Рис. 23. Морфологические изменения в МЧП плаценты крыс под влиянием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ). а – базальная часть (БЧ) плаценты с трофобластическими колоннами клеток спонгиотрофобласта (СпТ) и гликогеновыми клетками (ГлК) в гнездах в контрольной группе. Г-Э, $\times 200$; б – базальная часть (БЧ) плаценты, заполненная клетками спонгиотрофобласта (СпТ) с отдельными гликогеновыми клетками (ГлК) в группе ГГЦ. Г-Э, $\times 200$; в – относительная площадь (S%) клеток спонгиотрофобласта (СпТ) от общей площади базальной части в контрольной и подопытной группах на 14-ый и 20-ый день беременности (n=3-14 в каждой группе); Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Слой гигантских клеток трофобласта

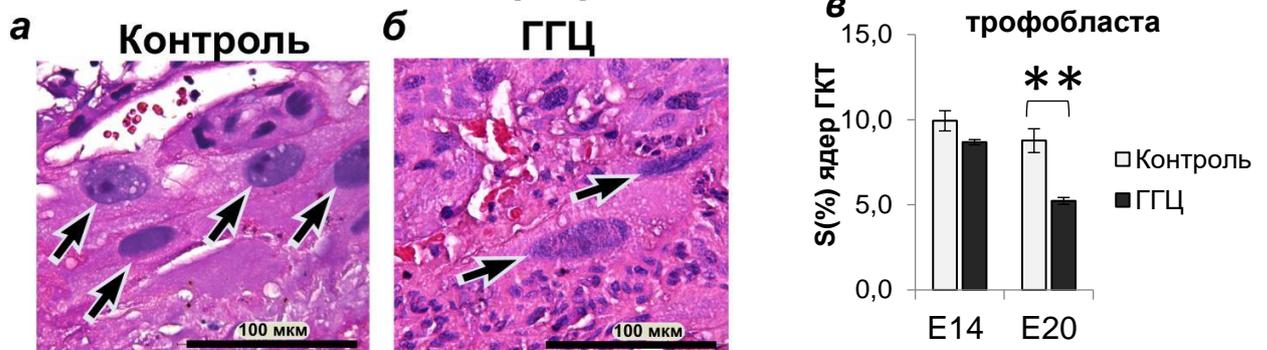


Рис. 24. Морфологические изменения в слое гигантских клеток трофобласта плаценты крыс под влиянием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ). а: гигантские клетки трофобласта (ГКТ) с равномерной оксифильной цитоплазмой и ядром с равномерным распределением хроматина в контрольной группе на 20-ый день беременности. Г-Э, $\times 400$; б: гигантские клетки трофобласта (ГКТ) с дистрофией цитоплазмы и кариолизисом в группе ГГЦ на 20-ый день беременности. Г-Э, $\times 400$; в: относительная площадь (S%) ядер гигантских клеток трофобласта (ГКТ) от общей площади слоя ГКТ в контрольной и подопытной

группах на 14-ый и 20-ый день беременности ($n = 3-14$ в каждой группе); ** $p < 0,005$ по сравнению с контролем.

3.2.9. Содержание и экспрессия нейротрофинов и их рецепторов в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии

В настоящее время появились доказательства того, что нейротрофические факторы играют существенную роль в процессах имплантации бластоцисты, развития плаценты и становлении транс-плацентарного барьера [Kawamura K et al., 2011; Garces MF et al., 2014]. В проводимом исследовании было подтверждено наличие таких нейротрофических факторов как BDNF и NGF в МЧП и ПЧП на 14-ый и 20-ый день беременности в сопоставимом с мозгом плода количестве (Рис. 25а, 26а). При этом в обеих частях плаценты на данных сроках беременности не обнаруживается изоформа с молекулярной массой 39 кДа, которая в различных отделах мозга взрослых животных определяется как преобладающая (Рис12а). Таким образом, BDNF представлен двумя изоформами 29 кДа (про-форма) и 14 кДа (зрелая форма) (25а,в 26а,в). Показано, что на 14-ый день беременности на фоне ГГЦ в МЧП происходит повышение содержание изоформы 29 кДа (Рис.25в), что выражается в снижении отношения mBDNF/proBDNF (Рис.25г). Показано, что в обеих частях плаценты BDNF преимущественно представлен в форме 29 кДа, содержание которой более чем в 10 раз превосходит содержание формы 14 кДа. При этом в контроле содержание обеих изоформ BDNF в МЧП сопоставимо с их содержанием в ПЧП, тогда как содержание proNGF в ПЧП, в среднем, в 3 раза ниже, чем в МЧП.

Показано, что ГГЦ во время беременности приводит к увеличению содержания предшественников нейротрофических факторов BDNF (29 кДа) и NGF (31 кДа) в МЧП и ПЧП на 20-ый день беременности (рис. 26 б,в), что может отражать усиление их синтеза как компенсаторную реакцию в ответ на плацентарную недостаточность, вызванную воздействием материнской ГГЦ. Вместе с тем, в ПЧП было обнаружено снижение экспрессии гена NGF (рис. 27), поэтому в данном случае повышение уровня предшественника NGF связано вероятнее всего с нарушением его дальнейшего процессинга. Значимого изменения

содержания изоформы BDNF с молекулярной массой 14 кДа в обеих частях плаценты на 20-ый день беременности не обнаружено.

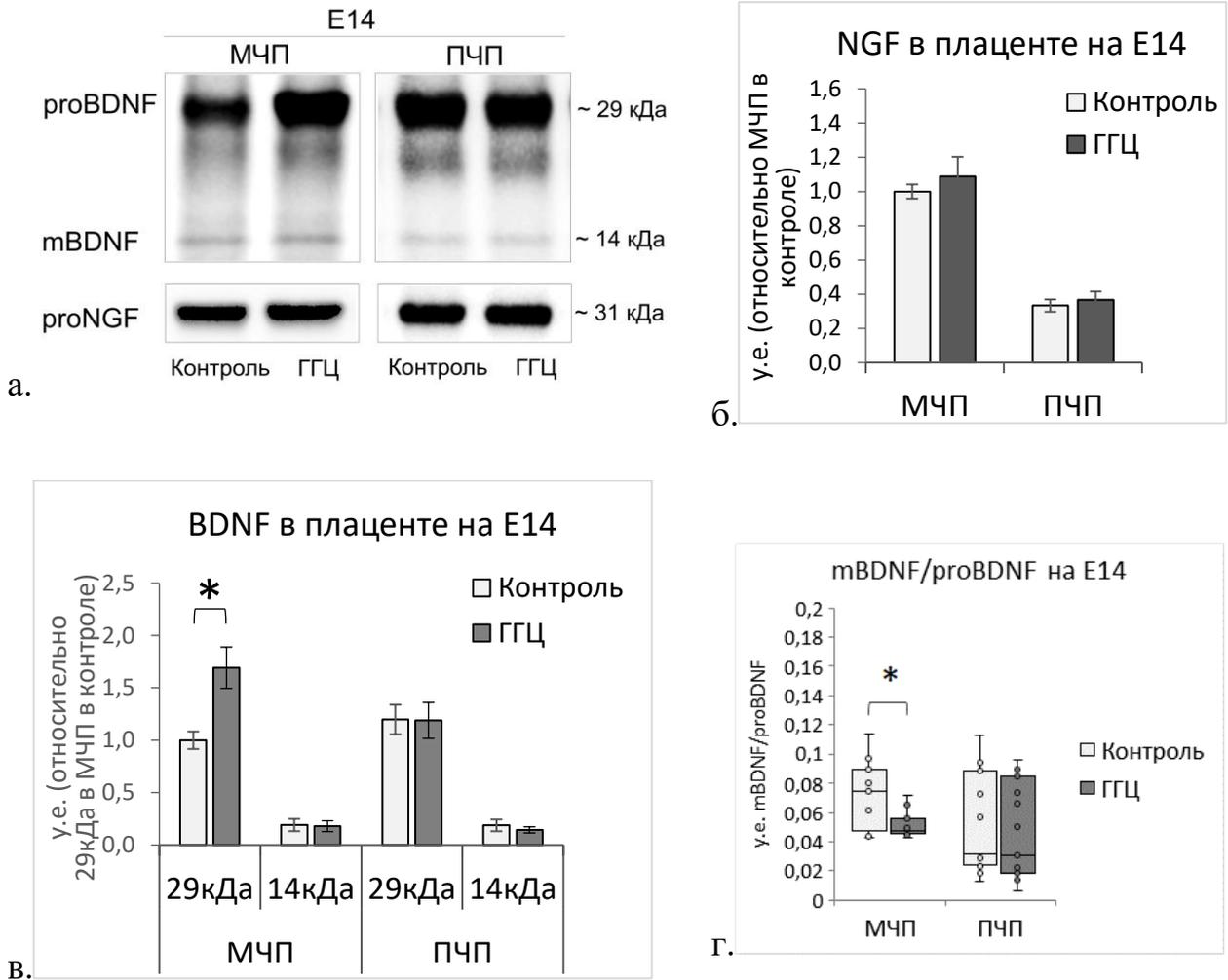


Рис. 25 Влияние гипергомоцистеинемии на содержание нейротрофинов в плаценте на 14-ый день беременности а – репрезентативный иммуноблот распределения NGF и изоформ BDNF в МЧП, и ПЧП, б – содержание NGF в материнской (МЧП) (n=15 в каждой группе) и плодной (ПЧП) (n=15 в каждой группе) крыс на 14-ый день беременности в контрольной группе и в группе животных с ГГЦ, в – содержание изоформ BDNF и NGF в материнской (МЧП) (n=15 в каждой группе) и плодной (ПЧП) (n=15 в каждой группе) частях плаценты крыс на 14-ый день беременности в контрольной группе и в группе животных с ГГЦ, Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга, за условную единицу (у.е.) принято содержание NGF (б) и BDNF 29 кДа (в) в МЧП в контроле на E14. Данные представлены как $M \pm se$ (б,в) и как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение (г); * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

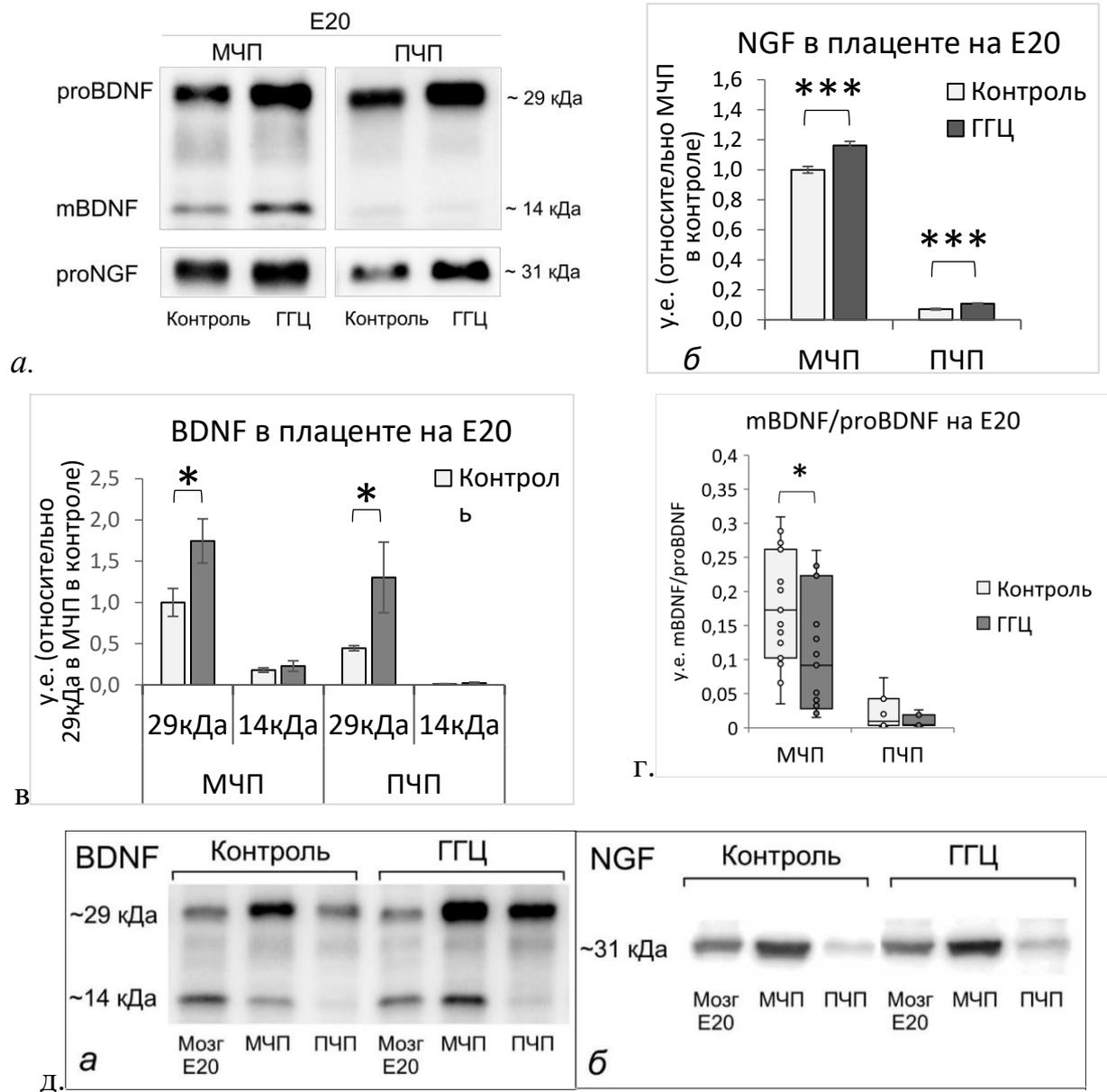


Рис. 26. Влияние ГГЦ на содержание нейротрофинов в плаценте на 20-ый день беременности. а – репрезентативный иммуноблот распределения NGF и изоформ BDNF в МЧП, и ПЧП, б – содержание NGF в МЧП (n=15 в каждой группе) и ПЧП (n=7 в каждой группе) крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе и в группе животных с ГГЦ, в – содержание изоформ BDNF в материнской (МЧП) (n=15) и плодной (ПЧП) (n=7) частях плаценты крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе и в группе с ГГЦ, д – репрезентативный иммуноблот относительного содержания нейротрофинов в обеих частях плаценты и сравнение с их содержанием в мозге плода на 20-ый день беременности. Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную

единицу (у.е.) принято содержание NGF и BDNF 29 кДа в МЧП в контроле на E20. Данные представлены как $M \pm se$ и как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$ – различия в группе самок с ГГЦ и группе контроля.

При этом, по сравнению с мозгом плода, в котором обе изоформы BDNF находятся в сопоставимом количестве, в обеих частях плаценты на 20-ый день беременности, на 20-ый день беременности, также, как и на 14-ый, преобладает изоформа 29 кДа (рис.26д). Показано, что отношение BDNF 14кДа к BDNF 29 кДа в МЧП в группе животных с ГГЦ значимо ниже, чем в группе контроля, что связано с повышенным содержанием про-формы. При этом, несмотря на преобладание BDNF 29 кДа в ПЧП опытной группы по сравнению с контролем, значимого снижения соотношения изоформ BDNF установлено не было, что возможно является следствием того, что изоформа BDNF 14 кДа представлена в большинстве исследованных образцов в следовом количестве (рис. 26а,г,д). Так в ПЧП в группе животных без ГГЦ соотношение BDNF 14кДа к BDNF 29 кДа по медиане в 10 раз меньше чем МЧП ($p < 0,05$). Отмечена также разница между содержанием NGF в МЧП и в ПЧП (рис. 26б,д), которая становится даже более выраженной по сравнению с 14-ым днем беременности. Изменения экспрессии генов *bdnf* и *ngf* и их рецепторов под влиянием ГГЦ в МЧП и ПЧП на 14-ый и 20-ый день беременности, за исключением экспрессии *ngf* и *trkB* в ПЧП на 20-ый день беременности, не обнаружено (Рис. 27).

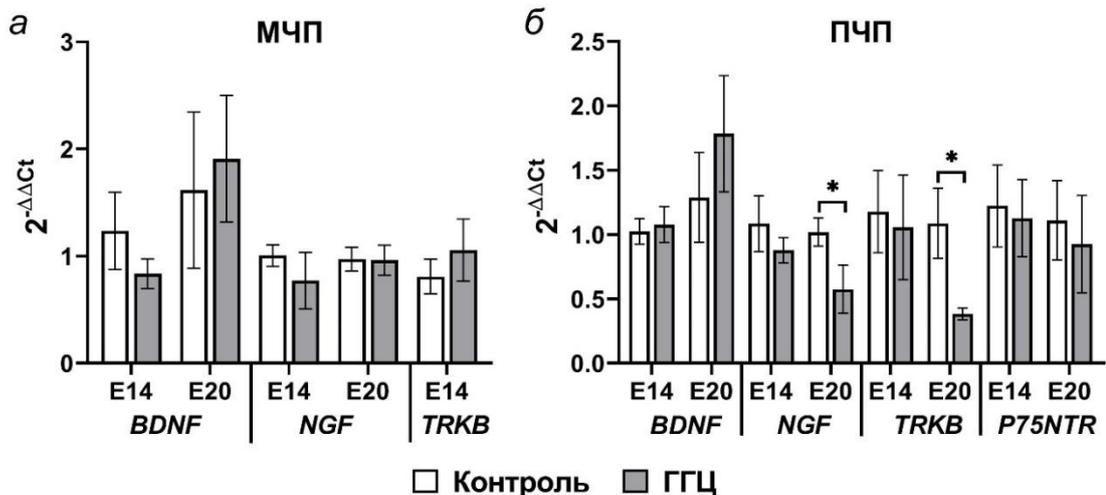


Рис. 27. Уровень экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов в плаценте

самок крыс на 14-ый и 20-ый день беременности в норме и при ГГЦ. а – уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецепторов *TRKB* в материнской (МЧП) части плаценты крыс на 14-ый и 20-й день беременности в контрольной группе (контроль) (n=4-6) и в группе животных, перенесших гипергомоцистеинемию (ГГЦ) (n=5-8); б – уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецепторов *TRKB* и *P75NTR* в плодной (ПЧП) части плаценты крыс на 14-ый и 20-й день беременности в контрольной группе (контроль) (n=4-6) и в группе животных, перенесших гипергомоцистеинемию (ГГЦ) (n=5-8); Данные представлены как $M \pm se$, * - $p < 0,05$ – достоверное отличие экспериментальных животных от контроля.

3.2.10. Активность матриксной металлопротеиназы-2 и содержание VEGFA в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии

Обнаружено, что на фоне ГГЦ у беременных крыс в ПЧП на 14-ый день беременности отмечено снижение содержания VEGFA ($p < 0,05$), при этом в МЧП значимого изменения его содержания обнаружено не было (Рис.28). Однако именно в МЧП, но не в ПЧП при ГГЦ на данном сроке беременности показано снижение активности MMP-2 ($p < 0,05$) (Рис.29).

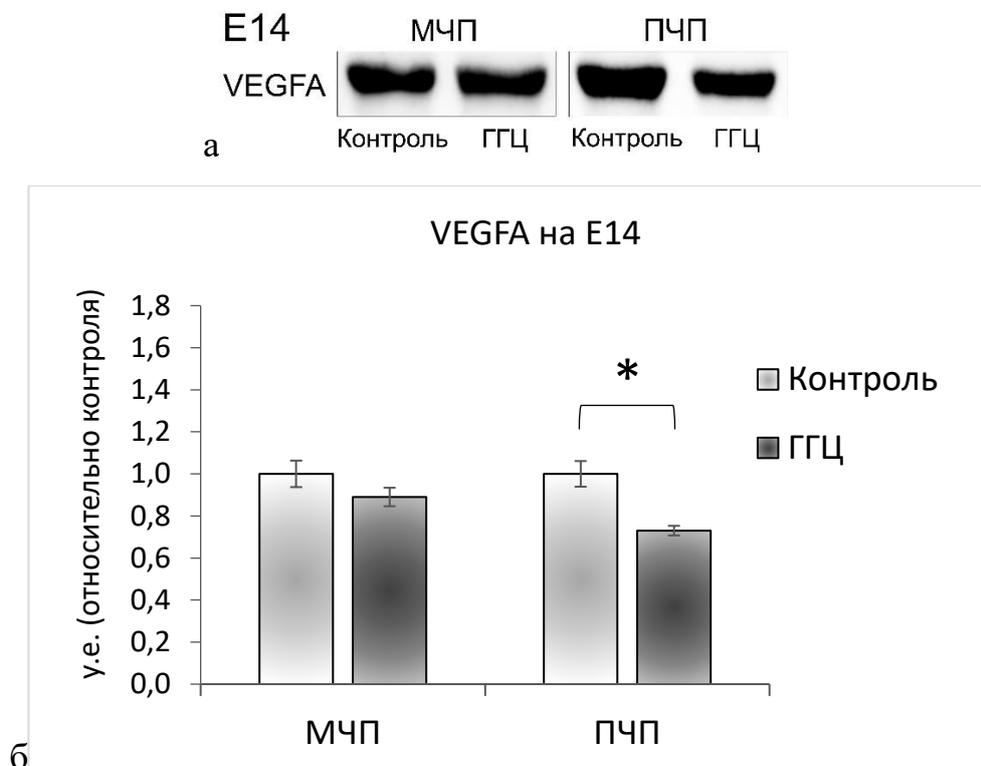


Рис.28 Влияние ГГЦ на содержание VEGF в различных частях плаценты самок крыс на 14-ый день беременности. а – репрезентативный иммуноблот содержания VEGFA

в материнской (МЧП, n=4 в каждой группе) и плодной (ПЧП, n=4 в каждой группе) частях плаценты. б – содержание VEGFA в МЧП и ПЧП крыс на 14-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. Значения показателя контрольных и экспериментальных беременных самок крыс нормализованы по его содержанию в группе контрольных животных с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

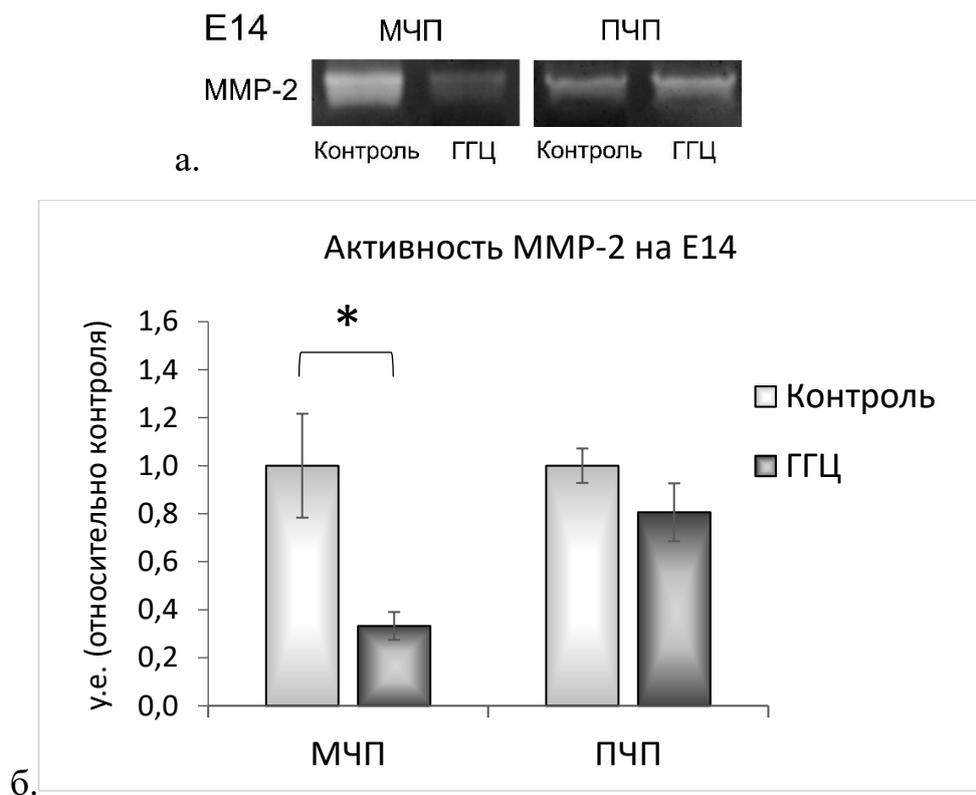


Рис.29 Влияние ГГЦ на активность MMP-2 в различных частях плаценты самок крыс на 14-ый день беременности. а – репрезентативная зимограмма активности MMP-2 в материнской (МЧП, n=7-8 в каждой группе) и плодной (ПЧП, n=7-8 в каждой группе) частях плаценты. б – результаты зимографического анализа активности MMP-2 в МЧП и ПЧП крыс на 14-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. Значения показателя контрольных и экспериментальных беременных самок крыс нормализованы по его содержанию в группе контрольных животных с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

В проведенном исследовании, отмечено, что на более позднем сроке беременности характер влияния ГГЦ на данные показатели меняется. Так, на 20-ый день беременности в группе с ГГЦ снижается содержание VEGFA в МЧП ($p < 0,05$), однако в ПЧП, напротив, отмечено его повышение ($p < 0,01$) (Рис.30). Активность MMP-2 на данном сроке беременности под действием ГГЦ снижается в обеих частях плаценты ($p < 0,05$) (Рис.31).

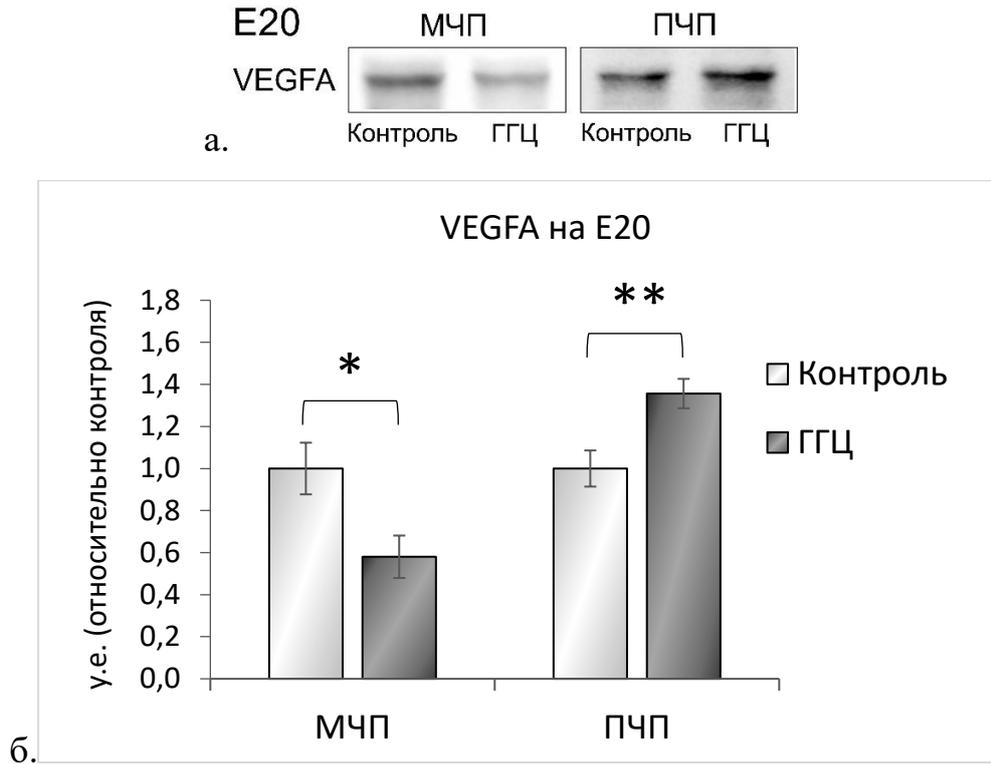


Рис.30 Влияние ГГЦ на содержание VEGF в различных частях плаценты самок крыс на 20-ый день беременности. а – репрезентативный иммуноблот содержания VEGFA в материнской (МЧП, $n=9$ в каждой группе) и плодной (ПЧП, $n=9$ в каждой группе) частях плаценты. б – содержание VEGFA в МЧП и ПЧП крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. Значения показателя контрольных и экспериментальных беременных самок крыс нормализованы по его содержанию в группе контрольных животных с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

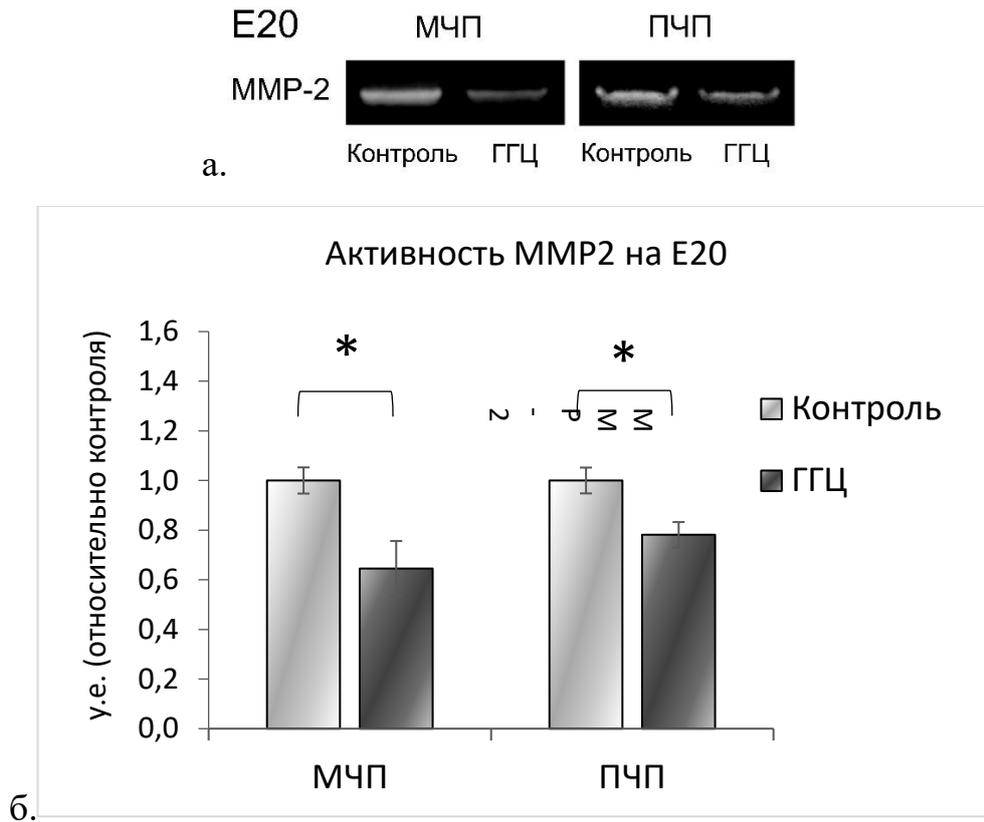


Рис.31 Влияние ГГЦ на активность MMP-2 в различных частях плаценты самок крыс на 20-ый день беременности. а – репрезентативная зимограмма активности MMP-2 в материнской (МЧП, n=7-8 в каждой группе) и плодной (ПЧП, n=7-8 в каждой группе) частях плаценты. б – результаты зимографического анализа активности MMP-2 в МЧП и ПЧП крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. Значения показателя контрольных и экспериментальных беременных самок крыс нормализованы по его содержанию в группе контрольных животных с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

Анализ экспрессии генов *vegfa*, *vegfb* и рецептора *KDR (VEGFR-2)* в плаценте на 14-ый и 20-ый день беременности показал, что значимых отличий между контрольными беременными самками и крысами, которые в период беременности находились на метиониновой нагрузке, в МЧП обнаружено не было (рис. 32а), наблюдается только тенденция к снижению экспрессии *vegfa* и *KDR (VEGFR-2)* на 14-ый день беременности и *vegfb* на 14-ый и 20-ый день беременности. При этом в

ПЧП, на фоне ГГЦ на 20-ый день беременности обнаружено снижение уровня экспрессии *KDR* (*VEGFR-2*) и *vegfb* ($p<0,05$) (рис. 32б).

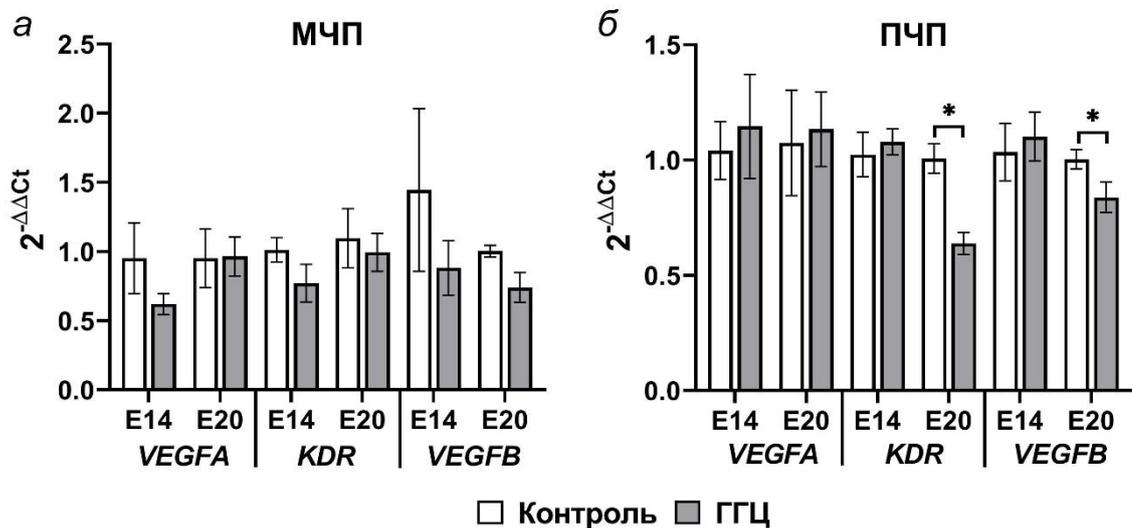


Рис.32 Уровень экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFB* и рецептора *KDR* в плаценте самок крыс на 14-ый и 20-ый день беременности в норме и при ГГЦ. а – уровень экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFB* и рецептора *KDR* в материнской (МЧП) части плаценты крыс на 14-ый и 20-й день беременности в контрольной группе (контроль) (n=5-6) и в группе животных, перенесших гипергомоцистеинемию (ГГЦ) (n=6-8); б – уровень экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFB* и рецептора *KDR* в плодной (ПЧП) части плаценты крыс на 14-ый и 20-й день беременности в контрольной группе (контроль) (n=5-6) и в группе животных, перенесших гипергомоцистеинемию (ГГЦ) (n=6-8); Данные представлены как $M \pm se$, * - $p<0,05$ – достоверное отличие экспериментальных животных от контроля.

3.2.11. Содержание NRG1 в материнской и плодной частях плаценты при гипергомоцистеинемии

Установлено, что NRG1, обнаруживаемый в плаценте, как в МЧП, так и в ПЧП на 20-ый день беременности, снижается при ГГЦ по сравнению с контролем, при этом, если в ПЧП отмечена лишь тенденция, то в МЧП содержание NRG1 на фоне ГГЦ значимо ниже по сравнению с нормально протекающей беременностью ($p<0,05$) (рис.33). При этом, аналогично NTs, как уже было показано, уровень NRG1 в МЧП выше его уровня в ПЧП.

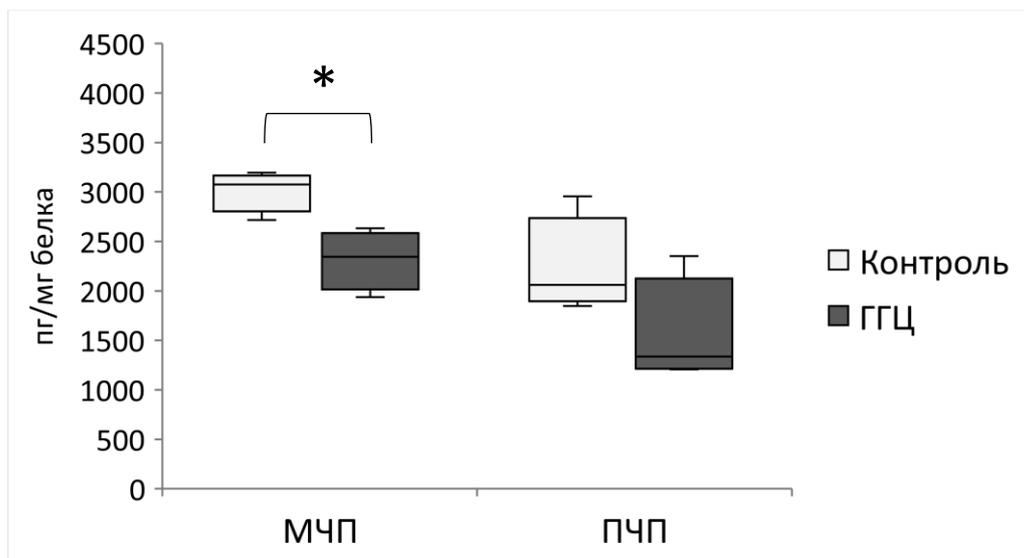


Рис 33 Содержание NRG1 в различных частях плаценты самок крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. МЧП – материнская часть плаценты (n=5 в каждой группе), ПЧП – плодная часть плаценты (n=5 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

3.2.12. Активность моноаминоксидазы в плаценте на 20-й день беременности при гипергомоцистеинемии

В плаценте также была проанализирована активность моноаминоксидазы (MAO), показано, что на 20-ый день беременности ее активность в цельной плаценте снижена у самок крыс с ГГЦ по сравнению с контрольными животными при нормально протекающей беременности ($p < 0,05$) (рис.34).

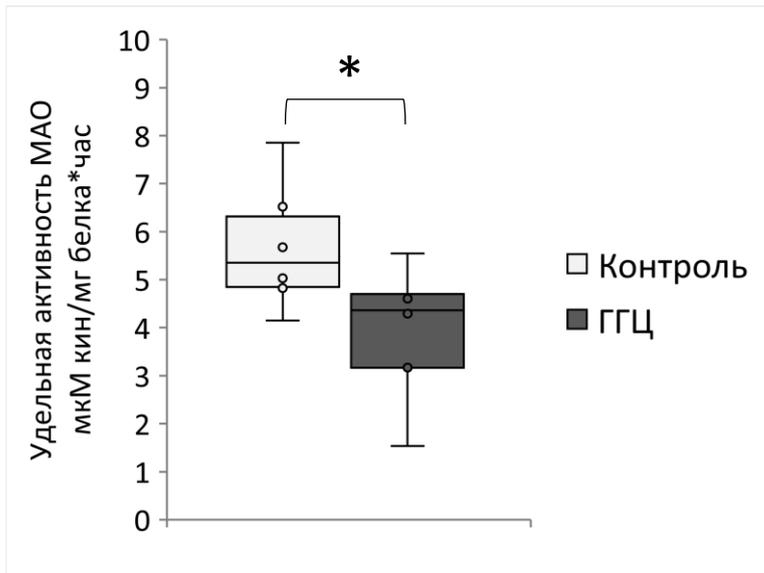


Рис 34 Активность моноаминоксидазы (MAO) в плаценте самок крыс на 20-ый день беременности в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ГГЦ. (n=7 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля

3.3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии во время беременности на развитие плода

3.3.1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови, ткани мозга и амниотической жидкости плода при гипергомоцистеинемии матери

При хронической метиониновой нагрузке беременных самок крыс в модели ежедневного перорального введения метионина (1 раз/сут) с 4 по 20-ый день беременности наблюдается повышение уровня ГЦ в сыворотке, мозге плодов и их амниотической жидкости. Так показано, что на 20-ый день беременности ГЦ быстро повышается в сыворотке и мозге плодов уже через час после введения метионина беременным самкам крыс. повышение Уровень ГЦ в сыворотке крови у плодов, матери которых получили метионин уже через 1 час по медиане в 25 раз выше чем у плодов, беременные самки которых получили воду ($p < 0,01$) (рис.35а). Повешенный уровень наблюдается у них и через 6 часов ($p < 0,05$). После этого происходит медленное снижение, однако он остается повешенным по сравнению с контрольными животными и через 18 часов после введения матерям метионина

($p < 0,05$). При этом ни у одного исследованного плода уровень ГЦ через 18 часов не вернулся к значениям, наблюдаемым у контрольных плодов в это время. Снижение содержания ГЦ в сыворотке крови опытных плодов до уровня, наблюдаемого у плодов крыс, получавших воду, происходит только через 24 часа после материнской метиониновой нагрузки. Таким образом, при введении метионина беременным самкам крыс каждые 24 часа, плоды находятся в состоянии ГГЦ не менее 75% времени и можно заключить, что плоды в период внутриутробного развития находятся в состоянии пренатальной ГГЦ (ПГГЦ). Повышенный уровень ГЦ в мозге плода, при этом наблюдается через 1 час и через 6 часов после введения метионина беременным самкам крыс ($p < 0,05$) (рис.35б), и содержание ГЦ по медиане в 3 раза выше чем в контроле. Через 18 часов его уровень в мозге плода уже не отличается от контрольных значений.

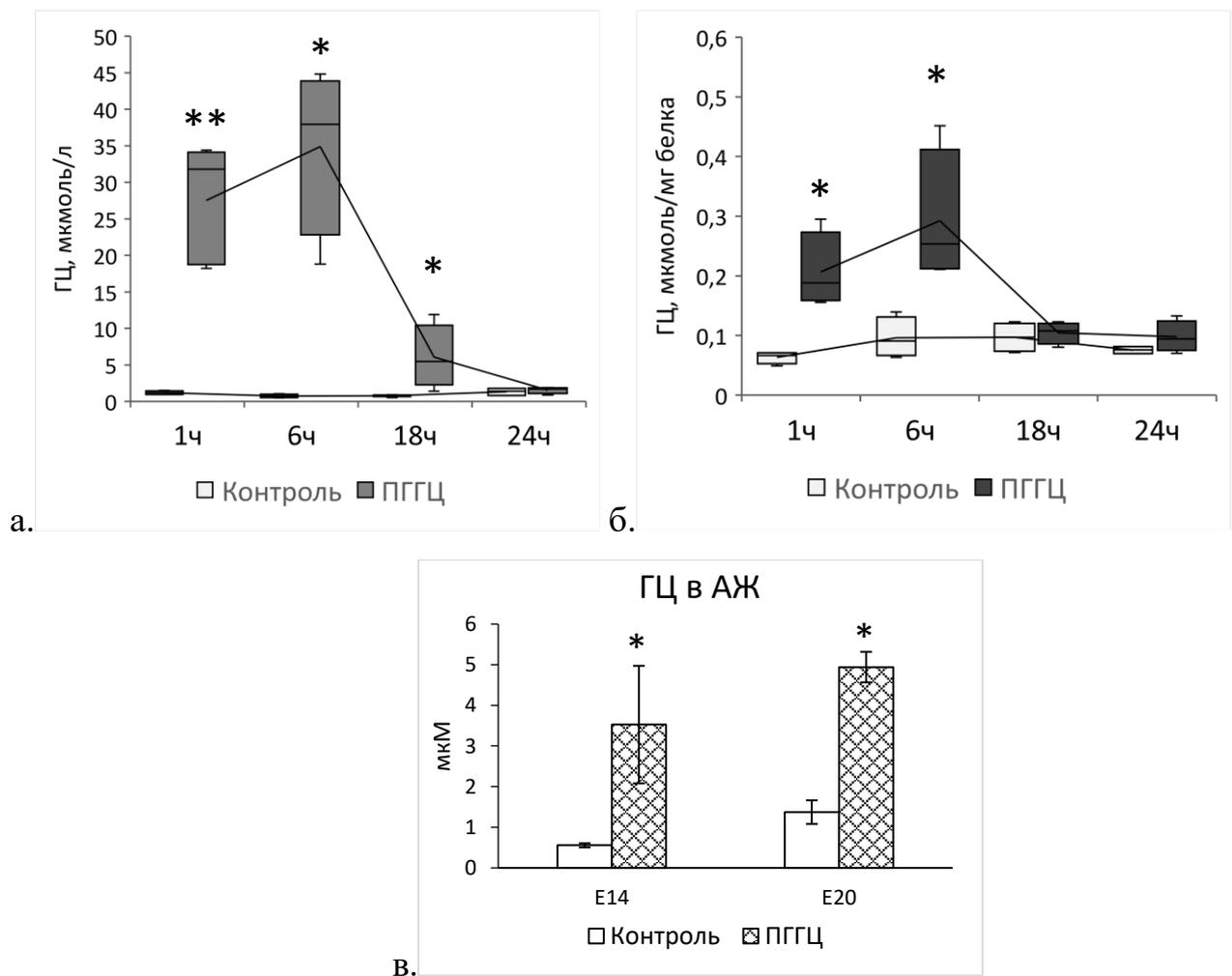


Рис. 35. Изменение уровня гомоцистеина в сыворотке крови, мозге плода и амниотической жидкости при хронической метиониновой нагрузке беременных

самок крыс. а – суточная динамика содержания ГЦ в сыворотке плодов через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина (ПГГЦ) или воды (контроль) беременным самкам крыс на E20 (n = 4-6 в каждой группе и каждой временной точке), б - суточная динамика содержания ГЦ в головном мозге плодов через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина (ПГГЦ) или воды (контроль) беременным самкам крыс на E20 (n = 4-6 в каждой группе и каждой временной точке), в – содержание ГЦ в амниотической жидкости (АЖ) на E14 и E20 у контрольных плодов и плодов, матерям которые во время беременности находились на метиониновой нагрузке (n=5 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение (а,б) и как $M \pm se$ (в); * - $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – достоверные различия значения показателя в группе плодов с ПГГЦ и группе контроля.

Таким образом повышенный уровень ГЦ в мозге плода наблюдается минимум 25% времени. Также, анализ амниотической жидкости на 14-й и 20-й день беременности показал, что после хронической метиониновой нагрузки во время беременности, в ней повышен уровень ГЦ на обоих гестационных сроках (рис.35в).

3.3.2. Морфометрические данные плодов и плаценты на фоне пренатальной гипергомоцистеинемии

Помимо увеличения содержания ГЦ в крови, у животных с ПГГЦ наблюдались изменения морфометрических показателей. Так, у животных с ПГГЦ на E20 выявлено снижение массы плаценты и массы плода ($p < 0,001$). При этом на E14 значимых различий между опытной и контрольной группами обнаружено не было, отмечена лишь тенденция к снижению (рис.36).

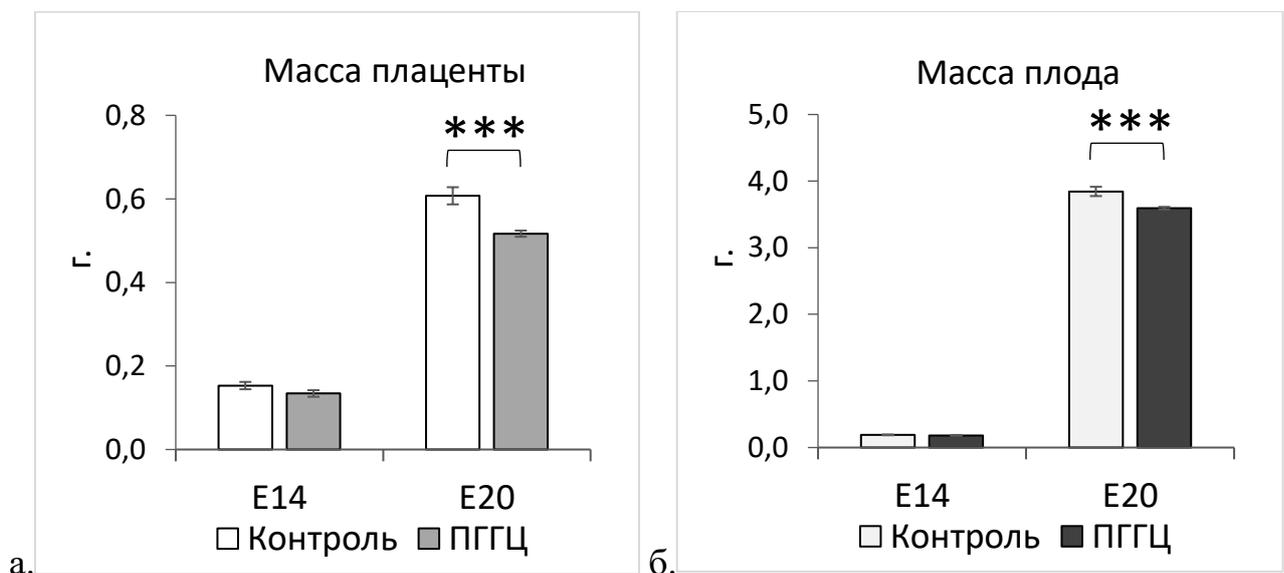


Рис. 36. Влияние ГГЦ на массу плаценты и плода на 14-ый и 20-ый день беременности. а – масса плаценты б – масса плода на E14 и E20 в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ПГГЦ (n=120 в контроле E14, n=120 в группе с ПГГЦ E14, n=100 в контроле E20, n=190 в группе с ПГГЦ E20); Данные представлены как $M \pm se$. *** - $p < 0,001$ достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.3.3. Содержание цитокинов в ткани мозга плодов при пренатальной гипергомоцистеинемии

При определении влияния ГГЦ во время беременности на содержание про- и противовоспалительных цитокинов было установлено повышение содержания IL-10 в мозге плодов на E20 ($p < 0,05$) (Рис.37). Его содержание в головном мозге подопытных животных по сравнению с контролем возрастало в 1,2 раза. При этом значимого изменения содержания исследованных провоспалительных цитокинов, в частности, TNF- α , IL-6 и IL-1 β в головном мозге плодов с ГГЦ на E20 обнаружено не было.

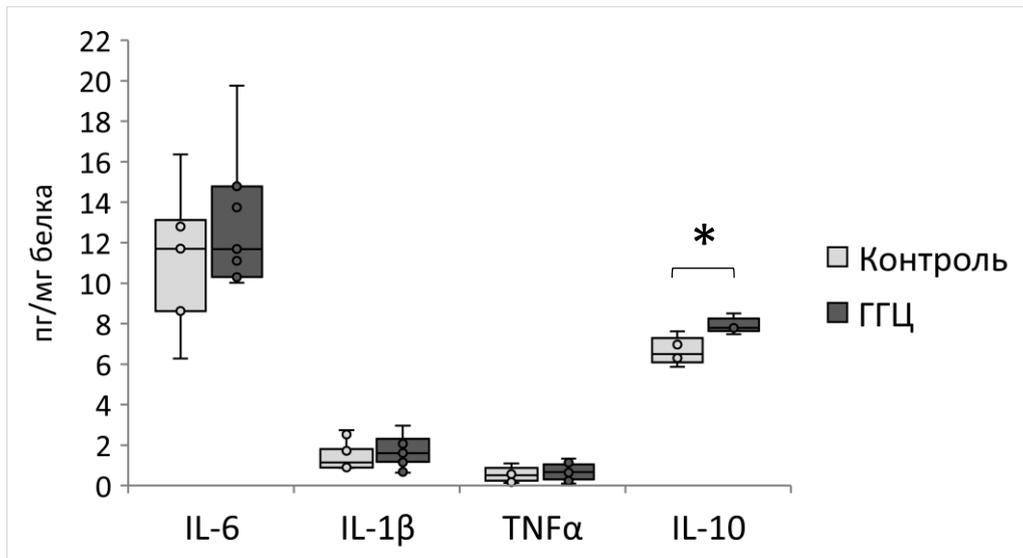


Рис. 37 Влияние ГГЦ на содержание цитокинов в мозге плодов на E20. (n=6-12 в каждой группе); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - $p < 0,05$ – достоверное отличие подопытной группы от контроля.

3.3.4. Изменение показателей окислительного стресса в сыворотке крови и ткани мозга плодов при пренатальной гипергомоцистеинемии

Развитие ОС является одним из основных механизмов нейротоксического воздействия ГЦ, поэтому мы проанализировали показатели ОС в мозге, а также в сыворотке плодов на E20 после хронической ПГГЦ. Показано, что активность СОД в сыворотке крови и мозге плодов перенесших ПГГЦ не отличалась от плодов контрольной группы, матери которых во время беременности не находились на метиониновой нагрузке (рис.38а,б). При этом, при исследовании продуктов окислительных модификаций липидов и белков было показано, что на фоне ПГГЦ в мозге плодов на E20 происходит увеличение количества МДА ($p < 0,05$) (рис.38в), тогда как не наблюдается значимого изменения уровня карбонильных производных белков (рис.38г,д).

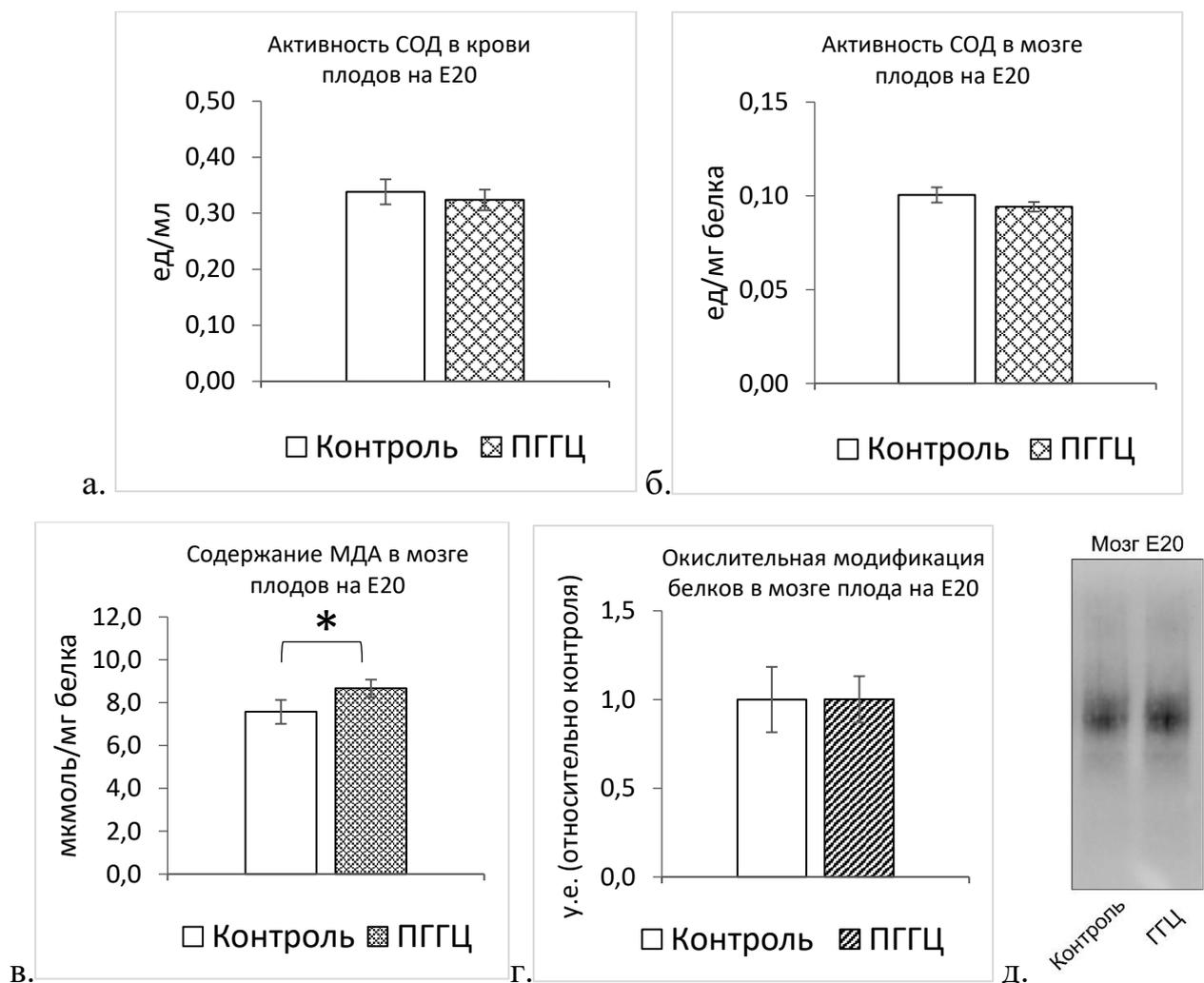


Рис. 38. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на изменение показателей окислительного стресса в сыворотке и мозге плодов на E20. а. – активность СОД в сыворотке крови плодов на E20 в контрольной группе и группе животных с

ПГГЦ (n=8 в каждой группе), б – активность СОД (n=8 в каждой группе), в – содержание малонового диальдегида (МДА) (n=18 в каждой группе); г – относительный уровень окислительной модификации белков в мозге плода на E20 в контрольной группе и в группе животных с ПГГЦ (n=10 в каждой группе); г. – репрезентативный Oxyblot содержания окисленных форм белков в мозге плода на E20. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе плодов с ПГГЦ и в группе контроля

В результате комплексного исследования содержания цитокинов, а также показателей, с помощью которых можно оценить развитие ОС под действием ГГЦ на уровне матери, плаценты и плода были установлены отдельные корреляционные связи между данными маркерами. В частности показано, что увеличение уровня ТБК-активных продуктов в сыворотке крови беременных самок крыс, которое наблюдается при ГГЦ в сыворотке крови беременных самок прямо коррелирует со степенью окислительной модификации белков как в МЧП, так и в меньшей степени с ПЧП (табл.7).

Таблица 7. Коэффициенты корреляции (rs) содержания показателей окислительного стресса и цитокинов в сыворотке, плаценте беременных самок, сыворотке и мозге плода на 20-ый день беременности

Показатели	IL-6,	IL-1 β ,	TNF,	ОМБ, у.е.	
	пг/мл	пг/мл	пг/мл	МЧП	ПЧП
	сыворотка беременных самок				
МДА сыворотка беременных самок, мкмоль/л	0,064	0,329	0,076	0,683**	0,468*
Активность СОД в сыворотке беременных самок Ед/мл	0,211	-0,709*	-0,451	-0,401	-0,408
Активность СОД в сыворотке плода Ед/мл	0,679*	0,273	0,673*	-0,014	0,224
Активность СОД в мозге плода Ед/мг белка	-0,306	-0,316	-0,638*	-0,111	0,152

Явных различий в уровне ОМБ в ПЧП контрольных и подопытных группах обнаружено не было. Несмотря на то, что значимой корреляции между уровнем МДА и IL-1 β в сыворотке крови беременных самок крыс установить не удалось, ранее мы уже показали обратную взаимосвязь между МДА и активностью СОД (рис.20), кроме того, обнаружена отрицательная корреляция между активностью СОД и уровнем IL-1 β в сыворотке беременных самок крыс (табл. 7). Активность СОД в сыворотке и мозге плода соответственно положительно и отрицательно коррелирует с уровнями TNF в сыворотке крови их матерей (табл. 6), при этом ни один из этих показателей не изменяется при воздействии ГГЦ.

3.3.5. Содержание маркеров апоптоза в ткани мозга плода при пренатальной гипергомоцистеинемии

Показано, что при ПГГЦ мозге плодов на E20 происходит снижение содержания инициаторной прокаспазы-8 по сравнению с контрольными плодами. При этом ПГГЦ не вызывала активацию каспазы-8 в мозге плода, так показано, что, относительно контрольных животных, отсутствует усиление ее расщепления с образованием промежуточного фрагмента p41/p43 и конечного расщепления до активной каспазы-8 (p18) (Рис. 39а). Содержание эффекторной прокаспазы-3 и формы активной каспазы-3 (p17-фрагмент) в мозге контрольных и подопытных и контрольных плодов на E20 не отличалось. При этом в обеих группах уровень прокаспазы-3 значительно превосходил уровень активной каспазы-3, обнаруживаемой методом иммуноблотинга (рис. 39в), что указывает на слабую активацию данной каспазы в мозге плодов на E20. При этом на E14 в мозге плодов методом иммуноблотинга обнаруживается только прокаспаза-3 (данные не представлены). Используя метода анализа активности фермента с использованием специфического субстрата, было показано, что на E20 в мозге плодов с ПГГЦ по сравнению с контролем ферментативная активность каспазы-3, оцениваемая как увеличение скорости накопления продуктов реакции, повышена ($p < 0,05$) (рис.39г).

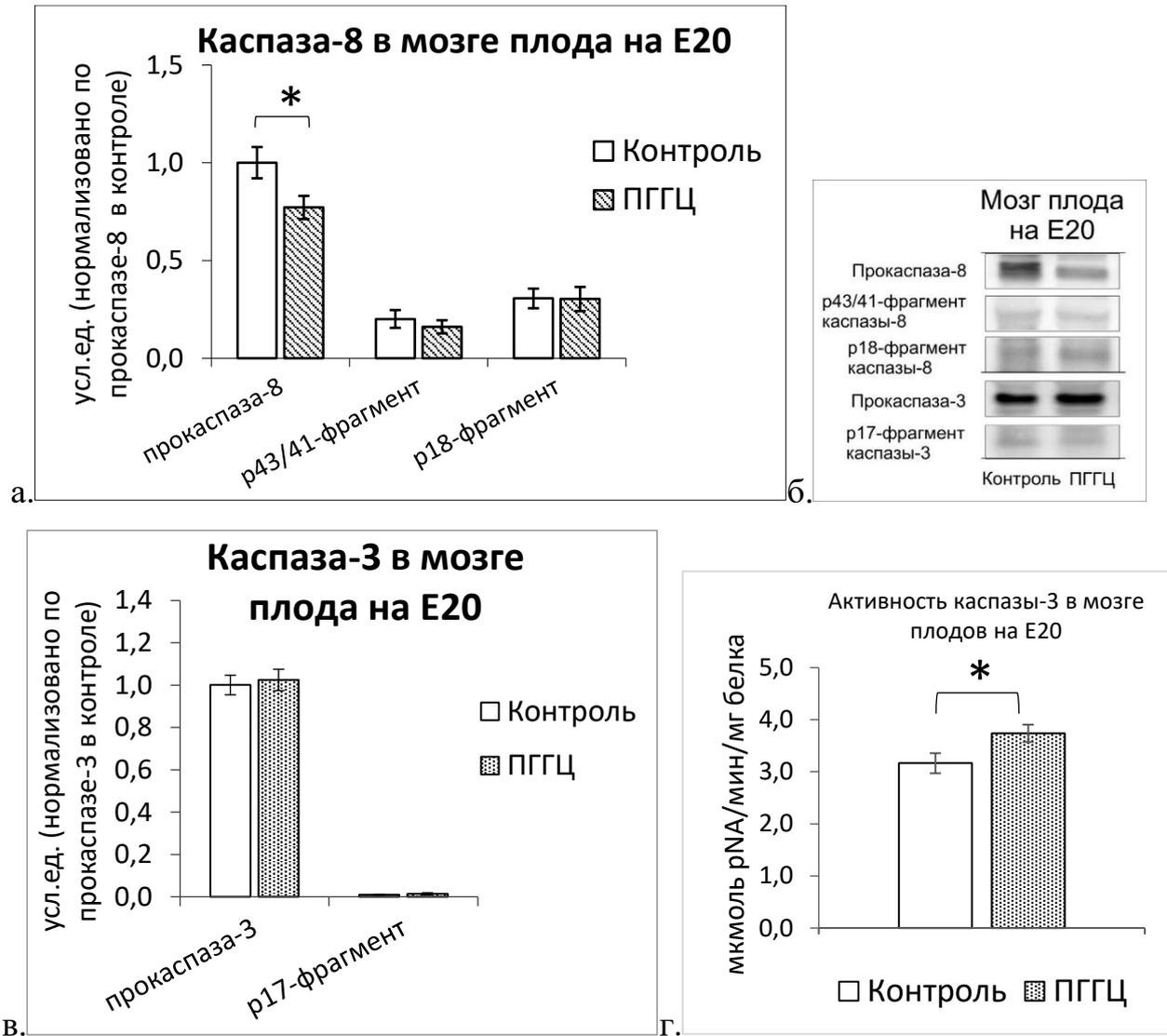
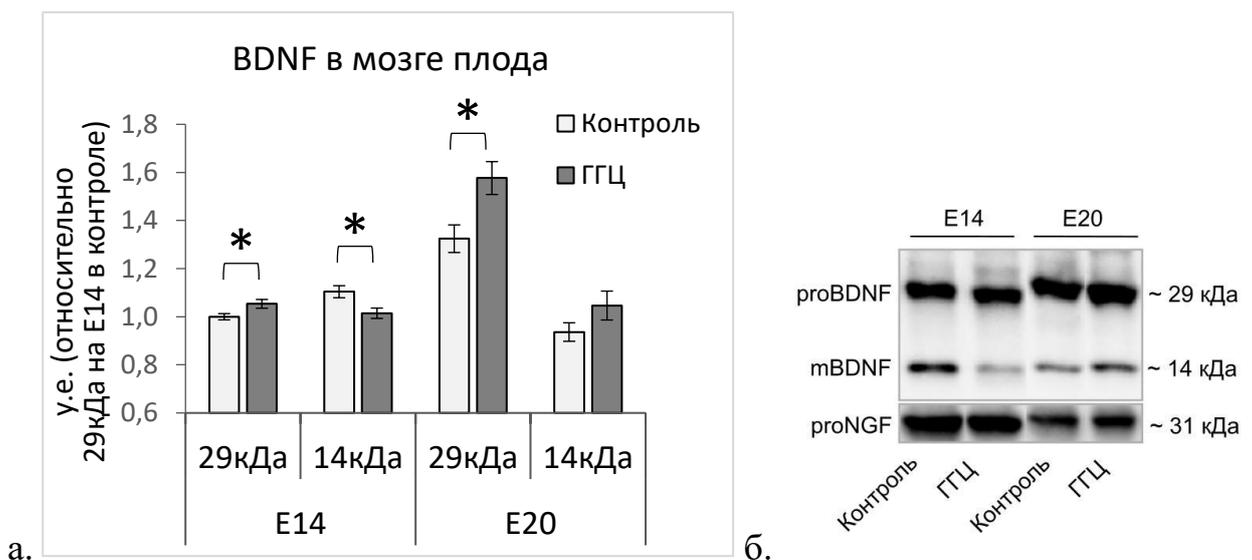


Рис. 39 Влияние ПГГЦ на содержание прокаспаз и их расщепленных фрагментов в мозге плода на E20. а – содержание прокаспазы-8, ее промежуточного фрагмента расщепления (p43/p41- фрагмент) и активной формы (p18-фрагмент) каспазы-8 в мозге плодов без ПГГЦ (контроль) и с ПГГЦ (n=10 в каждой группе) б – репрезентативный вестерн-блот изоформ исследованных каспаз. Изоформы каспазы-3: прокаспаза-3 – 35 кДа, p17-фрагмент – 17 кДа. Изоформы каспазы-8: прокаспаза-8 – 57 кДа, промежуточный фрагмент расщепления p43/p41 – 40-45 кДа, p18-фрагмент – 18 кДа; в – содержание прокаспазы-3 и ее активной формы (p17-фрагмент) в мозге плодов без ПГГЦ (контроль) и с ПГГЦ (n=10 в каждой группе); г – активность каспазы-3 в гомогенате головного мозга плода на E20 у крыс контрольной (n = 16) группы и с ПГГЦ (n = 21). Значения изоформ нерасщепленных прокаспаз и их расщепленных фрагментов контрольных и подопытных плодов нормализованы по содержанию соответствующих прокаспаз в группе контрольных животных с нормальным внутриутробным развитием без ПГГЦ (а,в). Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе плодов на E20 с ПГГЦ и группе контроля

3.3.6. Содержание и экспрессия нейротрофинов в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии

Анализ содержания NTs в мозге плода на E14 и E20 показал, что при воздействии ПГГЦ в мозге плодов изменяется уровень отдельных изоформ BDNF. Так установлено, что у плодов с ПГГЦ на E14 в мозге происходит повышение BDNF 29кДа и снижение BDNF 14кДа по сравнению с контролем (рис. 40а). Соотношение данных форм в мозге на E14 у подопытных животных также снижено по сравнению с плодами, матери которых не потребляли метионин (рис.40в), кроме того, как при ПГГЦ, так и при ее отсутствии в мозге плодов количество каждой из определяемых изоформ сопоставимо, и соотношение близко к единице (рис.40а,в). На E20 в мозге плодов на фоне ПГГЦ уровень BDNF 29кДа также значительно выше, по сравнению с контролем (рис.40а), кроме того, отмечена тенденция к повышению и BDNF 14кДа. Также, к данному сроку в мозге происходит снижение соотношения данных изоформ, при этом BDNF 29кДа в 1,5 раза преобладает над BDNF 14кДа (рис. 40в). На E20 в мозге плодов с ПГГЦ по сравнению с контролем повышена экспрессия гена *BDNF* (рис.41а) Уровень NGF 31 кДа в мозге плодов при ПГГЦ, как на E14, так и на E20, не отличается от его содержания в мозге плодов без воздействия ПГГЦ (рис.41г). Изменения экспрессии гена *NGF*, также как и гена *VEGFB* при ПГГЦ обнаружено не было (рис. 41б).



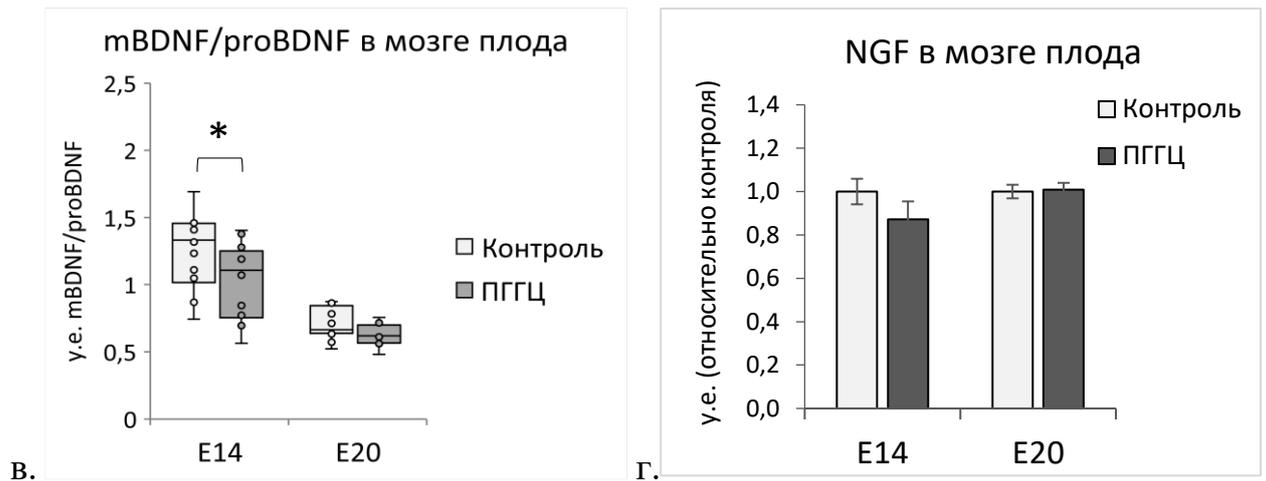


Рис. 40. Влияние ГГЦ на содержание нейротрофинов в мозге плода на E14 и E20. а – содержание изоформ BDNF в мозге плода на E14 (n=15 в каждой группе) и E20 (n=12 в каждой группе) в контрольной группе и в группе с ПГГЦ, б – репрезентативный иммуноблот распределения NGF и изоформ BDNF в мозге плода на E14 и E20, в – соотношение изоформ BDNF 14кДа и BDNF 29кДа в мозге плодов на E14 и E20 в группе с ПГГЦ и в контроле; г – содержание NGF в мозге плода на E14 (n=15 в каждой группе) и E20 (n=8 в каждой группе) в контрольной группе и в группе с ПГГЦ, Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную единицу (у.е.) принято содержание NGF (г) и BDNF 29 кДа (а) в контроле на E14. Данные представлены как $M \pm se$ (б,в) и как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение (г); * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

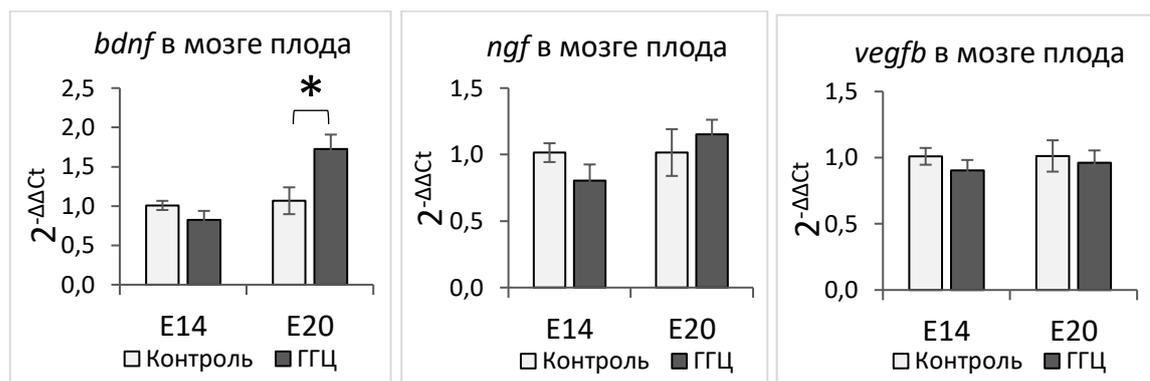


Рис. 41. Уровень экспрессии генов факторов роста в мозге плодов на e14 и E20 в норме и при ПГГЦ. а – уровень экспрессии генов *BDNF*, б – уровень экспрессии *NGF* в мозге плодов на E14 (n=4-6 в каждой группе) и на E20 (n=4-6 в каждой группе); в – уровень экспрессии *VEGFB* в мозге плодов на E14 (n=4-6 в каждой группе) и на E20 (n=5-8 в каждой группе); Данные представлены как $M \pm se$, * - $p < 0,05$ – достоверное отличие экспериментальных животных от контроля.

3.3.7. Активность матриксной металлопротеиназы-2 в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии

В мозге плодов на E14 при ПГГЦ снижена активность ММР-2 по сравнению с контролем ($p < 0,05$), на E20 активность ММР-2 снижается, при этом значимых различий между контрольной и подопытной группами обнаружено не было (рис.42).

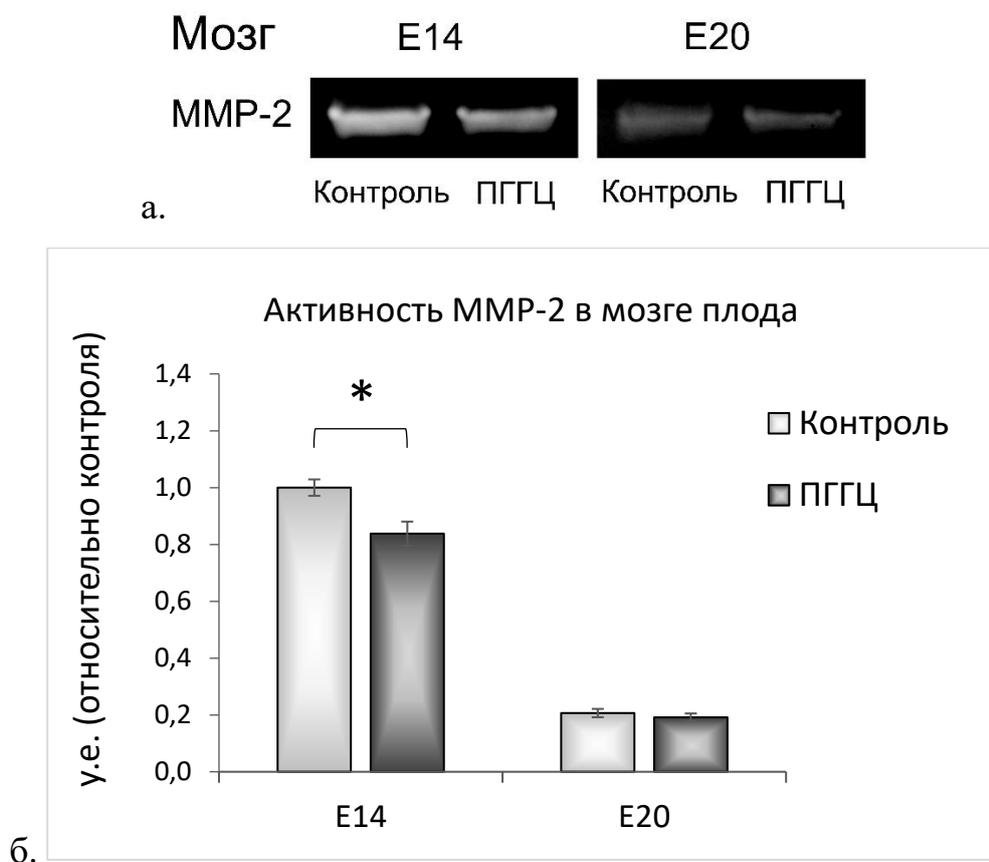


Рис.42 Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на активность ММР-2 в мозге плода на E14 и E20. а – репрезентативная зимограмма активности ММР-2 в мозге плода на E14 и E20. б – результаты зимографического анализа активности ММР-2 в мозге плодов на E14 ($n=8-9$ в каждой группе) и E20 ($n=7-8$ в каждой группе) в контрольной группе (Контроль) и в группе с ПГГЦ. Значения показателя контрольной и экспериментальной группы нормализованы по его содержанию в группе контрольных животных без ПГГЦ на E14. Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.3.8. Содержание NRG1 в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии

Установлено, что NRG1, определяемый в мозге плода на E20, повышается при ПГГЦ по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис.43).

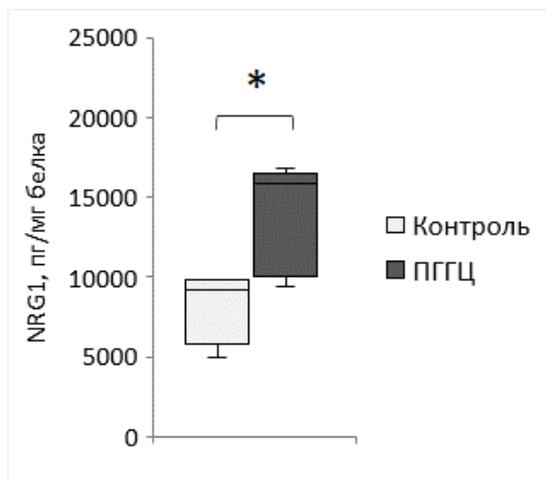


Рис 43. Содержание NRG1 в мозге плода на E20 в контрольной группе (Контроль) и в группе животных с ПГГЦ (n=5 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.3.9. Содержание биогенных аминов и их внутривезикулярных транспортеров в мозге плода при пренатальной гипергомоцистеинемии

Показано, что при ПГГЦ в мозге плодов на E20 отмечено повышение количества внутривезикулярных транспортеров моноаминов VMAT2 (рис. 44а,б). Значимого изменения количества VMAT1 при ПГГЦ в мозге плода на E20 по сравнению с контролем обнаружено не было. Содержание НА в цельном мозге плодов подопытной группы сопоставим с его уровнем в мозге плодов контрольной группы, без ПГГЦ (рис. 44в).

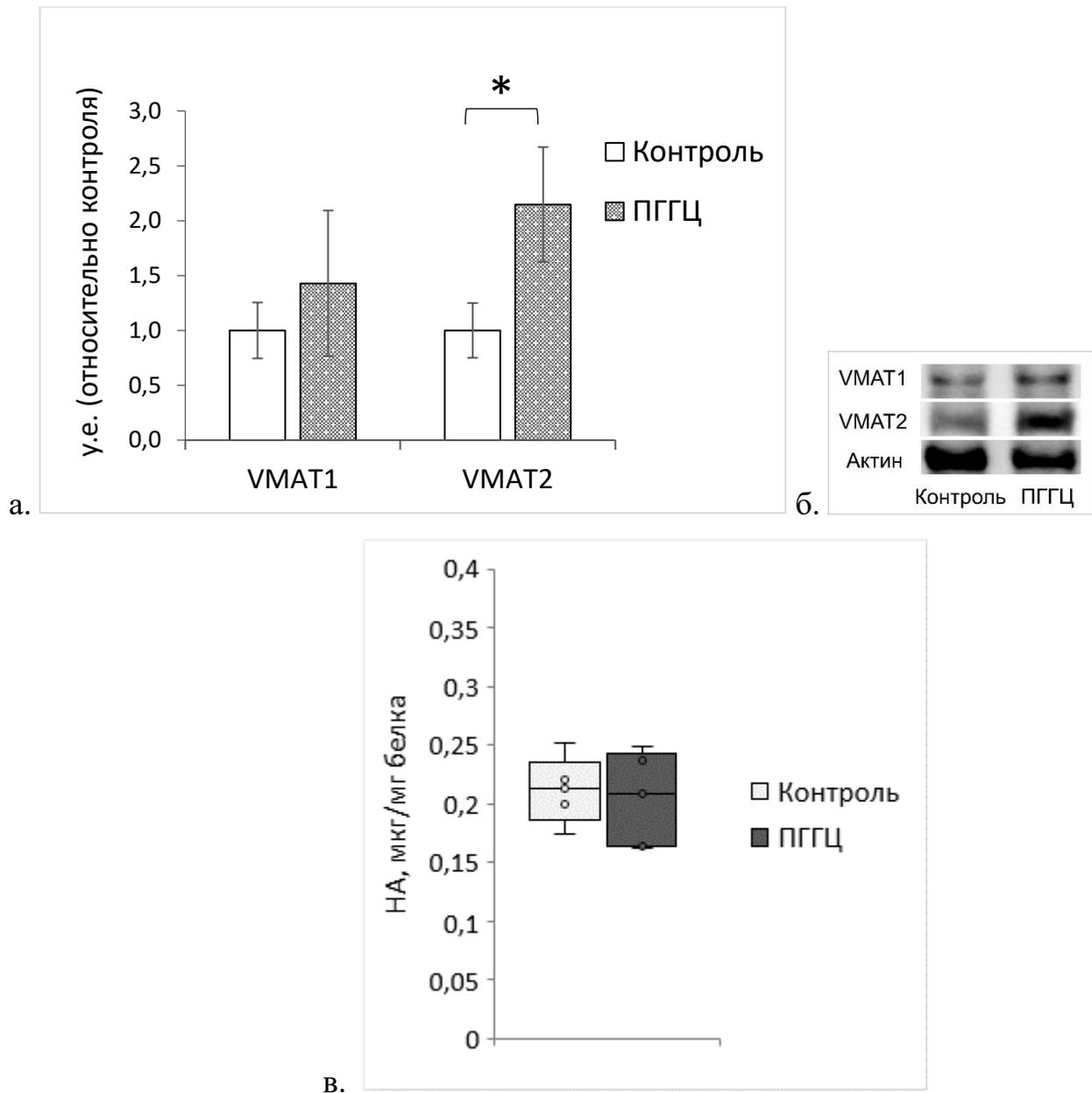
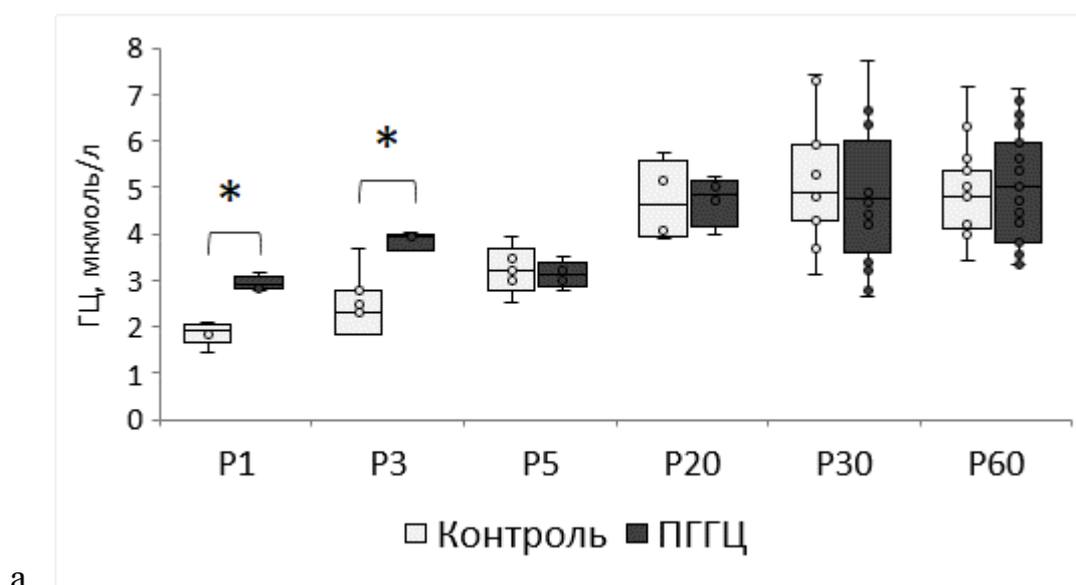


Рис. 44. Влияние ПГГЦ на содержание внутривезикулярных транспортеров и норадреналина в мозге плода на E20. а – содержание внутривезикулярных транспортеров VMAT1 и VMAT2 в мозге плода на E20 (n=5 в каждой группе) в контрольной группе и в группе с ПГГЦ, б – репрезентативный иммуноблот распределения VMAT1 и VMAT2 в мозге плода на E20, нормализованные по актину, в – содержание НА в мозге плодов на E20 в группе с ПГГЦ и в контроле (n=5 в каждой группе); Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную единицу (y.e.) принято содержание VMAT1 и VMAT2 в контроле соответственно. Данные представлены как $M \pm se$ (а) и как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение (в); * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.4. Влияние перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии на нервную систему потомства в раннем и позднем постнатальном периоде развития

3.4.1. Содержание гомоцистеина в сыворотке крови и мозге крыс разного возраста после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

Анализ уровня ГЦ в сыворотке крови крысят, перенесших ПГГЦ, матери которых в период беременности находились на хроническом пероральном потреблении метионина, в постнатальном периоде показал, что повышенный уровень ГЦ у них по сравнению с контролем сохраняется на P1 и P3. Уже с P5 и на более поздних этапах постнатального развития уровень ГЦ в сыворотке крови значимо не отличался от контрольных крысят (рис.45а). У контрольных животных отмечается постепенное увеличение уровня ГЦ от P1 к P20. В цельном мозге крысят повышенный уровень ГЦ в группе животных, перенесших с ПГГЦ, установлено только на P1, уже к P3 его содержание резко снижается до уровня характерного для контрольных животных (рис.45б).



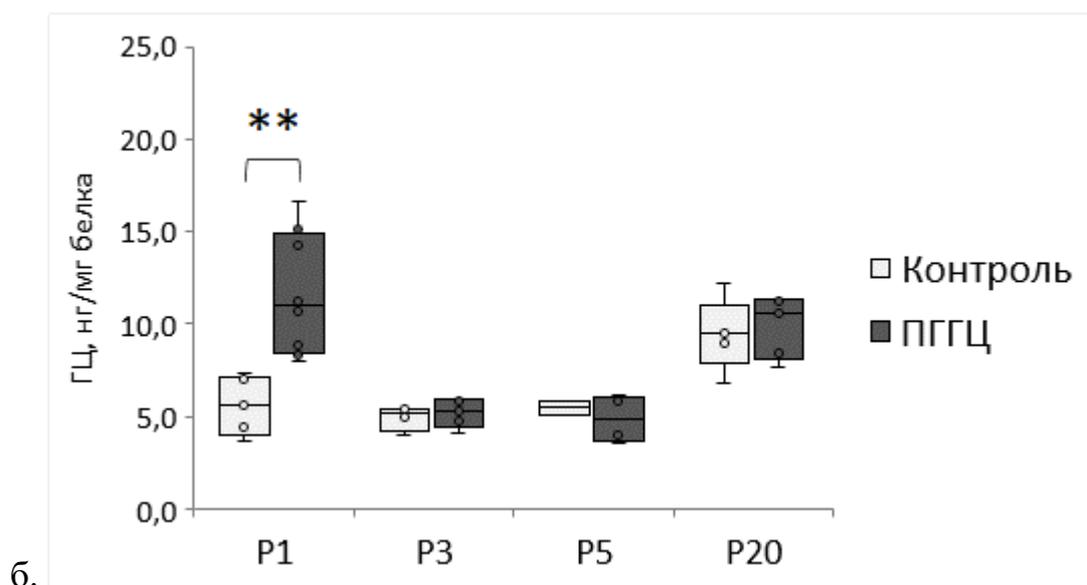


Рис. 45. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на общую концентрацию гомоцистеина в сыворотке и мозге крысят в постнатальном периоде а – содержание ГЦ в сыворотке крови (n=6-15 в каждой группе), б – содержание ГЦ в мозге в контрольной группе (Контроль) и в группе животных после ПГГЦ на различные сроки постнатального развития (n=3-12 в каждой группе). ПГГЦ, пренатальная гипергомоцистеинемия. Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля.

Уже в пренатальном периоде, на E20 у плодов с ПГГЦ отмечено снижение массы головного мозга (рис. 46). Сниженная масса мозга у подопытных крысят сохраняется и после рождения, на P1, P5 (рис. 46). В целом, как уже отмечалось у плодов на E20 снижена масса тела, несмотря на то что за последние сутки внутриутробного развития плоды значительно прибавляют в весе, на P1 также сохраняется значимое отличие массы тела крысят, перенесших ПГГЦ от контрольных крысят (рис.47).

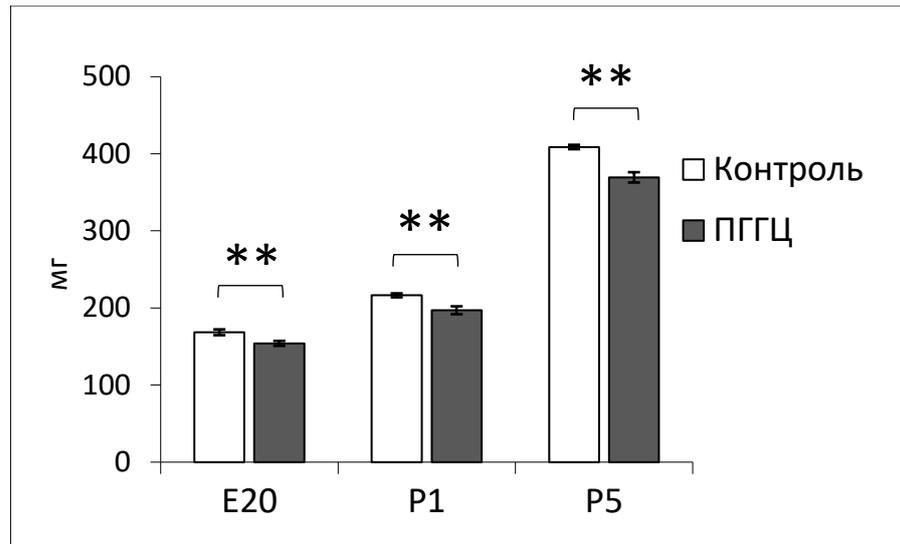


Рис. 46. Влияния перенесенной пренатальной ГГЦ на массу мозга плода в поздний пренатальный период и потомства в ранний постнатальный период (n=19-22 в каждой группе на E20, n=8-9 в каждой группе на P1, n=7-8 в каждой группе на P5). Данные представлены как $M \pm se$. ** - $p < 0,01$ – достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

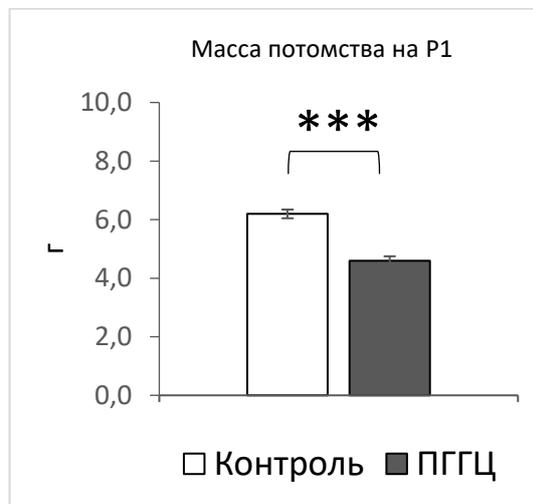


Рис. 47. Влияния перенесенной пренатальной ГГЦ на массу потомства в первый день постнатального развития (n=13 – в группу контроля, n=17 – в группе, перенесших ПГГЦ). Данные представлены как $M \pm se$. *** - $p < 0,001$ – достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.4.2. Изменений показателей окислительного стресса в сыворотке крови и мозге потомства в постнатальном периоде после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

После перенесенной ПГГЦ у крысят на P1 обнаружено изменение показателей, что указывает на развитие в мозге новорожденных крысят ОС (табл.8). Так показано снижение общей антиокислительной активности (ОАА) и показателя, характеризующего комплекс окислительной модификации белков (АОРР). Анализ показателей ферментативного и неферментативного звеньев ОАА показал снижение активности СОД в мозге крысят после ПГГЦ по сравнению с контрольными животными, тогда как изменения уровня аскорбиновой кислоты у них обнаружено не было. При этом ранее, значимых отличий в активности СОД на E20 в мозге контрольных и подопытных плодов обнаружить не удалось (рис 38б). Однако, значения, полученные у них, сопоставимы с данными, полученными на P1 в группе ПГГЦ. Что указывает на то, что после рождения в мозге крысят в норме, у контрольных животных, значимо повышается активность СОД, тогда как у подопытных животных данного изменения не происходит и активность сохраняется низкой. В мозге новорожденных крысят после ПГГЦ также показано повышенное содержание маркера окислительной модификации нуклеиновых кислот (8ОНdG) ($p < 0,01$), при этом изменений уровня нитритрозина, показателя окислительного повреждения белков, обнаружено не было (табл. 8). Проанализировав продукты окислительной модификации липидов и белков на P5 и P20 в гиппокампе, было установлено, что уровни МДА и карбонилированных белков в группе крысят перенесших ПГГЦ к этому возрасту не отличаются от их содержания в гиппокампах контрольных крысят, внутриутробное развитие которых проходило без ПГГЦ (рис. 49). В сыворотке крови у новорожденных крысят после ПГГЦ также снижена активность СОД по сравнению с крысятами без ПГГЦ (рис. 48б), и данное снижение у них наблюдается именно после рождения, так как на E20 ранее различия между контрольными и подопытными плодами показано не было. Несмотря на различия в активности СОД между потомством,

перенесшим ПГГЦ и без нее, уровень ОАА в сыворотке крови крысят обеих групп был сопоставим (рис. 48а).

Таблица 8. Показатели окислительного стресса в гомогенатах головного мозга крысят 1 дня жизни после перенесенной пренатальной ГГЦ. Данные представлены как Медиана [25 перцентиль–75 перцентиль].

Показатели	Контроль	ПГГЦ
Нитротирозин, нМ/мг белка	1,46 [1,08–1,76]	1,49 [1,16–1,79]
8-ОНdG, нг/мг белка	15,2 [13,6–16,0]	18,5 [16,5–20,4]**
АОРР, мкМ/мг белка	31,9 [30,1–32,9]	41,0 [37,1–41,4]**
СОД, Ед/мг белка	0,163 [0,151–0,193]	0,089 [0,086–0,136]*
Аскорбиновая кислота, нг/мг белка	39,2 [31,3–45,3]	37,3 [32,3–41,7]
ОАА, нМ/мг белка	0,845 [0,656–0,920]	0,635 [0,544–0,688]*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – отличия группы с метиониновой нагрузкой от контрольной группы

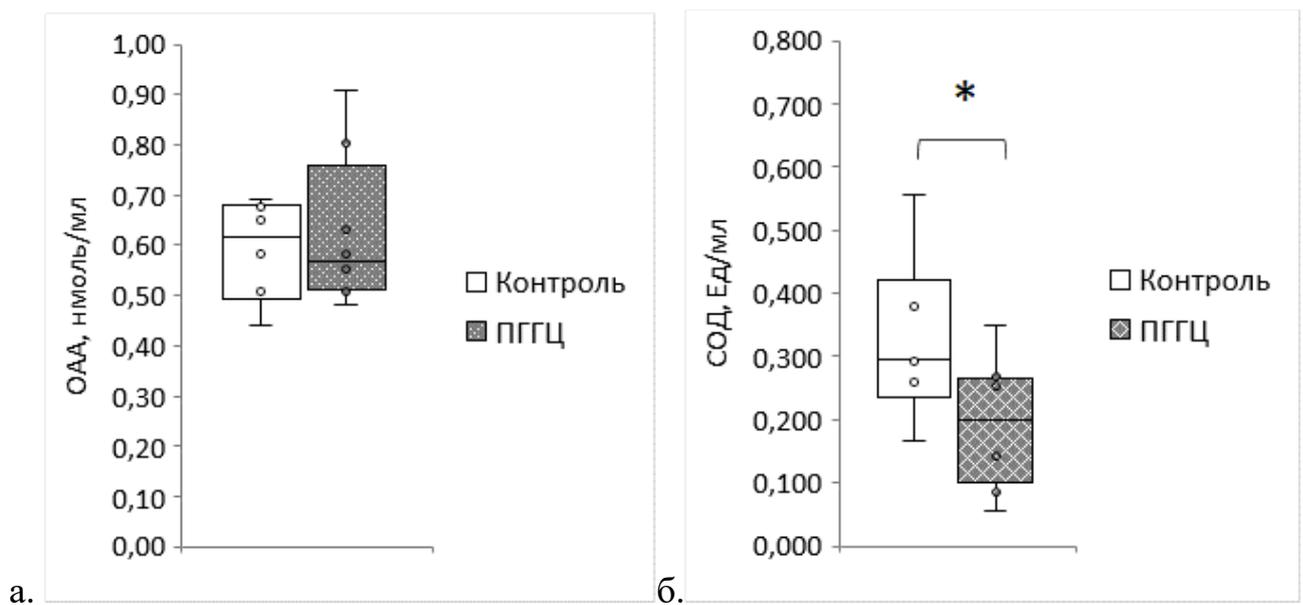


Рис. 48. Влияние пренатальной ГГЦ на показатели антиоксидантной системы в сыворотке крови новорожденных крысят первого дня жизни ($n=6$ в контрольной группе, $n=8$ в группе после ПГГЦ). а – уровень общей антиоксидантной активности в сыворотке крови крысят на P1 в контрольной группе (Контроль) и в группе животных, перенесших ПГГЦ. б – активность супероксиддисмутазы в сыворотке крови крысят на P1 в контрольной группе (Контроль) и в группе животных, перенесших ПГГЦ. Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

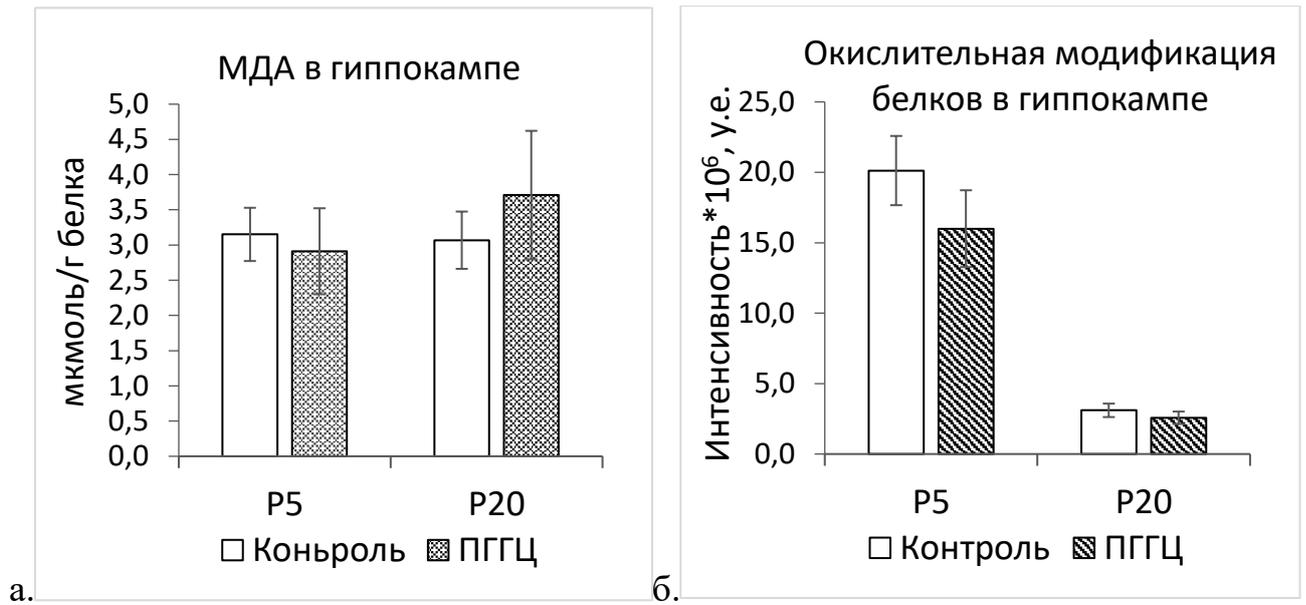


Рис 49. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на показатели окислительной модификации макромолекул в гиппокампе потомства в постнатальном периоде. а – содержание малонового диальдегида (МДА) (n=9 в каждой группе); б – относительный уровень окислительной модификации белков в гиппокампе потомства на P5 и P20 в контрольной группе и в группе животных, перенесших ПГГЦ (n=6 в каждой группе); Данные представлены как $M \pm se$. * - * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе крысят после ПГГЦ и группе контроля.

3.4.3. Содержание цитокинов в гиппокампе и коре потомства в раннем онтогенезе после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

Анализ влияния перенесенной ПГГЦ на содержание про- и противовоспалительных цитокинов в отдельных структурах мозга потомства в раннем онтогенезе показал, что на P5 как в гиппокампе, так и в коре уровень IL-6 в подопытной группе не отличается от контрольной. Однако на P20 в гиппокампе уровень IL-6 значимо выше у потомства после ПГГЦ по сравнению с контролем, в коре на данном сроке постнатального развития при общем повышении содержания IL-1 β в обеих группах значимого отличия между ними обнаружено не было (рис. 50). Показано, что на P5 в исследуемых структурах, перенесенная ПГГЦ не изменяет также и содержание IL-1 β . Однако на P20 как в гиппокампе, так и в коре потомства, перенесших ПГГЦ происходит повышение содержание данного цитокина, и становится значимо выше, чем, соответственно, в гиппокампе и коре

контрольных крысят без ПГГЦ (рис. 51). Значимых отличий между контрольными и подопытными крысятами в исследуемых структурах мозга по количеству TNF α как на P5, так и на P20 не обнаружено (рис. 52). При этом уровень противовоспалительного цитокина IL-10 под воздействием ПГГЦ по-разному изменяется в гиппокампе и коре на различные сроки постнатального периода. Так установлено, что при отсутствии влияния перенесенной ПГГЦ на его содержание в гиппокампе на P5, в коре на данном сроке, наблюдается значимое повышение IL-10 в подопытной группе по сравнению с контрольной. Напротив, на P20 в коре различия уже отсутствуют, тогда как в гиппокампе на фоне значительного увеличения его содержания в контрольной группе и менее выраженного в группе после ПГГЦ, уровень IL-10 у подопытных крысят в гиппокампе значимо ниже, чем у крысят без перенесенной ПГГЦ (рис. 53).

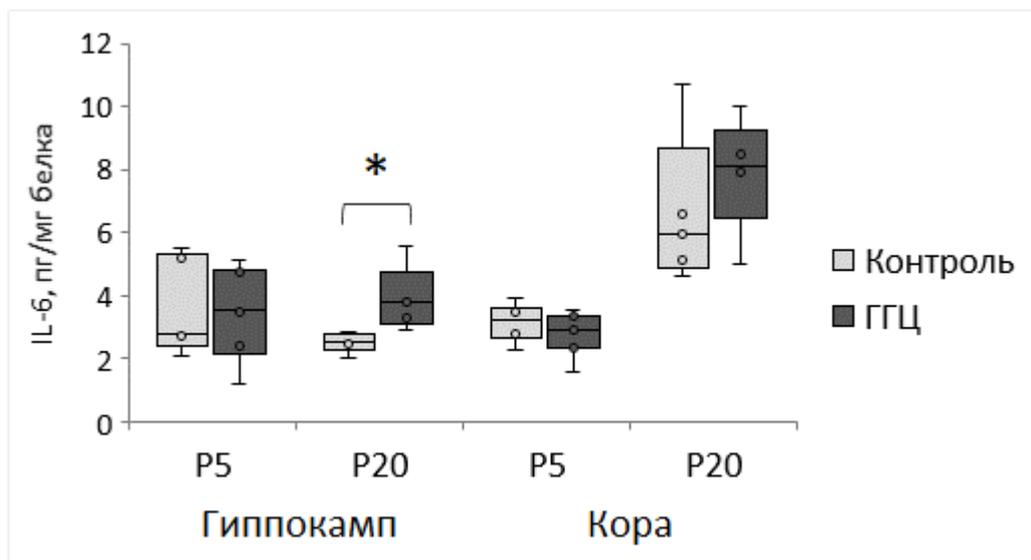


Рис 50. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание IL-6 в гиппокампе и коре потомства в постнатальном периоде на P5 и P20 (n=4-7 в каждой группе); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе крысят после ПГГЦ и в группе контроля.

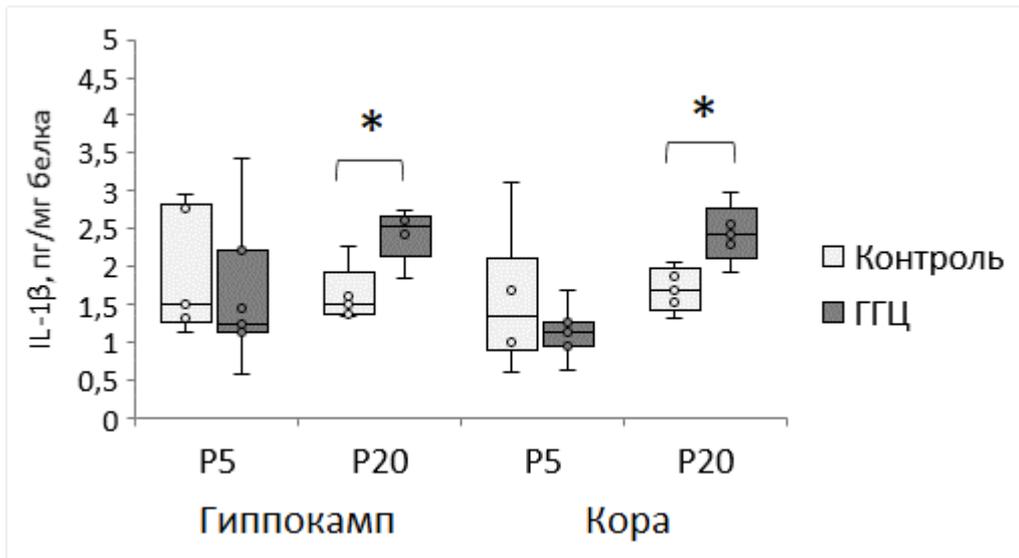


Рис 51. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание IL-1 β в гиппокампе и коре потомства в постнатальном периоде на P5 и P20 (n=4-7 в каждой группе); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - p<0,05 достоверные различия значения показателя в группе крысят после ПГГЦ и в группе контроля.

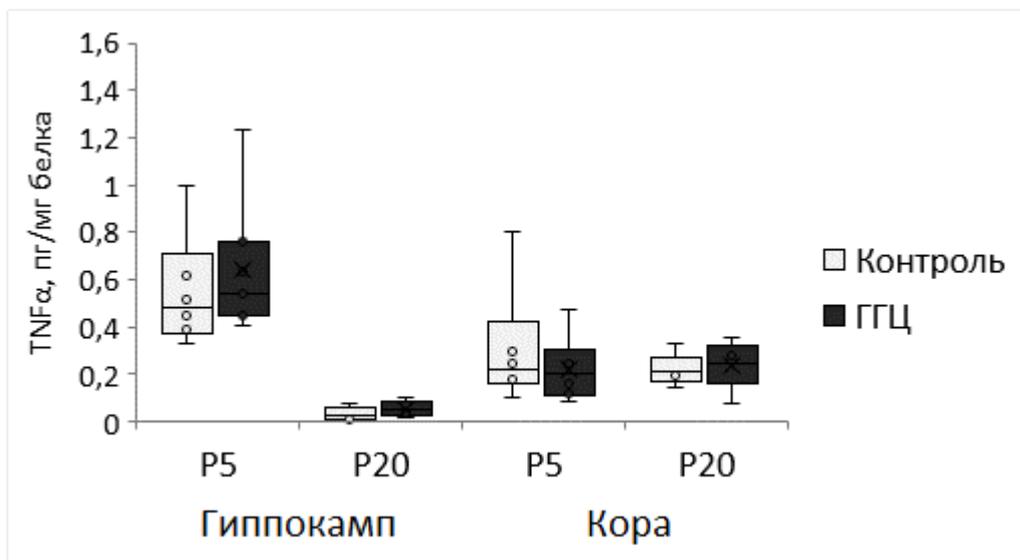


Рис 52. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание TNF α в гиппокампе и коре потомства в постнатальном периоде на P5 и P20 (n=4-7 в каждой группе); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - p<0,05 достоверные различия значения показателя в группе крысят после ПГГЦ и в группе контроля.

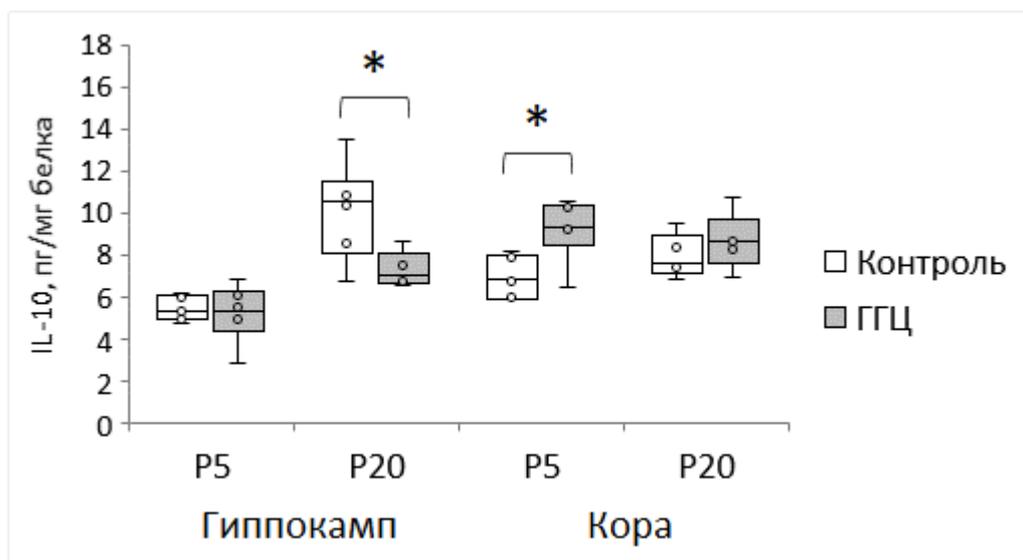
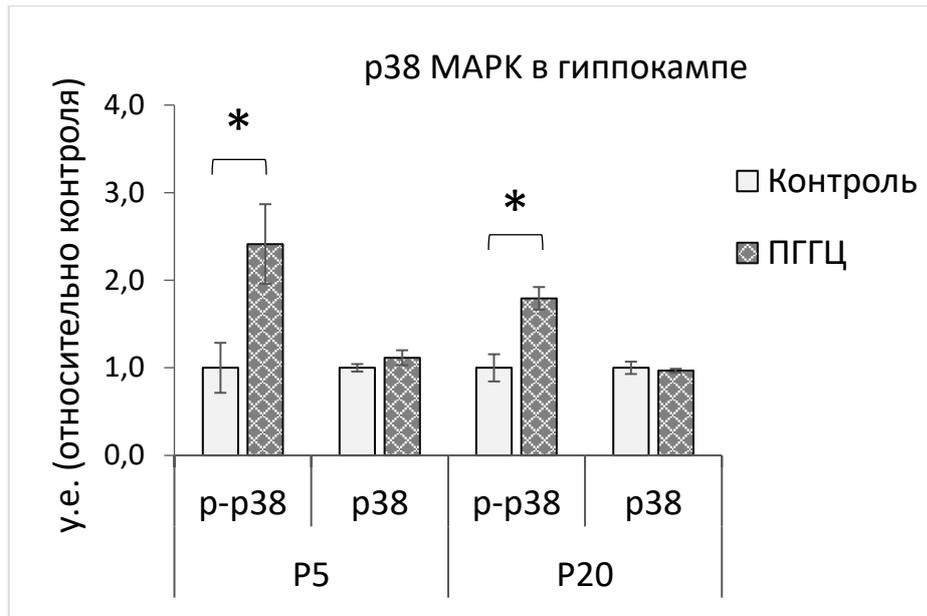


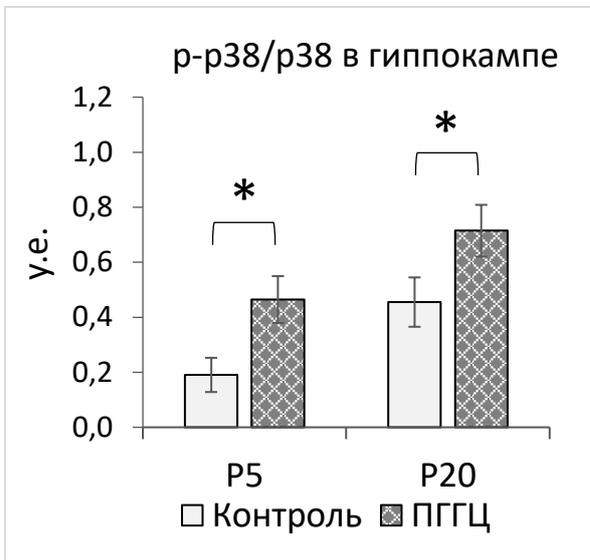
Рис 53. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание IL-10 в гиппокампе и коре потомства в постнатальном периоде на P5 и P20 (n=5-7 в каждой группе); Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ достоверные различия значения показателя в группе крысят после ПГГЦ и в группе контроля.

3.4.4. Изменение маркеров апоптоза в гиппокампе и коре потомства после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

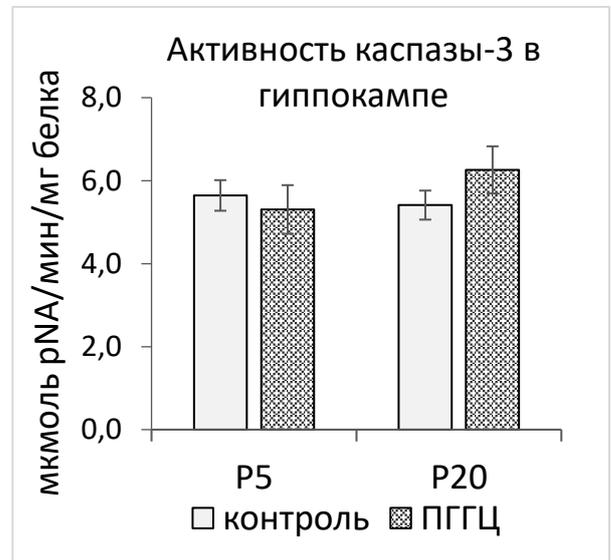
Установлено, что количество фосфорилированной p38 MAPK в гиппокампе крысят перенесших ПГГЦ на P5 в 2,4 раза выше, а на P20 в 1,8 раза выше, чем в гиппокампе контрольного потомства соответствующего возраста, несмотря на то что общий уровень p38 MAPK у них не отличается. (рис. 54а). Следовательно, соотношение фосфо-p38 (p-p38) и общего содержания p38 MAPK также было повышено в группе после ПГГЦ на оба исследованных срока постнатального периода (рис. 54б). В гиппокампе ни на P5 ни на P20 не было обнаружено расщепления прокаспазы-3 (p35) до ее активной формы (рис. 54д), при этом достоверной разницы в содержании прокаспазы-3 в контрольной и подопытной группе не наблюдалось (рис. 54г). Отличий между исследуемыми группами не выявлено также и по анализу ферментативной активности каспазы-3 ни на P5, ни на P20 (рис. 54в).



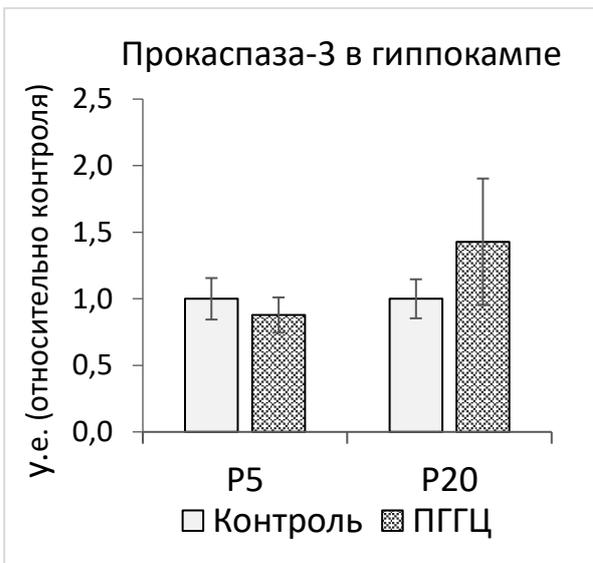
а.



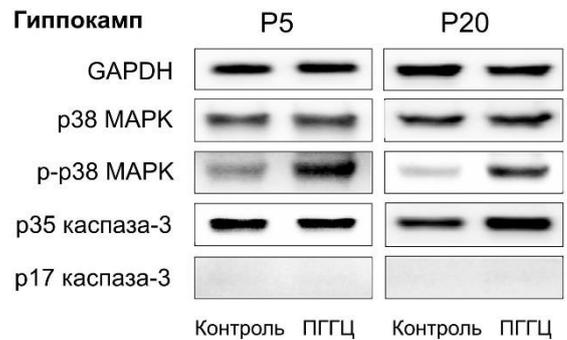
б.



в.



г.



д.

Рис. 54. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на р38 МАРК и каспазу-3 в гиппокампе потомства на P5 и P20. а – содержание фосфо-р38 (р-р38) и общего содержания р38 МАРК в гиппокампе крысят перенесших ПГГЦ и потомства без ПГГЦ (контроль) на P5 и P20; б – соотношение содержания фосфо-р38 (р-р38) и общего содержания р38 МАРК в гиппокампе крыс на P5 (n = 4–5 в каждой группе) и P20 (n= 4–5 в каждой группе) в контроле и группе после ПГГЦ, определяемых денситометрическим анализом; в – активность каспазы-3 в гиппокампе крыс на P5 (n = 6–8) и P20 (n = 10) в контрольной и ПГГЦ группах. г – относительная плотность полос содержания р35 каспазы-3 в гиппокампе крыс на P5 и P20 в контрольной (n = 12–13) и ПГГЦ (n = 13–15) группах; д – репрезентативный иммуноблот распределения исследованных показателей в гиппокампе потомства на P5 и P20. Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную единицу (у.е.) принято содержание показателя в соответствующем контроле (а,г). Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля.

Установлено, что количество фосфорилированной р38 МАРК в коре крысят перенесших ПГГЦ на P5 в 1,6 раза выше, чем в коре потомства из группы контроля, при этом, в отличие от гиппокампа, значимого увеличения данного маркера в коре на P20 в подопытной группе по сравнению с контрольной установить не удалось. Также как и в гиппокампе, общий уровень р38 МАРК на оба исследованных срока постнатального периода не отличается в контрольной группе и группе после ПГГЦ. (рис. 55а). Следовательно, соотношение фосфо-р38 (р-р38) и общего содержания р38 МАРК было повышено в группе после ПГГЦ исключительно на P5 (рис. 55б). В отличие от гиппокампа в коре на оба исследованных срока идентифицировались как нерасщепленная прокаспаза-3 (р35), так и ее активная расщепленная форма (р17) (рис. 54д), при этом достоверной разницы в содержании прокаспазы-3 в контрольной и подопытной группе не наблюдалось (рис. 55г,д). Однако на P5 в коре детенышей, перенесших ПГГЦ, отмечено существенное повышение р17-фрагмента активной каспазы-3, по сравнению с контролем, что соответственно также отражается в значимом повышении у них отношения р17 и прокаспазы-3 (рис. 55г).

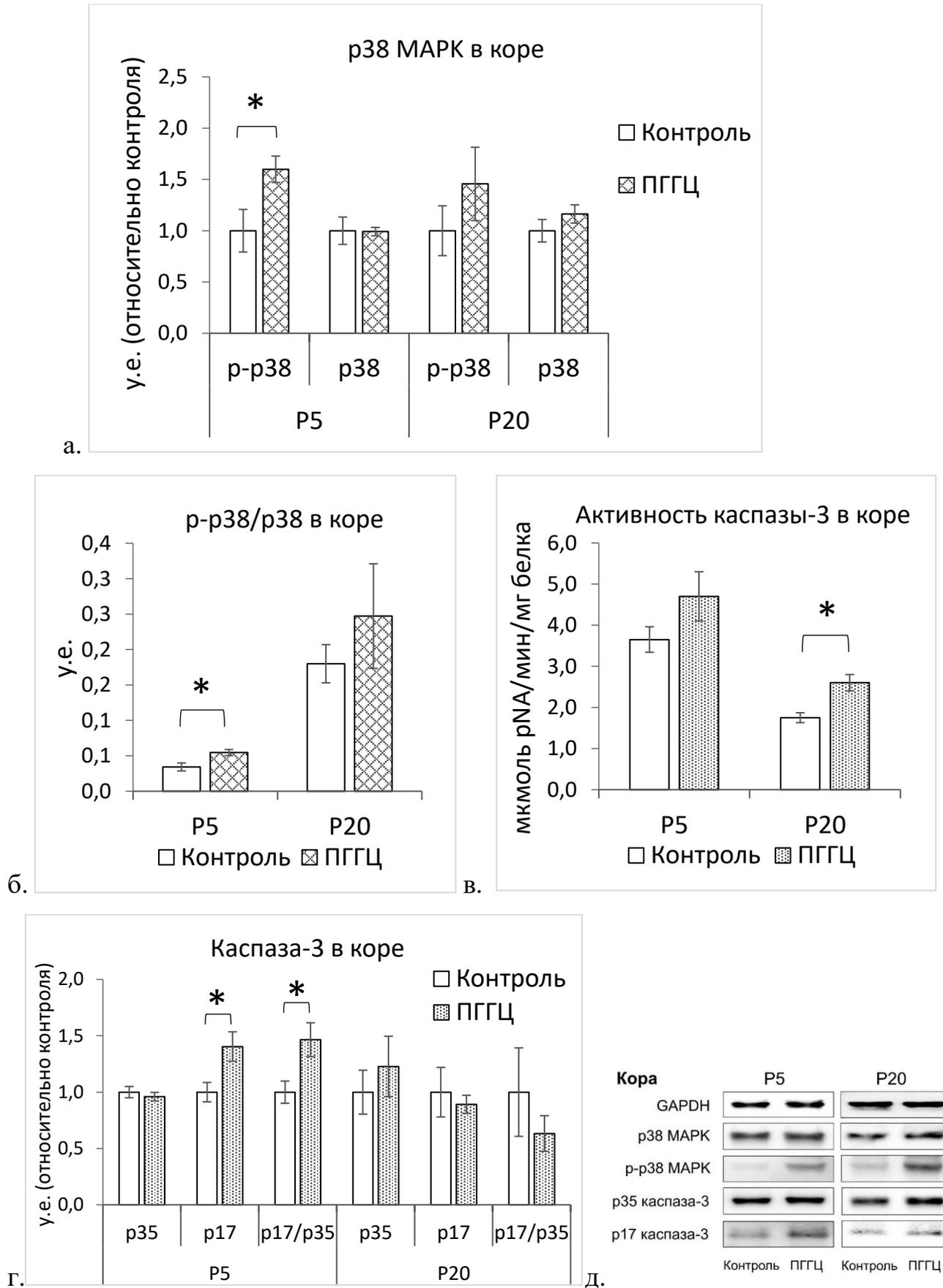


Рис. 55. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на p38 MAPK и каспазу-3 в коре потомства на P5 и P20. а – содержание фосфо-p38 (p-p38) и общего содержания p38

МАРК в коре крысят перенесших ПГГЦ и потомства без ПГГЦ (контроль) на P5 и P20; б – соотношение содержания фосфо-p38 (p-p38) и общего содержания p38 МАРК в коре крыс на P5 (n = 4–5 в каждой группе) и P20 (n= 4–5 в каждой группе) в контроле и группе после ПГГЦ, определяемых денситометрическим анализом; в – активность каспазы-3 в коре крыс на P5 (n = 6–8) и P20 (n = 10) в контрольной и ПГГЦ группах. г – относительная плотность полос содержания прокаспазы-3 (p35), расщепленного фрагмента каспазы-3 (p17) и их отношения в коре крыс на P5 и P20 в контрольной (n = 12–13) и ПГГЦ (n = 13–15) группах; д – репрезентативный иммуноблот распределения исследованных показателей в коре потомства на P5 и P20. Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную единицу (у.е.) принято содержание показателя в соответствующем контроле (а,г). Данные представлены как $M \pm se$. * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля.

Несмотря на то, что на P20 методом иммуноблотинга значимой разницы данного отношения получено не было, при исследовании ферментативной активности каспазы-3, было установлено ее повышение в группе после ПГГЦ по сравнению с контролем именно на P20, тогда как на P5 повышение носило характер тенденции и не достигало значимого отличия от контроля (рис. 55в).

3.4.5. Количество нейрональных и глиальных клеток в гиппокампе потомства после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

В области СА3 гиппокампа у крысят перенесших ПГГЦ по сравнению с контрольными крысятами снижено количество жизнеспособных нейронов, экспрессирующих белок NeuN как на P5, так и на P20. У потомства, после ПГГЦ на P5 количество нейронов составило 69,75% от контрольного уровня и уменьшилось до 47,77% на P20 (рис. 56, рис 57). Кроме того, после ПГГЦ в раннем онтогенезе у крысят в области СА3 гиппокампа наблюдается глиальная реакция и количество глиальных клеток было увеличено по сравнению с контролем (рис. 56). На P5 после ПГГЦ среднее количество микроглии в 1,97 раза выше контрольного уровня, при этом к P20 глиальная реакция после ПГГЦ значительно усиливается, так количество микроглиальных клеток в подопытной группе превышало контроль более чем в 4 раза (рис. 57б).

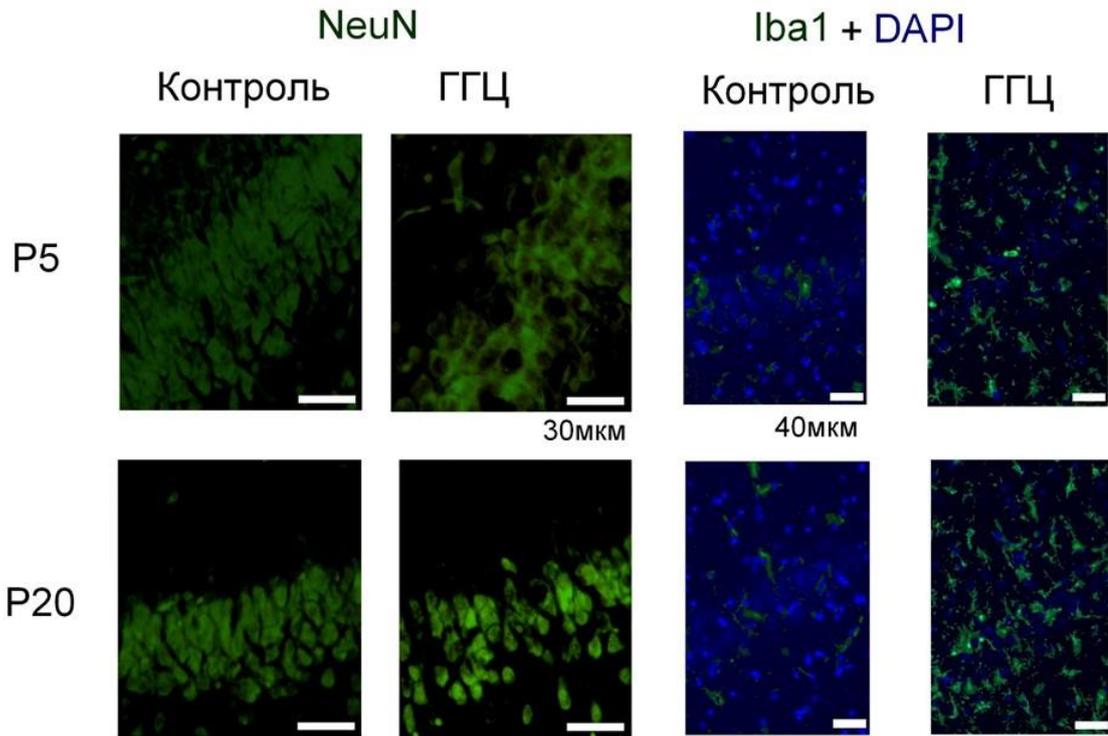


Рис. 56. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) на количество нейрональных и глиальных клеток в области СА3 гиппокампа. Микрофотографии области СА3 контрольных крысят на P5 и P20 и потомства, подвергнутого ПГГЦ. Иммуногистохимическое окрашивание нейронального маркерного белка NeuN (FITC, слева), или маркера микроглии Iba1 (PE, справа). Ядра клеток окрашивали неспецифическим красителем ядер DAPI (синий). Масштаб: 40 мкм.

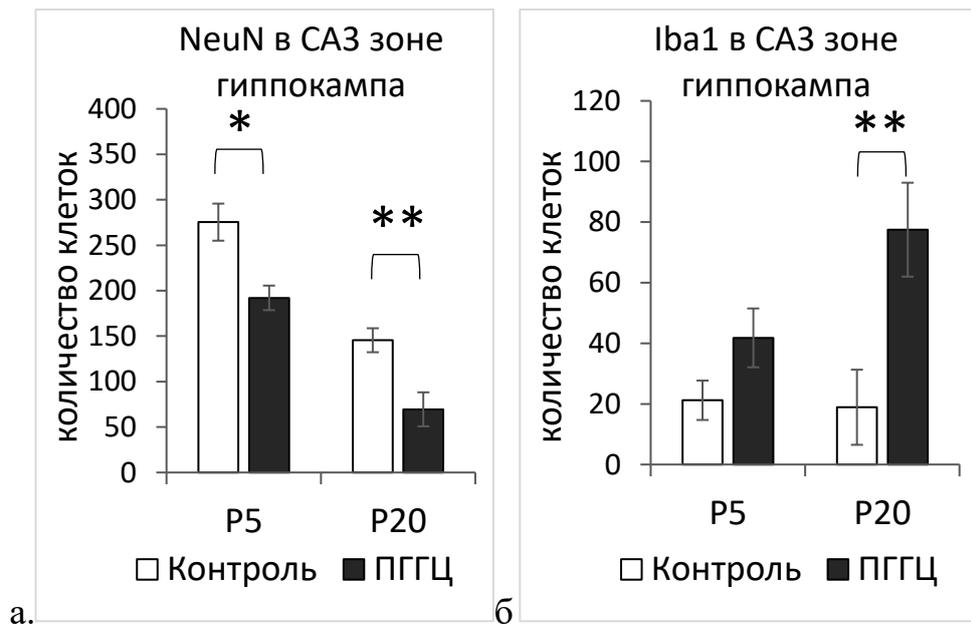
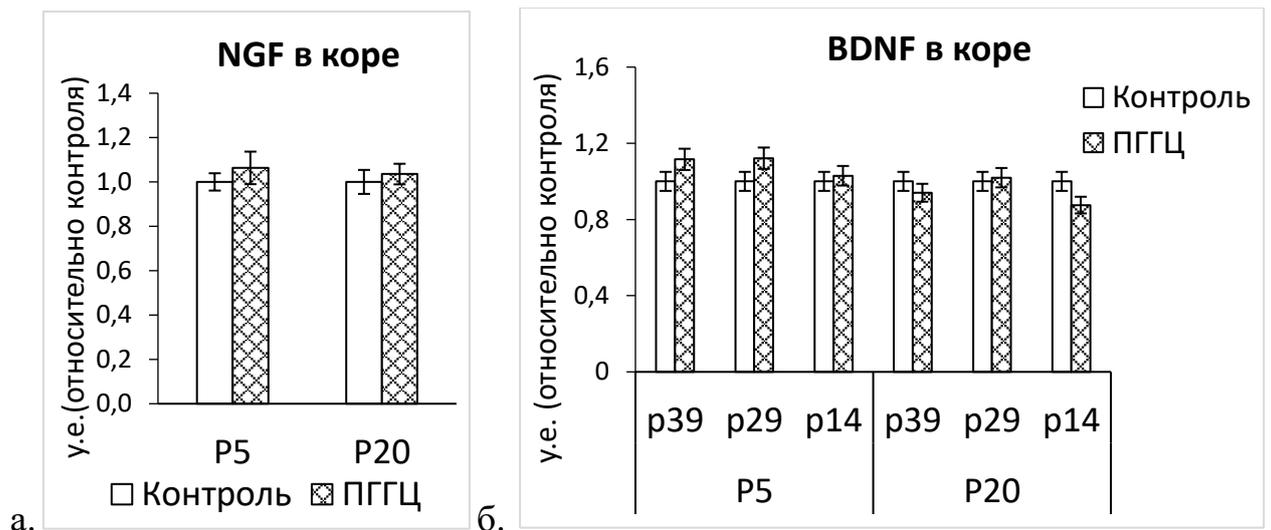


Рис. 57. Клеточный состав области СА3 гиппокампа контрольных крысят и крысят после пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) на P5 (n=8 в каждой

группе) и P20 (n=8 в каждой группе). а – количество нейронов. б – количество микроглиальных клеток. Данные представлены в виде $M \pm se$; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля

3.4.6. Содержание нейротрофинов в коре и гиппокампе потомства в раннем онтогенезе после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

Анализ содержания NTs в гиппокампе и коре потомства на P5 и P20 показал, что при воздействии ПГГЦ в гиппокампе на P5 снижено количество NGF 31 кДа и изоформа BDNF 39 кДа, по сравнению с контрольными животными (рис. 58в,г). По сравнению с мозгом плодов, в исследуемых структурах мозга на P5 и P20 методом иммуноблотинга обнаруживаются три изоформы BDNF: 14 кДа, 29 кДа и 39 кДа (рис.58д), причем изоформа 39 кДа, которая не определяется в мозге в период пренатального, на P20 в коре и гиппокампе становится преобладающей (рис. 58е). На P20 в гиппокампе значимых отличий, исследованных NTs в подопытной группе от контроля обнаружено не было. В коре, на оба срока постнатального периода развития, количество NGF и BDNF у крысят перенесших ПГГЦ и у потомства с нормальным внутриутробным развитием также были сопоставимы (рис. 58а,б).



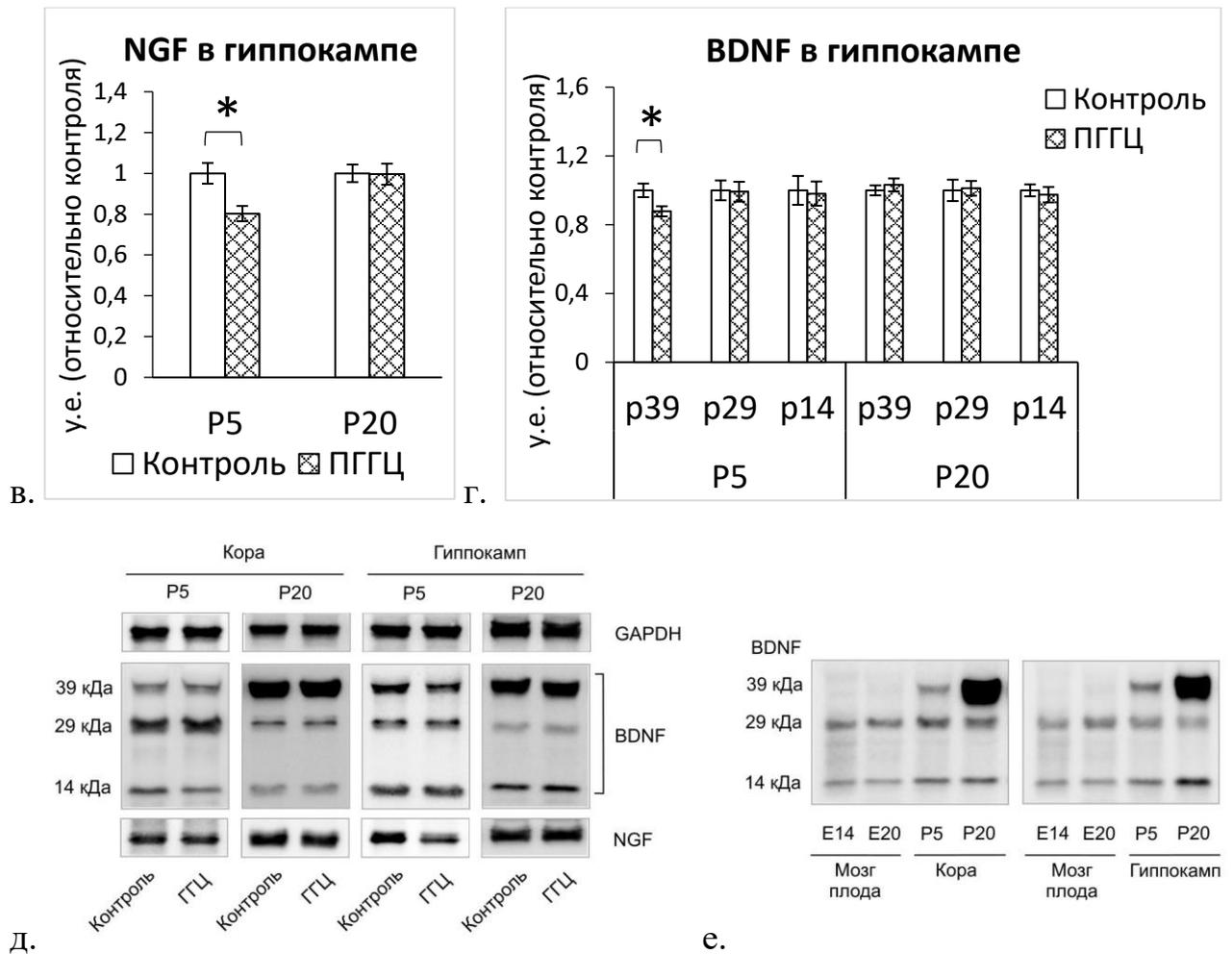


Рис. 58. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание нейротрофинов в коре и гиппокампе потомства в раннем постнатальном периоде развития. а – содержание NGF, б – содержание изоформ BDNF в коре крысят на P5 (n=12 в каждой группе) и P20 (n=12 в каждой группе) в контрольной группе и в группе с ПГГЦ, в – содержание NGF, б – содержание изоформ BDNF в гиппокампе крысят на P5 (n=8-12 в каждой группе) и P20 (n=8-12 в каждой группе) в контрольной группе и в группе с ПГГЦ, д – репрезентативный иммуноблот распределения NGF и изоформ BDNF в коре и гиппокампе крысят на P5 и P20; е – репрезентативный иммуноблот распределения изоформ BDNF в мозге плода и в коре и гиппокампе на P5 и P20 в контрольной группе. Ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблотинга, за условную единицу (у.е.) принято содержание показателя в контрольной группе. Данные представлены как $M \pm se$; * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе с ПГГЦ и группе контроля.

3.4.7. Показатели окислительного стресса в сыворотке крови самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

При исследовании отделенных последствий, перенесенной пренатальной ГГЦ, были проанализированы показатели ОС в сыворотке крови крысят. Показано, что через 1 мес после рождения у животных, пренатальное развитие которых происходило в условиях повышенного уровня ГЦ, содержание нитротирозина в сыворотке крови значимо выше, чем в контрольной группе. Сходные различия сохранялись у животных и в возрасте 3 мес (табл.9).

Таблица 9. Показатели окислительного стресса в сыворотке крови крысят в позднем постнатальном периоде после перенесенной пренатальной ГГЦ. Данные представлены как Медиана [25 перцентиль–75 перцентиль].

Возраст	Показатели	Контроль	ПГГЦ
P30	Нитротирозин, нмоль/л	5,62 [3,81–10,49]	11,55 [8,93–26,62]**
	8-OHdG, нг/мл	28,60 [17,67–38,81]	37,89 [21,45–43,68]
	СОД, Ед/мл	0,488 [0,400–1,000]	0,371 [0,306–0,743]
	Аскорбиновая кислота, нг/мл	20,6 [19,3–22,8]	16,3 [15,4–17,4]*
P90	Нитротирозин, нмоль/л	7,97 [6,45–9,24]	16,31 [8,08–20,45]**
	8-OHdG, нг/мл	24,01 [18,19–29,02]	21,13 [15,17–27,28]
	СОД, Ед/мл	0,145 [0,110–0,214]	0,335 [0,291–0,603]**
	Аскорбиновая кислота, нг/мл	13,0 [11,2–13,0]	13,1 [11,8–13,9]

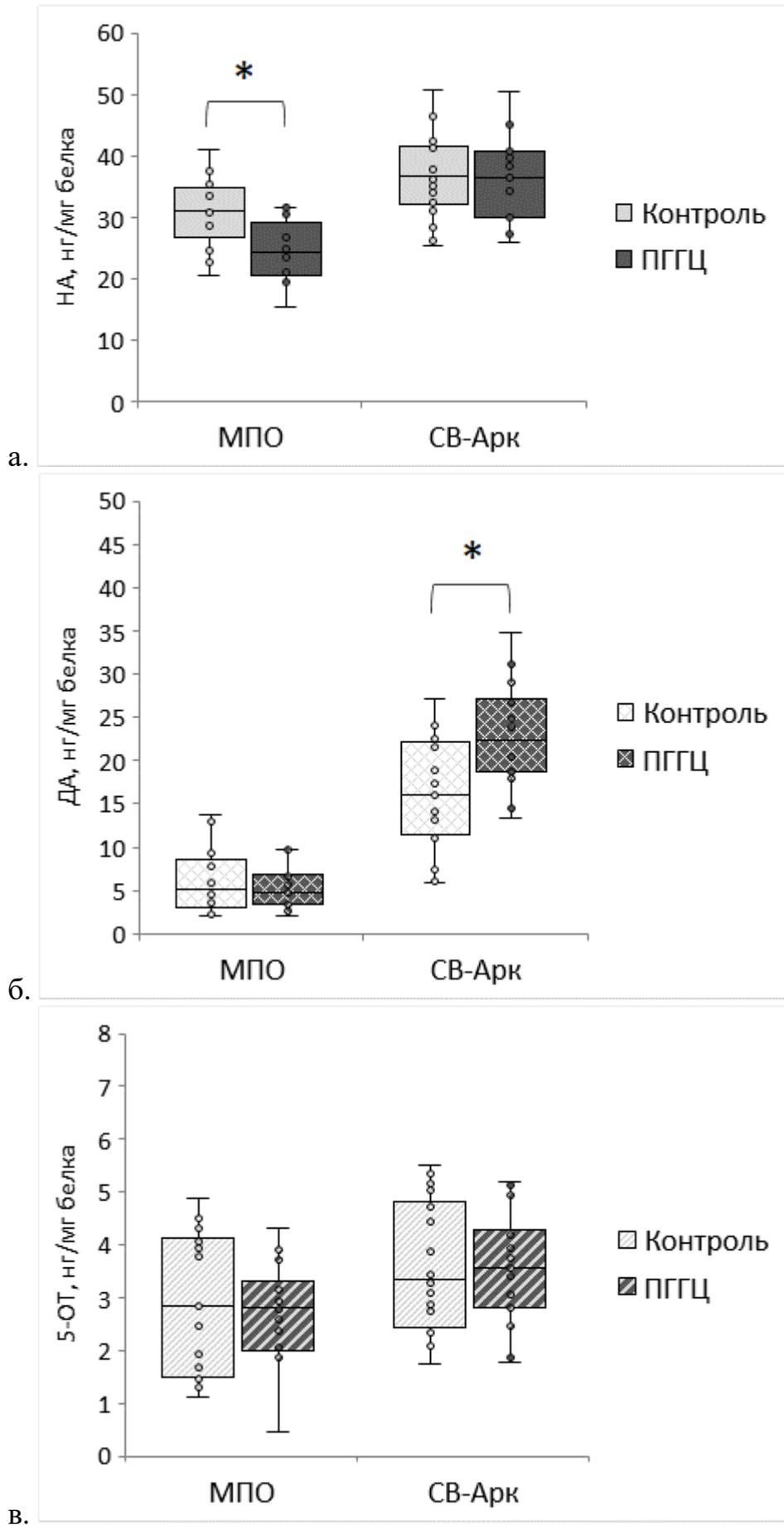
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – достоверность отличий группы ПГГЦ от контрольной группы

При определении количества 8-OHdG отмечено отсутствие различий между исследованными группами животных на P30. При достижении возраста P90 уровень 8-OHdG значимо снижался как в сыворотке крови у контрольных, так и у

подопытных животных ($p < 0,05$), однако в обеих группах крысят был сопоставим. (табл. 8). Показано, что у 30-дневных животных, матери которых в течение беременности получали метиониновую нагрузку, отмечено достоверное снижение в сыворотке крови уровня аскорбиновой кислоты по сравнению с таковым у животных, не подвергавшимся ПГГЦ. Однако к Р90 разница по этому показателю между подопытными и контрольными животными исчезала (табл.9). Ранее мы отмечали снижение активности СОД в сыворотке крови новорожденных животных, перенесших ПГГЦ (рис. 48). При этом показано, что через 1 мес ее активность у подопытных животных повышается и достигает контрольных значений, но через 3 мес активность СОД у контрольных животных, в отличие от подопытных, снижалась. В результате у животных, перенесших ПГГЦ, активность СОД становилась значимо выше (табл. 9).

3.4.8. Содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса и гиппокампе половозрелых самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

В отдаленном периоде после перенесенной ПГГЦ у половозрелых самок крыс через 2,5 мес в МПО снижено содержание НА в МПО гипоталамуса по сравнению с контрольными животными, пренатальное развитие которых проходило без ГГЦ ($p < 0,05$). При этом, в СВ-Арк значимых отличий подопытной группы от контрольной обнаружено не было (рис. 59а). При этом в данной гипоталамической структуре у половозрелых самок крыс после ПГГЦ повышены уровни ДА и ДОФУК ($p < 0,05$), однако в МПО их содержание не отличается от контрольных значений (рис. 69 б, д). Также у крыс в отдаленном периоде после ПГГЦ не обнаружено отличий от контроля в содержании 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК ни в МПО, ни в СВ-Арк (рис. 59в,г).



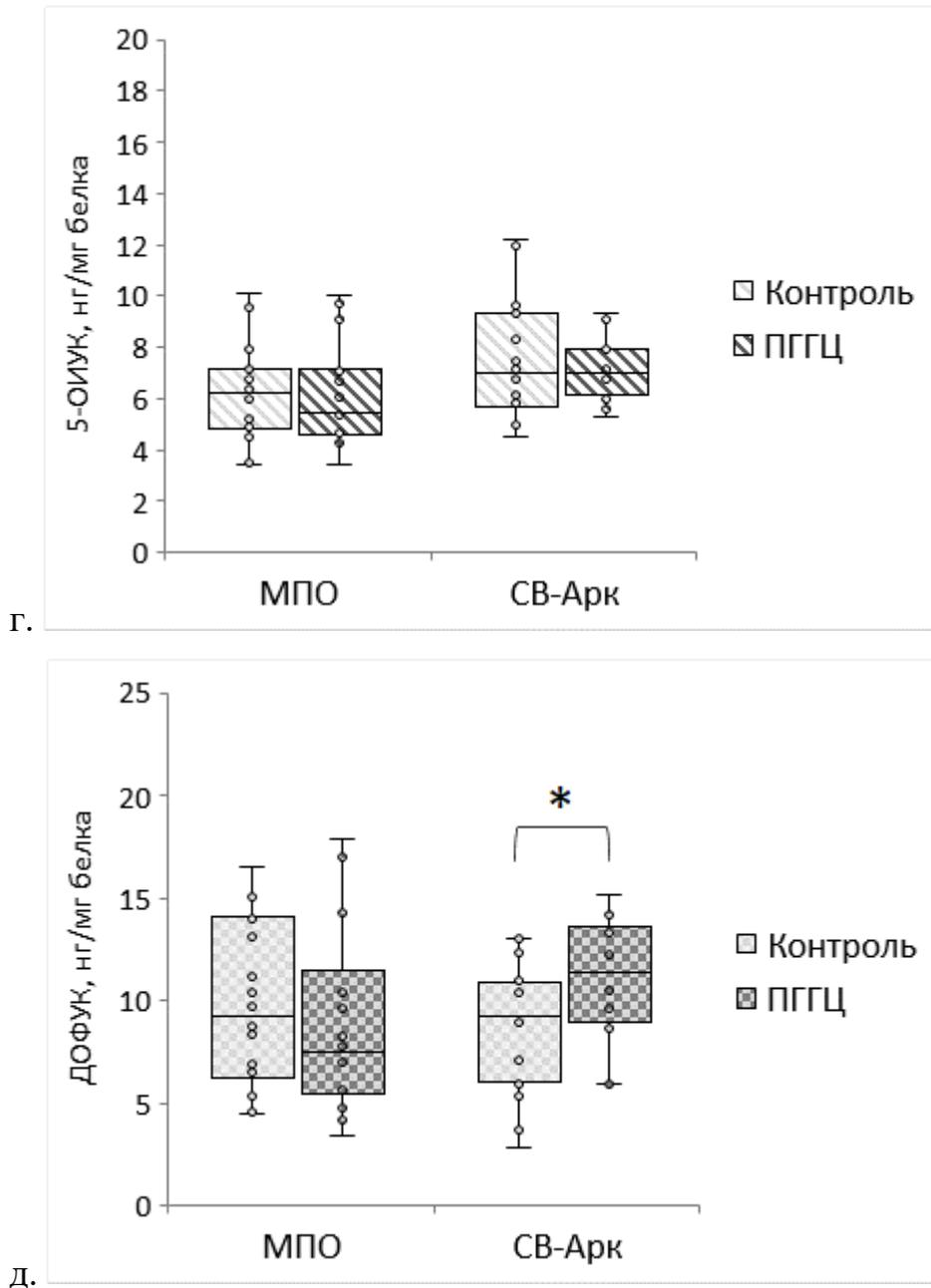


Рис. 59. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса ответственных за регуляцию репродуктивной функции в отдаленном периоде. *а* – содержание НА, *б* – содержание ДА, *в* – содержание 5-ОТ, *г* – содержание 5-ОИУК, *д* – содержание ДОФУК в медиальной преоптической области (МПО) и срединном возвышении с аркуатными ядрами (СВ-Арк) гипоталамуса у половозрелых самок крыс в контрольной группе и в группе перенесших ПГГЦ (n=15-19 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля.

В гиппокампе половозрелых самок крыс, перенесших ПГГЦ по сравнению с контрольными животными, пренатальное развитие которых проходило без ПГГЦ, ~ в 2 раза снижено содержание таких нейромедиаторов, как НА, 5-ОТ и 5-ОИУК (рис. 60а), кроме того показано увеличение активности MAO (рис. 60б).

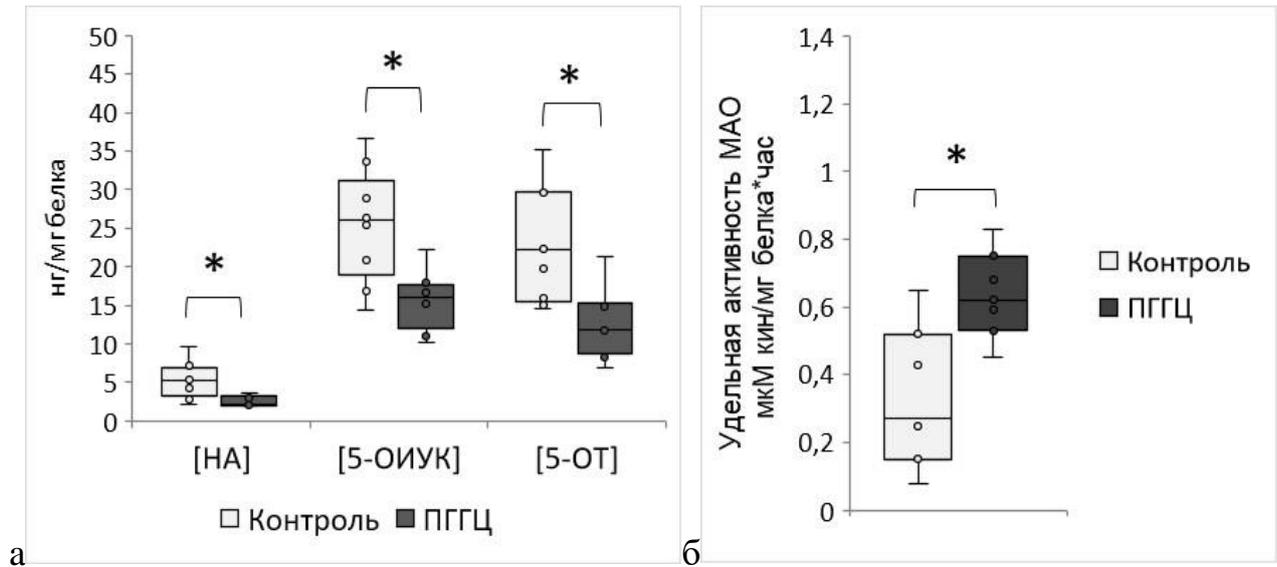


Рис. 60. Влияние перенесенной пренатальной ГГЦ на содержание биогенных аминов и активность MAO в гиппокампе половозрелых самок крыс. а – содержание биогенных аминов (n=7-9 в каждой группе), б – удельная активность MAO (n=7 в каждой группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение; * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе после ПГГЦ и группе контроля.

3.4.9. Исследование поведенческой активности и когнитивного статуса у половозрелых самок крыс после перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

Анализ ОИП оценивали в тесте «Открытое поле» (табл. 10). Основными проявлениями ОИП были побежки (локомоции) по поверхности поля, оцениваемые по числу пересеченных квадратов. От общего числа проявлений ОИП побежки (локомоции) по поверхности поля составляли в контрольной группе $66,2 \pm 2,13\%$, при этом в группе перенесших ПГГЦ данный процент был значимо выше и

составил $74,9 \pm 1,82\%$ ($p < 0,01$), что обусловлено преимущественно значимым повышением количества пересечений периферических квадратов в группе после ПГГЦ по сравнению с контрольными животными (Табл. 10). При этом значимой разницы между группами по показателю ОА не обнаружено. Тенденция к снижению числа стоек и актов умывания также отмечена у животных, перенесших ПГГЦ.

Таблица 10. Показатели ориентировочно-исследовательского поведения половозрелых самок крыс перенесших ПГГЦ и контрольных животных в стадию диэструса (Me (25-75 перцентили)).

Показатели ОИП	Контроль (n=10)	ПГГЦ (n=10)
Число пересеченных центральных квадратов, шт.	6,50 [3,75-14,25]	10,00 [4,75-17,00]
Число пересеченных периферических квадратов, шт.	57,50 [51,25-66,25]	68,00 [62,75-76,00]*
Число стоек, шт.	15,0 [7,0-18,0]	9,5 [6,0-17,5]
Заглядывание в норки, шт.	5,00 [3,75-6,50]	4,50 [2,75-6,50]
Число отряхиваний, шт.	0 [0-0]	0 [0-0]
Число актов умываний, шт.	9,0 [5,0-22,5]	6,00 [1,25-11,50]
Заглядывание в центральную норку, шт.	1,00 [0,75-1,25]	2,50 [0,75-3,00]
Общая активность (ОА), шт.	75,50 [66,00-92,75]	86,50 [83,50-114,25]

* $p < 0,05$ – достоверность отличий группы после ПГГЦ от контрольной группы

Во время фазы обучения (0 мин) в тесте распознавания объектов самки крыс контрольной и подопытной групп не проявляли предпочтения объекта (Рис.61). По сравнению с крысами после ПГГЦ, контрольные крысы продемонстрировали повышенное предпочтение нового объекта как через 10 мин, 60 мин, так и через 24 часа. Так показано, что контрольные самки продемонстрировали значительно более высокий индекс распознавания нового объекта, чем известного объекта; Во

всех трех тестах они уделяли новому объекту не менее 67% времени. Половозрелые самки крыс после ПГГЦ, по сравнению с контрольными, уже через 10 мин не отдавали предпочтение новому объекту, также низкий индекс распознавания нового объекта по сравнению со старым продемонстрировали они через 24 часа. Только через 60 мин крысы после ПГГЦ проявили большее предпочтение новому объекту, $58,8 \pm 2,86\%$ времени, и коэффициент дискриминации у них значимо не отличался от контрольных животных.

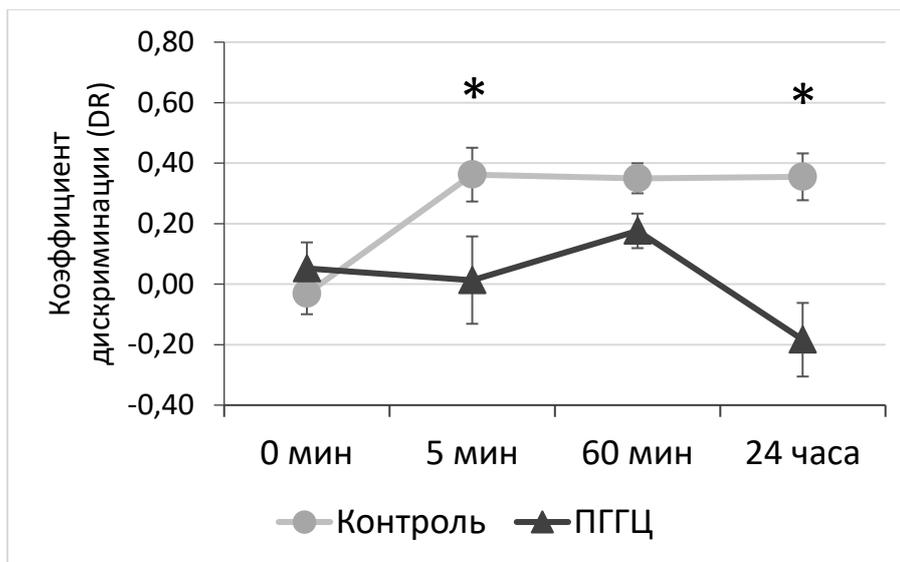


Рис. 61 Распознавание новых и известных объектов через 10 мин, 60 мин и 24 часа после тренировочного предъявления пары объектов (0 мин). На линейном графике показаны коэффициенты дискриминации контрольных крыс и крыс перенесших ПГГЦ во время задачи распознавания объектов. Коэффициент дискриминации (DR) рассчитывался путем деления разницы времени, проведенного на новом объекте (НО) и известном объекте (ИО), на общее время исследования: $DR = (НО - ИО) / (НО + ИО)$. Значения выше 0 указывают на предпочтение нового объекта, значения ниже 0 — на предпочтение известного объекта. ($M \pm se$, $n=11-13$ в каждой группе). * - $p < 0,05$ – достоверные различия коэффициентов дискриминации контрольных животных и крыс, перенесших ПГГЦ.

В восьмилучевом лабиринте при исследовании рабочей памяти было показано, что среднее время нахождения контрольных крыс внутри рукава $15,36 \pm 0,96$ секунд достоверно не отличалось от времени, выявленного у крыс экспериментальной группы $19,57 \pm 2,88$ секунд на 6-й день тестирования, что

позволяет говорить об отсутствии нарушений общей двигательной активности у самок после ПГГЦ. При этом процент правильных посещений кормушек у экспериментальных животных был ниже чем у контрольных животных начиная с четвертого дня тестирования ($p < 0,05$). Так, самки крыс, перенесшие ПГГЦ допускали ошибки на протяжении всех шести дней тестирования, тогда как у крыс контрольной группы к четвертому дню правильное посещение кормушек составило 100% (Рис.62).

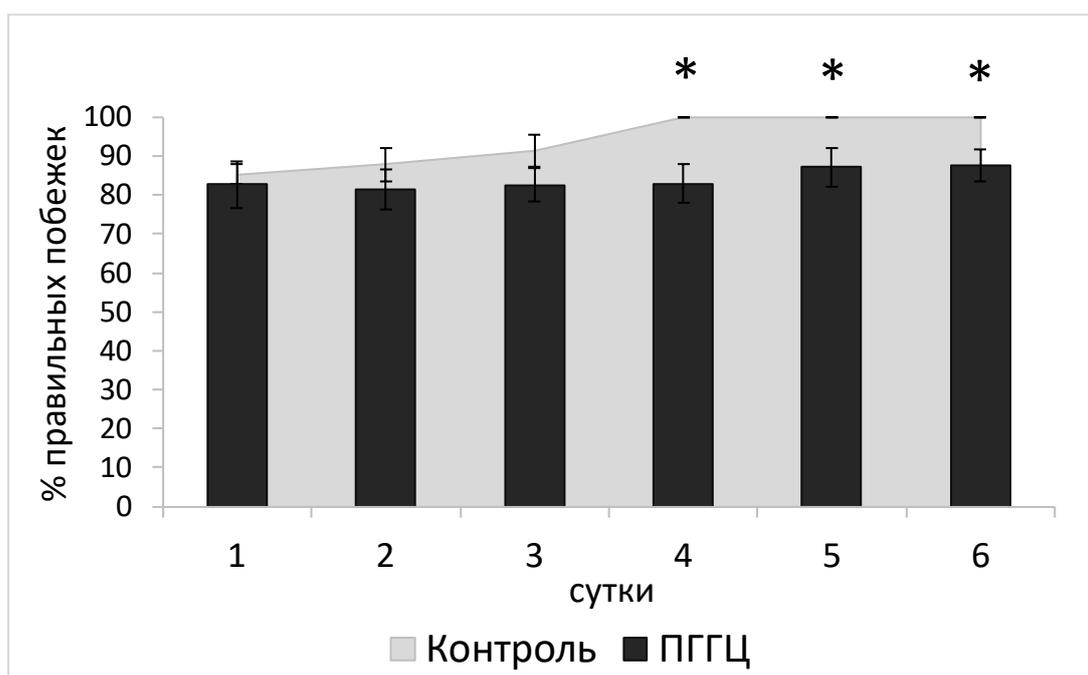


Рис 62. Влияние пренатальной ГГЦ на поведение крыс в восьмилучевом радиальном лабиринте. Ордината: среднее значение правильных посещений рукавов восьмилучевого лабиринта, выраженное в процентах от общего числа посещений для контрольных и перенесших пренатальную ГГЦ крыс ($M \pm m$, $n=11-13$ в каждой группе).

* - $p < 0,05$ достоверные различия между средними значениями правильных посещений рукавов половозрелыми самками крыс после ПГГЦ и контрольными животными.

3.5. Сравнительная характеристика влияния на половозрелых самок крыс хронической гипергомоцистеинемии взрослых животных и, перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии

При сравнении эффектов влияния хронической 30-тидневной ГГЦ и перенесенной ПГГЦ были сопоставлены данные по изменению показателей ОС в сыворотке крови у половозрелых самок крыс при этих различных моделях ГГЦ.

Установлено, что в обеих моделях ГГЦ наблюдалось значительное, примерно в 2 раза, по сравнению с контрольными животными, повышение уровня нитротирозина в сыворотке крови ($p < 0,01$) (рис. 63). В сыворотке крови самок крыс, подвергшихся ГГЦ во взрослом состоянии, было выявлено значимое повышение содержания 8ОНдГ ($p < 0,05$), при этом у половозрелых самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, его уровень не отличался от значений контрольных животных. Кроме того, отмечено, что активность СОД в исследованных группах имеет разнонаправленные изменения: так, в группе животных, перенесших ПГГЦ в период внутриутробного развития, в отдаленном периоде происходит статистически значимое повышение активности фермента ($p < 0,05$), тогда как 30-дневная метиониновая нагрузка половозрелых взрослых животных приводит к статистически значимому ее снижению на 20 % ($p < 0,05$) (рис. 63). Обе модели ГГЦ не приводили к значимому изменению уровня аскорбиновой кислоты в сыворотке крови половозрелых самок крыс по сравнению с соответствующим контролем (рис. 63).

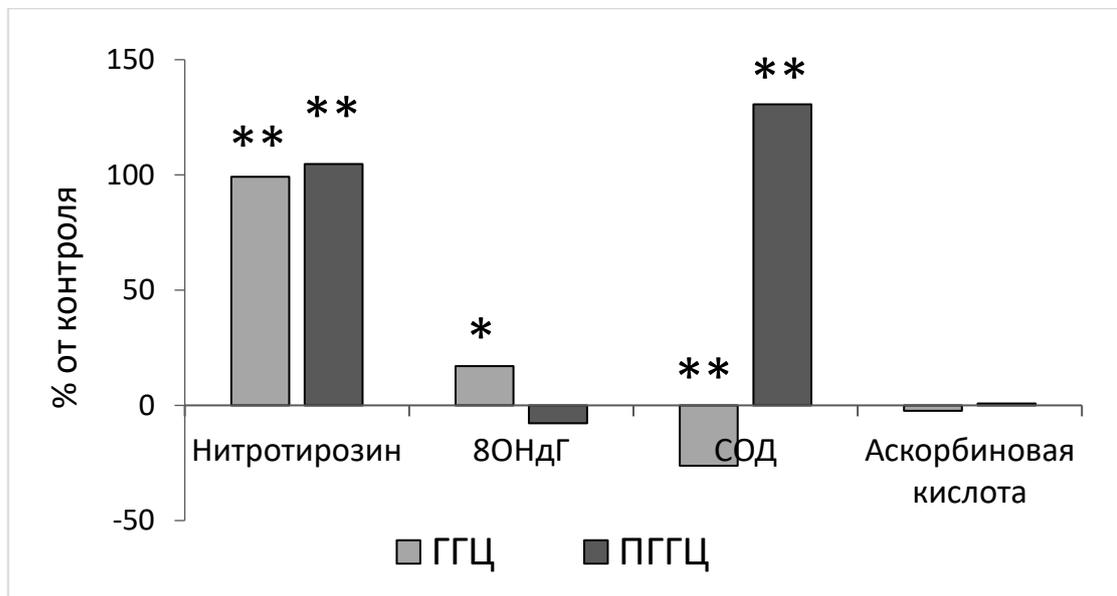


Рис. 63. Влияние различных моделей ГГЦ на показатели окислительного стресса в сыворотке крови относительно соответствующих показателей контроля (за нулевую линию принято значение показателей в группах животных без метиониновой нагрузки, получавших воду). ГГЦ – хроническая 30-тидневная гипергомоцистеинемия, ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия; различия содержания исследуемых показателей в группе

животных, которые перенесли ГГЦ, от группы животных без метиониновой нагрузки, получавших только воду, статистически значимы при * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

При сравнении содержания биогенных аминов в структурах гипоталамуса, ответственных за регуляцию репродуктивной функции, и в гиппокампе половозрелых самок крыс после хронической 30-тидневной ГГЦ и перенесенной ПГГЦ по отношению к соответствующему контролю без ГГЦ показано разнонаправленное изменение НА в МПО: повышение при ГГЦ и снижение после ПГГЦ (рис. 64). В гипоталамической структуре ответственной за секрецию гонадолиберина (СВ-Арк) изменения отмечены только после ПГГЦ, так показано повышение содержания ДА. Несмотря на то, что как при ГГЦ, так и после ПГГЦ отмечены изменения содержания нейромедиаторов в гипоталамических структурах, принимающих участие в формировании преовуляторного пика гонадолиберина, значимого изменения количества животных с нарушением эстрального цикла по сравнению с контрольной группой животных, не обнаружено (рис. 65). Однако показано, что обе модели оказали наиболее значимое воздействие на содержание биогенных аминов в гиппокампе, продемонстрированное в снижении содержания НА, 5-ОИУК и в модели ПГГЦ также и 5-ОТ, однако наблюдаемые эффекты наиболее выражены в модели ПГГЦ (рис. 64). Однако только в модели хронической ГГЦ на взрослых животных обнаружено повышение содержания NRG1 в гиппокампе, тогда как в гиппокампе половозрелых самок крыс после перенесенной ПГГЦ значимых отличий от контроля не установлено (рис. 66).

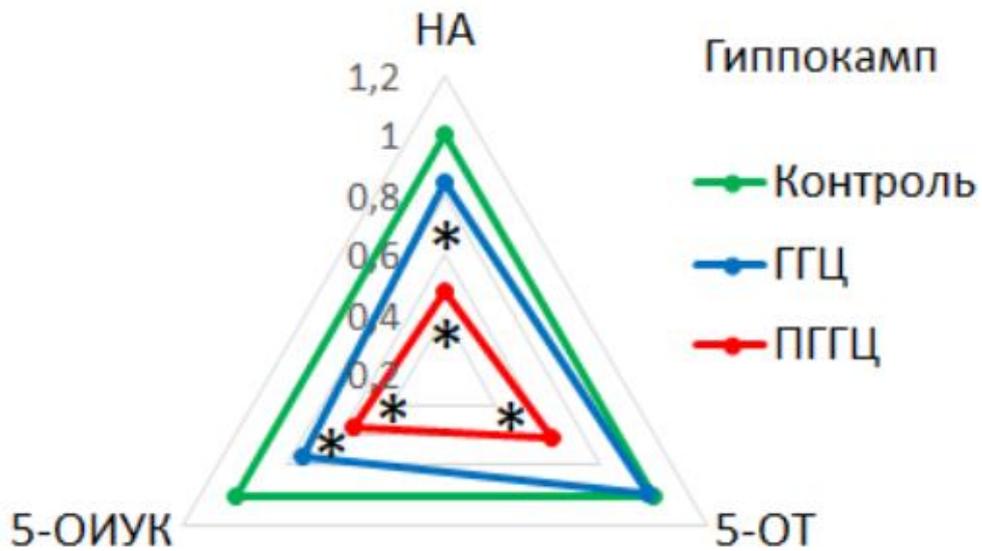
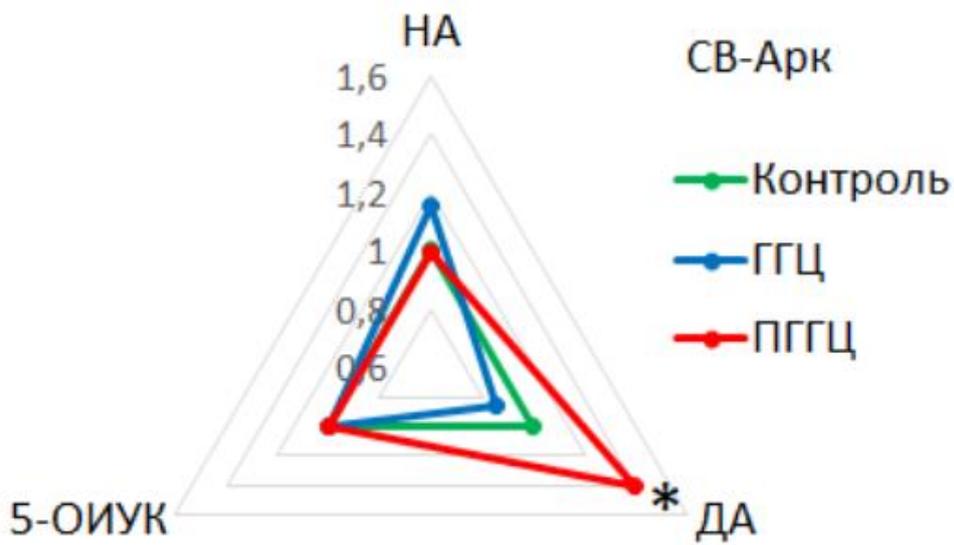
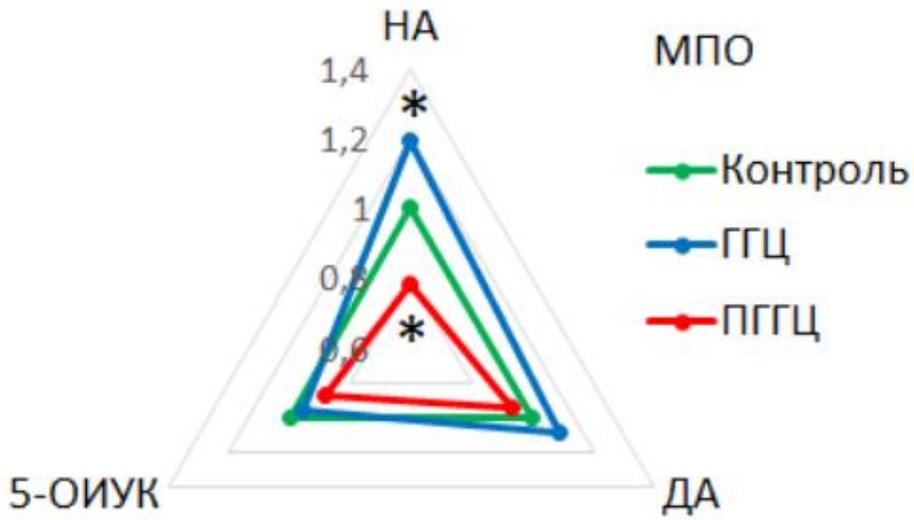


Рис. 64. Сравнение влияния различных моделей ГГЦ на содержание биогенных аминов в гипоталамусе и гиппокампе половозрелых самок крыс относительно соответствующих показателей контроля (за единицу принято значение (медиана) показателей в группах животных без метиониновой нагрузки, получавших воду (зеленая линия)). ГГЦ – хроническая 30-тидневная гипергомоцистеинемия, ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия; * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе после ГГЦ или ПГГЦ и в группе контроля

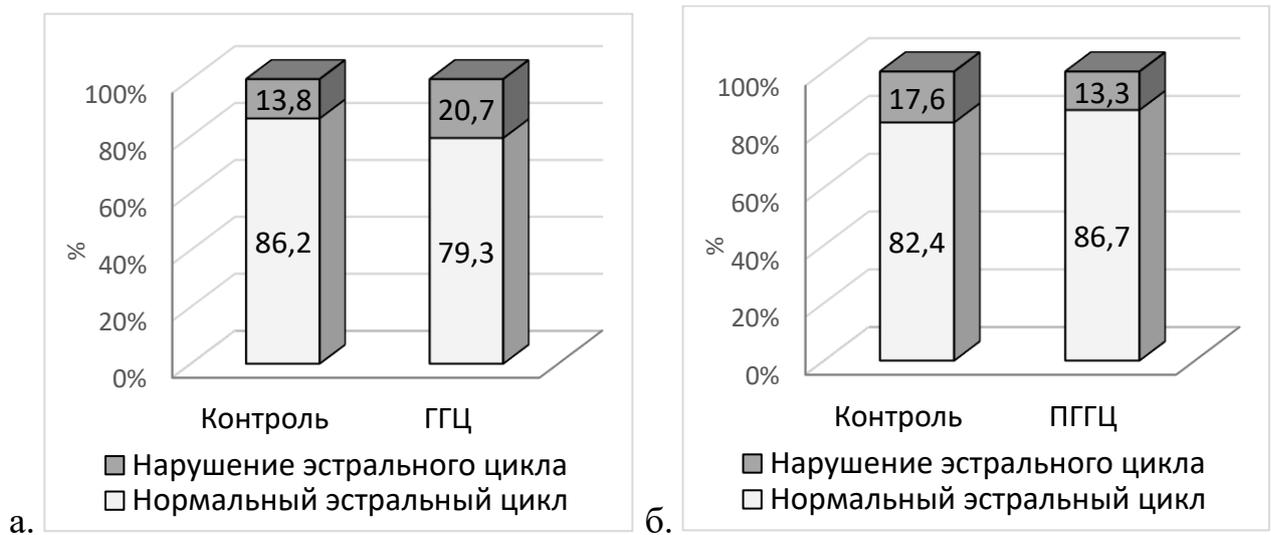


Рис. 65. Влияние различных моделей ГГЦ на продолжительность эстрального цикла у половозрелых самок крыс. а – частота встречаемости нарушения эстральных циклов у половозрелых самок крыс после хронической ГГЦ (n=29 в каждой группе); б – частота встречаемости нарушения эстральных циклов у половозрелых самок крыс после ПГГЦ (n=51 – в контрольной группе, n=45 – в группе после ПГГЦ); Нормальный эстральный цикл – наличие трех последовательных четырехдневных эстральных циклов. Нарушение эстрального цикла – отсутствие трех последовательных четырехдневных эстральных циклов, в связи с наличием иррегулярности, то есть удлинением или укорочением эстрального цикла за счет стадий диэструса или эструса.

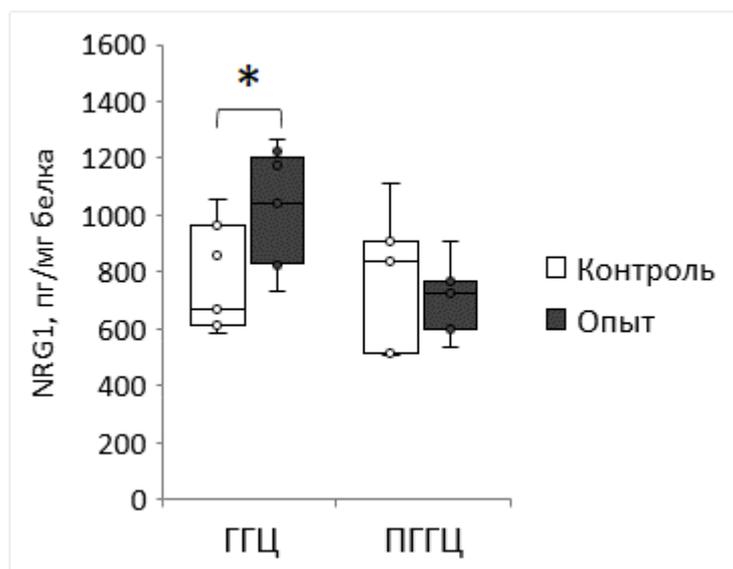


Рис. 66. Сравнение влияния различных моделей ГГЦ на содержание NRG1 в гиппокампе половозрелых самок крыс относительно соответствующего контроля. ГГЦ – хроническая 30-тидневная гипергомоцистеинемия, ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия; * - $p < 0,05$ – достоверные различия значения показателя в группе подопытных животных и в группе контроля

Таким образом, установлено, что как хроническая ГГЦ взрослых животных, так и перенесенная ПГГЦ приводит к снижению уровня биогенных аминов в гиппокампе половозрелых самок крыс, что в обеих моделях сопровождается нарушением различных видов памяти (рис. 6, 7, 61, 62). При этом хроническая ГГЦ вызывала менее выраженное снижение БА, и одновременно приводила к повышению уровня NRG1 в гиппокампе. Разнонаправленные изменения активности СОД в сыворотке крови и содержания НА в МПО и ДА в СВ-Арк, структурах гипоталамуса, ответственных за синтез и секрецию гонадолиберина, в рассмотренных моделях ГГЦ не сопровождаются нарушением эстрального цикла.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В проведенном исследовании подтверждено, что введение самкам раствора метионина уже через час приводит к повышению у них уровня ГЦ. Установлено, что экспериментальная ГГЦ является наиболее распространенным инструментом исследования механизмов нейротоксичности ГЦ [Yakovleva OV et al., 2018; Wyse ATS et al., 2021]. В ранних работах ГГЦ индуцировали путем введения животным производных ГЦ, в частности, SAH [Fonlupt P et al., 1979]. Впоследствии было установлено, что ГЦ, образуемый в процессе метаболизма метионина, может достигать высокого уровня в компартментах клетки, недоступных для экзогенного ГЦ [Sauls DL et al., 2007]. Поэтому внутриклеточный уровень метаболически генерируемого ГЦ в различных органах, в том числе в нервной системе, может быть значительно выше, чем при его экзогенном введении, даже несмотря на повышенный уровень ГЦ в крови. В связи с этим в последующем стали широко применяться экспериментальные модели ГГЦ, основанные на дополнительного введения животным метионина, [Yang Z et al., 2020; Yakovlev AV et al., 2022], так называемой метиониновой нагрузки [Хубутия МШ, Шевченко ОП, 2004]. Наиболее распространенным ее способом является потребление экспериментальными животными метионина с питьевой водой [Kovalska M et al., 2023]. При использовании этой модели ГГЦ был получен ряд интересных данных, раскрывающих молекулярные механизмы нейротоксичности ГЦ. Установлено, что ГГЦ вызывает повышение чувствительности нервных клеток к эксайтотоксическому окислительному повреждению *in vivo* и *in vitro* [Streck EL, 2003; Baydas G et al., 2006]. Пренатальная ГГЦ, модулируемая посредством метиониновой нагрузки при беременности, вызывает снижение когнитивных функций у потомства [Baydas G et al., 2008]. Показано, что токсический эффект ГЦ и ГЦК на процессы созревания мозга в условиях ГГЦ реализуется путем воздействия на метаболитные глутаматные рецепторы, а также изменения экспрессии нейроспецифических белков, принимающих участие в дифференциации нейронов и синаптогенезе [Baydas G et al., 2008]. Как уже отмечалось, существенным недостатком применяемой в описанных выше

исследованиях модели ГГЦ, является неконтролируемое потребление животными метионина при его приеме с питьевой водой. По данным Baydas G. и др., 2007 [Baydas G et al., 2007a], белые крысы при приеме метионина с питьевой водой в концентрации 1г/кг массы, которая обычно применяется в большинстве исследований, начиная со 2го дня приема, потребляли столько же воды, что и контрольные животные. Однако ранее, в наших экспериментах при данных условиях у значительной части подопытных крыс наблюдались признаки обезвоживания (потеря веса, вялость и т.п.) и сифункулятоз, обусловленного, по-видимому, ослаблением иммунитета [Arutyunyan AV et al., 2012]. Подобные негативные явления по нашему представлению являются недопустимыми, как при проведении исследований на взрослых, половозрелых самках, и, особенно, при проведении экспериментов на беременных самках, с последующей оценкой развития нервной системы плода и потомства. В связи с этим была предложена модель контролируемого принудительного перорального введения животным метионина. Нами продемонстрировано, что используемая схема введения метионина уже через час приводит к повышению уровня ГЦ в сыворотке крови как небеременных самок различного возраста, так и беременных самок крыс. Повышенный его уровень у небеременных самок сохраняется и через 24 часа, у беременных самок – через 18 часов, что указывает на более активный метаболизм ГЦ при беременности, а также, возможно, на высокое поглощение ГЦ плодом, с чем исследователи, в частности, предположительно связывают снижение его уровня в крови женщин с увеличением срока беременности [Cikot RJLM et al., 2007; Dai C et al., 2021b; Thakur P, Bhalerao A, 2023]. В целом, при ежедневном однократном пероральном введении метионина большую часть суток животное находится в состоянии ГГЦ. Отмечено, также, что хроническое его введение приводит к тому, что повышенный его уровень сохраняется и через 24 часа. Установлено, что более высокого уровня ГГЦ, чем в описанном исследовании можно достичь путем укорочения интервала времени, прошедшего после введения раствора метионина до забоя животного. Наиболее высокий уровень ГЦ наблюдается через 6 ч после приема метионина. Стоит отметить, что ежедневное

пероральное введение метионина через зонд в концентрации в 3 раза выше, применяемой нами концентрации, используется как описанная экспериментальная модель сосудистой деменции у крыс [Fayez AM et al., 2019; Khodir SA et al., 2022b]. При этом уровень ГЦ в сыворотке крови через 32 дня введения метионина составил ~17,5 мкмоль/л [Khodir SA et al., 2022b], что ~ в 2 раза выше по сравнению с нашей моделью, через 24 часа после введения метионина, однако в исследовании Khodir F. с соавторами не указывается точное время от последнего времени введения метионина до забора крови. В связи с тем, что объектом исследования в нашей работе являются различные отделы мозга, нами, в отличие от других работ, проведена оценка изменения в них уровня ГЦ при однократной метиониновой нагрузке. Показано, что в норме у молодых самок крыс, до введения метионина, содержание ГЦ в мозжечке и гиппокампе выше его уровня в коре и гипоталамусе. При этом значимое повышение уровня ГЦ отмечено в трех исследованных отделах. Так в гиппокампе максимальный подъем ГЦ показан через 6 ч. после введения метионина, тогда как в коре и гипоталамусе – через 3 ч. При этом через 24 ч. содержание ГЦ в них не отличается от значения данного показателя до введения метионина. При этом, в литературе имеются данные, что у самцов крыс после 30-тидневного хронического подкожного введения ГЦ его уровень повышен в коре и гиппокампе [Kumar M et al., 2017]. Выбранная нами схема введения метионина уже с первого дня приводит к повышению содержания ГЦ в гиппокампе, коре и гипоталамусе мозга, что предполагает также подобное его повышение во все последующие дни при ежедневном введении метионина каждые 24 часа.

Известно, что метионин способен проникать через гематоэнцефалический барьер [Young SN, Shalchi M, 2005; He W, Wu G, 2020; Wu G, 2021]. В мозге его максимальный уровень отмечается уже через 15-30 мин. после инъекции [Streck EL et al., 2002; Streck EL et al., 2003]. Транспорт ГЦ, образующегося при метаболизме метионина, опосредован различными транспортными системами клеток [Jiang X et al., 2007; Tsitsiou E et al., 2011]. Он имеет общие транспортеры с другими нейтральными аминокислотами [Budy B et al., 2006; Jiang X et al., 2007], что предполагает возможность его транспорта через гематоэнцефалический барьер. В

связи с этим, благодаря интенсивному транспорту метионина и ГЦ в исследуемые структуры мозга, непосредственно в них может быть реализован нейротоксический эффект как самого ГЦ, так и его метаболитов. Несмотря на то, что в исследовании изменение уровня ГЦ в структурах мозга при метиониновой нагрузке показано у самок крыс на самых ранних сроках беременности, особенности его метаболизма и транспорта позволяют экстраполировать полученные данные и на небеременных самок.

В настоящее время имеются некоторые сведения об изменении содержания биогенных аминов и их метаболитов в различных экспериментальных моделях ГГЦ в отделах головного мозга, прежде всего, связанных с формированием когнитивных функций [Gao L et al., 2012; Jadavji NM et al., 2015; Kumar M et al., 2017], однако, практически отсутствуют данные по влиянию ГГЦ на метаболизм биогенных аминов в структурах гипоталамуса, ответственных за регуляцию репродуктивной функции. Накопленные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие между факторами окружающей среды и эпигенетическими процессами, такими как метилирование ДНК и модификации хроматина, может играть роль в опосредовании неблагоприятных эффектов ГЦ, включая его влияние на регуляцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [Ngai YF et al., 2015]. Эффективный гидролиз SAH S-аденозилгомоцистеингидролазой (SAHN) необходим для поддержания реакций метилирования. Показано, что SAHN взаимодействует с DNMT1 и усиливает ее функциональный статус в клетках млекопитающих [Ponnaluri VKC et al., 2018]. Кроме того, SAHN контролирует циркадную экспрессию генов, взаимодействуя с основным активатором транскрипции CLOCK и BMAL1. У мышей ингибирование SAHN в гипоталамусе изменяет циркадную двигательную активность и ритмическую транскрипцию в супрахиазматическом ядре [Greco CM et al., 2020]. При этом циркадианные ритмы, в частности катехоламинов, в структурах гипоталамуса половозрелых самок крыс, связанных с регуляцией репродуктивной функции (МПО и СВ-Арк), способны нарушаться при ГГЦ [Korenevskii AV et al., 2014]. Известно, что нейроны ГнРГ экспрессируют только рецептор эстрогена ER β но не ER α или рецептор прогестина

(PR) [Fox SR et al., 1990; Hrabovszky E et al., 2000], однако они экспрессируют катехоламинергические рецепторы [Hosny S, Jennes L, 1998; Todman MG et al., 2005] и биогенные амины в данных структурах, прежде всего НА в ПО, являются важными нейротрансмиттерами регуляции обратной связи между стероидами яичников и секрецией ЛГ [Pau KY et al., 2000; Szawka RE et al., 2013]. В исследовании показано, что содержание биогенных аминов в структурах гипоталамуса, ответственных за синтез и секрецию ГнРГ имеет выраженную взаимосвязь с возрастом и снижается у старых животных, что, вероятно имеет причинно-следственные связи с изменением фона половых стероидов и угасанием репродуктивной функции. В литературе имеются некоторые данные о том, что в МПО, как и в других структурах гипоталамуса, с возрастом происходит значительное снижение концентрации биогенных аминов [Mohankumar PS et al., 1995; ThyagaRajan S et al., 1995; Tsunemi A et al., 2005; Portero-Tresserra M et al., 2020] и активности дофамин- β -гидроксилазы [Rahman MK et al., 2012]. Полученные результаты согласуются с данными Nicola et al., которые обнаружили снижение уровня НА в антеровентральном перивентрикулярном ядре (AVPV) ПО старых крыс, у которых уже отсутствовали нормальные эстральные циклы [Nicola AC et al., 2016]. Как известно, AVPV получает проекции норадренергических нейронов из голубого пятна и является важной областью экспрессии кисспептина-1 [Saper CB, Stornetta RL, 2015], который активирует репродуктивную ось путем непосредственной стимуляции нейронов, секретирующих ГнРГ и, следовательно, играет решающую роль в контроле у половозрелых самок грызунов, полового созревания и фертильности [Semaan SJ et al., 2012; Nicola AC et al., 2016]. Обнаружена также прямая активация НА адренергических рецепторов гонадолиберинергических нейронов (91% нейронов в стадию ДЭ и 50% - в стадию ПЭ), которая оказывает на них мощное, независимое от гонадных стероидов, подавляющее влияние [Han SK, Herbison AE, 2008], что возможно приводит к контролю чрезмерной непреовуляторной секреции ГнРГ. Таким образом НА в AVPV и в МПО участвует в генерации выброса ЛГ у самок крыс [Szawka RE et al., 2007; Szawka RE et al., 2013; Nicola AC et al., 2016].

У старых самок крыс, по сравнению с молодыми, в результате хронической метиониновой нагрузки происходит более значимое повышение уровня ГЦ, в сыворотке крови. При этом у них, уже на фоне низких уровней биогенных аминов в исследованных структурах гипоталамуса, изменения их содержания не наблюдается. Тогда как у молодых животных, на фоне нормального уровня БА, хроническая метиониновая нагрузка приводит к их изменениям, которые, однако, что очень важно, не приводят к нарушению эстральных циклов. С одной стороны, это может быть обусловлено активацией различных компенсаторных механизмов, в частности, связанных с работой опиоидной системы. Кроме того, подобные эффекты ГЦ на катехоламинергическую систему, могут приводить к иным нарушениям, помимо наиболее предполагаемого воздействия на формирование преовуляторного пика ГнРГ. Известно, что рассмотренная в нашем исследовании МПО гипоталамуса, также является ключевой областью, контролирующей сексуальное и материнское поведение [Balthazart J, Ball GF, 2007; Graham MD, Pfau JG, 2010; Snoeren EMS, 2019]

Показано, что $\alpha 1$ - и/или β -адренорецепторы участвуют в сексуальном поведении, и НА оказывает стимулирующее действие на рефлекс лордоза млекопитающих [Gonzalez-Flores O et al., 2007; Snoeren EMS, 2019], однако точные механизмы этого в настоящее время остаются невыясненными. При нормальных исходных условиях НА $\alpha 2$ -адренорецепторы в ПО не играют решающей роли в сексуальном поведении, но при повышенном уровне НА $\alpha 2$ -адренорецепторы приобретают большее значение, и приводят к торможению рефлекса лордоза у самок [Caldwell JD, Clemens LG, 1986; Snoeren EMS, 2019]. В нашем исследовании установлено, что у молодых самок крыс и половозрелых самок крыс среднего возраста с иррегулярными эстральными циклами, при ГЦ происходит увеличение уровня НА в МПО гипоталамуса, что, возможно, может повлечь за собой изменение их сексуального поведения. Предполагаемых причин повышения уровня НА в МПО при ГЦ может быть несколько. Имеются данные, что глутаматергические синаптические контакты могут усиливать высвобождение НА в ПО через NMDA-рецепторы и не-NMDA-рецепторы [Takahashi M et al., 2017].

При этом ГЦ, легко проникая через ГЭБ [Obeid R et al., 2007; Beard RS, Jr. et al., 2011; Curro M et al., 2014], реализует свои нейротоксические эффекты с участием ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов [Ziemińska E et al., 2003; Makhro AV et al., 2007; Boldyrev AA, 2009], гиперактивация которых является одним из основных механизмом действия ГЦ [Kruman II et al., 2000; Jara-Prado A et al., 2003]. Кроме того, в присутствии аденозина ГЦ эффективно преобразуется в SAH, понижая уровень метилирования молекул, который необходим для метаболизма нуклеиновых кислот, биогенных аминов и других нейротрансмиттеров [Zhu BT, 2002; Miller AL, 2008; Loscalzo J, Handy DE, 2014]. В связи с тем, что одним из двух основных ферментов метаболизма биогенных аминов является метилтрансфераза – COMT, снижение ее активности вследствие ингибирования SAH, может привести к накоплению БА. С повышенным уровнем ГЦ в крови связывают снижение количества метаболитов катехоламинов в ликворе [Bottiglieri T et al., 2000]

СВ-Арк гипоталамуса также является структурой, которая участвует в норадренергической регуляции сексуального поведения млекопитающих [Snoeren EMS, 2015]. Показано, что в СВ β -адренорецепторы, а не $\alpha 1$ -адренорецепторы, участвуют в стимулирующих эффектах НА [Scimonelli T et al., 2000], в то время как активация $\alpha 1$ -адренорецепторов может ингибировать рефлекс лордоза в этой области мозга [Foreman MM, Moss RL, 1978]. Нами отмечено повышение уровня НА в СВ-Арк у крыс среднего возраста с иррегулярными циклами при хронической ГГЦ, что также может приводить к чрезмерной активации его рецепторов.

Возможные механизмы воздействия ДА в контексте оценки сексуального поведения самок представляется более сложной задачей. Несмотря на то, что к настоящему времени получены некоторые данные по этому вопросу, зачастую они носят противоречивый характер. [Fernandez-Guasti A et al., 1987; Melis MR, Argiolas A, 1995; Ellingsen E, Agmo A, 2004; Ma ST et al., 2010; Snoeren EM et al., 2011; Snoeren EMS, 2019]. Самые известные дофаминергические нейроны гипоталамуса – это те, которые составляют тубероинфундибулярную ДА-систему. Клетки этих нейронов, располагающиеся в аркуатных и перивентрикулярных ядрах

гипоталамуса, проецируются на наружный слой СВ [Moore KE et al., 1980], что указывает на возможность достаточно активного участия ДА в процессах регуляции репродуктивной функции и полового поведения [Арутюнян А.В. и др., 2004]. Однако действие ДА опосредовано пятью различными подтипами рецепторов, которые являются членами большого надсемейства рецепторов, связанных с G-белком. Подтипы дофаминовых рецепторов делятся на два основных подкласса, D1-подобные и D2-подобные рецепторы, которые обычно связаны с Gs- и Gj-опосредованными системами трансдукции. В головном мозге различные подтипы рецепторов демонстрируют специфическое анатомическое распределение, при этом D1-подобные рецепторы являются в основном постсинаптическими, а D2-подобные рецепторы являются как пре-, так и постсинаптическими [Galvan A et al., 2014]. Доклинические исследования показали, что эстрадиол, тестостерон и прогестерон влияют на подтипы рецептора ДА и высвобождение ДА в МПО самок крыс [Matuszewich L et al., 2000]. Разнообразием рецепторов также можно объяснить различную роль ДА в женском сексуальном поведении. Показано, что при введении агентов, вызывающих небольшое повышение уровня ДА, лордозное поведение самок стимулировалось, в то время как индукция больших количеств дофамина приводила к ингибирующим эффектам [Stoof JC, Keabian JW, 1984]. Предположительно, стимулирование женского сексуального поведения связано с активацией пресинаптических рецепторов и, следовательно, последующим ингибированием высвобождения ДА и, в то время как ингибирование лордоза осуществляется через постсинаптические рецепторы. Исследования с антагонистами соответствующих рецепторов продемонстрировали, что рецепторы D2 преимущественно (или исключительно) вовлечены в поведение лордоза, чем рецепторы D1. [Grierson JP et al., 1988]. Эффекты влияния ДА и/или агонистов дофаминовых рецепторов на сексуальное поведение были обнаружены при их непосредственном введении в гипоталамус как в ПО, так и в аркуатных ядрах [Mani SK et al., 1994]. Однако, по другим данным, инфузия низких доз неселективного агониста дофаминовых рецепторов апоморфина непосредственно в ПО вызывает усиление копулятивного поведения

у самок. Тогда как высокие дозы того же препарата, по-видимому, не влияют на такое поведение. При этом другие компоненты женского сексуального поведения, в том числе и лордоз, не зависят ни от низких, ни от высоких доз агониста [Graham MD, Pfau JG, 2010]. В настоящее время считается, что ДА может оказывать два разных эффекта на сексуальное поведение самок, воздействуя на разные рецепторы в определенных популяциях нейронов с измененным балансом в D1 и D2 рецепторах [Graham MD, Pfau JG, 2012]. Неоднозначность интерпретации причин и следствий изменения уровня ДА в различных структурах гипоталамуса подтверждается полученными нами данными, которые показали, что изменение ДА в МПО может зависеть от различных факторов. При этом у взрослых половозрелых самок достоверных изменений в уровне ДА в МПО и СВ-Арк на фоне ГГЦ обнаружено не было, однако, после перенесенной пренатальной ГГЦ у взрослого потомства женского пола отмечено значительное повышение ДА в СВ-Арк, что может указывать на возможное нарушение формирования у них нормального сексуального поведения. При этом подобные заключения носят лишь характер предположения, так как роль ДА в контроле сексуального поведения по мнению ряда авторов достаточно сильно преувеличена, и может быть более существенной в регуляции иных функций, в частности, двигательной активности [Paredes RG, Agmo A, 2004]. Также с повышением уровня НА и ДА у старых животных в гипоталамусе при различной терапии связывают улучшение пространственной памяти [Pyrzanowska J et al., 2012].

Необходимо отметить, что даже в пределах гипоталамуса, те или иные воздействия могут не оказывать влияния на уровни биогенных аминов в одних его ядрах, но при этом изменять их содержание в других. Кроме того, наблюдается особенная зависимость эффектов воздействия от пола животного [Yardimci A et al., 2023]. Однако в нашем исследовании, в целом, показано, что содержание моноаминов и метаболита 5-ОТ в исследованных структурах гипоталамуса имеет корреляционные взаимосвязи, что возможно является следствием того, что они связаны с реализацией общей функции. Исходя из этого можно предположить, что воздействие ГГЦ, приводя к повышению уровня НА в МПО, влияет также и на

изменение содержания других биогенных аминов в исследуемых структурах, однако данный эффект менее выражен и не достигал статистической значимости, что возможно обнаруживалось бы при увеличении периода воздействия или при использовании модели ГЦ с более выраженным повышением уровня ГЦ. Следует отметить, что, например, другое нейротоксическое соединение — диметилгидразин, при метаболизме которого образуется большое количество свободных радикалов, оказывающих повреждающее действие на клетки головного и спинного мозга [Sasaki YF et al., 1998], лишь незначительно изменял содержание биогенных аминов в этих структурах, нарушая их нормальную суточную динамику [Milyutina YP et al., 2010].

Помимо упомянутого ранее нейротоксического влияния на глутаматные рецепторы, цитотоксические эффекты воздействия ГЦ характеризуется рядом других проявлений: окисление, гипометилирование, гомоцистеинелирование белка [Sharma GS et al., 2015], активация металлопротеиназ, повреждение теломер [Perez FP et al., 2007]. Все эти патологические процессы связывают также и с процессом старения. В данном же исследовании, при анализе главных компонент показано, что изменение уровня большинства биогенных аминов в структурах гипоталамуса, зависит и значимо различается от экспериментальных условий, связанных с изучением возрастных изменений в гипоталамусе, при этом изменение содержания ГЦ в сыворотке крови в слабой степени обусловлено действием выделенного фактора. Стоит отметить, что большинство значимых нейротоксических эффектов ГЦ продемонстрировано не столько *in vivo*, сколько в системе *in vitro*. Так, на культуре клеток мозжечка показано, что ГЦ активирует NMDA-рецепторы, в результате чего происходит повышение уровня ионизированного кальция и увеличение продукции АФК в нейронах [Boldyrev A et al., 2004]. Последнее приводит к развитию ОС, что считают одной из причин токсического эффекта ГЦ [Sharma GS et al., 2015; Tchanchou F et al., 2020]. Отмечено, что инкубация нейронов с антиоксидантными ферментами СОД или каталазой снижает негативный эффект ГЦ [Kim W-K, Paе Y-S, 1996]. Одним из наиболее существенных проявлений токсического эффекта ГЦ является окислительное

повреждение ДНК [Huang R-FS et al., 2001; Matte C et al., 2009a]. Предполагают, что это вызвано повышением активности нуклеаз под влиянием АФК, прежде всего гидроксил-радикала [Matte C et al., 2009a], а также супероксидного радикала и пероксида водорода [Kim W-K, Pae Y-S, 1996], образующихся при аутоокислении ГЦ [Faraci FM, Lentz SR, 2004]. Известно также, что при ГГЦ нарушается работа NO-синтазы [Nemanth Kumar B et al., 2016; Bhatia P, Singh N, 2020; Khodir SA et al., 2022b], в результате чего происходит накопление мощного окислителя — пероксинитрита [Zhang X et al., 2000; Ganapathy PS et al., 2011], что также приводит к повреждению ДНК, липидов и белков [Faraci FM, 2003; Cobb CA, Cole MP, 2015; Morris G, Berk M, 2015] и может стимулировать процессы некроза и апоптоза [Ramdial K et al., 2017]. Исследования показали, что пероксинитрит способен ингибировать различные ферменты путем нитрования специфических остатков тирозина, причем одним из ферментов-мишеней является митохондриальная СОД [MacMillan-Crow LA et al., 1996; Yamakura F et al., 1998; Faraci FM, 2003]. При этом в нашем работе не отмечено корреляций между уровнем биогенных аминов и показателями окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот в гипоталамусе. Изменения уровня данных маркеров также не наблюдалось, однако отмечено снижение активности СОД в гипоталамусе самок крыс при ГГЦ. В другом же исследовании показано, что длительная метиониновая нагрузка приводит к повышению уровня окислительной модификации белков и липидов в мозге мышей с одновременным снижением активности основных антиоксидантных ферментов [Mostafa MD et al., 2022]. Хроническое введение метионина в более высоких концентрациях, чем в нашем исследовании, приводит к снижению активности СОД и повышению уровня МДА в гиппокампе [Khodir SA et al., 2022a]. Введение ГГЦ самцам крыс в течение месяца также снижает активность и содержание СОД и каталазы в коре, что сопровождается увеличением в ней повреждения белков и ДНК [de S. Moreira D et al., 2017]. Однако имеются данные о том, что, например легкая ГГЦ, вызванная введением ГЦ в течение 30 дней, которая у самцов крыс приводит к увеличению повреждения ДНК в миндалевидном теле и префронтальной коре, напротив, приводит к увеличению в

них активности ферментов антиоксидантной защиты [dos Santos TM et al., 2019b], что возможно является ранним компенсаторным ответом. В целом, известно, что ГЦ ингибирует активность и экспрессию СОД, гемоксигеназы-1 и глутатионпероксидазы [Urchurch GR, Jr. et al., 1997; Sawle P et al., 2001]. У молодых животных при введении метионина наблюдается значительное снижение активности СОД, что может быть обусловлено как ее инактивацией пероксинитритом [Hooijmans CR et al., 2009], так и уменьшением общего количества фермента вследствие расхода на утилизацию супероксидных радикалов, образующихся при ГЦ. Таким образом, предположительно, ГЦ различной степени тяжести может либо приводить к увеличению активности антиоксидантных ферментов в структурах мозга, либо, при более выраженном токсическом воздействии – к их снижению, что показано также и в нашем исследовании. Известно, что с возрастом также происходит снижение ферментативной активности антиоксидантов, прежде всего СОД [Dubinina EE, Pustygina AV, 2007], что подтверждается полученными в нашем исследовании данными на 22–24-месячных животных, однако введение метионина лишь незначительно снижает активность данного фермента. При этом нельзя предположить, что действие ГЦ у старых животных сопровождается меньшим накоплением АФК. Возможно, данные результаты объясняются тем, что с возрастом, при достаточно сниженной активности СОД, усиливается роль других компонентов антиоксидантной защиты. Отмечено, что у старых животных увеличивается количество глутатионпероксидазы в митохондриях [Ji LL et al., 1991], то есть эффективность антиоксидантной защиты возрастает. Остается также слабо изученной взаимосвязь содержания биогенных аминов и уровня генерации АФК. Существует достаточно много сведений о том, что в мозге катехоламины, подвергаясь аутоокислению, а также ферментативному окислению под воздействием MAO, могут служить источником АФК [Bolton JL et al., 2000; Zhu BT, 2002; Cogley JN et al., 2018]. Следовательно, избыток НА в структурах гипоталамуса, образующийся при ГЦ, также может способствовать чрезмерному образованию в них АФК. Фактом, что в норме при окислении биогенных аминов

образуется, главным образом, H_2O_2 , можно объяснить обнаруженную нами корреляцию между содержанием биогенных аминов и аскорбиновой кислоты. Последняя, как известно, выполняет несколько функций в головном мозге и нейронах. Как антиоксидант, она катализирует восстановление железа, в большом количестве находящегося в мозге, бивалентные ионы которого быстро реагируют с пероксидными радикалами. Кроме того, аскорбиновая кислота усиливает биосинтез катехоламинов [Seitz G et al., 1998], так как, с одной стороны, является донором электронов для дофамин- β -гидроксилазы [Bornstein SR et al., 2003], а с другой — способствует регенерации тетрагидробиоптерина, являющегося кофактором тирозингидроксилазы при синтезе L-3,4-дигидроксифенилаланина [Seitz G et al., 1998; May JM et al., 2013]. Поэтому, несмотря на то что отмечена только тенденция к повышению уровня АК в гипоталамусе при ГГЦ, наличие корреляционных связей с уровнями БА, позволяет предположить ее возможную роль в повышении НА в МПО и СВ-Арк самок крыс при метиониновой нагрузке.

Полученные в нашей работе данные указывают на скорее слабое токсическое воздействие ГЦ и его метаболитов на гипоталамические структуры половозрелых самок крыс. Вероятно, при повышении концентрации ГЦ в крови большинство своих токсических эффектов он реализует прямо в сосудах, влияя на клетки эндотелия, пролиферацию гладкомышечных клеток сосуда и форменные элементы крови [Boldyrev AA, 2009; Ganguly P, Alam SF, 2015; Gurda D et al., 2015; Nemanth Kumar B et al., 2016]. Известно, что ГГЦ оказывает неблагоприятное влияние на регуляцию сосудистого тонуса, обмен липидов и коагуляционный каскад [Subbotina TF, Zhloba AF, 2013; Bhatia P, Singh N, 2020], показано, что ГЦ связывается с белками плазмы, которые ассоциированы с ремоделированием сосудистой стенки [Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., 2013]. Предположение подкрепляется полученными нами данными о том, что на фоне ГГЦ в сыворотке крови молодых самок крыс происходит снижение активности СОД, а также увеличение содержания маркеров окислительной модификации макромолекул, которые имеют положительную корреляцию с уровнем ГЦ в сыворотке крови. Таким образом наши результаты соотносятся с тем тезисом, что несмотря на

описанные в литературе нейротоксические эффекты ГЦ, его считают слабым нейротоксином [Ziemińska E et al., 2003]. Цитотоксический эффект *in vitro* описан только при концентрации ГЦ, превышающей 0,1 ммоль/л [Kim W-K, Paе Y-S, 1996; Troen AM, 2005]. Кроме того, возможно, у взрослых, а также у старых крыс данная модель ГЦ не приводит к стойкому нарушению метионинового цикла. Нормальная работа ферментов метаболизма метионина, даже при повышенном его потреблении в течение длительного времени, постепенно метаболизирует избытки ГЦ в организме и предотвращает его спонтанное окисление, препятствует накоплению ГЦК, а также гомоцистеин-тиолактона и других продуктов, опосредующих выраженные токсические эффекты ГЦ [Jakubowski H, 2004; 2006]. С другой стороны, имеются данные, что уровень ГЦ в мозге после его подкожной инъекции снижается медленнее, чем в плазме, что, по мнению исследователей, связано с тем, что в головном мозге ниже активность ферментов метаболизма ГЦ [Streck EL et al., 2002]. В связи с этим нейротоксические эффекты ГЦ следует ожидать именно при хронической ГЦ. Так показано, что пероральное ежедневное введение метионина через зонд в течение 5 недель приводит к значительному увеличению уровня глутамата и существенному снижению уровня ГАМК в мозге мышей, что частично ингибировалось, введением антиоксидантов. Также в данной модели при ГЦ в мозге мышей обнаружено снижение уровня антиапоптотического белка Bcl-2, тогда как уровни проапоптотических белков p53, Вах, каспазы-9 и каспазы-3 были значительно увеличены [Mostafa MD et al., 2022].

При анализе гиппокампа, также как и в МПО и СВ-Арк гипоталамуса, было показано снижение уровня биогенных аминов у старых животных. Известно, что с возрастом мозг претерпевает ряд физиологических и функциональных изменений, которые могут привести к большей восприимчивости к воздействию нейротоксических агентов и развитию нейродегенеративных расстройств. Возрастные биохимические изменения включают изменение уровней нейротрансмиттеров, и периферических гормонов, а также их рецепторных взаимодействий. Преимущественно отмечают снижение уровней моноаминов, активности ферментов их синтеза и чувствительности рецепторов [Tanila H et al.,

1994; Stemmelin J et al., 2000; Lee JJ et al., 2001; Tsunemi A et al., 2005; Esteban S et al., 2010; Sarubbo F et al., 2017]. Имеется ряд исследований в которых указывается на отсутствие возрастных изменений моноаминов, например, в гиппокампе экспериментальных животных [Von Linstow CU et al., 2017], или, в более ранних работах – их возрастное повышение в коре [Harik SI, McCracken KA, 1986; Godefroy F et al., 1991]. Изменения в стареющем мозге весьма неоднородны. Имеются данные, что именно в гиппокампе, лобной коре и полосатом теле они проявляются наиболее значимо [Abbott A, 2012]. Также возрастные изменения наблюдаются в таламусе, гипоталамусе, мозжечке и стволе мозга [Anderton ВН, 2002], тогда как одной из наименее затронутых областей является затылочная кора [Fjell AM, Walhovd KB, 2010].

Большинство исследований показывают, что в гиппокампе самцов экспериментальных животных с возрастом снижается уровень моноаминергических нейротрансмиттеров, таких как ДА [Tanila H et al., 1994; Míguez JM et al., 1999], НА и 5-ОТ [Tanila H et al., 1994; Stemmelin J et al., 2000; Tsunemi A et al., 2005; Esteban S et al., 2010; Sarubbo F et al., 2017], что согласуется с полученными нами данными. Имеются данные, которые показывают, что старение, приводит к увеличению соотношения 5-оксииндолуксусная кислота/серотонин (5-ОИУК/5-ОТ) в лобной коре, миндалевидном теле и полосатом теле [Míguez JM et al., 1999]. Мы подтвердили эти данные и в отношении гиппокампа.

Однако, в отличие от рассмотренных структур гипоталамуса в гиппокампе половозрелых самок отмечено снижение биогенных аминов при воздействии хронической ГЦ. Эти результаты согласуются с данными, полученными в исследованиях Gao et al, которые ранее показали, что у крыс, находящихся на диете с высоким потреблением метионина, наблюдали снижение содержания ДА и 5-ОТ в коре головного мозга [Gao L et al., 2012]. По другим данным, хроническое 30-тидневное подкожное введение ГЦ половозрелым самцам крыс также приводило к снижению у них уровня 5-ОТ в коре и гиппокампе, НА только в гиппокампе и ДА исключительно в коре. Причем снижение биогенных аминов у этих животных

сопровождается увеличением активности МАО [Kumar M et al., 2017]. Эти результаты согласуются также с данными, полученными в другом исследовании *in vitro*, в котором показано, что внутриклеточный дофамин связан с уязвимостью дофаминергических нейронов к токсичности ГЦ. Авторы предполагают, что при увеличении внутриклеточного метаболизма ГЦ усиливается работа СОМТ и МАО с образованием перекиси водорода, что и провоцирует развитие ОС с последующей гибелью нейронов [Imamura K et al., 2007].

Подобные разнонаправленные изменения монаминергических систем в различных отделах мозга показано и при воздействии других нейротоксических агентов, например, толуола [Alfaro-Rodriguez A et al., 2011]. Многочисленные исследования доказали, что катехоламинами, такими как НА или ДА модулируется консолидация и восстановление памяти [Liang KC et al., 1986; McGaugh JL, Roozendaal B, 2002; Lalumiere RT et al., 2004; Murchison CF et al., 2004]. Введение блокаторов НА в гиппокамп ухудшают контекстуальную память у мышей [Murchison CF et al., 2004]. На фоне улучшения когнитивных функций и координации движений у старых крыс при различной терапии отмечают также повышение уровня НА и 5-ОТ в гиппокампе [Esteban S et al., 2010; Pyrzanowska J et al., 2012; Sarubbo F et al., 2015; Ramis MR et al., 2016; Sarubbo F et al., 2017], обусловленное повышением активности ферментов синтеза моноаминов - триптофангидроксилазы и тирозингидроксилазы [Ramis MR et al., 2016], однако, корреляции между гиппокампальным уровнем НА и параметрами физиологических тестов у крыс обнаруживаются не всегда [Pyrzanowska J et al., 2012]. Кроме того, эффект зачастую наблюдался именно у старых животных, не приводя к избыточному увеличению уровня моноаминов у молодых животных [Tsunemi A et al., 2005].

В нашем исследовании мы не оценивали поведенческие тесты у старых самок крыс, так как хорошо известно, что старение характеризуется ухудшением пространственной рабочей памяти, анализируемой с помощью теста радиального лабиринта, эпизодической памяти, в тесте на распознавание новых объектов и ухудшение координации движений и пространственного обучения. Старые крысы

тратят больше времени и обычно допускают больше ошибок, чем молодые крысы при выполнении различных заданий [Ramis MR et al., 2016; Sarubbo F et al., 2017]. При этом никаких различий в двигательной активности не наблюдалось. Уровень беспокойства и исследования в открытом поле (посещаемые места, мочеиспускание и дефекация) с возрастом также не изменялись [Sarubbo F et al., 2017].

Сходные результаты были получены нами и при исследовании половозрелых самок крыс после ГГЦ. Так у них отсутствовали отклонения в ОИП, однако показано ухудшение кратковременной, долговременной памяти, а также пространственного обучения. Нарушение памяти и обучения показано также у половозрелых мышей-самцов после ГГЦ, вызванной 35-тидневной метиониновой нагрузкой с питьевой водой [Mostafa MD et al., 2022] и у половозрелых крыс-самцов после хронического перорального 32-хдневного введения L-метионина [Khodir SA et al., 2022b]. В последнем случае исследователи также обнаружили увеличение у крыс с ГГЦ увеличение тревожности, однако стоит отметить, что при этом они вводили в 3 раза более концентрированный раствор метионина, по сравнению с нашей метиониновой нагрузкой. Подобное снижение когнитивных функций может быть связано с дисфункцией гематоэнцефалического барьера, вызванной ГГЦ [Kamath AF et al., 2006; Beard RS, Bearden SE, 2011; Tawfik A et al., 2021]

Таким образом, эффекты хронической ГГЦ на уровне гиппокампа и рассмотренных структур гипоталамуса половозрелых животных значительно различаются. В гипоталамических структурах, связанных с реализацией репродуктивной функции, отмечается повышение уровня отдельных БА, что при этом не приводит к нарушению эстральных циклов, тогда как в гиппокампе происходит снижение уровня рассмотренных БА, что сопровождается нарушением когнитивных функций.

В связи с тем, что одним из основных, наблюдаемых нами и другими исследователями, эффектов воздействия ГГЦ, является когнитивная дисфункция [Huang Y et al., 2020], кора и гиппокамп преимущественно являются основными

объектами изучения [Fang M et al., 2014; de S. Moreira D et al., 2017; dos Santos TM et al., 2019b; Tchanchou F et al., 2020]. Показано, что ГЦ и образующаяся ГЦК индуцируют апоптоз в культурах нейронов гиппокампа *in vitro* [Kruman, II et al., 2000; Makhro AV et al., 2007; Boldyrev AA, 2009]. Внутримозговая инъекция ГЦ приводит к ремоделированию синапсов в гиппокампе мышей, а также вызывает повышенную экспрессию рецепторов NMDA и их мРНК [Kamat PK et al., 2016]. *In vivo* при хронической ГЦ происходит снижение активности цистатионин- γ -лиазы, CBS [Kumar M et al., 2017], а также Na⁺K⁺-АТФазы в гиппокампе [Streck EL et al., 2002], поддержание нормальной активности которой имеет решающее значение для нормальной функции мозга, а снижение связано с избирательным повреждением нейронов [Lees GJ et al., 1990; Crema L et al., 2010; Zhang X et al., 2022]. У самцов после хронической ГЦ обнаружено значительное увеличение пикнотических нейронов в коре головного мозга, зубчатой извилине и СА1 и СА3 зонах гиппокампа [Kumar M et al., 2017; Khodir SA et al., 2022a; Mostafa MD et al., 2022; Kovalska M et al., 2023]. В гиппокампе после длительной метиониновой нагрузки у взрослых мышей выраженные гистологические изменения, указывающие на развитие атрофических процессов, характеризуются уменьшением толщины пирамидного слоя с потерей клеток, а также расширением кровеносных капилляров и воспалительной инфильтрацией клеток, в первую очередь лимфоцитов [Mostafa MD et al., 2022]. У самцов крыс в зубчатой извилине даже при слабой хронической ГЦ, вызванной потреблением метионина с питьевой водой в течение 30 дней, отмечается увеличение TUNEL-позитивных клеток, снижение количества нейронов, увеличение количества астроглиальных клеток, существенная активация микроглии [Kovalska M et al., 2023]. В пирамидном слое гиппокампа при хроническом введении метионина увеличивается процент каспазо-3-положительных и снижается процент Ki-67-положительных клеток, [Khodir SA et al., 2022a], что указывает на активацию апоптоза и нарушение нейрогенеза [Kee N et al., 2002]. Снижение экспрессии Ki-67 может являться следствием установленного снижения уровня BDNF [Pansri P et al., 2021; Khodir SA et al., 2022a]. На фоне умеренной хронической ГЦ отмечено повышение уровня

провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 в коре [de S. Moreira D et al., 2017]. В гиппокампе препубертатных крыс уровень данных цитокинов также повышается, однако при более выраженной ГЦ [da Cunha AA et al., 2012b]. В другом исследовании показано, что уже 7 дней введения ГЦ приводят к стрессу эндоплазматического ретикулума и снижению экспрессии нейротрофина BDNF в гиппокампе крыс, а также к увеличению количества TUNEL-позитивных нейронов в области CA1 [Wei HJ et al., 2014]. У половозрелых самок мышей с ГЦ, вызванной дефицитом цистатионин-бета-синтазы (CBS) наблюдались повышенные уровни регулируемой киназы 1A для тирозин-(Y)-фосфорилирования с двойной специфичностью (DYRK1A), сверхэкспрессия которой приводит к гибели нейронов и нейродегенерации [Wegiel J et al., 2011].

Отдельный интерес представляют данные, которые были получены нами при анализе отдельных отделов мозга беременных самок крыс, на основании которых также можно сделать некоторые выводы по влиянию ГЦ на мозг взрослого организма. Разумеется, полученные эффекты могут быть обусловлены тем, что это беременные самки, а длительность ГЦ была практически в 2 раза короче, и данные факторы могут иметь существенное значение, но в настоящем исследовании не ставилась задача сравнения влияния ГЦ на беременных и небеременных самок крыс. Интерес прежде всего представляют данные, полученные по влиянию ГЦ на уровень отдельных изоформ NTs. NTs являются важными регуляторами функции нейронов в развивающемся и взрослом мозге и, таким образом, играют критическую роль в поддержании нормальной поведенческой функции [Souchet B et al., 2015]. Наиболее изученным из них является BDNF. В норме, содержание белка BDNF в гиппокампе выше, чем, например, в коре [Souchet B et al., 2015], что согласуется с полученными нами данными. Относительно недавно BDNF стал рассматриваться как возможная мишень для влияния ГЦ [Gao L et al., 2012; Souchet B et al., 2015] [Wei HJ et al., 2014].

При внутримозговой инъекции ГЦ отмечено снижение экспрессии белка BDNF и мРНК BDNF в гиппокампе мышей [Kamat PK et al., 2016]. В ряде исследований также показано, что у лабораторных животных при различных

моделях ГГЦ снижены уровни BDNF в спинномозговой жидкости и гиппокампе [Matte C et al., 2009b; Wegiel J et al., 2011; Gao L et al., 2012; Wei HJ et al., 2014; Souchet B et al., 2015], в том числе именно в моделях с метиониновой нагрузкой [Gao L et al., 2012; Khodir SA et al., 2022b]. Показано, что однократное («острое») введение ГЦ приводит к снижению зрелой формы BDNF (mBDNF) в гиппокампе уже через 1 ч. после введения, при этом, данный эффект нивелировался через 24 ч., тогда как, например, в коре данные исследователи не обнаружили изменений уровня BDNF ни через 1 ч., ни через 24 ч. [Matte C et al., 2009b]. Ряд исследователей также отмечают, что ГГЦ, вызванная хронической метиониновой нагрузкой в течении 2-6 месяцев не приводит к статистически значимому снижению BDNF в коре [de Rezende MM, D'Almeida V, 2014]. Таким образом, судя по имеющимся в литературе данным по влиянию ГГЦ на взрослых животных, влияние на экспрессию NTs преимущественно отмечено в гиппокампе, а не в коре. Однако в представленном нами исследовании показано, что у беременных крыс происходит снижение содержания изоформы BDNF 14 кДа, соответствующей mBDNF в коре и гипоталамусе, при этом, в отличие от других исследователей, мы не обнаружили значимого изменения содержания ни одной из обнаруженных изоформ BDNF в гиппокампе, также, как и в мозжечке. Необходимо отметить, что представленные ранее экспериментальные работы были выполнены преимущественно на самцах, либо небеременных самках, в связи с этим, полученные нами данные о том, что изменения содержания изоформ BDNF в гиппокампе при ГГЦ носят лишь характер тенденции, возможно связаны с фактом наличия беременности. Со снижением содержания BDNF и его рецептора TrkB в гиппокампе во время беременности, связывают развитие неблагоприятных последствий различных видов стресса, которым может подвергаться организм в данный период, в частности усиление депрессивного поведения во время беременности и в послеродовой период [Maghsoudi N et al., 2014]. Различные воздействия во время беременности характеризуются снижением уровня BDNF в гиппокампе, которое может служить маркером их неблагоприятных эффектов [Shojaei S et al., 2015; Miao Z et al., 2017; Vanmierlo T et al., 2018; Rezaei S et al., 2021]. Поэтому отсутствие изменений уровня

BDNF в гиппокампе беременных самок крыс при ГГЦ, полученное в нашем исследовании, по сравнению с его снижением, отмеченном во множестве других работ, выполненных на самцах или небеременных самках, указывает на то, что организм при беременности способен адаптивно обеспечить защиту от неблагоприятного воздействия ГГЦ. Подобное заключение было также сделано другими исследователями при сравнении эффектов иммобилизационного стресса на индукцию апоптоза нейронов гиппокампа у небеременных и беременных самок крыс [Moosavi M et al., 2011], что в совокупности с полученными нами результатами свидетельствует об усилении нейропластичности при беременности. Наличие противоречивых данных по изменению уровня BDNF в коре может быть связано с тем, что в ряде представленных работ исследовался общий уровень BDNF, проанализированный методом ELISA. При данном подходе, исключающем анализ отдельных изоформ NTs, существует большая вероятность того, что значимые различия не будут выявлены, так как в исследуемых областях мозга, как показано в нашем исследовании, методом иммуноблоттинга, обнаруживается достаточно низкий уровень mBDNF по сравнению с его про-формой 39 кДа.

В проведенном нами исследовании метиониновая нагрузка беременных самок крыс в течение 16 дней не приводила к изменению уровня NGF ни в одной из исследованных структур. В данном случае, NGF, определяемый как изоформа 30 кДа, соответствует его про-форме. Другими исследователями также показано, что только длительное введение ГЦ, в течение 15 месяцев, приводит к повышению уровня NGF в коре мозга крыс, при этом даже 5-месячное введение ГЦ не сопровождается изменением данного показателя [Pirchl M et al., 2010].

Установлено, что proNTs и mNTs оказывают различное влияние на выживание и функционирование нейронов. P75NTR связывает все NTs, в то время как TrkA, TrkB и TrkC предпочтительно связывают зрелые формы NGF, BDNF, а также NT4 и NT3 соответственно. [Boutillier J et al., 2008]. В последние годы появляется все больше данных о том, что P75NTR, является плеiotропной сигнальной молекулой и многие исследования представили новую информацию о различных функциях, выполняемых p75NTR [Sasi M et al., 2017; Wong L-W et al., 2022], которые гораздо

шире, чем его хорошо известная роль в активации процесса апоптоза [Troy SM et al., 2002; Bhakar AL et al., 2003; Boskovic Z et al., 2014; Yang B et al., 2021]. При этом показано, что нейродегенеративные заболевания и изменения в условиях окружающей среды, такие как ОС и гипоксия, играют роль в передаче сигналов гибели нейронов, опосредованных именно P75NTR [Kraemer BR et al., 2014; Sankorrakul K et al., 2021; Geng W et al., 2022]. Кроме того, proBDNF оказывает негативное влияние на нейрональные механизмы, участвующие в процессах обучения и памяти, что также указывает на противоположную роль, которую он играет по сравнению с mBDNF в развитии синаптической пластичности [Dincheva I et al., 2016]. Однако имеются данные, что добавление метионина способно увеличивать метилирование ДНК и снижать экспрессию мРНК BDNF в мозге крыс, в частности, в гипоталамусе [Idriss AA et al., 2020] и гиппокампе [Parrish RR et al., 2015]. Однако, с другой стороны, учитывая, что ГГЦ может приводить к снижению метилирования промоторов отдельных генов [Zhang D et al., 2012; Ma SC et al., 2017], можно также ожидать увеличение экспрессии генов NTs и содержания соответствующих белков. В нашем исследовании при ГГЦ мы не обнаружили значимого повышения содержания про-форм NTs в исследованных структурах мозга, более того, в коре отмечено также снижение уровня proBDNF 29 кДа. Таким образом, характер изменения содержания отдельных изоформ BDNF, скорее указывает не на изменение его экспрессии, а на интенсивное использование его зрелой формы.

На сегодняшний день, имеющиеся в литературе данные, не дают цельного представления об изменении процессов метилирования при различных моделях ГГЦ. Наиболее распространенное представление о том, что в условиях хронической ГГЦ и накопления SAH, а, следовательно, ингибирования большинства метилтрансфераз путем ингибирования продуктом реакции, наблюдается снижение как общего метилирования, так и метилирования промоторов отдельных генов, в настоящее время рассматривается уже не так однозначно. Действительно, большое количество исследований подтверждают тот факт, что ГГЦ может приводить к глобальному гипометилированию ДНК [Yi P et

al., 2000; Jiang Y et al., 2007]. SAH-опосредованное гипометилирование ДНК промоторных областей гена приводит к селективной активации генов, что способствует усиленному повреждению клеток [Kim CS et al., 2011]. Эти результаты отчасти подтверждаются в исследовании культур клеток в системе *in vitro*. Так в отдельных исследованиях было показано, что изменение концентрации SAH и соотношения SAH/SAM при воздействии ГЦ может приводить к снижению активности ДНК-метилтрансфераз (DNMT) в нейрональных стволовых клетках. ГЦ также снижает экспрессию белков DNMT1, DNMT3a и DNMT3b [Lin N et al., 2014]. Однако, характер влияния ГЦ на процессы метилирования ДНК в различных моделях ГЦ не всегда соответствовал предложенной схеме [Pogribny IP et al., 2008a]. В культуре клеток эндотелия пупочной вены человека HUVEC при воздействии ГЦ рядом исследователей показано снижение количества DNMT1, уровня метилирования промоторов отдельных генов и активация транскрипции [Zhang D et al., 2012; Ma SC et al., 2017], при этом в других работах получены противоположные данные: увеличение содержания DNMT1 [Jia SJ et al., 2013], и, соответственно, увеличение метилирования промотора гена диметиларгиназы DDAN2 и снижение уровня транскрипции. В эндотелиальных клетках головного мозга мыши линии bEnd.3 показано увеличение экспрессии DNMT1 и подавление экспрессии DNMT3b [Kamat PK et al., 2015a]. Еще сложнее представляется интерпретация результатов при исследовании влияния ГЦ на процессы метилирования *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют об изменениях под влиянием хронической ГЦ содержания ДНК-метилтрансфераз, общего метилирования ДНК, метилирования CpG-богатых регуляторных областей и промоторов отдельных генов в мозге, что, по мнению авторов, может приводить к нейродегенеративным нарушениям [Pogribny IP et al., 2008b; Kalani A et al., 2014a; Kalani A et al., 2014b; Li JG et al., 2017]. Показано, что ГЦ стимулирует ДНК-метилирование и экспрессию белков DNMT1 в мозге мышей [Kalaria RN, 2016]. Однако другими исследователями установлено, что метиониновая нагрузка в течение 9 недель значимо увеличивала ДНК-метилирование только в зоне CA1 гиппокампа и снижала экспрессию DNMT1 в коре [Pi T et al., 2021]. Наблюдаемое

в нашем исследовании повышение уровня DNMT1 в коре, мозжечке и гипоталамусе может носить компенсаторный характер, и являться следствием снижения ее активности, гипометилированием и, следовательно, увеличением экспрессии соответствующего гена. Необходимо отметить, что в гиппокампе, в отсутствие изменений содержания NTs, не происходит также и изменения содержания DNMT1.

Несмотря на то, что данные других исследований указывают на то, что гиппокамп наиболее восприимчив к ОС, тогда как кора является более устойчивой структурой [Salim S, 2017; Dionisie V et al., 2021], в нашей работе, при ГГЦ в гиппокампе не обнаружены значимые признаки развития ОС, в отличие от коры, в которой на фоне ГГЦ уровень окислительной модификации белков повышается более чем в 2 раза, по сравнению с контролем. Однако повышение уровня ГЦ после введения метионина отмечено в обеих этих структурах. Несмотря на то, что в данном исследовании в коре оценивался только маркер повреждения белков, полученный результат согласуется с данными других исследователей, которые показывают, что даже легкая ГГЦ у крыс также приводит к повреждению в ней белков и нуклеиновых кислот, что, кроме того, сопровождается изменением активности глутатионпероксидазы, каталазы и СОД [de S. Moreira D et al., 2017; dos Santos TM et al., 2019b]. Кроме того, еще на развивающемся мозге крыс показано, что именно в нейронах коры на E18, по сравнению с гиппокампом, активация NMDA-рецепторов приводила к большему увеличению внутриклеточного Ca^{2+} , что является одним из основных механизмов действия ГЦ, тогда как в нейронах гиппокампа при активации NMDA-рецепторов преимущественно снижался мембранный потенциал митохондрий [Kambe Y et al., 2008]. Также, тезис о том, что нейроны гиппокампа являются более уязвимыми к токсическим агентам, по сравнению с нейронами коры, не всегда находит подтверждение. Показано, что воздействие метилртути вызывает гибель нейронов коры головного мозга, тогда как в этого не происходит в отношении нейронов гиппокампа, что исследователи связывают с тем, что гены, связанные с функцией нейронов, в том числе кодирующие BDNF и антиоксидант транстиретин показали примерно в 50 раз

более высокую экспрессию в нейронах гиппокампа, чем в нейронах коры головного мозга [Fujimura M, Unoki T, 2022]. Изменение содержания и активности метилтрансфераз в различных отделах мозга вероятно зависит от накопления в них самого ГЦ и его метаболитов. Имеются сведения о распределении SAM в различных отделах головного мозга, в том числе, рассматриваемых в нашем исследовании. Так показано, что в норме, содержание SAM в них имеет значительные различия. При этом наибольшее его количество отмечено в коре и гиппокампе и существенно ниже в мозжечке и гипоталамусе [Wong DL et al., 1982]. При этом авторы отмечают, что при гипофизэктомии в различных структурах мозга уровень SAM имеет разнонаправленные изменения, а в некоторых, не изменяется вообще. Эти результаты свидетельствуют о том, что в различных отделах мозга представлено разнообразие факторов, регулирующих уровни SAM *in vivo*. На основании наших данных, подобное заключение справедливо и в отношении уровня и скорости метаболизма ГЦ. Мы также продемонстрировали значительные отличия в уровне ГЦ в различных отделах мозга; кроме того, при введении метионина, динамика его изменения в гипоталамусе и коре отличается от гиппокампа, тогда как наличие существенных индивидуальных особенностей метаболизма метионина у отдельных животных не позволило вообще достоверно определить единое время максимального подъема ГЦ в мозжечке. Важным результатом проведенного нами исследования является тот факт, что несмотря на то, что в гиппокампе, при метиониновой нагрузке, также, как в коре и в гипоталамусе, наблюдается повышение уровня ГЦ, значимых эффектов хронической ГГЦ в период беременности в данной структуре не обнаружено. При этом в коре на фоне ГГЦ происходит снижение уровня mBDNF и про-формы BDNF 29кДа, повышение содержания DNMT1 и увеличение продуктов окислительной модификации белков, указывающих на развитие ОС. При этом при воздействии метиониновой нагрузки в период беременности у самок крыс в сыворотке крови также отмечено повышение уровня продукта перекисного окисления липидов МДА, что согласуется с данными по повышению продуктов окислительной модификации белков и нуклеиновых кислот в сыворотке крови у рассмотренных

нами небеременных половозрелых самок крыс с ГГЦ. В отличие от последних, у беременных самок снижение уровня активности СОД при ГГЦ не достигало статистической значимости и носило только характер тенденции, однако показана обратная взаимосвязь между уровнем МДА и активностью СОД в сыворотке крови. На основании полученных данных можно выдвинуть предположение о в целом сходных механизмах действия ГГЦ на беременных и небеременных половозрелых самок крыс, при этом в силу того, что влияние метиониновой нагрузки на небеременных самок крыс имело несколько более продолжительный характер – 30 дней, против 16 дней у беременных самок, последствия ГГЦ на них по всей видимости должны иметь более выраженный характер. В связи с этим, несмотря на то что уровень провоспалительных цитокинов оценивался только в крови беременных самок крыс, можно сделать вывод о том, что при ГГЦ в модели с метиониновой нагрузкой происходит повышение уровня IL-1 β в сыворотке крови взрослых животных. В эксперименте с 35-тидневным введением метионина мышам также показано значительное повышением уровня IL-1 β , IL-6, TNF- α и, одновременно снижение уровня IL-13 в плазме. При этом наиболее существенное (примерно в 5 раз) повышение исследователями отмечено именно в отношении уровня IL-1 β [Mostafa MD et al., 2022]. В другом исследовании по влиянию хронической метиониновой нагрузки на уровень цитокинов в сыворотке крови самцов крыс анализ IL-1 β не проводился, однако показано повышение уровня IL-6 и TNF- α , а также снижение уровня IL-10 [Khodir SA et al., 2022a]. Как острая, так и хроническая ГГЦ, вызванные подкожным введением ГЦ, также приводят к повышению уровня IL-1 β , IL-6 и TNF- α в сыворотке крови крыс препубертатного возраста [da Cunha AA et al., 2010; da Cunha AA et al., 2012b] Сообщалось, что ГГЦ индуцирует сосудистое воспаление, зависимое от NMDA рецептора разрушение ГЭБ и синаптическую дисфункцию гиппокампа у мышей [Kamat PK et al., 2015b]. Вместе с этим уже изучаются возможные протекторы наблюдаемых нарушений, в частности, обладающие антиоксидантными и нейропротекторными свойствами [Tyagi N et al., 2012; Kamat PK et al., 2013; Kamat PK et al., 2016; Kumar M et al.,

2017; Kumar M et al., 2018; Figueiro PW et al., 2019; Kumar M, Sandhir R, 2019; 2020; 2021].

Таким образом, если при влиянии ГГЦ на взрослый организм, в частности на его нервную систему, оценивая полученные эффекты, представляется возможным сформулировать предположения о вкладе различных механизмов действия ГЦ и его метаболитов на развитие общего патологического процесса, то анализ последствий перенесенной пренатальной ГГЦ в последующем онтогенезе, является значительно более сложной задачей.

Существуют предположения, что исходной причиной многих нейроповеденческих расстройств у потомства являются патофизиологические изменения в плаценте матери, сопровождающиеся нарушениями развития мозга плода, который особенно уязвим к последствиям плацентарной дисфункции [Shallie PD, Naicker T, 2019b; Rosenfeld CS, 2020]. В связи с этим следующим особым и до сих пор малоизученным объектом воздействия ГЦ и его метаболитов во время беременности, в нашем исследовании становится плацента. Стоит также отметить, что дизайн нашего исследования, с началом введения метионина в конце 4 дня беременности, после проникновения бластоцист в матку и прикрепления эмбрионов, подразумевает возможность токсического воздействия уже на процесс физиологического повышения проницаемости сосудов матки вокруг места прикрепления, а также на процесс становления иммунологической толерантности, децидуализации стромальных клеток и инвазии трофобласта. [Massri N et al., 2023]. Однако в настоящее время именно плаценту рассматривают в качестве предполагаемой мишени воздействия ГГЦ, которая состоит из клеток различных популяций, основную клеточную массу которой составляют клетки трофобласта. Они отличаются по своим свойствам от клеток сосудов и нейрональных клеток, в отношении которых в основном изучались токсические эффекты ГЦ. Высокий уровень ГЦ напрямую влияет на плаценту, делая ее более уязвимой к возникновению осложнений беременности, которые прямо или косвенно влияют как на мать, так и на плод [Thakur P, Bhalerao A, 2023]. Следует подчеркнуть, что в литературе недостаточно информации о том, с помощью каких механизмов ГГЦ

увеличивает вероятность развития осложнений во время беременности и формирования негативных последствий для плода, в частности его нервной системы [Jakubowski H, 2004; Schroecksnadel K et al., 2004; Vilbo SD, 2009]. Известно, что успешный исход беременности требует сбалансированного взаимодействия иммунной, нервной и эндокринной системы. В процессе плацентации, способствующем созданию интерфейса взаимодействия плода и матери, плод является полуаллогенным, однако процесс инвазии и дифференцировки трофобласта происходит, несмотря на цитотоксический потенциал клеток иммунной системы матери. В связи с этим баланс про- и противовоспалительных сигналов в процессе имплантации, формировании и развитии плаценты имеет первостепенное значение. Дискуссионным в настоящее время остается вопрос о том, в какие периоды имплантации преобладают те или иные цитокины, однако неоспоримым признается факт, что баланс регуляции Th1/Th2 типов иммунного ответа способствует нормальной дифференцировке трофобласта, его полноценной инвазии и, следовательно, опосредует пролонгирование физиологической беременности. Имеются данные, что ГЦ, которая рассматривается как фактор риска воспалительных процессов [Wu JT, 2007], приводит к нарушению соотношения Th1/Th2 и, следовательно к увеличению медиаторов воспаления, что может способствовать развитию осложнений беременности [Mikael LG et al., 2012]. Показано, что ГЦ может ограничивать синтез ApoAI частично через белки семейства PPAR, которые играют важную роль в регуляции роста плаценты и воспаления [Rees WD et al., 2008; Mikael LG et al., 2012]. Противовоспалительные свойства ApoAI [Shah PK et al., 2001] частично опосредованы подавлением функции нейтрофилов [Furlaneto CJ et al., 2002] и снижением ответа IFN I типа [Suzuki M et al., 2010]. Также установлено, что PPAR α проявляет противовоспалительные свойства, участвуя в регуляции Th1/Th2 типов иммунного ответа: увеличивая продукцию цитокинов Th2 (IL-10 и IL-4) и уменьшая продукцию цитокинов Th1 (IFN и IL-2) [Dong M et al., 2005; Yessoufou A et al., 2006], а PPAR γ , как полагают, способствует росту плаценты за

счет увеличения дифференцировки трофобласта и ангиогенеза кровеносных сосудов плода [Hewitt DP et al., 2006].

Возможно также, что ГГЦ повышает уровень $IFN\gamma$ независимо от его влияния на $PPAR\alpha$ через развитие ОС [Schroecksnadel K et al., 2004; Wu JT, 2007]. Существует предположение, что одним из механизмов провоспалительного эффекта ГЦ является его воздействие на плацентарные макрофаги, приводящее к усилению ими синтеза и секреции провоспалительных цитокинов. Важная роль в активации этой секреции отводится повышению уровня образования АФК макрофагами и клетками эндотелия сосудов в ответ на повышение уровня ГЦ в крови [Zanin RF et al., 2015]. В эндотелиальных клетках ГГЦ через усиление генерации АФК может вызвать системное воспаление, сопровождающееся высвобождением $IL-1\beta$ [Xu X et al., 2016]. Полученные нами результаты позволяют рассматривать ГГЦ в качестве фактора, приводящего к избыточной активации материнской иммунной системы, следствием чего является повышение уровня в крови провоспалительных цитокинов, в частности, способного проникать через фетоплацентарный барьер $IL-1\beta$, что может вызывать нейродегенеративные и другие долгосрочные нарушения развития мозга у потомства [Jakubowski H, 2004; Vilbo SD, 2009]. Значимое повышение уровня данного цитокина отмечено нами также и в ПЧП – лабиринтной области. Кроме того, именно при ГГЦ отсутствуют корреляционные связи уровня $IL-1\beta$ в сыворотке крови и уровнями цитокинов в МЧП и ПЧП, которые закономерно присутствуют у животных без ГГЦ, что указывает на, вероятно, несколько различные механизмы развития провоспалительного ответа в сосудах и плаценте. Таким образом, повышение уровня $IL-1\beta$ в сыворотке крови при ГГЦ может не сопровождаться повышением его в ПЧП и наоборот, нормальный уровень данного цитокина в сыворотке не указывает на то, что в ПЧП он также находится в норме. При этом именно на фоне ГГЦ, повышенный уровень $IL-1\beta$ в ПЧП имеет взаимосвязь с $TNF\alpha$ в ПЧП и МЧП, следовательно, при значительном повышении $IL-1\beta$ в ПЧП можно ожидать и повышения других цитокинов, что, в целом, указывает на развитие воспалительной реакции в плаценте при ГГЦ. Отсутствие же значимых изменений уровня $TNF\alpha$ при

ГГЦ может быть также обусловлено тем, что в проведенном исследовании, как и в большинстве других работ, не учитывался возможный половой диморфизм плаценты, однако имеются данные, что, например, в модели ожирения, или избытке потребления соли, повышение TNF α наблюдается только в мужских плацентах [Reynolds CM et al., 2015]. При недостаточном потреблении питательных веществ во время беременности также в основном именно мужские плаценты повышают экспрессию ферментов, продуцирующих АФК, и понижают экспрессию ферментов, утилизирующих АФК [Phuthong S et al., 2020]. При этом ОС является одним из основных механизмов, связанных с неблагоприятным исходом программирования плода [Ojeda ML et al., 2021]. Несмотря на то, что ОС, возникающий в результате окисления ГЦ с образованием дисульфидных связей с другой молекулой ГЦ или с белком, способствует развитию острого и хронического воспалительного процесса посредством регуляции экспрессии транскрипционного фактора NF- κ B и молекул адгезии [Mansoor MA et al., 2004; Li M et al., 2006], повышенный уровень ГЦ и маркеров воспаления часто обнаруживаются одновременно, но не всегда коррелируют друг с другом [Wu JT, 2007]. На различные механизмы воздействия ГГЦ на уровне МЧП и ПЧП указывают также данные о том, что только в МЧП при ГГЦ показано снижение активности СОД с одновременным увеличением уровня ОМБ, который при этом, положительно коррелирует с уровнем IL-1 β в сыворотке крови, также повышенным при метиониновой нагрузке. В ПЧП, на фоне ГГЦ, при повышенном уровне IL-1 β , показано увеличение уровня МДА, что указывает на преимущественное окисление липидов, а не белков. Отмеченная разная чувствительность к ОС маркеров ПОЛ и ОМБ в двух исследованных частях плаценты может объясняться различиями их морфологической структуры, определяющей степень доступности ГЦ тем или иным клеткам, а также неодинаковым липидным и белковым составом клеток в МЧП и ПЧП. Известно, что в ПЧП, в микроворсинчатой мембране СТБ в норме происходит значительное повышение уровня докозагексаеновой кислоты (ДГК) за счет быстрого высвобождения от белка, связывающего жирные кислоты, что обеспечивает ее адекватную доставку к плоду, необходимой для развития его

нервной системы [Barta E, 2019]. Однако быстрое накопление ДГК и других ПНЖК с множественными двойными связями, может представлять серьезную угрозу, увеличивая риск ПОЛ при различных негативных воздействиях [Halliwell B, 1992; Yavin E et al., 2001; Stark MJ et al., 2013], что согласуется с нашими данными по увеличению уровня МДА в ПЧП при ГГЦ. Снижение антиоксидантов и чрезмерный ОС приводят к снижению ДГК [Dangat KD et al., 2010]. Кроме того, имеются данные, что повышенный уровень ГЦ отрицательно ассоциируется с уровнем ДГК [Kulkarni A et al., 2011; Dai C et al., 2021b]. Можно также предположить, что спектр образующихся под влиянием ГГЦ АФК в МЧП и ПЧП различается, в связи с чем в их устранении принимают участие различные антиоксидантные ферменты и неферментативные антиоксиданты. Известно, что в лабиринтной области к концу беременности, по сравнению с серединой беременности происходит значимое нарастание экспрессии внеклеточного СОД [Kim MR et al., 2011], что, вероятно, может скомпенсировать расход данного антиоксидантного фермента на утилизацию, образующегося на фоне ГГЦ супероксидного анион-радикала. В спонгиозотрофобласте, напротив, при высокой экспрессии внеклеточного СОД на E13-E15, в норме, к последним дням беременности происходит ее снижение [Kim MR et al., 2011], что возможно не позволяет восполнить снижение активности СОД при воздействии ГГЦ. Во многих исследованиях под действием ГГЦ отмечалось сходное снижение уровня общей антиоксидантной защиты, однако влияние ГГЦ на экспрессию генов, уровень белка и активность отдельных антиоксидантных ферментов в различных тканях не носило однонаправленного характера [Faverzani JL et al., 2017]. Следует отметить, что изучение непосредственного влияния материнской ГГЦ на показатели ОС, антиоксидантной защиты и на пути активации апоптоза в ткани плаценты *in vivo* до сих пор не проводилось, хотя подобные показатели в плаценте человека исследовались при состоянии ПЭ. Предполагается, что окислительное повреждение плаценты приводит к воспалению и апоптозу [Goulopoulou S, Davidge ST, 2015].

В ряде исследований было показано повышение уровня маркеров апоптоза под влиянием высоких концентраций ГЦ *in vitro* в культуре клеток трофобласта [Di Simone N et al., 2003; Kamudhamas A et al., 2004; Gao L et al., 2022]. Изучения воздействия материнской ГГЦ на пути активации апоптоза в ткани плаценты *in vivo* не проводилось, однако регулярно высказываются предположения, что вызванный ГГЦ ОС может приводить к индукции апоптоза клеток плаценты [Luo D et al., 2014], в частности, при ПЭ [Kasture VV et al., 2018]. Полученные в нашем исследовании результаты показали, что ГГЦ во время беременности вызывает повышение содержания расщепленной активной формы каспазы-3 в МЧП, что является признаком необратимого развития апоптотического процесса [Hengartner MO, 2000; Robertson JD et al., 2000]. Повышение уровня активной эффекторной каспазы-3 в сочетании с данными о повышении ОМБ и снижении уровня активности СОД в МЧП позволяют предполагать, что проапоптотическое воздействие ГЦ, содержащегося в крови матери в более высоких концентрациях, чем в крови плода, направлено в первую очередь на этот отдел плаценты. В целом, апоптоз рассматривается как невоспалительная и нецитолитическая форма запрограммированной клеточной гибели [Gao J et al., 2018b], что не противоречит полученным данным об отсутствии в МЧП при ГГЦ усиления провоспалительной реакции. Отсутствие повышения в МЧП активной формы инициаторной каспазы-8 позволяет предполагать, что активация апоптоза в данном случае происходит по внутреннему митохондриальному пути, как уже было отмечено в отношении воздействия ГЦ на клетки мозга [Baydas G et al., 2005b]. Показана активация именно митохондриального пути апоптоза (каспазы-3 и каспазы-9) в клетках трофобласта линии HTR-8/SVneo при воздействии ГЦ [Gao L et al., 2022]. При этом в ПЧП активации каспазы-3 обнаружено не было, однако, тот факт, что именно в ПЧП отмечено повышение уровня IL-1 β , можно предположить, что в зоне лабиринта имеет место активация пироптоза, что, конечно, требует исследования уровня IL-18 и каспазы-1. Пироптоз, который быстро лизирует клетку, биохимически характеризуется как каспазо-1-зависимая и каспазо-3-независимая форма клеточной смерти [Gao J et al., 2018b]. Появляется все больше доказательств

того, что пироптоз также вызывает стерильное воспаление в неиммунных клетках в ответ на эндогенные сигналы опасности [Nadeau-Vallee M et al., 2016; Chen A et al., 2018; Neo MJ et al., 2019]. Имеются убедительные доказательства того, что повышенный пироптоз происходит и в клетках трофобласта плаценты при ПЭ. При этом маркеры пироптоза преимущественно обнаруживаются в СТБ. Показано, что в трофобласте, в ответ на гипоксию и стресс эндоплазматического ретикулума, каспаза-1 активирует продукцию IL-1 β и IL-18 [Cheng S-B et al., 2019].

К наиболее вероятным механизмам негативного воздействия материнской ГГЦ на функциональное состояние плаценты относят нарушения плацентарного васкулогенеза и ангиогенеза [Latacha KS, Rosenquist TH, 2005; Oosterbaan AM et al., 2012; Li Y et al., 2015; Kasture VV et al., 2018]. Этому может способствовать инициируемый ГГЦ ОС [Lai WK, Kan MY, 2015], способный приводить к нарушениям морфологического созревания плацентарной сосудистой сети [Pereira RD et al., 2015]. У крыс, как и у человека, во время плацентации трофобласты плода глубоко проникают в материнскую ткань, устанавливая кровообращение с плодом [Soares MJ et al., 2017]. Стоит отметить, что сосудистая сеть в плаценте крысы активно развивается и на поздних сроках беременности, вплоть до 20 дня [Kalinichenko VV et al., 2013]. На наличие у ГЦ антиангиогенных эффектов указывает его негативное воздействие на эндотелиальные клетки различного происхождения, приводящее к развитию в них стресса эндоплазматического ретикулума с последующей их гибелью [Lai WK, Kan MY, 2015]. Показано, что ГЦ снижает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, ингибирует ангиогенез в моделях *in vitro*, вызывая снижение в эндотелиальных клетках активности MMP-2 [Rodriguez-Nieto S et al., 2002], а также экспрессии на уровне мРНК и белка ключевых ангиогенных факторов VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 (KDR) [Zhang Q et al., 2012; Pan L et al., 2017; Wang XJ et al., 2019]. На модели экстраэмбриональной сосудистой сети куриного эмбриона было показано ингибирующее воздействие ГЦ на васкулогенез и ангиогенез, сопровождающееся снижением экспрессии генов и уровня белка VEGF и VEGFR-2 [Latacha KS, Rosenquist TH, 2005; Oosterbaan AM et al., 2012]. Одним из косвенных

доказательств негативного воздействия повышенного уровня ГЦ в крови матери на ангиогенез в плаценте может служить тот факт, что ГЦ рассматривается в качестве фактора риска ПЭ и ЗВУР [Hague WM, 2003; Chen YY et al., 2018], этиология которых связана с нарушениями формирования плацентарного сосудистого русла [Burton GJ, Jauniaux E, 2018; Burton GJ et al., 2019]. Вместе с тем, исследования, в которых бы изучалось воздействие ГЦ на уровень ангиогенных факторов и процессы ангиогенеза непосредственно в плаценте, крайне немногочисленны. В модели материнской ГЦ, вызванной безфолатной диетой, у беременных самок мышей на сроке E6-E8 (после имплантации, но до образования плаценты) в материнской децидуальной оболочке наблюдалось снижение экспрессии на уровне мРНК и белка ангиогенных факторов VEGF и VEGFR-2, сопровождавшееся задержкой децидуального ангиогенеза [Li Y et al., 2015]. В другой работе, выполненной также на самках мышей, было показано снижение уровня мРНК и белка VEGF в цельной плаценте на сроке E17,5 после однократного введения ГЦ [Xu X et al., 2016].

В настоящей работе было впервые изучено влияние хронической материнской ГЦ на уровень VEGF в различных функциональных частях плаценты на разных сроках ее формирования и показано, что эффект ГЦ может различаться в зависимости от срока беременности и исследуемого отдела плаценты. При воздействии ГЦ на сроке E14 нами наблюдалось снижение уровня VEGF в ПЧП и отсутствие значительных изменений содержания этого фактора в МЧП, в то время как к концу беременности, на сроке E20, снижение содержания VEGF в МЧП сопровождалось повышением его уровня в ПЧП. Для понимания возможных причин таких различий следует обратить внимание на различную роли, которую играет VEGF в ПЧП и МЧП плаценты, а также на изменения характера проангиогенного действия VEGF на разных сроках созревания плаценты.

У грызунов зрелая плацента представлена двумя морфологически и функционально различными зонами. Находящаяся в непосредственной близости к плоду лабиринтная область плаценты (ПЧП) содержит сосуды матери и плода и является основной зоной трансплацентарного обмена. Прилегающая к ней с

материнской стороны базальная губчатая часть (соединительная зона) или спонгиотрофобласт (МЧП), содержит только сосуды матери и играет, как предполагается, эндокринную роль [Burton GJ et al., 2016]. В МЧП также входит базальная оболочка, которая после 15-го дня беременности истончается и прочно прилегает к соединительной зоне [Ain R et al., 2006]. К сроку E13,5, совпадающему с завершением процессов органогенеза и началом интенсивного роста плода, основные зоны плаценты грызунов уже сформированы [Ain R et al., 2006]. В этот период в плаценте наблюдается значительное изменение экспрессии генов, в том числе контролирующих ангиогенез [Knox K, Baker JC, 2008; Vaswani K et al., 2013], сопровождающееся ростом лабиринтной области [Furukawa S et al., 2019] и усиленным ветвлением и удлинением находящихся там сосудов [Coan PM et al., 2004], что позволяет адаптировать плацентарную кровеносную систему к все возрастающим потребностям плода в кислороде и питательных веществах. Окончательное формирование базальной части (МЧП) завершается к сроку E14-15, в то время, как процессы пролиферации и ангиогенеза в зоне лабиринта активно продолжаются вплоть до последних дней внутриутробного развития [Rennie MY et al., 2012; Silva JF, Serakides R, 2016; Furukawa S et al., 2019]. Вследствие этих морфологических изменений к концу беременности (E21) ширина ПЧП значительно превосходит ширину МЧП, в то время, как на сроке E14 эти зоны сопоставимы по ширине [Furukawa S et al., 2019], что было отмечено и в нашем исследовании.

Плацентарная экспрессия ангиогенных факторов и их соотношение в различных отделах плаценты изменяется в зависимости от срока беременности, что необходимо для координации по времени различных стадий плацентарного васкулогенеза и ангиогенеза [Wang Y, Zhao S, 2010; Umaphathy A et al., 2020]. У грызунов на сроке E14 в плаценте наблюдается повышение экспрессии на уровне белка и/или мРНК ангиогенных факторов VEGF и VEGFR-1 [Silva JF et al., 2017]. Следует предположить, что именно в этот период процессы ангиогенеза, регулируемые VEGF, происходят наиболее активно. Однако ангиогенез в плаценте крыс, продолжающийся и на более поздних сроках беременности, характеризуется

тем, что в норме плацентарная экспрессия Vegfa с E14 по E20 увеличивается в 3 раза, в то время как его рецептор VegfR2 в этот период снижается [Kalinichenko VV et al., 2013]. После E13,5 длина плодных капилляров в плаценте мышей увеличивается примерно в 10 раз [Coan PM et al., 2004], аналогично растет и материнское артериальное дерево [Rennie MY et al., 2012]. Другим важным для обеспечения кровоснабжения плода процессом, активно начинающимся в период E13-E14, является процесс миграции клеток эндovasкулярного и интерстициального трофобласта, сопровождающийся повышением активности MMP [Silva JF, Serakides R, 2016; Silva JF et al., 2017; Furukawa S et al., 2019].

Отмеченное нами снижение под воздействием ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на сроке E14, в ключевой момент для развития разветвленной сосудистой сети зоны лабиринта и ремоделирования материнских спиральных артерий, согласуется с данными других исследований [Li Y et al., 2015; Xu X et al., 2016] и может служить одной из причин наблюдавшегося недостаточного развития лабиринтной области и ее сосудистой компоненты. Повышение под влиянием материнской ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на конечном сроке беременности (E20) могло явиться компенсаторной реакцией на недостаточное формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети и возникающие вследствие него нарушение плацентарного кровообращения и гипоксию [Burton GJ et al., 2019; Mesiano S, 2019], а также ответом на отмеченное снижение экспрессии рецептора Vegfr-2 (Kdr) в этой части плаценты. Увеличение содержания VEGF в ПЧП может быть также связано с повышением уровня стимулирующих экспрессию VEGF провоспалительных цитокинов [Choi SJ et al., 2002], что и обнаружено в нашей работе.

Предполагается, что VEGF, синтезируемый в МЧП, осуществляет в большей степени эндокринную функцию либо непосредственно, высвобождаясь в материнский кровоток, либо путем влияния на эндокринную активность клеток трофобласта в этом отделе плаценты [Lieu SA et al., 2014]. В нашем исследовании при воздействии ГГЦ наблюдалось снижение уровня VEGF в МЧП на E20, которое могло явиться результатом уменьшения количества продуцирующих VEGF клеток

и/или снижения в них синтеза VEGF вследствие отмеченной нами активации ОС и апоптотических процессов в данном отделе плаценты. В частности, нами наблюдалось уменьшение толщины слоя гигантских клетках трофобласта, способных продуцировать VEGF [Hemberger M et al., 2003], сопровождавшееся патологическими изменениями внутри этих клеток.

VEGF стимулирует эндотелиальную экспрессию протеаз, в том числе MMP-2 и -9, которые разрушают внеклеточный матрикс и освобождают клетки эндотелия от закоривания, позволяя им мигрировать и пролиферировать, участвуя таким образом в процессах плацентарного ангиогенеза [Funahashi Y et al., 2011; Sahay AS et al., 2017; Silva JF et al., 2017; Gualdoni GS et al., 2021a]. На ранних сроках беременности недостаточная активность MMP-2 и -9 препятствует инвазии трофобласта и нормальному ремоделированию маточных артерий, что приводит к начальным патофизиологическим изменениям в формирующейся плаценте [Espino Y. Sosa S et al., 2017; Gualdoni GS et al., 2021b], на более поздних сроках - снижение уровня данных протеиназ может привести к нарушению вазодилатации, усилению сужения сосудов [Chen J, Khalil RA, 2017b]. Показано, что экспрессия MMP-2 в клетках трофобласта при воздействии, например, EGF, прогестерона и ХГЧ регулируется РКА посредством активации путей ERK 1/2 и PI3K/АКТ [Prast J et al., 2008; Staun-Ram E et al., 2009b; Liu H et al., 2023] с участием различных транскрипционных факторов, включая Ets-2, p53, С/ЕВР [Staun-Ram E et al., 2009a]. Патологическое снижение экспрессии MMP-2 и MMP-9 клетками трофобласта и, следовательно, их инвазии, может быть связано с ингибированием данных сигнальных путей [Zhu X et al., 2016; Xu Y et al., 2019; Cheng M et al., 2021; Ye Y et al., 2021]. Предполагается, что MMP совместно с VEGF вовлечены в патогенез плацентарных осложнений беременности, связанных с нарушением ангиогенеза, в частности, ПЭ [Narumiya H et al., 2001; Chen J, Khalil RA, 2017a]. Антагонист VEGF sFLT-1 (VEGFR-1) снижает содержание и активность MMP-2 и -9 в тканях матки и плаценты крыс, в то время, как введение VEGF возвращает эти показатели к исходным значениям [Li W et al., 2014]. Показано, что ГЦ вызывает снижение синтеза и активности MMP-2 и -9 в культуре клеток цитотрофобласта человека

[Yang PF et al., 2007]. Снижение активности данных желатиназ при воздействии ГЦ отмечено в адвентициальных фибробластах аорты самцов крыс [Guo YH et al., 2008], а также в эндотелиальных клетках аорты крупного рогатого скота, что сопровождается снижением их пролиферации и миграции [Rodriguez-Nieto S et al., 2002]. ГЦ значительно снижал секрецию MMP-2 и MMP-9 опухолевыми клеточными линиями фибросаркомы и остеосаркомы в культуральные среды и ингибировал их активность [Chavarría T et al., 2003]. При этом в культуре гладкомышечных клеток сосудов человека (VSMC) воздействие ГЦ, напротив, через NMDA-рецептор и активацию PI3K- и MAPK-путей приводит к увеличению синтеза и секреции MMP-2 [Doronzo G et al., 2010; Trovati M et al., 2017]. Также показано, что ГЦ напрямую способен активировать proMMP-2 при низком молярном соотношении, однако при высоком молярном соотношении он ингибирует активный MMP-2 [Bescond A et al., 1999]. Этот ингибирующий эффект, можно объяснить взаимодействием между тиоловой группой ГЦ и цинком активного центра, приводящим к образованию неактивной формы в соответствии с механизмом, описанным для тиоловых ингибиторов металлопротеиназ, таких как каптоприл [Simionescu A et al., 1996]. В подтверждение данного заключения показано, что ни метионин, ни гомоцистин, которые не имеют свободных тиоловых групп, не проявляли ингибирующего действия в отношении MMP-2 [Bescond A et al., 1999]. При этом доступность свободного ГЦ и proMMP-2 в каждой ткани может быть частично ответственна за тканевую специфичность изменений внеклеточного матрикса при ГГЦ. Действительно, в значительном количестве исследований наблюдалось повышение уровня мРНК/белка/активности MMP под влиянием ГЦ, но эти работы в большинстве своем были посвящены воздействию ГЦ на сердечно-сосудистую систему, соответственно, для исследования использовались клетки эндотелия и гладкомышечные клетки сосудов, а не клетки трофобласта, составляющие основную часть клеточной массы плаценты. При этом под воздействием ГЦ на гладкомышечные клетки эндотелия подразумевает рецептор-опосредованную активацию экспрессии гена и синтеза белка, как предполагается, через экспрессирующийся в них NMDA-рецептор [Doronzo G et al., 2010],

отсутствующий в клетках трофобласта. Кроме того, показано, что даже в пределах одного кровеносного сосуда ГЦ может как активировать MMP-2 в стенке, так и ингибировать, в зависимости от характера образовавшегося в нем тромба [Siennicka A et al., 2018]. В модели ГГЦ с метиониновой нагрузкой в течение 6 месяцев у самцов крыс отмечено снижение активности MMP-2 в сердце, при этом активность MMP-9 не изменялась, тогда как содержание MMP-2 и TIMP-2 даже увеличивались [Raaf L et al., 2010]. Из механизма активации MMP-2 следует, что умеренные количества TIMP-2 способствуют активации MMP-2, однако повышенное его содержание избыточно ингибирует MT1-MMP на поверхности клетки и тем самым снижает количество активируемой MMP-2 [Strongin AY et al., 1995; Butler GS et al., 1998; Sato H, Takino T, 2010]. В нашей работе мы не исследовали содержание данного ингибитора, однако показано, что уровень TIMP-2 повышен в ворсинах плацент женщин со ЗВУР [Swierczewski A et al., 2012] и с ПЭ [Zhang L et al., 2019], что позволяет предположить участие данного механизма в снижении активности MMP при ГГЦ. Повышение экспрессии TIMPs и снижение MMP-2 и MMP-9 в ворсинах плаценты при ПЭ сопровождается повышением уровня H3K9me3 в промоторных областях данных желатиназ [Rahat B et al., 2016]. Дополнительным подтверждением того, что вполне возможно разнонаправленное воздействие ГЦ на активность MMP в клетках сосудов и клетках трофобласта, служат данные о том, что введение фолиевой кислоты, оказывающей противоположные ГЦ эффекты за счет снижения его уровня, вызывало в культуре клеток трофобласта повышение экспрессии генов MMP-2 и MMP-9 и усиливало инвазивные и миграционные свойства этих клеток [Williams PJ et al., 2011; Zhou L et al., 2015; Rahat B et al., 2022]. In vivo, на уровне плаценты у грызунов изучения влияния ГГЦ на активность MMP до сих пор не проводилось. Обнаруженное нами снижение активности MMP-2, особенно четко проявлявшееся в МЧП на обоих изучаемых сроках беременности (E14 и E20), может являться следствием как уменьшения уровня VEGF, так и активации процессов апоптоза в этом отделе плаценты, и служить одной из причин недостаточного ремоделирования материнских плацентарных артерий при ГГЦ. Характер

морфологических изменений плаценты у крыс с ГГЦ также указывает на нарушение формирования ее сосудистой сети в процессе развития. Сходное снижение уровня VEGF и MMP-2 в децидуальной оболочке и плаценте мышей, сопровождавшееся нарушением плацентарного ангиогенеза и задержкой роста плода, наблюдалось при пренатальном воздействии алкоголя, который, подобно ГЦ, способен индуцировать развитие ОС [Almeida-Toledano L et al., 2021; Gualdoni GS et al., 2021b]. Снижение активности MMP-2 в плаценте отмечено также в модели генерализованного снижения перфузионного давления матки, приводящей к ее ишемии и уменьшению массы плода и плаценты [Dias-Junior CA et al., 2017]. Некоторое восстановление активности MMP-2, также как и значимое увеличение уровня VEGFA, в ПЧП к E20 возможно связано с отмеченным повышением на этом сроке беременности количества IL-1 β в данной части плаценты. Показано, что IL-1 β увеличивает активность MMP-2 и MMP-9 в культуральных средах клеток трофобласта линии Jeg-3 [Fontana VA et al., 2010] и индуцирует накопление мРНК VEGFA (но не KDR) в децидуальных стромальных клетках, выделенных из доношенных плацент [Snegovskikh VV et al., 2009].

Фактор VEGF-B, связывающийся с рецептором VEGFR-1, по-видимому, имеет не столь решающее значение для развития плода, как VEGF-A. Выключение у мышей гена *Vegfb* не вызывало серьезных отклонений в развитии, в то время как инактивация гена *Vegfa* приводила к эмбриональной гибели на сроке E11-12 [Ferrara N, 2004; Bry M et al., 2014]. В настоящее время считается, что VEGF-B обладает незначительными проангиогенными эффектами, но, вместе с тем, выполняет антиоксидантную функцию, повышая активность ключевых антиоксидантных ферментов [Chen R et al., 2019]. Отмеченное нами снижение экспрессии фактора *Vegfb* в ПЧП на сроке E20 может быть связано с наблюдаемым под влиянием материнской ГГЦ снижением уровней антиоксидантов и общей антиоксидантной защиты.

Получены доказательства важной ангиогенной роли факторов семейства NTs [Nico B et al., 2008; Caporali A, Emanuelli C, 2009]. Предполагается, что в плаценте человека и грызунов NTs, также как и в ЦНС, выполняют функцию ростовых и

проангиогенных факторов [Toti P et al., 2006; Mayeur S et al., 2011; Dhobale M, 2014; 2017; Sahay AS et al., 2017; Sahay A et al., 2020]. BDNF, NGF и их рецепторы обнаруживаются на уровне белка и/или мРНК как в материнских децидуальных и эндотелиальных клетках, так и в клетках трофобласта и эндотелия сосудов плода [Toti P et al., 2006; Kawamura K et al., 2009; Mayeur S et al., 2010; Fujita K et al., 2011; Kawamura K et al., 2011; Dhobale MV et al., 2013; Garces MF et al., 2014; Sahay AS et al., 2015; Sahay AS et al., 2019]. При этом, при возможности выполнения схожих функций данных NTs, не стоит исключать того, что BDNF и NGF могут играть и различные роли в процессе формирования плаценты и в механизмах взаимодействия матери и плода. Необходимо, однако отметить, что несмотря на то, что Trks обладают высокой степенью гомологии и используют перекрывающиеся сигнальные пути, передача сигналов от них нередко приводит к совершенно различным исходам. В нейробластоме экспрессия и передача сигналов TrkA коррелируют преимущественно с благоприятным прогнозом, тогда как экспрессия и передача сигналов TrkB ассоциируется с плохим прогнозом, что предположительно связано с различиями в киназной активности и продолжительности аутофосфорилирования их тирозинкиназных доменов [Artim SC et al., 2020].

В отношении экспрессии NGF в плаценте имеются скудные и неоднозначные данные. Была установлена экспрессия мРНК NGF в гестационных тканях как на ранних сроках беременности, так и на поздних, перед родоразрешением. С помощью иммуногистохимии NGF обнаружен в клетках цито-, синцитио- и вневорсинчатого трофобласта (EVT) [Toti P et al., 2006]. Согласно другим данным, при нормальной беременности экспрессия NGF локализована, в основном, в децидуальной ткани, в слоях цитотрофобласта и EVT плаценты, тогда как в образцах при самопроизвольных выкидышах экспрессия NGF дополнительно наблюдалось в СТБ [Frank P et al., 2014]. Наши данные также демонстрируют, что преимущественно NGF обнаруживается именно в МЧП. У мышей на ранних сроках беременности (E7,5-12,5) экспрессия мРНК *Ngf* и рецептора TrkA отмечалась только в материнской децидуальной оболочке, но не в тканях плаценты, вместе с

тем клетки трофобласта экспрессировали рецептор p75NTR и подвергались трансформации в гигантские клетки под воздействием NGF, вследствие чего авторы предположили, что на дифференциацию этих клеток оказывает влияние NGF материнского происхождения [Kanai-Azuma M et al., 1997; Frank P et al., 2014]. В ряде работ белок NGF определялся в цельной плаценте крыс на поздних сроках беременности (E16-E21) [Gilmore JH et al., 2003a; 2005; Fornes R et al., 2016], однако, его содержание в отдельных частях плаценты не было изучено. В данной работе впервые было исследовано содержание белка proNGF в МЧП и ПЧП и показано повышение его уровня в МЧП к концу беременности (E20) по сравнению со сроком E14. По аналогии с проформой BDNF уровень proNGF повышался в обеих частях плаценты под влиянием материнской ГГЦ, однако, в отличие от proBDNF, этот эффект наблюдался только на позднем сроке беременности (E20).

Активация сигнального пути BDNF/TrkB усиливает пролиферацию и дифференциацию клеток трофобласта и снижает в них уровень апоптоза [Kawamura K et al., 2009; Kawamura K et al., 2011], в том числе, вызванного ОС [Fujita K et al., 2011]. Вместе с тем, роль NTs в плаценте и их взаимодействие с плацентарными ангиогенными факторами остаются пока слабо изученными.

Данные об экспрессии и локализации NGF и его рецепторов на границе в системе мать-плацента-плод, указывают на важную роль NTs в установлении сбалансированных нейро-иммунно-эндокринных взаимодействий во время беременности [Frank P et al., 2014; Wang F et al., 2020]. Показано, что NTs нейтрализуют индуцированную IFN- γ , который повышается при дисбалансе местного цитокинового профиля, экспрессию МНС класса II [Neumann H et al., 1998]. ОС и воспаление тканей в плаценте, могут вызывать aberrantную экспрессию HLA класса II и способствовать усилению системного воспалительного ответа у матери [Tersigni C et al., 2018; Tersigni C et al., 2020]. Более того, предварительная обработка опухолевых клеток трофобласта факторами, вызывающими клеточный стресс, восстанавливает способность IFN- γ индуцировать в них экспрессию МНС класса II [Gregorie CJ et al., 2009]. Существует предположение, что чрезмерное снижение уровня NGF на границе

раздела плода и матери может привести к индукции экспрессии МНС II на клетках трофобласта, что дополнительно указывает на то, что сбалансированные уровни NGF необходимы для поддержания беременности [Tometten M et al., 2005]. При этом чрезмерное повышение NTs также может явиться признаком нарушения в системе «мать-плацента-плод». Значительное повышение экспрессии децидуального NGF [Frank P et al., 2014] и TrkA-рецепторов [Tometten M et al., 2004] в модели самопроизвольного выкидыша, вызванного стрессом, связано с нейрогенным воспалением. При этом стрессовое воздействие преобразуется в увеличение локальной продукции NGF и высвобождение воспалительного нейропептида – субстанции P из децидуальных чувствительных нервных окончаний, что усиливает хемотаксис иммунных клеток, также экспрессирующих NGF [Fan CG et al., 2005], что, в свою очередь, способствует увеличению плотности нервных волокон, экспрессирующих субстанцию P и приводит к формированию воспалительной среды, характеризующейся повышенной экспрессией цитокинов Th1 и молекул адгезии, что в конечном итоге вызывает резорбцию плода [Tometten M et al., 2006; Frank P et al., 2014]. Повышение уровня NGF в плаценте, особенно в материнской ее части, может явиться ответом на развитие в ней ОС, например, при ПЭ [Sahay AS et al., 2015]. Можно предположить, что NTs способны защитить клетки трофобластов от апоптоза, индуцированного цитокинами или ОС. Подобный эффект уже хорошо изучен в отношении других факторов роста, включая эпидермальный фактор роста (EGF) и инсулиноподобный фактор роста (IGF) [Smith S et al., 2002; Moll SJ et al., 2007]. Избыточный уровень ОС, вызываемый ГГЦ, способен негативно влиять на плацентарный ангиогенез и ремоделирование спиральных сосудов плаценты, в частности, за счет изменения уровня экспрессии различных транскрипционных факторов (KLF8, Ets-1, NFκB, Sp1, Sp3, STAT-3, Nrf2), которые регулируют экспрессию и активность белков, вовлеченных в процессы ангиогенеза и инвазии трофобласта (VEGF, MMP и др.) [Pereira RD et al., 2015]. Состояние ОС вызывает окислительную модификацию белков proBDNF и proNGF, препятствующую их процессингу протеазами, в результате чего происходит накопление их незрелых форм [Fleitas C et al., 2018].

При этом именно в МЧП показано усиление окислительной модификации белков, накопление про-форм NTs и активация каспазы-3 без признаков воспаления.

Эффективное расщепление pro-BDNF в m-BDNF несколькими MMPs была продемонстрирована в клеточной культуре [Lee R et al., 2001] (Hwang et al. 2005), показано, также, что MMP-9 отвечает за превращение pro-BDNF в m-BDNF в гиппокампе мышей (Mizoguchi et al. 2011). Процессинг proBDNF имеет несколько уровней, и экспрессия или активация вовлеченных протеаз представляют собой потенциальные мишени для регуляции баланса изоформ BDNF. Регулируемое равновесие между pro-BDNF и m-BDNF становится решающим как для физиологических, так и для патологических состояний. [Foltran RB, Diaz SL, 2016]. В отличие от нейронов, в которых секреция BDNF может быть не только конститутивной, но и активно-зависимой или регулируемой, в ненеурональных клетках секреция его исключительно конститутивная (Seidah et al. 1996 г.; Mowla et al. 2001). Кроме того, показано, что BDNF и NGF через активацию своих специфических рецепторов TrkB и TrkA стимулируют экспрессию MMP и повышают способность клеток эндотелия к миграции и васкулогенезу [Caporali A, Emanuelli C, 2009; Sahay AS et al., 2017]. В то же время, ряд исследователей предполагают, что MMPs, в частности MMP-9 и MMP-3, не участвуют в процессинге pro-NGF в m-NGF, а ответственны за деградацию m-NGF в биологически неактивные пептиды [Cuellar AC, Bruno MA, 2007; Kucharczyk M et al., 2016; Pentz R et al., 2021]. Однако другие авторы показывают обратное, подчеркивая участие MMP-2 в процессинге pro-NGF в m-NGF, отмечая, однако, что активация самого MMP-2 может и не зависеть от NGF [Saygili E et al., 2010]. Существует также предположение, что proNGF в периферических тканях и ЦНС является основной изоформой этого NT, обладающей сходными со зрелой формой mNGF биологической активностью и эффектами и для осуществления своего действия не требующей дальнейшего процессинга до mNGF, который в тканях не всегда обнаруживается [Fahnestock M, Shekari A, 2019]. Данное заключение выдвинуто группой ученых на основании своих исследований, выполненных с начала 2000-ых годов, в основе которых лежит предположение, что proNGF

активно связывается не только с p75NTR, но и с TrkA рецептором. При этом не всегда, другими исследователями данное предположение рассматривается как абсолютно доказательное. Действительно, мы в нашей работе, как и многие другие исследователи, также не смогли обнаружить mNGF, однако, некоторые из них полагают, что причина этого заключается в том, что образующийся биологически активный mNGF с высоким сродством связывает рецепторы TrkA, в то время как оставшийся свободный mNGF быстро разрушается активированной MMP-9 [Cuello AC, Bruno MA, 2007]. Также слабо выраженное обнаружение mNGF может быть связано с тем, что proNGF легко образует стабильный комплекс с растворимым тканевым альфа-2-макроглобулином, который повышает его устойчивость к протеолитическому расщеплению [Barcelona PF, Saragovi HU, 2023]. Кроме того, в настоящее время существуют разногласия по поводу того, оказывает ли proNGF нейротрофическое действие после связывания с TrkA. Показано, что proNGF (мутантные формы proNGF устойчивые к расщеплению) и mNGF связываются с p75NTR с сопоставимым сродством, в то время как proNGF имеет более низкое сродство, чем mNGF для TrkA. При этом показано, что proNGF при связывании с TrkA запускал нейротрофический процесс, хотя и менее эффективно, чем mNGF. [Clewes O et al., 2008]. Эффекты данного взаимодействия в ненейрональных тканях, исследованы еще хуже. В этой связи необходимо отметить, что с образованием комплекса pro-NGF с сортилином и TrkA продемонстрировано участие его сигнальных путей в усилении инвазии и метастазировании опухоли молочной железы [Demont Y et al., 2012; Lévêque R et al., 2019]. Несмотря на то, что предшественники proNGF и proBDNF способны связываться соответственно с рецепторами TrkA и TrkB и оказывать сходные со зрелыми формами NGF и BDNF эффекты, более селективно proBDNF и proNGF связываются с рецептором p75NTR, образуя комплекс с сортилином и индуцируя активацию путей p38 и JNK, оказывают проапоптотическое действие и способствуют развитию воспалительных процессов [Minnone G et al., 2017; Mufson EJ et al., 2019; Sycheva M et al., 2019; Luo M et al., 2021; Tian Y et al., 2022].

При этом предположения об участии сигнала NGF / p75NTR в регуляции процессов апоптоза в плаценте в основном базируются на косвенных свидетельствах. Показано, что p75NTR экспрессируется на клетках трофобласта, как цитотрофобласта, так и СТБ [Frank P et al., 2014], вследствие чего возможной функцией NTs, и, в частности, NGF может быть регуляция апоптоза [Tometten M et al., 2005]. Накопленной в настоящее время информации по экспрессии p75NTR клетками трофобласта недостаточно для заключения о том, какие процессы обусловлены активацией данного рецептора. Однако роль участия сигнала NGF / p75NTR в плаценте видимо шире, нежели имеющиеся на настоящее время представления, что подтверждается не только тем, что нам, как и многим другими исследователям не удалось выявить зрелую форму NGF, но и тем, что также не удалось обнаружить экспрессию рецептора TrkA в обеих изученных частях плаценты.

Возможность проанализировать полученные нами данные по изменению уровня другого нейротрофина – BDNF и его изоформ в различных частях плаценты при ГГЦ отчасти возможна благодаря многолетней работе Kawamura K, и соавт. в области исследования роли данного NT в плаценте при различных акушерских патологиях (ПЭ, ЗВУР, преждевременные роды, пузырный занос). Показано, что передача сигналов, опосредованная BDNF через TrkB, играет важную роль в имплантации эмбриона, последующем развитии плаценты и росте плода за счет поддержания пролиферации и выживаемости трофобласта. [Kawamura K et al., 2009]. Установлено, что ингибирование сигналинга BDNF/TrkB приводит к уменьшению толщины лабиринтной области, веса плаценты и плода, а также активации апоптоза во всех отделах плаценты [Kawamura K et al., 2009]. Поэтому наблюдаемые нами в условиях материнской ГГЦ снижение веса плаценты, нарушение развития ее лабиринтной и базальной части, а также усиление процессов апоптоза, что подтверждается активацией каспазы-3 в МЧП, могут являться следствием негативного воздействия на сигнальные пути BDNF и NGF в плаценте и увеличением взаимодействия pro-форм с p75NTR.

Нами показано, что с увеличением срока беременности в норме соотношение mBDNF/proBDNF в МЧП увеличивается. Так отмечено, что уровень proBDNF в МЧП на сроке E14 значительно превосходит содержание этой изоформы на сроке E20 и согласуется с данными о повышении содержания BDNF в плаценте крыс во второй трети внутриутробного развития по сравнению с наблюдаемым в конце беременности [Garces MF et al., 2014], что, возможно, имеет функциональную связь с повышением уровня других ангиогенных факторов в этот период [Silva JF et al., 2017]. При материнской ГГЦ в МЧП уже на сроке E14 по сравнению с физиологически протекающей уровень proBDNF повышен, к E20 данная pro-форма при ГГЦ повышена уже в обеих исследованных структурах МЧП и ПЧП. При этом уровень зрелой изоформы mBDNF при ГГЦ оставался неизменным. Подобная картина может отражать как усиление синтеза, что не подтверждается данными по анализу уровня экспрессии гена BDNF, так и нарушение процессинга его незрелой формы. Нарушение превращения proBDNF в mBDNF, выраженное в снижении соотношения mBDNF/proBDNF, при ГГЦ согласуется с полученными нами данными о значительном снижении активности MMP-2. Однако имеется исследование, которое демонстрирует, что соотношение proBDNF/mBDNF не зависело от нокдауна MMP2, но увеличивалось в средах клеточных линий рака легкого при нокдауне MMP-9 [Dorandish S et al., 2021]. Исследователи делают заключение, что это связано с тем, что имеются данные, согласно которым MMP-2 не способна превращать proBDNF в mBDNF, несмотря на сопоставимые ферментативные характеристики MMP-2 с MMP-9 [Je HS et al., 2012; Niculescu D et al., 2018]. Однако другие исследователи отсутствие данных свойств приписывают именно MMP-9, а не MMP-2. Кроме того, имеются данные о том, что изменение в постнатальном гиппокампе крысят соотношения mBDNF/proBDNF после пренатального стресса сопровождается только снижением активности и экспрессии тканевого активатора плазминогена (tPA), ключевой сериновой протеазы, участвующей во внеклеточном превращении pro-BDNF в mBDNF, тогда как активности MMP-2 и MMP-9 не наблюдается [Yeh CM et al., 2012]. На данный момент имеющиеся исследования не позволяют сделать общего вывода о роли

MMP в процессинге NTs, однако тот факт что нарушение соотношения mBDNF/proBDNF наблюдалось именно в тех тканях и на тех же сроках, когда было также отмечено снижение активности MMP-2: в МЧП на E14 и E20, а также в мозге плода на E14, позволяет сделать предположение об участии MMP-2 в патологическом нарушении процессинга NTs при ГГЦ, или, как минимум, о взаимосвязи данных явлений. Данное заключение подтверждается тем, что отсутствие изменения соотношения mBDNF/proBDNF при ГГЦ в ПЧП на E14 и мозге плода на E20 также не сопровождается снижением активности MMP-2. Более того, в ПЧП на сроке E20 наблюдалось снижение уровня экспрессии гена рецептора TrkB. Ингибирование сигнального пути BDNF/TrkB может негативно влиять на процессы ангиогенеза, вызывая в эндотелиальных клетках активацию апоптоза и снижение экспрессии рецептора Kdr (VEGFR-2) [Kim H et al., 2004], что наблюдалось и в нашем исследовании. Снижение активности MMP-2 может также являться не причиной нарушения в процессинге NTs, а следствием: как уже отмечалось, снижение передачи сигналов через тирозинкиназные рецепторы может привести к снижению синтеза VEGF и MMP-2 [Caporali A, Emanuelli C, 2009; Sahay AS et al., 2017].

Несмотря на то, что в отличие от BDNF оценивалась только pro-форма NGF, ее повышение также можно рассматривать как показатель нарушения его посттрансляционной модификации. Наличие возможности посттранскрипционной регуляции содержания NTs в плаценте подтверждается и данными о том, что наблюдаемые при состоянии ПЭ изменения содержания белков BDNF и NGF в различных отделах плаценты человека не сопровождались изменениями экспрессии их мРНК [Sahay AS et al., 2015; Sahay AS et al., 2019]. При этом характер воздействия материнской ГГЦ на уровне ПЧП в нашем исследовании для двух рассмотренных NTs различный. Так экспрессия гена BDNF на E20 имеет тенденцию к повышению, тогда как NGF – значимо снижается.

Полученные нами данные позволяют утверждать, что материнская ГГЦ оказывает воздействие на ряд проангиогенных и ростовых факторов в плаценте (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF и NGF). При этом эффекты ГГЦ варьируют в

зависимости от морфологического и функционального отдела плаценты и срока ее развития. Нарушение баланса проангиогенных и ростовых факторов в плаценте под влиянием ГГЦ может привести к недостаточному развитию плацентарной сосудистой сети, которое наблюдается при заболеваниях матери и осложнениях беременности (ПЭ, ЗВУР), фактором риска которых служит высокий уровень ГЦ. Снижение поступления питательных веществ и кислорода от матери к плоду вследствие нарушений процесса ангиогенеза в плаценте может являться одной из причин наблюдаемых при материнской ГГЦ нарушений развития мозга плода и снижения когнитивных функций потомства.

Отмеченные патологические процессы в МЧП подтверждается данными о снижении в плаценте нейрегулина 1 (NRG1). Показано, что представители семейства белков NRG (NRG1-4) функционируют как факторы роста, которые могут связываться с рецепторами EGF [Fang C et al., 2021]. Можно предположить, что NRG1 в плаценте выполняет функции, сходные с EGF, в отношении которого показана роль в стимулировании инвазии и пролиферации экстраворсинчатых клеток трофобласта (EVT), через активацию PI3K/Akt сигнального пути [Fang L et al., 2021; Ticiani E et al., 2022].

Показано, что клетки EVT экспрессируют рецепторы NRG1: ErbB2, который не связывается с лигандом, но активно образует димеры с другими рецепторами ErbB2 [Jokhi PP et al., 1994; Yarden Y, Sliwkowski MX, 2001; Meinhardt G et al., 2015] и истинный рецептор ErbB3 [Fock V et al., 2015a; Fock V et al., 2015b]. Также, экспрессия рецептора NRG1 ErbB3 была обнаружена в трофэктодерме бластоцисты кроликов, и, далее, на цито- и СТБ, тогда как в месте имплантации к бластоцисте эпителиальные клетки просвета матки демонстрировали отчетливую мембранную иммунолокализацию ErbB2 [Klonisch T et al., 2001]. Продемонстрирована экспрессия и секреция самого NRG1 децидуальными стромальными клетками человека. Функциональные исследования показали, что NRG1 способствует образованию EVT в культурах эксплантов плаценты матерью [Fock V et al., 2015a].

Несмотря на то, что исследование роли NRG1 в плаценте, в отличие от нервной и сердечно-сосудистой систем, находится на начальном этапе, в настоящее

время уже предложена модель действия NRG1 на границе между плодом и матерью [Fock V et al., 2015a]. Децидуальные стромальные клетки (ДСК) продуцируют NRG1, который взаимодействует с его рецептором ErbB3, экспрессируемым дифференцированными трофобластами клеточной колонки. Клеточный ответ передачи сигналов NRG1 через MAPK/ERK и PI3K/Akt пути включает в себя подавление апоптотической гибели клеток, что, в свою очередь, приводит к стабилизации размера клеточной колонки трофобласта. При нарушении оси NRG1–ErbB2–ErbB3 трофобласты более восприимчивы к апоптотическим стимулам и погибают от апоптоза при различных негативных воздействиях. Это приводит к уменьшению количества клеточных колонок, что, в свою очередь, может привести к недостаточной инвазии EVT в децидуа [Fock V et al., 2015a]. Данные авторы не рассматривают возможность аутокринной регуляции этого процесса, в связи с тем, что они показывают, что NRG1 экспрессируют и секретируют именно ДСК. Этот вывод согласуется с исследованием, в котором сообщалось об экспрессии NRG1 в железах матки и стромальных клетках небеременного эндометрия [Srinivasan R et al., 1999]. Напротив, трофобласты по их данным не демонстрируют или демонстрируют очень слабую экспрессию NRG1 [Fock V et al., 2015a]. Однако в последнее время было показано, что NRG1 экспрессируется преимущественно именно в цитоплазме EVT, кроме того его экспрессия у беременных с ПЭ была значительно снижена [Liu Y et al., 2023]. В системе *in vitro* показано, что NRG1 контролирует синтез ДНК в трофобластах линии HTR-8 / SVneo через сигнальный путь NF-κB [Liu Y et al., 2023]. Опираясь на немногочисленные данные о возможных функциях и об экспрессии NRG1 и его рецепторов в плаценте в норме и при ПЭ, отмеченное нами снижение уровня NRG1 в МЧП указывает на вероятное нарушение инвазии трофобласта и формирование плаценты.

Таким образом нарушение формирования плаценты, наблюдаемое при ГГЦ может явиться причиной нарушения развития плода, что проявляется в снижении веса плодов и плацент. У человека одним из последствий повышенного содержания ГЦ в крови матери во время беременности, наряду с другими акушерскими

осложнениями, является задержка внутриутробного развития плода (ЗВУР) и снижение массы новорожденного [Dai C et al., 2021a; Gaiday A et al., 2022; Memon SI et al., 2023]. Наблюдаемое нами снижение общего размера плаценты и недостаточное развитие плацентарного сосудистого дерева может способствовать снижению транспорта питательных веществ и кислорода от матери к плоду. Известно, что основным фактором, определяющим скорость внутриутробного роста, является поступление питательных веществ из плаценты к плоду, которое зависит от морфологии, размера и кровоснабжения плаценты [Fowden AL et al., 2006; Burton GJ et al., 2016]. С точки зрения морфологии неполное развитие сосудистой системы в плаценте при ГГЦ в нашем исследовании выразилось в снижении площади материнских синусоид в зоне лабиринта, в следствии чего уменьшается площадь контакта крови матери со слоем СТБ. Подобное нарушение сосудистой системы зоны лабиринта, обеспечивающей транспорт питательных веществ от матери к плоду, часто приводит к задержке роста плода [Sapehia D et al., 2023]. Под влиянием пищевого дефицита фолатов, сопровождающегося повышением уровня ГЦ, у беременных мышей также отмечается уменьшение толщины базального и лабиринтного слоев плаценты, снижение количества гигантских клеток трофобласта, что авторы связывают с патологической активацией процессов аутофагии и апоптоза в плаценте [Yin X et al., 2019].

Кроме того, имеется предположение, что ГЦ может затруднять транспорт протеиногенных аминокислот от матери к плоду, конкурируя с ними за общие транспортеры аминокислот в плаценте [Jansson T, 2009; Tsitsiou E et al., 2009; 2011], что также способно привести к снижению массы плода. Транспорт ГЦ через плаценту подтверждается полученными нами данными об одновременном повышении уровня ГЦ в сыворотке матери и плода уже через час после метиониновой нагрузки. Причем повышенный уровень ГЦ также сохранялся в течение 18 часов. Повышение уровня ГЦ не только в сыворотке крови плода, что мы рассматриваем как пренатальную ГГЦ (ПГГЦ), но и в мозге плода и амниотической жидкости, указывает на то, что ГЦ, способный проходить через плаценту способен напрямую оказывать свое токсическое воздействие на плод и

его нервную систему, в частности. При обнаруженных нами нарушениях развития плаценты и, вероятно, снижением ее общей транспортной функции, можно ожидать дефицит транспорта и других важных соединений, в частности моноаминов. Плацента человека представляет собой уникальный вненейрональный участок экспрессии транспортеров моноаминов на апикальных мембранах микроворсин СТБ, осуществляющих транспорт материнских моноаминов, и на базальных мембранах СТБ, которые опосредуют транспорт катехоламинов из кровеносной системы плода [Horackova H et al., 2022]. Они имеют патофизиологическое значение в пренатальном периоде, а моноамины (5-ОТ, ДА, НА) являются важнейшими нейромодуляторами для правильного функционирования плаценты и развития плода, включая пролиферацию клеток, дифференцировку и миграцию нейронов. Синтез катехоламинов начинается в середине беременности (у мышей: дофамин – E9,5 НА – E10,5, адреналин - E13,5, соответственно у крыс на 2 дня позднее [Kennedy TG et al., 2007]), Норадренергическая система регулирует развитие клеток Кахаля-Ретциуса, которые являются первыми нейронами коры головного мозга и играют важную роль в миграции нейронов и формировании ламинарной структуры коры [Naqui SZ et al., 1999]. Серотонинергические клетки активно генерируются в головном мозге примерно от E11 до E15 у крысы [Thomas SA et al., 1995; Herlenius E, Lagercrantz H, 2001]. Таким образом, имеется предположение, что плацента, и СТБ, в частности, играют нейтрализующую роль в предотвращении повышения уровня моноаминов в тканях плода [Hadden C et al., 2017; Horackova H et al., 2022]. Несмотря на важность данной темы для понимания механизмов участия моноаминов матери и плода в процессах развития плода, исследования в этой области весьма немногочисленны, но активно развиваются в последнее время. Ранее было показано, что до 50% экстрагированного фетального НА метаболизируется в трофобласте через СОМТ и МАО-А и высвобождается на материнской стороне в виде неактивных метаболитов [Sodha RJ et al., 1984]. Сравнительно недавно было установлено, что МАО СТБ при необходимости также участвует в деградации избытка материнских моноаминов [Zhang H et al., 2010; Palmer K et al., 2011;

Karahoda R et al., 2020]. В частности, для 5-ОТ показано отсутствие транспорта от матери к плоду через плаценту крыс в норме на доношенном сроке, однако когда MAO-A ингибируется показано ограниченное поступление плацентарного 5-ОТ к плоду [Karahoda R et al., 2020], наличие подобных особенностей транспорта можно предположить и для других моноаминов. На наличие ограниченного плацентарного переноса моноаминов от матери плоду указывают данные, что за счет него 5% плодов мышей с нарушением гена дофамин-бета-гидроксилазы не умирали внутриутробно (с E11 по E18,5), а рождались живыми [Thomas SA et al., 1995; Herlenius E, Lagercrantz H, 2001].

Выше нами уже рассматривались механизмы, посредством которых ГЦ и нарушение метионинового цикла могут приводить к нарушению метаболизма моноаминов. Предполагаемое их увеличение вследствие ингибирования COMT при ГГЦ подразумевает повышение нагрузки на транспортные системы моноаминов и на активность второго фермента их деградации – MAO в плаценте. Мы не исследовали уровень транспортеров моноаминов в плаценте, однако обнаруженное снижение в ней удельной активности MAO при ГГЦ на E20 указывает не на усиление метаболизма моноаминов, а скорее на его снижение. СТБ в норме не накапливает моноамины, а эффективно их метаболизирует, что подтверждается отсутствием экспрессии их везикулярных транспортеров (VMAT) [Bottalico B et al., 2004; Perić M et al., 2022]. В связи с этим, предполагаемый избыток моноаминов при ГГЦ в условиях снижения активности ферментов их деградации может привести к последующему их аутоокислению, что может вносить вклад в развитие ОС в плаценте. Имеются данные, которые показывают, что у мышей с избытком 5-ОТ скорость гибели клеток трофобласта была значительно выше, чем у мышей с его недостатком [Mercado CP et al., 2013]. Гибель клеток трофобласта при накоплении 5-ОТ происходит по каспаза-3-независимому пути [Hadden C et al., 2017]. При этом в мозге плода на E20 содержание НА при ПГГЦ в нашем исследовании не отличалось от содержания его в мозге плодов с физиологически протекающей беременностью. Однако нельзя исключить дисбаланс в содержании других моноаминов на данном, и на более ранних, сроках

беременности. В пользу данного предположения можно отнести обнаруженное нами повышение уровня VMAT2 в мозге плода на E20 при ГГЦ, что указывает на усиление транспорта избытка моноаминов во внутриклеточные везикулы [Lohr KM et al., 2014; Stefanovic B et al., 2016; Lee H et al., 2023]. Показано, что подобное компенсаторное увеличение количества VMAT2 ингибирует гибель клеток, вызванную окислительным повреждением свободных цитозольных моноаминов [Lee H et al., 2023]. Кроме того, VMAT2 обеспечивает нейрозащиту не только от эндогенных, но и от экзогенных токсикантов, и что, хотя VMAT2 был адаптирован эукариотами для синаптической передачи, он получен из филогенетически древних белков, которые первоначально эволюционировали с целью клеточной защиты [Guillot TS, Miller GW, 2009].

Несмотря на то, что плацента и плод при ГГЦ видимо реализуют механизмы поддержания нормальных уровней моноаминов в мозге плода, остаются спорными как само качество реализации этих механизмов, так и надежность и безопасность последствий использованных для этого средств. При этом действительно, на E20 в сыворотке и мозге плода при ПГГЦ не происходит значимого изменения активности СОД и ПОБ, отмечено только некоторое повышение уровня МДА в мозге плодов. Уровень исследованных провоспалительных цитокинов также не изменяется, как например, в модели внутриутробной инфекции с введением липополисахаридов [Ghiani SA et al., 2011], и показано только увеличение уровня IL-10, что однако не стоит однозначно расценивать как положительную характеристику, так как, по факту, уже является дисбалансом, который также может влиять на развитие моноаминергических систем в мозге плода [Jarskog LF et al., 1997]. Показано, что воздействия, связанные с активацией иммунной системы матери на поздних сроках беременности большей частью приводят к повышению уровня IL-10 в мозге плода, что направлено на снижение или даже предотвращение прогрессирования апоптоза нейронов в постнатальном периоде, например, путем ингибирования продукции и активности TNF- α [Bachis A et al., 2001]. Следовательно повышение уровня IL-10 в нашей работе также вероятно связано с регуляцией апоптоза. Кроме того, тенденция к снижению активности СОД в мозге,

отмеченная на E20, на P1 достигает статистической значимости. При этом у крысят в норме после рождения уровень активности СОД в мозге увеличивается почти в 1,5 раза, тогда как у крысят с ПГГЦ она после рождения практически не изменяется, а в сыворотке крови даже снижается. В норме ПОЛ при рождении повышается, что свидетельствует об увеличении уровня АФК, связанном с физиологическими событиями в неонатальной адаптации. При этом активируются антиоксидантные системы, что приводит к снижению уровня АФК, и тем самым поддержанию окислительного гомеостаза [França de Souza D et al., 2020; Riccio AV et al., 2023]. Показано, что повышенная экспрессия внутриклеточной СОД в мозге новорожденного обеспечивает значительную защиту от его повреждения гипероксией [Zaghloul N et al., 2012]. Подобно активности СОД в мозге крысят с нормальным внутриутробным развитием по сравнению с крысятами после ПГГЦ на P1 повышен уровень ОАА. Отсутствие увеличения активности СОД и ОАА в мозге крысят с ПГГЦ на P1 указывает на снижение их антиоксидантных адаптационных резервов, а следовательно, высокой кислородной нагрузки после рождения по сравнению с внутриутробным периодом развития, что может иметь важное патофизиологическое значение для дальнейшего развития мозга. Важно отметить, что клетки ЦНС имеют высокую скорость потребления кислорода, особенно в условиях гипероксии [D'Agostino DP et al., 2007; Ahn ES et al., 2008], и при этом обладают меньшей антиоксидантной активностью по сравнению с другими тканями [Uttara V et al., 2009], что может привести к избыточной продукции АФК и активных форм азота. Как следствие, наблюдается избыточная гибель клеток, что в исследованиях по влиянию гипероксии на клетки мозга сопровождается снижением активности NT-зависимых путей а также индукцией проапоптотических путей, увеличении количества провоспалительных цитокинов, матриксных металлопротеиназ и ОС [D'Agostino DP et al., 2007; Gerstner V et al., 2008; Sifringer M et al., 2009].

В нашем исследовании мы ограничились регистрацией повышенного уровня МДА в мозге плодов на E20, так как целью являлось подтверждение гипотезы об усилении ПОЛ в мозге при ПГГЦ в период пренатального развития. Учитывая

особенности физиологической адаптации после рождения к новой прооксидативной среде с высоким уровнем кислорода, представляется крайне маловероятным, что у крысят после ПГГЦ, со сниженной активностью антиоксидантных ферментов, уровень МДА мог бы снизиться, так как ПОЛ является одним из основных последствий и индикатором увеличения АФК для мозга. Кроме того, другими исследователями в схожей экспериментальной модели ПГГЦ, ранее уже показано значительное усиление ПОЛ в мозге крысят первого дня жизни, выраженное в увеличении его продуктов в цитозоле, во фракциях ядер и, особенно, митохондрий мозга крысят [Baydas G et al., 2007b; Koz ST et al., 2010]. Показана также значительная положительная корреляция между уровнями ГЦ в плазме и уровнем МДА в мозжечке новорожденных крысят [Bagheri F et al., 2015]. Отсутствие значимого окисления белков, как и на E20, подтверждается отсутствием отличия по сравнению с контролем уровня 3-нитротирозина на P1. Как уже отмечалось, одним из механизмов развития ОС при ГГЦ является накопление пероксинитрита, а нитрованию им тирозиновых остатков белков в нервной ткани отводится особенно важная роль. При этом продукты окисления тирозина являются более стабильными в отличие от карбонилпроизводных аминокислот [Dubinina EE et al., 2002]. Известно, что при снижении количества тетрагидробиоптерина, вследствие его окисления, опосредованного избытком ГЦ, NO-синтаза начинает генерировать супероксидные анион-радикалы, которые далее при взаимодействии с оксидом азота образуют пероксинитрит [Faraci FM, Lentz SR, 2004; Powers RW et al., 2004]. Кроме того, ГЦ способствует окислению сульфгидрильных групп NO-синтазы, что также снижает активность данного фермента [Zhang X et al., 2000]. Однако тот факт, что в мозге новорожденных крысят после ПГГЦ уровень 3-нитротирозина и АК, которая способствует регенерации тетрагидробиоптерина, не отличается от контрольных значений, позволяет предположить, что ПГГЦ не приводит к значимому нарушению работы NO-синтазы в мозге в период внутриутробного развития.

Вместе с тем обнаружено повышение уровня окислительной модификации нуклеиновых кислот в мозге новорожденных крысят после ПГГЦ, что не

исследовалось на E20. Показано, что ГЦ достаточно быстро поглощается нейронами, что приводит к накоплению его высоких концентраций внутри клетки. Повышенные уровни ГЦ в ядре клеток могут вызывать разрывы цепей ДНК, нарушая цикл метилирования ДНК [Blount BC et al., 1997]. Нейротоксичность ГЦ частично обусловлена повреждением ДНК [Kruman, P et al., 2000]. Одним из потенциальных механизмов, с помощью которых ГЦ может увеличивать повреждение ДНК, является ингибирование активности клеточного GPx [Urchurch GR, Jr. et al., 1997]. Окислительное повреждение ДНК коррелирует со скоростью окисления глутатиона [Joseph JA et al., 1996]. Кроме того, несмотря на то, что методом иммуноблотинга нами не было показано образования фрагмента активной каспазы-3, мы демонстрируем увеличение ферментативной активности каспазы-3/7 с помощью специфического субстрата. Это может быть связано с тем, что данные по активации каспаз методом вестерн блота не всегда совпадают с результатами исследования активности с использованием специфических субстратов [van Raam BJ, Salvesen GS, 2012], а также в целом с низким уровнем активной каспазы-3 в мозге плода. Кроме того, используемый нами субстрат Ac-DEVD-pNA являются общим для каспазы-3 и каспазы-7 [Peterson QR et al., 2010], которые, имеют перекрывающуюся, но при этом и различную роль в апоптозе [Lamkanfi M, Kanneganti T-D, 2010]. Так, активация каспазы-7, в отличие от каспазы-3, требует активации каспазы-1, которая является инициатором воспалительного ответа [Lakhani SA et al., 2006]. Полученные нами результаты согласуются и дополняют данные других исследований, в которых представлен вывод о том, что ПГЦ стимулирует клеточную гибель в нервной ткани на основании повышения уровня фрагментации ДНК с образованием олигонуклеосомных фрагментов, увеличении экспрессии мРНК и количества белка p53 и снижении уровня антиапоптотического белка Bcl2 [Koz ST et al., 2010]. Отмеченные нами результаты воздействия ГЦ на развивающийся мозг плодов крыс практически полностью соотносятся с уже описанными эффектами влияния ГЦ на эмбриональный мозг цыплят: повышение уровня гидроперекисей липидов, изменения мембран головного мозга, выраженное в снижении уровня длинноцепочечных ненасыщенных мембранных жирных

кислот и повышении уровня насыщенных короткоцепочечных мембранных жирных кислот, что коррелировало с индуцированным ГЦ увеличением активности каспазы-3 в мозге, снижением массы мозга и самих эмбрионов [Miller RR et al., 2003; Miller RR et al., 2006].

Таким образом, можно предположить, что поддержание нормального уровня моноаминов в мозге накануне родов в условиях усиленной клеточной гибели при ПГГЦ достигается увеличением их концентрации в клетке, что подтверждается данными о повышении уровня VMAT2, что, в связи с возможностью их активно окисляться, является потенциально опасным для развития ОС и, следовательно дополнительной интенсификации процессов апоптоза. При этом накопленные данные свидетельствуют о том, что даже временное нарушение баланса моноаминов во время беременности может привести к необратимым изменениям в структурах и функциях мозга плода, имеющие последствия во взрослой жизни. Интересно, что самки мышей, родившихся в условиях нарушения работы дофамин- β -гидроксилазы на этапах эмбриогенеза, с последующим восстановлением уровня НА с E14,5 обладали недостаточной способностью заботиться о своем потомстве. Таким образом, по-видимому, существует критический момент на раннем этапе развития, когда НА участвует в формировании путей, ответственных за материнское поведение [Thomas SA, Palmiter RD, 1997]. Имеются экспериментальные и клинические исследования, указывающие на то, что пренатальный стресс, сопровождавшийся нарушением моноаминергического обмена связан с последующими когнитивными расстройствами у потомства [Weinstock M, 1997; Bowman RE et al., 2004; Bernhardt L et al., 2018].

В предложенной модели ПГГЦ, создаваемой с 4 дня гестации, возможное цитотоксическое воздействие ГЦ может быть реализовано как на процессы имплантации (E5,5-6) так и на все этапы нейруляции: первичной, начинающейся у крыс с E8-9, и вторичной, заканчивающейся к E13. При этом передний и задний нейропор у крыс закрываются на E10,5 и E11 соответственно (26-28 день гестации у человека) [DeSesso JM et al., 1999; Semple BD et al., 2013]. Имеются данные, что тератогенные свойства ГЦ могут играть важную роль в возникновении дефектов

нервной трубки (ДНТ) [Liu H et al., 2000; Yang M et al., 2016; Kobus-Bianchini K et al., 2017; Zhang Q et al., 2018]. Показано, что более высокие уровни ГЦ способствуют возникновению ДНТ за счет увеличения гомоцистеинилирования гистона H3 (H3K79Hcy) в мозге плода, что приводит к аномальной экспрессии генов, связанных с ДНТ [Zhang Q et al., 2018].

Начиная со второй недели беременности у крыс, начинают формироваться специфические области ЦНС с нейрогенезом и миграцией клеток в переднем, среднем и заднем мозге. Далее следует последовательность процессов развития, включая пролиферацию, миграцию, дифференцировку, синаптогенез, апоптоз и миелинизацию, которые продолжаются в постнатальном периоде. [Rice D, Barone S, Jr., 2000].

Промежуточный мозг, включающий ядра гипоталамуса и таламуса, развивается на эмбриональном и практически завершается на внутриутробном периоде как у крыс (E12-E19), так и у человека (4-12 неделя беременности). Кортикальные структуры переднего мозга неокортекса и формации гиппокампа начинают развиваться во внутриутробном периоде как у крыс, так и у человека, при этом пролиферация глии и нейронов, дифференцировка и синаптогенез продолжается и в постнатальном периоде. [Bayer SA et al., 1993]. Несмотря на то, что временные критические периоды нейрогенеза различаются в разных областях мозга, хроническое воздействие ПГГЦ до E20 предполагает возможность воздействия на любой процесс развития нервной системы в период внутриутробного развития.

По мере миграции нейронов взаимодействие внеклеточных и внутриклеточных сигналов инициирует экспрессию определенных генов, которые будут влиять на нейрональный или глиальный фенотип. Многочисленные примеры, подтверждают утверждение о том, что окружающая среда влияет на этот процесс развития. Агенты окружающей среды, влияющие на дифференцировку нервной системы, относятся к широкому спектру химических классов, включая этанол [Vallés S et al., 2002; Li Y et al., 2021], никотин [Audesirk T, Cabell L, 1999; Lim DK, Kim HS, 2001], метилртуть [Barone S et al., 1998; Jebbett NJ et al., 2013] и

свинец [Alfano DP, Petit TL, 1982] и др.. Важно отметить, что воздействия, которые изменяют пролиферацию и миграцию нейронов, часто приводят к изменению дифференцировки. Культуральные исследования микромаcсы клеток среднего мозга эмбрионов крыс показали, что ГЦ ингибирует в большей степени клеточную дифференцировку, и, в меньшей степени - пролиферацию. Степень ингибирования при этом является дозозависимой [Liu H et al., 2000]. ГЦ также снижал пролиферацию и дифференцировку нервных клеток куриного эмбриона [Kobus-Bianchini K et al., 2017]. В использованной нами модели ГГЦ после родоразрешения введение метионина крысятам и самкам в период лактации не проводилось, что снижает вероятность прямого воздействия ГЦ на процессы (миграция клеток, миелинизация и синаптогенез) в областях, которые уже подверглись нейрогенезу, причем активное завершение нейрогенеза в мозжечке и гиппокампе также уже происходит в отсутствие ГГЦ [Ornoy A et al., 2020].

Несмотря на то, что развитие нервной системы у крыс активно продолжается в раннем постнатальном периоде, который в целом соответствует 3 триместру беременности у человека, использованная модель ГГЦ не выходила за рамки пренатального периода, по ряду причин. К ним прежде всего относится исследование вклада плаценты в регуляцию развития мозга в условиях ГГЦ матери. Также, имеющиеся в литературе на настоящий момент данные, посвященные эффектам влияния пренатального стресса и стресса раннего возраста на постнатальное развитие нервной системы, в частности изменения глиальной функции, указывают на существенные их различия и необходимость четкого разграничения в подобных исследованиях [Orso R et al., 2023]. Кроме того показано, что внутриутробный период развития служит критическим временным окном, в течение которого воздействие добавок доноров метильных групп на мать может влиять на экспрессию генов в головном мозге, и эпигенетические изменения, индуцированные SAM в позднем эмбриональном и раннем внутриутробном периодах, не индуцируются, если SAM вводится в течение первой недели постнатальной жизни грызунов [Ornoy A et al., 2020]. При этом принято считать, что основные раунды эпигенетического перепрограммирования происходят во

время раннего эмбрионального развития, вскоре после оплодотворения [Lee Heather J et al., 2014]. Соответственно, основное воздействие ГЦ на развитие нервной системы, состояния непосредственно влияющего на процессы метилирования, стоит ожидать именно во внутриутробный период.

Не стоит также исключать, что и в развивающемся мозге ГЦ способна негативно воздействовать через метаботропные и ионотропные глутаматные рецепторы. Данный механизм достаточно хорошо исследован в различных отделах мозга взрослых животных, а также в системе *in vitro*. Несмотря на то, что установлено, что ГЦ приводит к гиперактивации NMDA-рецепторов, на эмбриональном мозге продемонстрированы и иные его эффекты. Так ГЦ и, особенно, его окисленные формы (гомоцистеинсульфиновая кислота и ГЦК), образующиеся при спонтанном окислении ГЦ [Thompson GA, Kilpatrick IC, 1996], через NMDA-рецептор дозозависимо ингибировали спонтанную активность нейронной сети эмбриональных корковых нейронов E15 крыс [Görtz P et al., 2004]. Показано, что ГЦ и ГЦ-тиолактон оказывают активирующее действие на спонтанную сетевую активность нейронов гиппокампа неонатальных крысят, что связано с активацией ионотропных рецепторов глутамата, что при хронической ГЦ может привести к нарушению формирования нейрональных сетей гиппокампа, а также вызывать гипервозбудимость и риск развития эпилепсии в постнатальный период [Курмашова Е.Д., и др. 2019].

Было показано, что активация пресинаптических глутаматных рецепторов участвует в высвобождении моноаминов [Wang JKT et al., 2006; Pittaluga A, 2021], что указывает на возможное влияние ГЦ и его метаболитов на данный процесс, однако реальные эффекты на развивающемся мозге в настоящее время пока не изучены. При этом, отсутствие потребления избытка метионина после рождения крысят, минимизирует вероятные эксайтотоксические эффекты воздействия ГЦ и его метаболитов на развивающийся мозг, что обусловлено достаточно низкой экспрессией рецепторов глутамата в период внутриутробного развития. Субъединицы NR1 и NR2B экспрессируются в нейронах коры головного мозга уже на E14 [Babb TL et al., 2005]. Также показано, что в зоне гиппокампа и теменной

кору ряд субъединиц NMDA-рецепторов, которые даже не обнаруживались на E18 и имели незначительную экспрессию на E20, значительно повышались уже у новорожденных крысят. Исключение составляет височная кора, в которой уже на E18 обнаруживаются все субъединицы NMDA-рецептора [Takai H et al., 2003], однако, имеются данные, что сборка субъединиц NR1-NR2B активно регистрируется уже после рождения [Babb TL et al., 2005]. ГГЦ в период раннего постнатального развития, предположительно имела бы более выраженные последствия в виде клеточной гибели, в связи с тем, что, например, в коре пик экспрессии субъединиц и сборки NMDA-рецепторов приходится на P20 [Babb TL et al., 2005; Semple BD et al., 2013]. Однако стоит отметить, что используемая нами хроническая ПГГЦ приводила к сохранению повышенного уровня ГЦ на P1 и P3 в сыворотке крови и на P1 в мозге. Так как нами показано, что у плодов на E20 уровень ГЦ через 24 часа после введения метионина приходит в норму как в сыворотке, так и в мозге, данное явление возможно связано с остаточным его поступлением с молоком матери или со снижением скорости метаболизма под влиянием стресса, связанного с переходом к постнатальной жизни. Данный факт является существенным и его стоит учитывать при оценке влияния ПГГЦ на последующее развитие нервной системы. Так, например, к моменту рождения клетки радиальной глии в развивающейся коре начинают дифференцироваться в астроциты, экспрессирующие глиальный фибриллярный белок (GFAP) [Semple BD et al., 2013]. Показано, что у крысят через 20 часов после рождения начинается активная пролиферация глиальных клеток в различных областях мозга. При этом в коре за шесть дней постнатальной жизни их количество увеличивается в 1,5 раза [Dmitrieva NI, 1984]. В связи с этим, при повышенном уровне ГЦ в мозге на P1 данный активный процесс формирования глии может стать мишенью для его токсического воздействия. Основным же процессом в развитии коры, на который в данной модели ПГГЦ вероятно приходится существенное токсическое воздействие является миграция нейронов в кортикальную пластину с E13-14 и формированием 6 слоев коры к E19 [Bayer SA, Altman J, 1990; Molnar Z, Clowry G, 2012; Sun T, Nevner RF, 2014; Ohtaka-Maruyama C, Okado H, 2016]. Данные литературы

свидетельствуют о том, что у плодов крыс различные неблагоприятные воздействия в процессе внутриутробного развития приводят к сходным нарушениям миграции нейробластов в разных областях коры головного мозга (префронтальной, височной, теменной и др.), поскольку механизмы миграции радиальных нейробластов в целом сходны [Rakic P, 1988]. Так нарушение миграции нейронов показано при пренатальном воздействии этанола [Delatour LC et al., 2019], ультразвука [Ang ESBC et al., 2006] и гипоксии [Vasilev DS et al., 2016]. Модель ПГГЦ с метиониновой нагрузкой приводит к сходным нарушениям миграции нейробластов в слоях теменной коры на E14 и в E18. При этом скорость образования нейробластов в развивающемся неокортексе снижается [Vasilev DS et al., 2023]. Нарушение цитоархитектоники коры при воздействии ГЦ показано также в мозге эмбрионов птиц. При этом отмечено уменьшение толщины коры головного мозга и снижение экспрессии белка β -тубулина III, ответственного за приобретение нейронального фенотипа клеток, NCAM, участвующих в процессе миграции нейронов и MAP, которые играют важную роль в морфологии нейронов. Также обнаруживается возникновение реактивного глиоза с увеличением экспрессии мРНК и содержания белка GFAP, что сопровождается увеличением белка p53, являющегося маркером активации апоптотических процессов [Cecchini MS et al., 2019]. Известно, что миграция клеток в развивающемся мозге зависит от баланса различных NTs и других сигнальных молекул и транскрипционных факторов. В ряде исследований сообщалось об изменениях уровней NTs (NGF, BDNF) в биологических жидкостях матери и плода в связи с развитием патологической беременности. У животных и человека концентрации BDNF и NGF снижаются при инфекциях в головном мозге и околоплодных водах потомства [Marx CE et al., 1999; Gilmore JH et al., 2003b]. В нашем исследовании высокий уровень ПГГЦ также приводит к изменению содержания BDNF в головном мозге плода. Повышение уровня proBDNF, в отсутствие изменений mBDNF, может быть обусловлено снижением метилирования промоторов гена *bdnf* в условиях ПГГЦ и, активацией транскрипции, отмеченной в нашем исследовании. При этом имеются данные, что метиониновая нагрузка приводит к увеличению числа метилированных цитозинов

промотора рилина, ответственного за регуляцию формирования слоистой структуры коры и модуляцию клеточной адгезии, в результате происходит снижение экспрессии данного белка в мозге мышей [Tremolizzo L et al., 2005]. Однако, в настоящее время до сих пор в различных исследованиях представлены противоречивые данные о нарушении механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов при ГГЦ [Perla-Kajan J, Jakubowski H, 2019]. Изменение метилирования и экспрессии гена *bdnf* в мозге потомства крыс отмечено также при дополнительном приеме фолиевой кислоты [Yan Z et al., 2017]. Однако, увеличение экспрессии гена в данном случае может и не являться следствием нарушения в эпигенетической регуляции, а представляет из себя компенсаторную реакцию, направленную на поддержание нормального уровня зрелой формы данного NT. Так, в отличие от E20, на E14 на фоне ПГГЦ, увеличение *proBDNF* сопровождалось снижением *mBDNF*, что не сопровождается изменением экспрессии соответствующего гена. Рассматривая процесс в динамике от E14 к E20, можно сделать вывод о том, что первичное нарушение посттрансляционного расщепления *proBDNF* и сигнал о снижении уровня *mBDNF*, приводит к увеличению экспрессии гена. Показано, что во время эмбрионального развития мозга, параметры пролиферация нейробластов и их дальнейшее участие в формировании коры очень чувствительны к повышенной или пониженной передаче сигналов BDNF и поэтому они должны жестко регулироваться [Fukumitsu H et al., 2006; Bartkowska K et al., 2007], в связи с этим, аберрантное увеличение экспрессии BDNF в головном мозге плода может способствовать развитию когнитивных расстройств [Almeida LEF et al., 2014]. Дисбаланс *proBDNF* и *mBDNF*, однако при отсутствии изменения его общего уровня, в лобной коре и стриатуме потомства также был отмечен при воздействии никотина, что связывают с нарушением расщепления с помощью внутриклеточной протеазы фурина, содержание которой было заметно снижено [Buck JM et al., 2019]. Таким образом, можно предположить, что дисбаланс различных форм BDNF в мозге плодов при ПГГЦ обусловлен как усилением экспрессии гена, так и снижением активности протеаз, что подтверждается полученными нами данными об одновременном снижении в мозге плода на E14

при ПГГЦ соотношения mBDNF/proBDNF и активности внеклеточной MMP-2. При сравнении эффектов пренатального и хронического умеренного стресса на систему NGF только в модели последнего в клетках гипоталамуса показано увеличение мРНК Ngf и снижение количества mNGF и активности MMP. В нашей модели ПГГЦ мы также не обнаружили изменения ни в уровне экспрессии гена, ни в количестве самого белка proNGF, что еще раз указывает на наличие различных функций, а, следовательно, и механизмов регуляции уровня данных NTs в развивающемся мозге [Kucharczyk M et al., 2016].

Принимая во внимание тот факт, что в норме, ингибирование миграции нейронов связано с активацией сигнального пути p75NTR/RhoA [Zanin JP, Friedman WJ, 2022], накопление про-форм NTs, которое мы наблюдаем в нашем исследовании ПГГЦ в отношении proBDNF, может привести к миграционным нарушениям нейронов, приводящим к ряду поведенческих расстройств и патологиям развития [Boettner B, Van Aelst L, 2002]. На более поздних стадиях развития нервной системы фармакологическое ингибирование протеолитического превращения proBDNF в mBDNF ускоряет элиминацию синапсов через активацию p75NTR [Je HS et al., 2013].

Таким образом наблюдаемое нами снижение уровня mBDNF вместе с повышенным уровнем proBDNF помимо предполагаемого нами влияния на миграцию клеток, может снижать TrkB-опосредованную передачу сигналов выживания нейронов и усиливать p75NTR-зависимый про-апоптотический процесс. Эта гипотеза подтверждается, наблюдаемой повышенной активностью каспазы-3 в мозге плодов при ПГГЦ.

Также в данном исследовании в мозге плода на E20 на фоне ПГГЦ обнаружено повышение уровня NRG1. Он является многофункциональным NT, который опосредует развитие нервной системы [Mei L, Xiong W-C, 2008]. NRG1 и его рецептор ErbB4 экспрессируются в мозге плода уже на ранних сроках внутриутробного развития [Muraki K, Tanigaki K, 2015]. Роль сигнального пути NRG1-ErbB4 в пренатальном периоде включает в себя участие в миграции нейронов. NRG1 через ErbB4 действует как медиатор взаимодействий между

мигрирующими нейронами и клетками радиальной глии в развивающейся коре головного мозга [Patten BA et al., 2003]. В связи с тем, что повышение уровня NRG1 в мозге плода, преимущественно рассматривается как положительная реакция, например при воздействии сульфата магния [Dabbah-Assadi F et al., 2020], наблюдаемое нами увеличение также предположительно может являться компенсаторным ответом на нарушение миграции нейронов при ПГГЦ. Компенсаторное повышение уровня NRG1 в мозге плода в условиях ПГГЦ, может быть обусловлено также его ролью в регуляции процессов метаболизма метионина. NRG1 через канонический PI3K/Akt сигнальный путь стимулирует транспорт в клетку витамина B12 и цистеина, увеличивая синтез глутатиона, и, следовательно, активируя работу метионинсинтазы [Zhang Y et al., 2016]. Можно предположить, что повышение количества NRG1, способствуя увеличению синтеза глутатиона, направлено на защиты от ОС и клеточной гибели нейроны мозга плода при ПГГЦ, подобный эффект NRG1 продемонстрирован при развитии ОС, инициируемого различными агентами, такими как, например, перекись водорода [Goldshmit Y et al., 2001].

Таким образом, воздействие ПГГЦ на мозг плода приводит к увеличению окислительного повреждения липидов, а также сокращению антиоксидантных резервов, что особенно проявляется при рождении, изменению экспрессии гена *bdnf* и нарушению процессинга его белка, сопровождающееся снижением активности MMP-2. Несмотря на отсутствие увеличения провосполительных цитокинов, изменения активности СОД и НА, а также компенсаторное повышение уровня NRG-1 и VMAT-2, что рассматривается как попытка поддержания гомеостаза в развивающемся мозге плода, ПГГЦ и значительное нарушение функционального состояния плаценты приводит к усилению процессов апоптоза, выраженное в повышении активности каспазы-3 и, судя по характеру отмеченных изменений, к нарушению миграции нейронов.

Последующее раннее постнатальное развитие потомства уже в условиях отсутствия метиониновой нагрузки демонстрирует снижение количества нейронов и увеличение клеток астроцитов и микроглии как в коре [Shcherbitskaia AD et al.,

2020], так и в гиппокампе, в зоне CA1 [Shcherbitskaia AD et al., 2021], так и в представленной в данной работе зоне CA3. Предшественники микроглиальных клеток попадают в центральную нервную систему после первой недели плода и играют жизненно важную роль в развитии коры головного мозга, регулируя размер пула клеток-предшественников нейронов [Cunningham CL et al., 2013]. В процессе постнатального развития промежуточная микроглия распространяется из субверттрикулярной зоны по всему мозгу и дифференцируется к P15 [Savchenko VL et al., 1997]. В мозге взрослых грызунов микроглия, перемещаясь к месту повреждения, действует аналогично макрофагам. При этом в коре количество микроглиальных клеток после ПГГЦ значительно повышено уже на P5 [Shcherbitskaia AD et al., 2020], тогда как в гиппокампе ее значимое увеличение отмечено только на P20, что вероятно связано с активным воздействием ПГГЦ на процессы миграции клеток в период формирования коры головного мозга в последние дни внутриутробного развития. Подобная реакция в коре и гиппокампе в постнатальном периоде, как результат перенесенной ПГГЦ, не является специфической и показана в данных структурах мозга потомства после воздействия различных стресс-факторов на организм матери во время беременности [Omotoso GO et al., 2018; Yamashita R et al., 2021; Orso R et al., 2023]. Большинство из них отмечают активацию глии после пренатального стресса и на более поздних сроках постнатального развития. Воздействие стресса во время раннего развития, предположительно, провоцирует микроглиальные клетки к повышению их реактивности, а при длительной или хронической ее активации повышенный уровень высвобождаемых воспалительных биомаркеров может влиять на множественные нейробиологические процессы в головном мозге и приводить к поведенческим нарушениям в более позднем возрасте [Fonken LK et al., 2018; Orso R et al., 2023]. При этом микроглия является первичными иммунокомпетентными клетками головного мозга, она чрезвычайно чувствительна к нарушениям гомеостаза и, таким образом, может действовать как немедленная реакция на токсическое воздействие окружающей среды. В подтверждение этого показано, что после стресса на E13 уже через сутки на E14 происходит увеличение количества

микроглиальных клеток в кортикальной пластинке мозга плода [Bittle J, Stevens NE, 2018]. Поэтому можно предположить, что повышение количества микроглиальных клеток в коре происходит не на P5, а на более ранних стадиях постнатального периода или, даже в период внутриутробного развития. При активации микроглии наблюдается усиление воспаления за счет выработки АФК и провоспалительных цитокинов, что, в свою очередь, увеличивает ОС и приводит к дальнейшей гибели нейрональных клеток [Longoni A et al., 2017]. При этом в нашем исследовании у крысят после ПГГЦ в раннем постнатальном периоде мы не обнаружили увеличения количества продуктов окисления белков и липидов ни в коре, ни в гиппокампе, что в целом указывает на отсутствие дисбаланса работы про- и антиоксидантных систем в этот период развития в данных структурах. Как в коре, так и в гиппокампе нами показано повышение количества IL-1 β , а также IL-6 исключительно в гиппокампе на P20. Имеются данные, что ПГГЦ, также как и наша модель, вызванная ежедневным введением метионина во время беременности не изменяли уровни TNF- α и IL-6 во цельном мозге потомства крыс на P21; однако концентрацию IL-1 β исследователи не определяли [Schweinberger VM et al., 2017]. Стоит отметить, что IL-1 β играет ключевую роль в регуляции микроглии в период ее развития [Meyer U et al., 2006]. При активации материнской иммунной системы во время беременности уже через несколько часов в мозге плода повышается количество нескольких провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-13, MCP-1 и MIP α , однако только уровень IL-1 β сохраняется повышенным в мозге плода через 24 ч [Meyer U et al., 2006]. IL-1 β является важным участником взаимодействия нейронов и глии, который, как было продемонстрировано, опосредует повреждение нейронов и потенцирует эксайтотоксичность [32]. Показано, что в условиях отсутствия клеточной гибели нейронов активированная микроглия экспрессирует pro-IL-1 β и накапливает его внутриклеточно, секреция его происходит только в случае повреждения нейронов или их гибели, что, однако обычно только усугубляет процесс [Wang P et al., 2008]. Как и в случае с IL-1 β , IL-6 изменяет NMDA-рецептор-опосредованный ответ и усиливает нейротоксичность [33]. Кроме того, продемонстрировано, что нейроны мозжечков животных,

развившиеся в условиях материнской ГГЦ, характеризуются десенсibilизацией NMDA-рецепторов [34]. Несколько исследований показали, что астроциты также могут реагировать на различные стимулы, включая воздействие ГЦ, высвобождая такие провоспалительные цитокины, как TNF- α , IL-1 β и IL-6 [Longoni A et al., 2017]. Продолжительный астроглиоз, в том числе отмеченный при воздействии ГГЦ [Di Meco A et al., 2018; Kumar M, Sandhir R, 2019], и при ПГГЦ [Shcherbitskaia AD et al., 2020; Shcherbitskaia AD et al., 2021], может стать причиной ограничения регенерации аксонов и привести к выделению избыточного количества нейротоксических веществ [Zhang D et al., 2010]. При этом стоит отметить, что активация астроглии в постнатальном развитии нервной системы после воздействия различных токсических агентов и стресса в период пренатального развития наблюдается далеко не всегда. В частности показано, что усиленный ОС, развивающийся в постнатальном периоде у животных, подвергнутых в период внутриутробного развития воздействию сигаретного дыма приводит к интенсивной клеточной гибели не только нейронов, но и астроцитов [Hamdi Y et al., 2016]. В настоящее время частично описаны последствия воздействия ГЦ *in vitro* и ГГЦ *in vivo* на морфологию и функцию астроцитов [Cecchini MS et al., 2019; Wyse ATS et al., 2021]. Продемонстрировано, что культуры кортикальных астроцитов, подвергнутые воздействию ГЦ, вызывают в них реорганизацию цитоскелета, что по мнению исследователей ведет к нарушению функциональности [Loureiro SO et al., 2010]. Данное обстоятельство особенно значимо для развития коры в ранний постнатальный период, в связи с тем, что именно к моменту рождения у крыс клетки радиальной глии начинают дифференцироваться в астроциты и при этом еще возможно непосредственное воздействие повышенного уровня ГЦ.

Некоторые эффекты воздействия микроглии на нейроны, по-видимому, опосредованы активацией митоген-активируемой протеинкиназы p38 (p38-МАРК), поскольку установлено, что активированная микроглия стимулирует фосфорилирование p38-МАРК в нейронах [Li Y et al., 2003]. Фосфорилирование p38 МАРК увеличивалось в гиппокампе и коре головного мозга в условиях гипоксии [Bu X et al., 2007], а гипоксическая активация p38 МАРК сопровождалась

апоптозом нейронов и снижением когнитивных функций у молодых крыс [Zhu Z et al., 2020]. На P5 в коре на фоне увеличения количества микроглиальных клеток наблюдается сниженное количество нейронов [Shcherbitskaia AD et al., 2020], что, как показано в нашей работе, сопровождается увеличением количества активной каспазы-3, а также активацией p-38 MAPK, что указывает на развитие апоптотического процесса в данной структуре. Повышение уровня IL-10 на этот срок в коре, вероятно, представляет из себя один из результатов, принятых целого ряда комплексных мер, направленных на снижение прогрессирования апоптоза нейронов. При этом на P20 в коре происходит снижение количества активной каспазы-3, и фосфорилированной формы p38 MAPK. Однако в данной структуре сохраняется повышенное количество клеток микроглии и астроглии [Shcherbitskaia AD et al., 2020], а также активность каспазы-3/7, количество нейронов не восстанавливается, уровень IL-10 снижается, а IL-1 β повышается, что указывает на то, что токсические последствия перенесенной ПГГЦ не удается адекватно скомпенсировать в период раннего постнатального развития. При этом изменения уровня NTs не отмечено ни на один из исследованных периодов.

В гиппокампе после ПГГЦ активация p38 MAPK сигнального пути отмечена на P5, однако, в отличие от коры, сохраняется на P20. При этом, увеличение микроглиальных клеток наблюдается только на P20, одновременно с повышением уровня IL-1 β и IL-6, а также снижением уровня IL-10. Полученные данные согласуются с тем, что под влиянием хронического стресса p38 MAPK активирует нейровоспалительный сигнальный путь в гиппокампе [Song Q et al., 2018]. В нескольких исследованиях сообщалось, что повышенная экспрессия и секреция провоспалительных цитокинов ЦНС, активируемые p38 MAPK, способствуют повреждению нейронов [van der Bruggen T et al., 1999; Bachstetter AD, Van Eldik LJ, 2010]. Однако отсутствие активации каспазы-3, указывает на то, что либо клеточная гибель реализуется через каспаза-3-независимые пути, либо выраженный апоптотический процесс при наблюдаемой картине нейровоспаления на P20 будет фиксироваться в последующие дни.

Некоторые различия в характере изменений в двух исследованных структурах мозга, прежде всего биохимические, а не морфологические, могут быть обусловлены особенностями протекающих процессов развития, а следовательно, и их уязвимости, на момент воздействия ПГГЦ, а также наличием индивидуальных наборов механизмов для устранения негативных последствий ПГГЦ в раннем постнатальном периоде

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что биохимические изменения, индуцируемые в головном мозге плода при повышении уровня ГЦ в организме матери, могут вызывать впоследствии развитие нейровоспаления и апоптотическую гибель нейронов, тем самым нарушая формирование гиппокампа и коры головного мозга крысят.

Исследование самок крыс после ПГГЦ, достигших половозрелости, подтверждает данные предположения. Гипотеза о том, что пренатальное воздействие различных факторов может вызвать стойкие отделенные последствия и характер этих отклонений может быть более выражен, по сравнению с воздействием данных факторов на взрослый организм, подтверждается и в модели воздействия ГЦ. Установлено, что в гиппокампе крыс после перенесенной ПГГЦ, в постпубертатном периоде наблюдается значимое снижение НА, 5-ОТ и 5-ОИУК, при этом более чем в 2 раза интенсивнее, чем у постпубертатных крыс после ГЦ. Как уже отмечалось, со снижением уровня моноаминов связывают нарушение когнитивных функций, при этом у крыс после ПГГЦ отмечено снижение кратковременной и долговременной памяти, однако оно было вполне сопоставимо с самками после ГЦ. Не показывали они более худших результатов по сравнению с крысами после ГЦ и в тесте в восьмилучевом лабиринте, отличия от контроля стали проявляться только на 4 день исследования. Однако в «Открытом поле» крысы после ПГГЦ испытывали большую тревожность и поэтому преимущественно находились на периферических квадратах, что не наблюдалось при исследовании крыс с ГЦ. Таким образом, при более выраженном снижении уровней моноаминов в гиппокампе половозрелых самок крыс после ПГГЦ результаты физиологических тестов показали, что отклонения от нормы были

сопоставимыми с группой ГГЦ, что вероятно связано с тем, что крысы после ПГГЦ, в отличие от самок после хронической ГГЦ, выработали определенную адаптацию к жизни в условиях сниженных уровней моноаминов. При этом отсутствие в гиппокампе половозрелых самок крыс после ПГГЦ повышения уровня NRG1, наблюдаемое у самок после ГГЦ, предположительно связано с тем, что увеличение его содержания происходит непосредственно в ответ на воздействие стресс-фактора, в нашем случае – ГГЦ, и сопряжено с развитием в этот момент ОС. Между тем в группе с ПГГЦ воздействие ГЦ крысята испытывали исключительно при пренатальном развитии. Компенсаторное повышение у них в мозге уровня NRG1 на первый день жизни выступает в пользу данного предположения. Следует отметить, что нарушение уровня моноаминов у крыс после ПГГЦ не ограничивается гиппокампом, в СВ-Арк гипоталамуса показано существенное повышение уровня ДА, тогда как в МПО гипоталамуса продемонстрировано снижение уровня НА. Увеличение содержания НА после ГГЦ рассматривается как менее негативная реакция, связанная вероятно со снижением активности СОМТ, при этом сохраняется вероятность ее обратимости после прекращения хронического воздействия. Однако снижение моноаминов через три месяца после воздействия ПГГЦ не оставляет сомнений в том, что это устойчивое снижение и связано оно с более существенными структурными изменениями. Несмотря на то, что у крыс после ПГГЦ при более выраженном дисбалансе катехоламинов в МПО и СВ-Арк, структурах гипоталамуса ответственных за реализацию репродуктивной функции, также как и в группе после ГГЦ не происходит увеличения процента нарушений эстральных циклов, наши данные указывают на то, что после воздействия ПГГЦ на развитие плода возникают долгосрочные изменения в норадренергической, серотонинергической и дофаминергической системах, которые могут способствовать повышению уязвимости этих нейромедиаторных систем. При этом, проведенные нами исследования подтверждают возможность использования нейрохимических показателей, таких как содержание НА, 5-ОТ и ДА и их метаболитов в областях мозга, в качестве общепринятых индикаторов индикаторов нейротоксичности [Del Pino J et al., 2011], включая нейротоксичность

индуцированную агентами при развитии нервной системы в пренатальном и постнатальном периоде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе получены новые данные, касающиеся влияния ГГЦ при беременности на развитие нервной системы плода и, в дальнейшем, потомства. Показано, что ГГЦ матери во время беременности вследствие транспорта ГЦ и его метаболитов через плаценту приводит к развитию пренатальной ГГЦ, что указывает на реализацию их непосредственных токсических эффектов на развивающийся плод. При том, что нейротоксические механизмы воздействия ГЦ и его метаболитов в настоящее время частично описаны, большинство исследований в этой области выполнено либо в системе *in vitro*, либо *in vivo* при оценке влияния ГГЦ на нервную систему взрослых животных, преимущественно в контексте развития нейродегенеративных заболеваний. При изучении формирования нервной системы плода ГГЦ в большей степени рассматривается как показатель дефицита фолиевой кислоты, с которым может быть связано возникновение на ранних стадиях эмбрионального развития ДНТ, основной механизм которого также в настоящее время остается неясным. Причиной возникновения ДНТ также может явиться и фолат-независимая ГГЦ, что позволяет рассматривать ГГЦ не только как маркер нарушения метаболизма фолатов, но и как отдельный фактор цитотоксического воздействия, способный привести к развитию как ранних, так и поздних осложнений беременности и развития плода. При этом создаваемая в нашем исследовании модель ГГЦ беременных (метиониновая нагрузка) с Е4, не приводит к выраженному прерыванию беременности на ранних сроках, на что указывает отсутствие снижения размера помета. Помимо непосредственного влияния ГЦ и его метаболитов на ткани развивающегося мозга плода, другим предполагаемым механизмом токсического воздействия ГЦ и его метаболитов, приводящим к нарушению развития плода и его нервной системы, является воздействие на процессы имплантации и формирования плаценты. Нарушение процессов ангиогенеза, основные механизмы которого представлены на рис. 67, приводят к морфологическим нарушениям плаценты, снижению разветвленности ее лабиринтной области и количества гликогеновых клеток в зоне спонгиозотрофобласта. Подобные изменения предсказуемо ведут к

снижению различных функций плаценты, в том числе ее транспортной функции, ограничению роста плода и задержке его внутриутробного развития. Патологический морфогенез плаценты может быть связан с нарушением иммунного гомеостаза в зоне инвазии трофобласта, что подтверждается повышением уровня IL-1 β в сыворотке крови матери и МЧП. Снижение активности MMP-2, количества VEGF и нарушение посттрансляционной модификации NTs при ГГЦ также указывают на нарушение васкуло- и ангиогенеза в плаценте.

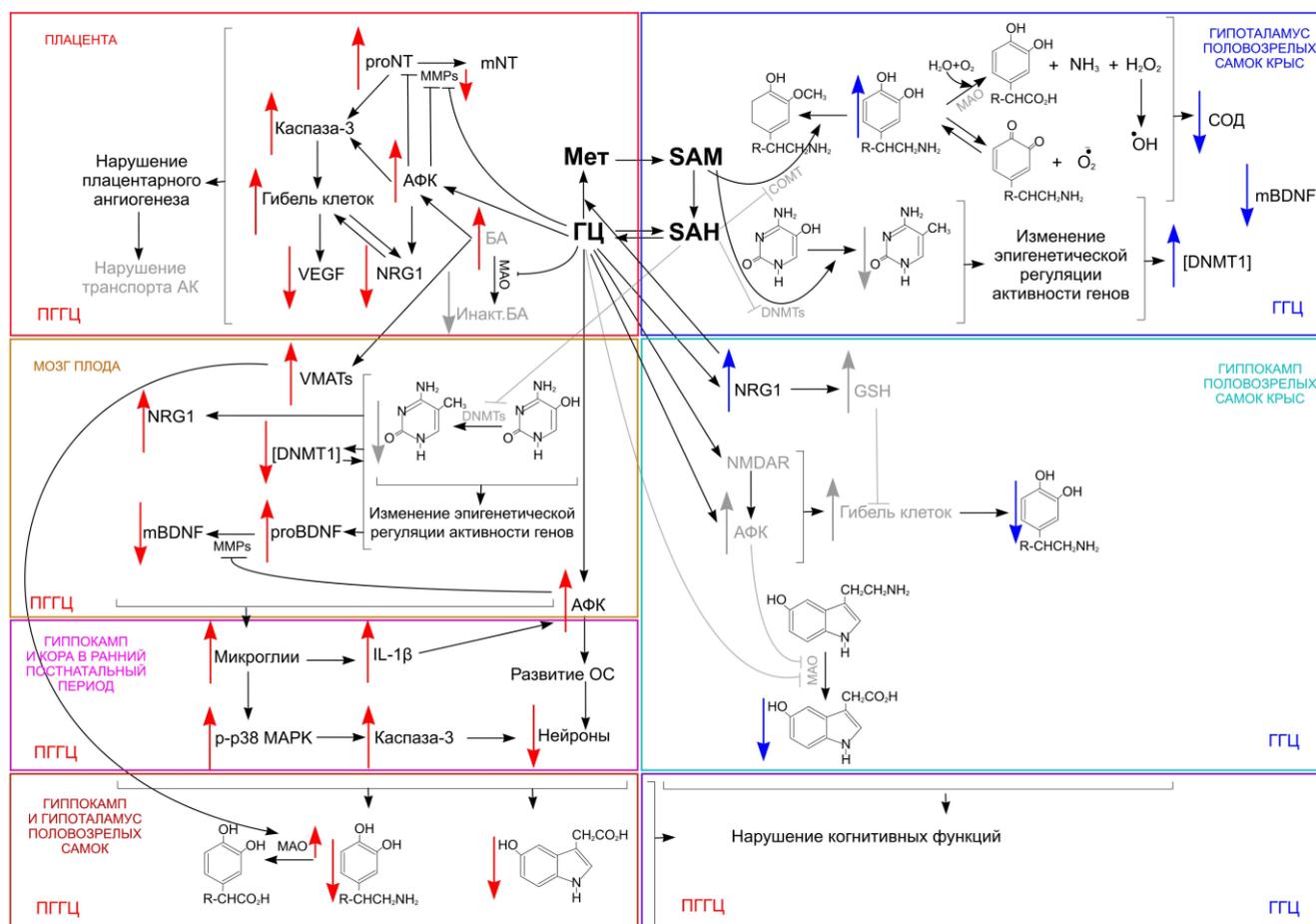


Рис. 67. Схема влияния хронической гипергомоцистеинемии на половозрелых самок крыс и пренатальной гипергомоцистеинемии во время беременности на биохимические процессы в плаценте, мозге плода и потомства.

Примечания: Мет – метионин, ГЦ – гомоцистеин, SAH – S-аденозилгомоцистеин, SAM - S-аденозилметионин, COMT – катехол-О-метилтрансфераза, MAO – моноаминоксидаза, DNMTs – ДНК-метилтрансферазы, ОС – окислительный стресс, АФК – активные формы кислорода, БА –

биогенные амины, инакт.БА – инактивированные биогенные амины (образующие в результате метаболизма биогенных аминов соответствующие альдегиды и карбоновые кислоты); proNT – про-формы нейротрофинов, mNT – зрелые формы нейротрофинов; MMPs – матриксные металлопротеиназы; GSH – глутатион; NRG1 – нейрегулин 1 β ; VMATs – везикулярные транспортеры моноаминов.

Красными стрелками отмечено изменение содержания показателей или активности ферментов при модели пренатальной ГГЦ, установленное в данной работе, синими стрелками – при модели хронической ГГЦ на половозрелых самках крыс. Серым цветом – отмечено то, что не оценивалось непосредственно в представленной работе, но продемонстрировано в других исследованиях.

Наиболее выраженные цитотоксические эффекты воздействия ГГЦ при этом, закономерно проявляются в части плаценты, включающей спонгиозотрофобласт и децидуальную оболочку. Показано усиление процессов апоптоза, выраженное в повышении уровня активной каспазы-3, снижение активности СОД и повышение уровня окислительной модификации белков в данной структуре, которое взаимосвязано с повышением IL-1 β в сыворотке матери при ГГЦ и сопровождается снижением уровня NRG1, а также отношения mBDNF/proBDNF. При этом полученные данные указывают на то, что в плаценте при метиониновой нагрузке происходит смещение работы SAH-гидролазы в сторону образования SAH, что приводит к отсутствию дополнительных резервов эффективного метаболизма быстро накапливающегося ГЦ. В зоне лабиринта характер изменений, в целом, сходен, однако они выражены слабее, либо носят лишь характер тенденции, что указывает на подключение компенсаторных механизмов со стороны СТБ, либо со стороны плода, сигнализирующего об избыточном поступлении ГЦ и снижении транспорта питательных веществ и кислорода вследствие нарушения развития плаценты. При этом снижение соотношения SAM/SAH указывает на ослабление потенциала клеточного метилирования, что может привести к эпигенетической дисрегуляции экспрессии генов при ГГЦ в плаценте и мозге плода. Дополнительным цитотоксическим механизмом в плаценте, ведущим к развитию ОС, а также нарушению барьерной функции при ГГЦ матери, является снижение

активности в ней МАО, что в совокупности с ингибированием СОМТ значительно ухудшает функциональные возможности трофобласта в отношении метаболизма биогенных аминов и приводит к избыточному их транспорту к плоду, который оказывается в ситуации необходимости самостоятельно регулировать их количество, на что указывает увеличение уровня VMATs в мозге плода. При этом предполагаемое приоритетное развитие систем ускоренного метаболизма биогенных аминов в пренатальном периоде, может обуславливать повышенную активность МАО и уменьшение количества биогенных аминов в мозге потомства в постнатальном периоде. Снижение уровня mBDNF в мозге плода при ПГГЦ в результате нарушения посттрансляционного расщепления данного NT в середине беременности, закономерно приводит к увеличению его экспрессии на более поздних сроках, благодаря чему создается существенный избыток его pro-формы, взаимодействие которой с p75NTR, индуцирует активацию сигнального пути p38 MAPK, что оказывает проапоптотическое действие и способствует развитию воспалительных процессов. Признаки развития нейровоспаления в гиппокампе и снижение количества нейронов в раннем постнатальном периоде также способствуют последующему снижению уровня БА. Таким образом, механизмы, лежащие в основе однонаправленных изменений уровня биогенных аминов в гиппокампе половозрелого потомства после перенесенной пренатальной ГГЦ и хронической ГГЦ самок, сопровождающиеся сходными нарушениями когнитивных функций, являются принципиально различными (рис. 67). У взрослых половозрелых самок крыс в результате непосредственного воздействия ГЦ большинство нейротоксических эффектов в гиппокампе определяется его эксайтотоксичностью вследствие структурного сходства с глутаматом. Ингибирование активности ферментов метаболизма биогенных аминов при непосредственном воздействии ГЦ определяет менее выраженное снижение содержания биогенных аминов и отсутствие изменения уровня 5-ОТ в гиппокампе, а также увеличение НА в структурах гипоталамуса при хронической ГГЦ по сравнению с половозрелым потомством, после перенесенной ПГГЦ. Общим механизмом для обеих моделей (пренатальная ГГЦ и хроническая ГГЦ у взрослых

животных) является развитие ОС. В частности, аутоокисление ГЦ и БА, в результате нарушения их метаболизма, приводят к увеличению уровня АФК в плаценте и мозге плода при ПГЦ и различных структурах мозга при ГЦ у половозрелых животных.

Таким образом, в работе описаны новые молекулярные механизмы воздействия ГЦ во время беременности, приводящие к нарушению в функциональной системе «мать-плацента-плод», которая формируется уже на ранних этапах гестации, с целью вынашивания и рождения жизнеспособного потомства. Новые данные свидетельствуют о том, что внутриутробные повреждения при ГЦ создают неблагоприятную биохимическую среду, которая требует компенсаторной адаптации плода. Данные механизмы через изменения в структуре и функции плаценты и развивающегося мозга, способствуют формированию различных метаболических фенотипов у новорожденного, которые могут сохраняться на протяжении последующей жизни, приводя к развитию когнитивного дефицита. Полученные данные дают основание полагать, что использование нейропротекторов для профилактики осложнений беременности, сопровождающихся повышением содержания ГЦ при метиониновой нагрузке, может ослабить его повреждающее влияние на формирующийся мозг плода и отдаленные последствия ГЦ. Наряду с этим, необходимо учитывать, что использование в клинической практике препаратов, содержащих метионин (гептрал, гепциферол, гепатрин и др.), гипотетически может способствовать развитию пренатальной ГЦ. Специальных исследований, подтверждающих безопасность метионина для плода при применении его в период беременности, а также безопасность для ребенка в период грудного вскармливания, не проводилось. Однако следует отметить, что большинство используемых в клинике гепатопротекторов в качестве активного начала содержит не метионин, а S-аденозилметионин, который, как указывалось нами при обсуждении полученных результатов, является эффективным нейропротектором.

ВЫВОДЫ

1. Однократное введение метионина приводит к повышению уровня гомоцистеина в сыворотке крови взрослых самок крыс через час после введения и сохраняется в течение 18 часов, в гипоталамусе, гиппокампе и теменной коре – через 3-6 часов. Хроническое ежедневное введение метионина во время беременности приводит к повышению уровня гомоцистеина в сыворотке и мозге плода. В сыворотке крови он сохраняется повышенным в течение трех дней после рождения, в мозге – первые сутки. Полученные данные подтверждают правомочность использованных моделей гипергомоцистеинемии и пренатальной гипергомоцистеинемии

2. Экспериментальная гипергомоцистеинемия во время беременности приводит к повышению окисления белковых молекул и активации каспазы-3 и снижения активности СОД, MMP-2, содержания VEGFA и NRG1, и количества гликогеновых клеток в базальной зоне плаценты, а также повышение продуктов ПОЛ, IL-1 β и активности MMP-2, сужению материнских синусоидов и утолщению трофобластических колонок в зоне лабиринта. В обеих зонах плаценты показано повышение уровня про-форм нейротрофинов.

3. В мозге плода при ГГЦ отмечено повышение продуктов ПОЛ и активности каспазы-3, а повышение про-формы BDNF сопровождается снижением его зрелой формы на E14 и дополнительным повышением его экспрессии на E20.

4. Снижение удельной активности MAO в плаценте не сопровождается изменением уровня норадреналина в мозге плода, однако приводит к повышению содержания везикулярного транспортера моноаминов-2 (VMAT2) на 20-й день беременности.

5. Пренатальная ГГЦ вызывает снижение количества нейронов и увеличение числа астроглии и микроглии в теменной коре и гиппокампе в раннем постнатальном периоде, что сопровождается увеличением уровня IL-1 β , активации p-38 MAPK в обеих структурах и каспазы-3 в теменной коре. Значимых изменений уровня изоформ BDNF (29 kDa и 14 kDa) обнаружено не было.

6. Пренатальная гипергомоцистеинемия приводит к более выраженному снижению уровня биогенных аминов в гиппокампе, уровень норадреналина в МПО гипоталамуса также снижается при пренатальной гипергомоцистеинемии, однако повышается при хронической гипергомоцистеинемии, что сопровождается снижением активности СОД в гипоталамусе и сыворотке крови. В сыворотке крови при гипергомоцистеинемии также показано повышение количества продуктов окисления белков и нуклеиновых кислот.

7. В сыворотке крови и цельном мозге после пренатальной гипергомоцистеинемии у новорожденных крысят отмечено снижение активности СОД. В мозге также обнаружено снижение ОАА и повышение продуктов окислительной модификации нуклеиновых кислот. С увеличением возраста потомства в сыворотке крови после гоомоцистеинемии отмечается увеличение уровня нитротирозина активности СОД.

8. Изменение в уровне биогенных аминов в структурах гипоталамуса и гиппокампа у половозрелых самок как после хронической гипергомоцистеинемии взрослых животных, так и перенесенной пренатальной гипергомоцистеинемии сопровождается ухудшением когнитивных функций, что выражается в нарушении кратковременной, долговременной и пространственной памяти.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендовать контролировать уровень ГЦ в сыворотке крови при осложнениях беременности, сопряженной с риском развития ГГЦ и нарушения формирования нервной системы плода, подбирая оптимальные условия терапии препаратами фолиевой кислоты.

2. На основании полученных в эксперименте результатов о повреждающем действии ГГЦ на развитие нервной системы в раннем онтогенезе выработать алгоритм использования в клинике нейропротекторов при осложнениях беременности, относящихся к группе риска возникновения функциональных нарушений мозга плода и новорожденного (ПЭ и ЗВУР).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 5-ОИУК – 5-оксииндолуксусная кислота
5-ОТ – серотонин
8-ОНdG – 8-окси-2'-дезоксигуанозин
BDNF - Нейротрофический фактор мозга
CBS – цистатионин- β -синтаза
COMT – катехол-О-метилтрансфераза
MMP – матриксная металлопротеиназа
MAO – моноаминоксидаза
NGF - фактор роста нервов
NRG1 – нейрегулин 1
NT - нейротрофины
SAH – S-аденозилгомоцистеин
SAHH – S-аденозилгомоцистеингидролаза
SAM – S-аденозилметионин
TH – тирозингидроксилаза
VEGF – фактор роста эндотелия сосудов
VMAT – везикулярный транспортер моноаминов
АК – аскорбиновая кислота
АФК – активные формы кислорода
ГГЦ – гипергомоцистеинемия
ГЦ – гомоцистеин
ГЦК - гомоцистеиновая кислота
ДА – дофамин
ДНТ – дефекты нервной трубки
ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота
ЗВУР – задержка внутриутробного развития
НА – норадреналин

МПО – медиальная преоптическая область

МЧП – материнская часть плаценты

ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЧП – плодная часть плаценты

ПЭ – преэклампсия

СВ-Арк – срединное возвышение с аркуатными ядрами

СОД – супероксиддисмутаза

СТБ – синцитиотрофобласт

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.В., Керкешко Г.О., Степанов М.Г., Корневский А.В., Айламазян Э.К. Роль биогенных аминов в гипоталамической регуляции репродуктивной функции // Журнал акушерства и женских болезней. - 2004. - Т. 53. - №1. - С. 98-106
2. Арутюнян А.В., Степанов М.Г., Керкешко Г.О., Айламазян Э.К. Нарушение гипоталамической регуляции репродуктивной функции при воздействии нейротоксических соединений и мелатонина // Журнал акушерства и женских болезней. – 2003. – Т.52. – №2. – С. 77-80.
3. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. Оценка связывания гомоцистеина с фракцией белков плазмы, ассоциированных с ремоделированием сосудистой стенки // Артериальная гипертензия. – 2013. – Т.19. – №2. – С.184-188.
4. Зильфян В.Н., Кумкумаджян В.А. Новый метод взятия крови у мелких лабораторных животных. // Журн. Экспер. и клин. Медицины. – 1970. – Т.10. – С.12-14
5. Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Зефиоров А.Л., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В. Влияние гомоцистеина и его производных на спонтанную сетевую активность в гиппокампе новорожденных крысят // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т.105. – №3. – С.1236-1246
6. Курьянова Е.В., Укад А.С., Жукова Ю.Д. Половые и типологические различия поведенческой активности нелинейных крыс в тесте «Открытое поле» // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С.460
7. Макацария А.Д. и др. Гипергомоцистеинемия и осложнения беременности // (под общ. ред. А.Д. Макацария). – М.: «Триада-Х», 2005. – 216 с
8. Разыграев А.В., Арутюнян А.В. Спектрофотометрический метод определения моноаминоксидазной активности в микроструктурах головного мозга крыс, основанный на реакции окисления кинурамина // Biological Communications. – 2006. – №3. – С. 114-118
9. Хубутя М.Ш., Шевченко О.П. Гомоцистеин при коронарной болезни сердца и сердечного трансплантата. – М.: Реафарм, 2004. – 271 с
10. Яковлева О.В., Зиганшина А.Р., Герасимова Е.В. и др. Влияние витаминов группы В на раннее развитие крысят с пренатальной гипергомоцистеинемией. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – 105. – С. 1247–1261.
11. Abbott A. Cognition: The brain's decline. // Nature. – 2012. – V. 492. – № 7427. – P. S4-S5.
12. Acevedo CG, Marquez JL, Rojas S, et al. Insulin and nitric oxide stimulates glucose transport in human placenta. // Life Sci. – 2005. – V. 76. – № 23. – P. 2643-2653.

13. Acosta O, Ramirez VI, Lager S, et al. Increased glucose and placental GLUT-1 in large infants of obese nondiabetic mothers. // *Am J Obstet Gynecol.* – 2015. – V. 212. – № 2. – P. 227 e221-227.
14. Ahn ES, Robertson CL, Vereczki V, et al. Normoxic ventilatory resuscitation following controlled cortical impact reduces peroxynitrite-mediated protein nitration in the hippocampus. // *J Neurosurg.* – 2008. – V. 108. – № 1. – P. 124-131.
15. Ain R, Konno T, Canham LN, et al. Phenotypic analysis of the rat placenta. // *Methods Mol Med.* – 2006. – V. 121. – P. 295-313.
16. Alfano DP, Petit TL. Neonatal lead exposure alters the dendritic development of hippocampal dentate granule cells. // *Experimental Neurology.* – 1982. – V. 75. – № 2. – P. 275-288.
17. Alfaro-Rodriguez A, Bueno-Nava A, Gonzalez-Pina R, et al. Chronic exposure to toluene changes the sleep-wake pattern and brain monoamine content in rats. // *Acta Neurobiol Exp (Wars).* – 2011. – V. 71. – № 2. – P. 183-192.
18. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, et al. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. // *Journal of Pineal Research.* – 2002. – V. 34. – № 1. – P. 1-10.
19. Almeida-Toledano L, Andreu-Fernandez V, Aras-Lopez R, et al. Epigallocatechin Gallate Ameliorates the Effects of Prenatal Alcohol Exposure in a Fetal Alcohol Spectrum Disorder-Like Mouse Model. // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – № 2. – P.715.
20. Almeida LEF, Roby CD, Krueger BK. Increased BDNF expression in fetal brain in the valproic acid model of autism. // *Molecular and Cellular Neuroscience.* – 2014. – V. 59. – P. 57-62.
21. Anandapadamanaban M, Masson GR, Perisic O, et al. Architecture of human Rag GTPase heterodimers and their complex with mTORC1. // *Science.* – 2019. – V. 366. – № 6462. – P. 203-210.
22. Anderton BH. Ageing of the brain. // *Mechanisms of Ageing and Development.* – 2002. – V. 123. – № 7. – P. 811-817.
23. Ang ESBC, Gluncic V, Duque A, et al. Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2006. – V. 103. – № 34. – P. 12903-12910.
24. Artim SC, Kiyatkin A, Lemmon MA. Comparison of tyrosine kinase domain properties for the neurotrophin receptors TrkA and TrkB. // *Biochem J.* – 2020. – V. 477. – № 20. – P. 4053-4070.
25. Arutjunyan A, Kozina L, Stvolinskiy S, et al. Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2012. – V. 5. – № 2. – P. 179–185.
26. Arutjunyan AV, Kerkeshko GO, Stepanov MG, et al. Experimental study of mechanisms of disturbances of hypothalamic regulation of reproduction. // *Journal of obstetrics and women's diseases.* – 2005. – V. 54. – № 1. – P. 57-63.

27. Arutyunyan AV, Korenevskii AV. Age-related impairment of hypothalamic regulation of the reproductive cycle and its correction. // *Advances in Gerontology*. – 2014. – V. 4. – № 4. – P. 229-237.
28. Arutyunyan AV, Milyutina YP, Zaloznyaya IV, et al. The use of different experimental models of hyperhomocysteinemia in neurochemical studies. // *Neurochemical Journal*. – 2012. – V. 6. – № 1. – P. 71-76.
29. Audesirk T, Cabell L. Nanomolar concentrations of nicotine and cotinine alter the development of cultured hippocampal neurons via non-acetylcholine receptor-mediated mechanisms. // *Neurotoxicology*. – 1999. – V. 20. – № 4. – P. 639-646.
30. Babb TL, Mikuni N, Najm I, et al. Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex. // *Epilepsy Research*. – 2005. – V. 64. – № 1-2. – P. 23-30.
31. Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, et al. Interleukin-10 prevents glutamate-mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. // *J Neurosci*. – 2001. – V. 21. – № 9. – P. 3104-3112.
32. Bachstetter AD, Van Eldik LJ. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. // *Aging Dis*. – 2010. – V. 1. – № 3. – P. 199-211.
33. Bagheri F, Goudarzi I, Lashkarbolouki T, et al. Melatonin prevents oxidative damage induced by maternal ethanol administration and reduces homocysteine in the cerebellum of rat pups. // *Behavioural Brain Research*. – 2015. – V. 287. – P. 215-225.
34. Bale TL, Baram TZ, Brown AS, et al. Early life programming and neurodevelopmental disorders. // *Biol. Psychiatry*. – 2010. – V. 68. – № 4. – P. 314-319.
35. Balthazart J, Ball GF. Topography in the preoptic region: differential regulation of appetitive and consummatory male sexual behaviors. // *Front Neuroendocrinol*. – 2007. – V. 28. – № 4. – P. 161-178.
36. Barcelona PF, Saragovi HU. A Pro-Nerve Growth Factor (proNGF) and NGF Binding Protein, α 2-Macroglobulin, Differentially Regulates p75 and TrkA Receptors and Is Relevant to Neurodegeneration Ex Vivo and In Vivo. // *Molecular and Cellular Biology*. – 2023. – V. 35. – № 19. – P. 3396-3408.
37. Barnes JA, Singh S, Gomes AV. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. // *Mol Cell Biochem*. – 2004. – V. 263. – № 1-2. – P. 227-239.
38. Barone S, Haykal-Coates N, Parran DK, et al. Gestational exposure to methylmercury alters the developmental pattern of trk-like immunoreactivity in the rat brain and results in cortical dysmorphology. // *Developmental Brain Research*. – 1998. – V. 109. – № 1. – P. 13-31.

39. Barta E. Transport of Docosahexaenoic Acid via the Human Placenta: A Theoretical Study. // *The Journal of Membrane Biology*. – 2019. – V. 252. – № 6. – P. 617-626.
40. Bartkowska K, Paquin A, Gauthier AS, et al. Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. // *Development*. – 2007. – V. 134. – № 24. – P. 4369-4380.
41. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. // *Scand J Med Sci Sports*. – 2017. – V. 27. – № 1. – P. 4-25.
42. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, et al. Melatonin inhibits oxidative stress and apoptosis in fetal brains of hyperhomocysteinemic rat dams. // *Journal of Pineal Research*. – 2007a. – V. 43. – № 3. – P. 225-231.
43. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, et al. Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats. // *Journal of Pineal Research*. – 2008. – V. 44. – № 2. – P. 181-188.
44. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. // *Int J Dev Neurosci*. – 2007b. – V. 25. – № 3. – P. 133-139.
45. Baydas G, Ozer M, Yasar A, et al. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2006. – V. 71. – № S1. – P. S91-S95.
46. Baydas G, Özer M, Yasar A, et al. Melatonin improves learning and memory performances impaired by hyperhomocysteinemia in rats. // *Brain Research*. – 2005a. – V. 1046. – № 1-2. – P. 187-194.
47. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, et al. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. // *Neuroscience*. – 2005b. – V. 135. – № 3. – P. 879-886.
48. Bayer SA, Altman J. Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. // *Exp Neurol*. – 1990. – V. 107. – № 1. – P. 48-62.
49. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. // *Neurotoxicology*. – 1993. – V. 14. – № 1. – P. 83-144.

50. Beard RS, Bearden SE. Vascular complications of cystathionine β -synthase deficiency: future directions for homocysteine-to-hydrogen sulfide research. // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. – 2011. – V. 300. – № 1. – P. H13-H26.
51. Beard RS, Jr., Reynolds JJ, Bearden SE. Hyperhomocysteinemia increases permeability of the blood-brain barrier by NMDA receptor-dependent regulation of adherens and tight junctions. // *Blood*. – 2011. – V. 118. – № 7. – P. 2007-2014.
52. Becker M, Gorobets D, Shmerkin E, et al. Prenatal SAMe Treatment Changes via Epigenetic Mechanism/s USVs in Young Mice and Hippocampal Monoamines Turnover at Adulthood in a Mouse Model of Social Hierarchy and Depression. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V. 24. – № 13. – P. 10721.
53. Behura SK, Dhakal P, Kelleher AM, et al. The brain-placental axis: Therapeutic and pharmacological relevancy to pregnancy. // *Pharmacol Res*. – 2019. – V. 149. – P. 104468.
54. Bell AW, Ehrhardt RA. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. // *Nutr Res Rev*. – 2002. – V. 15. – № 2. – P. 211-230.
55. Bernhardt L, Bairy K, Madhyastha S. Neuroprotective Role of N-acetylcysteine against Learning Deficits and Altered Brain Neurotransmitters in Rat Pups Subjected to Prenatal Stress. // *Brain Sciences*. – 2018. – V. 8. – № 7. – P.120.
56. Bescond A, Augier T, Chareyre C, et al. Influence of Homocysteine on Matrix Metalloproteinase-2: Activation and Activity. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999. – V. 263. – № 2. – P. 498-503.
57. Bhakar AL, Howell JL, Paul CE, et al. Apoptosis induced by p75^{NTR} overexpression requires Jun kinase-dependent phosphorylation of Bad. // *J Neurosci*. – 2003. – V. 23. – № 36. – P. 11373-11381.
58. Bhatia P, Singh N. Ameliorative effect of ozagrel, a thromboxane A₂ synthase inhibitor, in hyperhomocysteinemia-induced experimental vascular cognitive impairment and dementia. // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2020. – V. 35. – № 4. – P. 650-666.
59. Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. // *Cell*. – 2011. – V. 146. – № 6. – P. 866-872.
60. Bialuk I, Jakubów P, Winnicka MM. Significance of IL-6 Deficiency in Recognition Memory in Young Adult and Aged Mice. // *Behavior Genetics*. – 2019. – V. 49. – № 4. – P. 415-423.
61. Bianco-Miotto T, Mayne BT, Buckberry S, et al. Recent progress towards understanding the role of DNA methylation in human placental development. // *Reproduction*. – 2016. – V. 152. – № 1. – P. R23-30.

62. Bilbo SD. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. // *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. – 2009. – V. 3. – P.14.
63. Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. // *Front. Behav. Neurosci.* – 2009. – V. 3. – № 14. – P.14
64. Bittle J, Stevens HE. The role of glucocorticoid, interleukin-1 β , and antioxidants in prenatal stress effects on embryonic microglia. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – V. 15. – № 1. – P.44.
65. Blaise SA, Nedelec E, Schroeder H, et al. Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats. // *Am J Pathol.* – 2007. – V. 170. – № 2. – P. 667-679.
66. Blanchard RJ, Blanchard DC. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. // *J Comp Psychol.* – 1989. – V. 103. – № 1. – P. 70-82.
67. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 7. – P. 3290-3295.
68. Boettner B, Van Aelst L. The role of Rho GTPases in disease development. // *Gene.* – 2002. – V. 286. – № 2. – P. 155-174.
69. Boldyrev A, Bulygina E, Makhro A. Glutamate receptors modulate oxidative stress in neuronal cells. A mini-review. // *Neurotoxicity Research.* – 2004. – V. 6. – № 7-8. – P. 581-587.
70. Boldyrev AA. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. // *Biochemistry (Moscow).* – 2009. – V. 74. – № 6. – P. 589-598.
71. Bolton JL, Bilbo SD. Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms. // *Dialogues Clin. Neurosci.* – 2014. – V. 16. – № 3. – P. 307–320.
72. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, et al. Role of Quinones in Toxicology. // *Chemical Research in Toxicology.* – 2000. – V. 13. – № 3. – P. 135-160.
73. Bornstein SR, Yoshida-Hiroi M, Sotiriou S, et al. Impaired adrenal catecholamine system function in mice with deficiency of the ascorbic acid transporter (SVCT2). // *The FASEB Journal.* – 2003. – V. 17. – № 13. – P. 1-13.
74. Boskovic Z, Alfonsi F, Rumballe BA, et al. The Role of p75NTR in Cholinergic Basal Forebrain Structure and Function. // *The Journal of Neuroscience.* – 2014. – V. 34. – № 39. – P. 13033-13038.
75. Bottalico B, Larsson I, Brodzski J, et al. Norepinephrine Transporter (NET), Serotonin Transporter (SERT), Vesicular Monoamine Transporter (VMAT2) and Organic Cation Transporters (OCT1, 2 and EMT) in Human Placenta from Pre-eclamptic and Normotensive Pregnancies. // *Placenta.* – 2004. – V. 25. – № 6. – P. 518-529.

76. Bottiglieri T, Laundry M, Crellin R, et al. Homocysteine, folate, methylation, and monoamine metabolism in depression. // *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. – 2000. – V. 69. – № 2. – P. 228-232.
77. Boutilier J, Ceni C, Pagdala PC, et al. Proneurotrophins require endocytosis and intracellular proteolysis to induce TrkA activation. // *J Biol Chem*. – 2008. – V. 283. – № 19. – P. 12709-12716.
78. Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, et al. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. // *Endocrinology*. – 2004. – V. 145. – № 8. – P. 3778-3787.
79. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // *Anal Biochem*. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
80. Brown K, Heller DS, Zamudio S, et al. Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. // *Placenta*. – 2011. – V. 32. – № 12. – P. 1041-1049.
81. Bry M, Kivela R, Leppanen VM, et al. Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. // *Physiol Rev*. – 2014. – V. 94. – № 3. – P. 779-794.
82. Bu X, Huang P, Qi Z, et al. Cell type-specific activation of p38 MAPK in the brain regions of hypoxic preconditioned mice. // *Neurochemistry International*. – 2007. – V. 51. – № 8. – P. 459-466.
83. Buck JM, O'Neill HC, Stitzel JA. Developmental nicotine exposure elicits multigenerational disequilibria in proBDNF proteolysis and glucocorticoid signaling in the frontal cortices, striata, and hippocampi of adolescent mice. // *Biochemical Pharmacology*. – 2019. – V. 168. – P. 438-451.
84. Budy B, O'Neill R, DiBello PM, et al. Homocysteine transport by human aortic endothelial cells: identification and properties of import systems. // *Arch Biochem Biophys*. – 2006. – V. 446. – № 2. – P. 119-130.
85. Burton GJ, Fowden AL. The placenta: a multifaceted, transient organ. // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2015. – V. 370. – № 1663. – P. 20140066.
86. Burton GJ, Fowden AL, Thornburg KL. Placental Origins of Chronic Disease. // *Physiol Rev*. – 2016. – V. 96. – № 4. – P. 1509-1565.
87. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. // *Am J Obstet Gynecol*. – 2018. – V. 218. – № 2S. – P. S745-S761.
88. Burton GJ, Redman CW, Roberts JM, et al. Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications. // *BMJ*. – 2019. – V. 366. – P. 12381.
89. Buss C, Entringer S, Wadhwa PD. Fetal programming of brain development: intrauterine stress and susceptibility to psychopathology. // *Sci Signal*. – 2012. – V. 5. – № 245. – P. pt7.
90. Butler GS, Butler MJ, Atkinson SJ, et al. The TIMP2 Membrane Type 1 Metalloproteinase “Receptor” Regulates the Concentration and Efficient Activation of Progelatinase A. // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – V. 273. – № 2. – P. 871-880.

91. Cai M, Kolluru GK, Ahmed A. Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. // *J Pregnancy*. – 2017. – V. 2017. – P. 6972732.
92. Caldwell JD, Clemens LG. Norepinephrine infusions into the medial preoptic area inhibit lordosis behavior. // *Pharmacol Biochem Behav*. – 1986. – V. 24. – № 4. – P. 1015-1023.
93. Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. // *Physiol Rev*. – 2009. – V. 89. – № 1. – P. 279-308.
94. Castillo-Castrejon M, Yamaguchi K, Rodel RL, et al. Effect of type 2 diabetes mellitus on placental expression and activity of nutrient transporters and their association with birth weight and neonatal adiposity. // *Mol Cell Endocrinol*. – 2021. – V. 532. – P. 111319.
95. Catena V, Fanciulli M. Deptor: not only a mTOR inhibitor. // *J Exp Clin Cancer Res*. – 2017. – V. 36. – № 1. – P. 12.
96. Cecchini MS, Bourckhardt GF, Jaramillo ML, et al. Exposure to homocysteine leads to cell cycle damage and reactive gliosis in the developing brain. // *Reprod Toxicol*. – 2019. – V. 87. – P. 60-69.
97. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. // *Cell Cycle*. – 2010. – V. 9. – № 6. – P. 1072-1083.
98. Chandru H, Sharada AC, Manjunath S. [Expression of matrix metalloproteinase (MMP-2) and extracellular matrix metalloproteinases inducer (EMMPRIN) in benign and advanced breast cancer tissue samples]. // *Biomed Khim*. – 2007. – V. 53. – № 4. – P. 461-467.
99. Chappell JC, Taylor SM, Ferrara N, et al. Local guidance of emerging vessel sprouts requires soluble Flt-1. // *Dev Cell*. – 2009. – V. 17. – № 3. – P. 377-386.
100. Charest PL, Vrolyk V, Herst P, et al. Histomorphologic Analysis of the Late-term Rat Fetus and Placenta. // *Toxicol Pathol*. – 2018. – V. 46. – № 2. – P. 158-168.
101. Chavarría T, Rodríguez-Nieto S, Sánchez-Jiménez F, et al. Homocysteine is a potent inhibitor of human tumor cell gelatinases. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2003. – V. 303. – № 2. – P. 572-575.
102. Chen A, Chen Z, Xia Y, et al. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – V. 499. – № 2. – P. 267-272.
103. Chen DB, Wang W. Human placental microRNAs and preeclampsia. // *Biol Reprod*. – 2013. – V. 88. – № 5. – P. 130.
104. Chen G, Ke Z, Xu M, et al. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. // *Autophagy*. – 2012. – V. 8. – № 11. – P. 1577-1589.
105. Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2017a. – V. 148. – P. 87-165.

- 106.Chen J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Remodeling in Health and Disease: Target Tissues and Therapy.* – 2017b. – P. 87-165.
- 107.Chen R, Lee C, Lin X, et al. Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications. // *Pharmacol Res.* – 2019. – V. 143. – P. 33-39.
- 108.Chen WG, Chang Q, Lin Y, et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. // *Science.* – 2003. – V. 302. – № 5646. – P. 885-889.
- 109.Chen X, Wang S, Zhou Y, et al. Phf8 histone demethylase deficiency causes cognitive impairments through the mTOR pathway. // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 114.
- 110.Chen Y-Y, Gupta MB, Grattton R, et al. Down-regulation of placental folate transporters in intrauterine growth restriction. // *The Journal of Nutritional Biochemistry.* – 2018. – V. 59. – P. 136-141.
- 111.Chen YY, Gupta MB, Grattton R, et al. Down-regulation of placental folate transporters in intrauterine growth restriction. // *J Nutr Biochem.* – 2018. – V. 59. – P. 136-141.
- 112.Cheng M, Liu Z, Ji W, et al. Tissue Transglutaminase Impairs HTR-8/SVneo Trophoblast Cell Invasion via the PI3K/AKT Signaling Pathway. // *Gynecologic and Obstetric Investigation.* – 2021. – V. 86. – № 3. – P. 264-272.
- 113.Cheng S-B, Nakashima A, Huber WJ, et al. Pyroptosis is a critical inflammatory pathway in the placenta from early onset preeclampsia and in human trophoblasts exposed to hypoxia and endoplasmic reticulum stressors. // *Cell Death & Disease.* – 2019. – V. 10. – № 12. – P.927.
- 114.Choi SJ, Park JY, Lee YK, et al. Effects of cytokines on VEGF expression and secretion by human first trimester trophoblast cell line. // *Am J Reprod Immunol.* – 2002. – V. 48. – № 2. – P. 70-76.
- 115.Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, et al. LAT-1 expression in pre- and post-implantation embryos and placenta. // *Placenta.* – 2009. – V. 30. – № 3. – P. 270-276.
- 116.Cikot RJLM, Steegers-Theunissen RPM, Thomas CMG, et al. Longitudinal vitamin and homocysteine levels in normal pregnancy. // *British Journal of Nutrition.* – 2007. – V. 85. – № 1. – P. 49-58.
- 117.Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. // *Journal of Neurochemistry.* – 2008. – V. 107. – № 4. – P. 1124-1135.
- 118.Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. // *Biol Reprod.* – 2004. – V. 70. – № 6. – P. 1806-1813.
- 119.Cobb CA, Cole MP. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. // *Neurobiology of Disease.* – 2015. – V. 84. – P. 4-21.

- 120.Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. // *Redox Biology*. – 2018. – V. 15. – P. 490-503.
- 121.Cowden Dahl KD, Fryer BH, Mack FA, et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha regulate trophoblast differentiation. // *Mol Cell Biol*. – 2005. – V. 25. – № 23. – P. 10479-10491.
- 122.Cramer S, Beveridge M, Kilberg M, et al. Physiological importance of system A-mediated amino acid transport to rat fetal development. // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2002. – V. 282. – № 1. – P. C153-160.
- 123.Crema L, Schlabitz M, Tagliari B, et al. Na⁺, K⁺ ATPase Activity Is Reduced in Amygdala of Rats with Chronic Stress-Induced Anxiety-Like Behavior. // *Neurochemical Research*. – 2010. – V. 35. – № 11. – P. 1787-1795.
- 124.Cuello AC, Bruno MA. The failure in NGF maturation and its increased degradation as the probable cause for the vulnerability of cholinergic neurons in Alzheimer's disease. // *Neurochem Res*. – 2007. – V. 32. – № 6. – P. 1041-1045.
- 125.Cuffe JS, Walton SL, Singh RR, et al. Mid- to late term hypoxia in the mouse alters placental morphology, glucocorticoid regulatory pathways and nutrient transporters in a sex-specific manner. // *J Physiol*. – 2014. – V. 592. – № 14. – P. 3127-3141.
- 126.Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. // *The Journal of Neuroscience*. – 2013. – V. 33. – № 10. – P. 4216-4233.
- 127.Curro M, Gugliandolo A, Gangemi C, et al. Toxic effects of mildly elevated homocysteine concentrations in neuronal-like cells. // *Neurochem Res*. – 2014. – V. 39. – № 8. – P. 1485-1495.
- 128.D'Agostino DP, Putnam RW, Dean JB. Superoxide ([•]O₂⁻) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. // *J Neurophysiol*. – 2007. – V. 98. – № 2. – P. 1030-1041.
- 129.D'Souza SW, Glazier JD. Homocysteine Metabolism in Pregnancy and Developmental Impacts. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2022. – V. 10. – P.
- 130.da Cunha AA, Ferreira AG, Loureiro SO, et al. Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats. // *Neurochem Res*. – 2012a. – V. 37. – № 8. – P. 1660–1669.
- 131.da Cunha AA, Ferreira AGK, Loureiro SO, et al. Chronic Hyperhomocysteinemia Increases Inflammatory Markers in Hippocampus and Serum of Rats. // *Neurochemical Research*. – 2012b. – V. 37. – № 8. – P. 1660-1669.

- 132.da Cunha AA, Ferreira AGK, Wyse ATS. Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration. // *Metabolic Brain Disease*. – 2010. – V. 25. – № 2. – P. 199-206.
- 133.Dabbah-Assadi F, Khatib N, Ginsberg Y, et al. Short-Term Effect of MgSO₄ on the Expression of NRG-ErbB, Dopamine, GABA, and Glutamate Systems in the Fetal Rat Brain. // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2020. – V. 71. – № 3. – P. 446-454.
- 134.Dai C, Fei Y, Li J, et al. A Novel Review of Homocysteine and Pregnancy Complications. // *Biomed Res Int*. – 2021a. – V. 2021. – P. 6652231.
- 135.Dai C, Fei Y, Li J, et al. A Novel Review of Homocysteine and Pregnancy Complications. // *BioMed Research International*. – 2021b. – V. 2021. – P. 1-14.
- 136.Dangat KD, Mehendale SS, Yadav HR, et al. Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Composition of Breast Milk in Pre-Eclamptic Mothers. // *Neonatology*. – 2010. – V. 97. – № 3. – P. 190-194.
- 137.Das UG, He J, Ehrhardt RA, et al. Time-dependent physiological regulation of ovine placental GLUT-3 glucose transporter protein. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2000. – V. 279. – № 6. – P. R2252-2261.
- 138.de Bree A, van der Put NM, Mennen LI, et al. Prevalences of hyperhomocysteinemia, unfavorable cholesterol profile and hypertension in European populations. // *Eur J Clin Nutr*. – 2005. – V. 59. – № 4. – P. 480-488.
- 139.de Rezende MM, D'Almeida V. Central and systemic responses to methionine-induced hyperhomocysteinemia in mice. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – № 8. – P. e105704.
- 140.de S. Moreira D, Figueiró PW, Siebert C, et al. Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective? // *Neurotoxicity Research*. – 2017. – V. 33. – № 3. – P. 580-592.
- 141.Del Pino J, Martínez MA, Castellano VJ, et al. Effects of prenatal and postnatal exposure to amitraz on norepinephrine, serotonin and dopamine levels in brain regions of male and female rats. // *Toxicology*. – 2011. – V. 287. – № 1-3. – P. 145-152.
- 142.Delatour LC, Yeh PW, Yeh HH. Ethanol Exposure In Utero Disrupts Radial Migration and Pyramidal Cell Development in the Somatosensory Cortex. // *Cereb Cortex*. – 2019. – V. 29. – № 5. – P. 2125-2139.
- 143.Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – V. 9. – P. 655731.

- 144.Demir B, Demir S, Pasa S, et al. The role of homocysteine, asymmetric dimethylarginine and nitric oxide in pre-eclampsia. // *J Obstet Gynaecol.* – 2012. – V. 32. – № 6. – P. 525-528.
- 145.Demont Y, Corbet C, Page A, et al. Pro-nerve Growth Factor Induces Autocrine Stimulation of Breast Cancer Cell Invasion through Tropomyosin-related Kinase A (TrkA) and Sortilin Protein. // *Journal of Biological Chemistry.* – 2012. – V. 287. – № 3. – P. 1923-1931.
- 146.DeSesso JM, Scialli AR, Holson JF. Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. // *American Journal of Medical Genetics.* – 1999. – V. 87. – № 2. – P. 143-162.
- 147.Desforges M, Greenwood SL, Glazier JD, et al. The contribution of SNAT1 to system A amino acid transporter activity in human placental trophoblast. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – V. 398. – № 1. – P. 130-134.
- 148.Dhobale M. Neurotrophins: Role in adverse pregnancy outcome. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2014. – V. 37. – P. 8-14.
- 149.Dhobale M. Neurotrophic Factors and Maternal Nutrition During Pregnancy. // *Vitam Horm.* – 2017. – V. 104. – P. 343-366.
- 150.Dhobale MV, Pisal HR, Mehendale SS, et al. Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries. // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 2013. – V. 31. – № 8. – P. 719–723.
- 151.Di Meco A, Li J-G, Barrero C, et al. Elevated levels of brain homocysteine directly modulate the pathological phenotype of a mouse model of tauopathy. // *Molecular Psychiatry.* – 2018. – V. 24. – № 11. – P. 1696-1706.
- 152.Di Simone N, Maggiano N, Caliandro D, et al. Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features. // *Biol. Reprod.* – 2003. – V. 69. – № 4. – P. 1129–1134.
- 153.Dias-Junior CA, Chen J, Cui N, et al. Angiogenic imbalance and diminished matrix metalloproteinase-2 and -9 underlie regional decreases in uteroplacental vascularization and fetoplacental growth in hypertensive pregnancy. // *Biochemical Pharmacology.* – 2017. – V. 146. – P. 101-116.
- 154.DiBello PM, Dayal S, Kaveti S, et al. The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia. // *Mol Cell Proteomics.* – 2010. – V. 9. – № 3. – P. 471-485.
- 155.Dincheva I, Lynch NB, Lee FS. The Role of BDNF in the Development of Fear Learning. // *Depress Anxiety.* – 2016. – V. 33. – № 10. – P. 907-916.
- 156.Dionisie V, Ciobanu AM, Toma VA, et al. Escitalopram Targets Oxidative Stress, Caspase-3, BDNF and MeCP2 in the Hippocampus and Frontal Cortex of a Rat Model of Depression Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress. // *Int J Mol Sci.* – 2021. – V. 22. – № 14.

157. Dmitrieva NI. Periods of development of brain structure in the ontogenesis of rats (review). // *Neurosci Behav Physiol.* – 1984. – V. 14. – № 5. – P. 435-439.
158. Dong J, Lei J, Elsayed NA, et al. The effect of intrauterine inflammation on mTOR signaling in mouse fetal brain. // *Dev Neurobiol.* – 2020. – V. 80. – № 5-6. – P. 149-159.
159. Dong M, He J, Wang Z, et al. Placental imbalance of Th1- and Th2-type cytokines in preeclampsia. // *Acta Obstet Gynecol Scand.* – 2005. – V. 84. – № 8. – P. 788-793.
160. Dong Y, Ito T, Velayo C, et al. Intrauterine ischemic reperfusion switches the fetal transcriptional pattern from HIF-1alpha- to P53-dependent regulation in the murine brain. // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 10. – P. e110577.
161. Dorandish S, Atali S, Ray R, et al. Differences in the Relative Abundance of ProBDNF and Mature BDNF in A549 and H1299 Human Lung Cancer Cell Media. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2021. – V. 22. – № 13.
162. Doronzo G, Russo I, Del Mese P, et al. Role of NMDA receptor in homocysteine-induced activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidyl Inositol 3-Kinase pathways in cultured human vascular smooth muscle cells. // *Thrombosis Research.* – 2010. – V. 125. – № 2. – P. e23-e32.
163. Dos Santos TM, Ramires Junior OV, Alves VS, et al. Hyperhomocysteinemia alters cytokine gene expression, cytochrome c oxidase activity and oxidative stress in striatum and cerebellum of rodents. // *Life Sci.* – 2021. – V. 277. – P. 119386.
164. Dos Santos TM, Siebert C, de Oliveira MF, et al. Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. // *Cell Mol Neurobiol.* – 2019a. – V. 39. – № 5. – P. 687-700.
165. dos Santos TM, Siebert C, de Oliveira MF, et al. Chronic mild Hyperhomocysteinemia impairs energy metabolism, promotes DNA damage and induces a Nrf2 response to oxidative stress in rats brain. // *Cellular and Molecular Neurobiology.* – 2019b. – V. 39. – № 5. – P. 687-700.
166. Dubinina EE, Gavrovskaya SV, Kuzmich EV, et al. Oxidative modification of proteins: oxidation of tryptophan and production of dityrosine in purified proteins using Fenton's system. // *Biochemistry (Mosc).* – 2002. – V. 67. – № 3. – P. 343-350.
167. Dubinina EE, Pustygina AV. [Free radical processes in aging, neurodegenerative diseases and other pathological states]. // *Biomed Khim.* – 2007. – V. 53. – № 4. – P. 351-372.
168. Dunk C, Shams M, Nijjar S, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. // *Am J Pathol.* – 2000. – V. 156. – № 6. – P. 2185-2199.

- 169.Dye JF, Vause S, Johnston T, et al. Characterization of cationic amino acid transporters and expression of endothelial nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelial cells. // *FASEB J.* – 2004. – V. 18. – № 1. – P. 125-127.
- 170.Efeyan A, Zoncu R, Chang S, et al. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. // *Nature.* – 2012. – V. 493. – № 7434. – P. 679-683.
- 171.Ellingsen E, Agmo A. Sexual-incentive motivation and paced sexual behavior in female rats after treatment with drugs modifying dopaminergic neurotransmission. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2004. – V. 77. – № 3. – P. 431-445.
- 172.Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. // *Behav Brain Res.* – 1988. – V. 31. – № 1. – P. 47-59.
- 173.Ericsson A, Hamark B, Jansson N, et al. Hormonal regulation of glucose and system A amino acid transport in first trimester placental villous fragments. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2005. – V. 288. – № 3. – P. R656-662.
- 174.Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F, et al. Role of Extracellular Vesicles and microRNAs on Dysfunctional Angiogenesis during Preeclamptic Pregnancies. // *Front Physiol.* – 2016. – V. 7. – P. 98.
- 175.Espino Y, Sosa S, Flores-Pliego A, Espejel-Nuñez A, et al. New Insights into the Role of Matrix Metalloproteinases in Preeclampsia. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2017. – V. 18. – № 7.
- 176.Esse R, Imbard A, Florindo C, et al. Protein arginine hypomethylation in a mouse model of cystathionine beta-synthase deficiency. // *FASEB J.* – 2014. – V. 28. – № 6. – P. 2686-2695.
- 177.Esteban S, Garau C, Aparicio S, et al. Improving Effects of Long-Term Growth Hormone Treatment on Monoaminergic Neurotransmission and Related Behavioral Tests in Aged Rats. // *Rejuvenation Research.* – 2010. – V. 13. – № 6. – P. 707-716.
- 178.Eto K, Asada T, Arima K, et al. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2002. – V. 293. – № 5. – P. 1485-1488.
- 179.Fahnestock M, Shekari A. ProNGF and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. // *Front Neurosci.* – 2019. – V. 13. – P. 129.
- 180.Fan CG, Zhang QJ, Tang FW, et al. Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors. // *Neurosci Lett.* – 2005. – V. 380. – № 3. – P. 322-325.
- 181.Fan G, Beard C, Chen RZ, et al. DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals. // *J Neurosci.* – 2001. – V. 21. – № 3. – P. 788-797.
- 182.Fan G, Hutnick L. Methyl-CpG binding proteins in the nervous system. // *Cell Res.* – 2005. – V. 15. – № 4. – P. 255-261.

- 183.Fang C, Kang B, Zhao P, et al. Targeting Neuregulin 1 (NRG1): A Novel Biomarker for Non-Small-Cell Lung Cancer. // *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. – 2021. – V. 40. – № 4. – P. 61-72.
- 184.Fang L, Gao Y, Wang Z, et al. EGF stimulates human trophoblast cell invasion by downregulating ID3-mediated KISS1 expression. // *Cell Communication and Signaling*. – 2021. – V. 19. – № 1.
- 185.Fang M, Wang J, Yan H, et al. A proteomics study of hyperhomocysteinemia injury of the hippocampal neurons using iTRAQ. // *Mol Med Rep*. – 2014. – V. 10. – № 5. – P. 2511-2516.
- 186.Faraci FM. Hyperhomocysteinemia: a million ways to lose control. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2003. – V. 23. – № 3. – P. 371-373.
- 187.Faraci FM, Lentz SR. Hyperhomocysteinemia, Oxidative Stress, and Cerebral Vascular Dysfunction. // *Stroke*. – 2004. – V. 35. – № 2. – P. 345-347.
- 188.Faverzani JL, Hammerschmidt TG, Sitta A, et al. Oxidative Stress in Homocystinuria Due to Cystathionine β -Synthase Deficiency: Findings in Patients and in Animal Models. // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2017. – V. 37. – № 8. – P. 1477-1485.
- 189.Fayez AM, Elnoby AS, Bahnasawy NH, et al. Neuroprotective effects of zafirlukast, piracetam and their combination on L-Methionine-induced vascular dementia in rats. // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2019. – V. 33. – № 6. – P. 634-648.
- 190.Fedorchak AV, Miller MW. Episodic Prenatal Exposure To Ethanol Affects Postnatal Neurogenesis In The Macaque Dentate Gyrus And Visual Recognition Memory. // *International Journal of Developmental Neuroscience*. – 2019. – V. 79. – № 1. – P. 65-75.
- 191.Feldmann M, Beckmann D, Eysel UT, et al. Early Loss of Vision Results in Extensive Reorganization of Plasticity-Related Receptors and Alterations in Hippocampal Function That Extend Through Adulthood. // *Cereb Cortex*. – 2019. – V. 29. – № 2. – P. 892-905.
- 192.Feng J, Chang H, Li E, et al. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. // *J Neurosci Res*. – 2005. – V. 79. – № 6. – P. 734-746.
- 193.Feng X, Xu Y. Hyperhomocysteinemia as a Metabolic Risk Factor for Glucose Intolerance Among High-Risk Groups of Chinese Adults. // *Med Sci Monit*. – 2017. – V. 23. – P. 2775-2781.
- 194.Fernandez-Guasti A, Ahlenius S, Hjorth S, et al. Separation of dopaminergic and serotonergic inhibitory mechanisms in the mediation of estrogen-induced lordosis behaviour in the rat. // *Pharmacol Biochem Behav*. – 1987. – V. 27. – № 1. – P. 93-98.
- 195.Fernandez-Twinn DS, Constância M, Ozanne SE. Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2015. – V. 43. – P. 85-95.

- 196.Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. // *Endocr Rev.* – 2004. – V. 25. – № 4. – P. 581-611.
- 197.Figueiro PW, de SMD, Dos Santos TM, et al. The neuroprotective role of melatonin in a gestational hypermethioninemia model. // *Int J Dev Neurosci.* – 2019. – V. 78. – P. 198-209.
- 198.Fjell AM, Walhovd KB. Structural Brain Changes in Aging: Courses, Causes and Cognitive Consequences. // *Reviews in the Neurosciences.* – 2010. – V. 21. – № 3.
- 199.Fleitas C, Pinol-Ripoll G, Marfull P, et al. proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing. // *Mol Brain.* – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 68.
- 200.Fock V, Plessl K, Draxler P, et al. Neuregulin 1-mediated ErbB2/ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation. // *Journal of Cell Science.* – 2015a.
- 201.Fock V, Plessl K, Fuchs R, et al. Trophoblast subtype-specific EGFR/ERBB4 expression correlates with cell cycle progression and hyperplasia in complete hydatidiform moles. // *Human Reproduction.* – 2015b. – V. 30. – № 4. – P. 789-799.
- 202.Foltran RB, Diaz SL. BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? // *Journal of Neurochemistry.* – 2016. – V. 138. – № 2. – P. 204-221.
- 203.Fonken LK, Frank MG, Gaudet AD, et al. Stress and aging act through common mechanisms to elicit neuroinflammatory priming. // *Brain, Behavior, and Immunity.* – 2018. – V. 73. – P. 133-148.
- 204.Fonlupt P, Roche M, Cronenberger L, et al. Action of S-adenosyl-L-homocysteine on the metabolism of dopamine, norepinephrine and serotonin in rat brain. // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* – 1979. – V. 240. – № 1. – P. 35-44.
- 205.Fontana VA, Sanchez M, Cebral E, et al. Interleukin-1 beta regulates metalloproteinase activity and leptin secretion in a cytotrophoblast model. // *Biocell.* – 2010. – V. 34. – № 1. – P. 37-43.
- 206.Foreman MM, Moss RL. Role of hypothalamic alpha and beta adrenergic receptors in the control of lordotic behavior in the ovariectomized-estrogen primed rat. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1978. – V. 9. – № 2. – P. 235-241.
- 207.Fornes R, Hu M, Maliqueo M, et al. Maternal testosterone and placental function: Effect of electroacupuncture on placental expression of angiogenic markers and fetal growth. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2016. – V. 433. – P. 1-11.
- 208.Fournier I, Ploye F, Brun J, et al. Folate Deficiency Alters Melatonin Secretion in Rats. // *The Journal of Nutrition.* – 2002. – V. 132. – № 9. – P. 2781-2784.
- 209.Fowden AL, Ward JW, Wooding FP, et al. Programming placental nutrient transport capacity. // *J Physiol.* – 2006. – V. 572. – № Pt 1. – P. 5-15.

210. Fox SR, Harlan RE, Shivers BD, et al. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. // *Neuroendocrinology*. – 1990. – V. 51. – № 3. – P. 276-283.
211. França de Souza D, Alonso MA, Brito MM, et al. Oxidative state in equine neonates: Anti- and pro-oxidants. // *Equine Veterinary Journal*. – 2020. – V. 53. – № 2. – P. 379-384.
212. Frank P, Barrientos G, Tirado-Gonzalez I, et al. Balanced levels of nerve growth factor are required for normal pregnancy progression. // *Reproduction*. – 2014. – V. 148. – № 2. – P. 179-189.
213. Freitag M, Selker EU. Controlling DNA methylation: many roads to one modification. // *Curr Opin Genet Dev*. – 2005. – V. 15. – № 2. – P. 191-199.
214. Fu G, Brkic J, Hayder H, et al. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. // *Int J Mol Sci*. – 2013. – V. 14. – № 3. – P. 5519-5544.
215. Fujimura M, Unoki T. Preliminary evaluation of the mechanism underlying vulnerability/resistance to methylmercury toxicity by comparative gene expression profiling of rat primary cultured cerebrocortical and hippocampal neurons. // *The Journal of Toxicological Sciences*. – 2022. – V. 47. – № 5. – P. 211-219.
216. Fujita K, Tatsumi K, Kondoh E, et al. Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors. // *Placenta*. – 2011. – V. 32. – № 10. – P. 737-744.
217. Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. // *Ann Hum Genet*. – 2004. – V. 68. – № Pt 3. – P. 196-204.
218. Fukumitsu H, Ohtsuka M, Murai R, et al. Brain-derived neurotrophic factor participates in determination of neuronal laminar fate in the developing mouse cerebral cortex. // *J Neurosci*. – 2006. – V. 26. – № 51. – P. 13218-13230.
219. Funahashi Y, Shawber CJ, Sharma A, et al. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing Matrix Metalloprotease activity. // *Vasc Cell*. – 2011. – V. 3. – № 1. – P. 2.
220. Furlaneto CJ, Ribeiro FP, Hatanaka E, et al. Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions. // *Lipids*. – 2002. – V. 37. – № 9. – P. 925-928.
221. Furukawa S, Hayashi S, Usuda K, et al. Toxicological pathology in the rat placenta. // *J Toxicol Pathol*. – 2011. – V. 24. – № 2. – P. 95-111.
222. Furukawa S, Tsuji N, Sugiyama A. Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation. // *J Toxicol Pathol*. – 2019. – V. 32. – № 1. – P. 1-17.

223. Gaiday A, Balash L, Tussupkaliyev A. The Role of High Concentrations of Homocysteine for the Development of Fetal Growth Restriction. // *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2022. – V. 44. – № 4. – P. 352-359.
224. Gaiday AN, Tussupkaliyev AB, Bermagambetova SK, et al. Effect of homocysteine on pregnancy: A systematic review. // *Chem Biol Interact.* – 2018. – V. 293. – P. 70-76.
225. Galvan A, Hu X, Rommelfanger KS, et al. Localization and function of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of normal and parkinsonian monkeys. // *Journal of Neurophysiology.* – 2014. – V. 112. – № 2. – P. 467-479.
226. Ganapathy PS, White RE, Ha Y, et al. The role of N-methyl-D-aspartate receptor activation in homocysteine-induced death of retinal ganglion cells. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* – 2011. – V. 52. – № 8. – P. 5515-5524.
227. Ganguly A, Collis L, Devaskar SU. Placental glucose and amino acid transport in calorie-restricted wild-type and Glut3 null heterozygous mice. // *Endocrinology.* – 2012. – V. 153. – № 8. – P. 3995-4007.
228. Ganguly A, Touma M, Thamocharan S, et al. Maternal Calorie Restriction Causing Uteroplacental Insufficiency Differentially Affects Mammalian Placental Glucose and Leucine Transport Molecular Mechanisms. // *Endocrinology.* – 2016. – V. 157. – № 10. – P. 4041-4054.
229. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. // *Nutr J.* – 2015. – V. 14. – P. 6.
230. Gao J, Cahill CM, Huang X, et al. S-Adenosyl Methionine and Transmethylation Pathways in Neuropsychiatric Diseases Throughout Life. // *Neurotherapeutics.* – 2018a. – V. 15. – № 1. – P. 156-175.
231. Gao J, Cui JZ, To E, et al. Evidence for the activation of pyroptotic and apoptotic pathways in RPE cells associated with NLRP3 inflammasome in the rodent eye. // *Journal of Neuroinflammation.* – 2018b. – V. 15. – № 1.
232. Gao J, Prough D, McAdoo D, et al. Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury. // *Experimental Neurology.* – 2006. – V. 201. – № 2. – P. 281-292.
233. Gao L, Wu Q, Yin H, et al. [The nuclear translocation of circRNA CPSF6 promotes apoptosis of trophoblast cells induced by homocysteine]. // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* – 2022. – V. 38. – № 2. – P. 146-152.
234. Gao L, Zeng XN, Guo HM, et al. Cognitive and neurochemical alterations in hyperhomocysteinemic rat. // *Neurol Sci.* – 2012. – V. 33. – № 1. – P. 39-43.

235. Garces MF, Sanchez E, Torres-Sierra AL, et al. Brain-derived neurotrophic factor is expressed in rat and human placenta and its serum levels are similarly regulated throughout pregnancy in both species. // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. – 2014. – V. 81. – № 1. – P. 141–151.
236. Geng W, Wang J, Xie L, et al. p75^{NTR} Interacts with the Zinc Finger Protein Glis2 and Participates in Neuronal Apoptosis Following Intracerebral Hemorrhage. // *Neurotoxicity Research*. – 2022. – V. 40. – № 2. – P. 461–472.
237. Geoffroy A, Kerek R, Pourie G, et al. Late Maternal Folate Supplementation Rescues from Methyl Donor Deficiency-Associated Brain Defects by Restoring Let-7 and miR-34 Pathways. // *Mol Neurobiol*. – 2017. – V. 54. – № 7. – P. 5017–5033.
238. Geoffroy A, Saber-Cherif L, Pourie G, et al. Developmental Impairments in a Rat Model of Methyl Donor Deficiency: Effects of a Late Maternal Supplementation with Folic Acid. // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. – № 4.
239. Gerasimova E, Yakovleva O, Burkhanova G, et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia on the early physical development and neurobehavioral maturation of rat offspring. // *BioNanoScience*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 155–158.
240. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K, et al. Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. // *J Neurosci*. – 2008. – V. 28. – № 5. – P. 1236–1245.
241. Geva E, Ginzinger DG, Zaloudek CJ, et al. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2002. – V. 87. – № 9. – P. 4213–4224.
242. Ghiani CA, Mattan NS, Nobuta H, et al. Early effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on foetal brain development in rat. // *ASN Neuro*. – 2011. – V. 3. – № 4. – P. e00068
243. Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. // *J. Neuroimmunol*. – 2003a. – V. 138. – № 1-2. – P. 49–55.
244. Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat. // *Journal of Neuroimmunology*. – 2003b. – V. 138. – № 1-2. – P. 49–55.
245. Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S. Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat. // *J. Neuroimmunol*. – 2005. – V. 159. – № 1-2. – P. 106–112.

246. Glazier JD, Jones CJ, Sibley CP. Purification and Na⁺ uptake by human placental microvillus membrane vesicles prepared by three different methods. // *Biochim Biophys Acta*. – 1988. – V. 945. – № 2. – P. 127-134.
247. Glazier JD, Jones CJ, Sibley CP. Preparation of plasma membrane vesicles from the rat placenta at term and measurement of Na⁺ uptake. // *Placenta*. – 1990. – V. 11. – № 5. – P. 451-463.
248. Glazier JD, Sibley CP. In vitro methods for studying human placental amino acid transport: placental plasma membrane vesicles. // *Methods Mol Med*. – 2006. – V. 122. – P. 241-252.
249. Godefroy F, Bassant MH, Lamour Y, et al. Effect of aging on dopamine metabolism in the rat cerebral cortex: a regional analysis. // *J Neural Transm Gen Sect*. – 1991. – V. 83. – № 1-2. – P. 13-24.
250. Goldshmit Y, Erlich S, Pinkas-Kramarski R. Neuregulin Rescues PC12-ErbB4 Cells from Cell Death Induced by H₂O₂. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – V. 276. – № 49. – P. 46379-46385.
251. Gonzalez-Flores O, Beyer C, Lima-Hernandez FJ, et al. Facilitation of estrous behavior by vaginal cervical stimulation in female rats involves alpha1-adrenergic receptor activation of the nitric oxide pathway. // *Behav Brain Res*. – 2007. – V. 176. – № 2. – P. 237-243.
252. Görtz P, Hoinkes A, Fleischer W, et al. Implications for hyperhomocysteinemia: not homocysteine but its oxidized forms strongly inhibit neuronal network activity. // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2004. – V. 218. – № 1-2. – P. 109-114.
253. Goulopoulou S, Davidge ST. Molecular mechanisms of maternal vascular dysfunction in preeclampsia. // *Trends in Molecular Medicine*. – 2015. – V. 21. – № 2. – P. 88-97.
254. Graham MD, Pfaus JG. Differential regulation of female sexual behaviour by dopamine agonists in the medial preoptic area. // *Pharmacol Biochem Behav*. – 2010. – V. 97. – № 2. – P. 284-292.
255. Graham MD, Pfaus JG. Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone. // *Pharmacol Biochem Behav*. – 2012. – V. 102. – № 4. – P. 532-539.
256. Greco CM, Cervantes M, Fustin JM, et al. S-adenosyl-l-homocysteine hydrolase links methionine metabolism to the circadian clock and chromatin remodeling. // *Sci Adv*. – 2020. – V. 6. – № 51. – P. eabc5629
257. Gregorie CJ, Wiesen JL, Magner WJ, et al. Restoration of immune response gene induction in trophoblast tumor cells associated with cellular senescence. // *J Reprod Immunol*. – 2009. – V. 81. – № 1. – P. 25-33.
258. Grierson JP, James MD, Pearson JR, et al. The effect of selective D1 and D2 dopaminergic agents on sexual receptivity in the female rat. // *Neuropharmacology*. – 1988. – V. 27. – № 2. – P. 181-189.

259. Gualdoni GS, Jacobo PV, Barril C, et al. Early Abnormal Placentation and Evidence of Vascular Endothelial Growth Factor System Dysregulation at the Feto-Maternal Interface After Periconceptional Alcohol Consumption. // *Front Physiol.* – 2021a. – V. 12. – P. 815760.
260. Gualdoni GS, Ventureira MR, Coll TA, et al. Perigestational alcohol consumption induces altered early placentation and organogenic embryo growth restriction by disruption of trophoblast angiogenic factors. // *Reprod Biomed Online.* – 2021b. – V. 42. – № 3. – P. 481-504.
261. Gueant JL, Namour F, Gueant-Rodriguez RM, et al. Folate and fetal programming: a play in epigenomics? // *Trends Endocrinol Metab.* – 2013. – V. 24. – № 6. – P. 279-289.
262. Guillot TS, Miller GW. Protective Actions of the Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) in Monoaminergic Neurons. // *Molecular Neurobiology.* – 2009. – V. 39. – № 2. – P. 149-170.
263. Guo YH, Chen FY, Wang GS, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates vascular reverse remodeling of balloon-injured arteries in rat. // *Chin Med J (Engl).* – 2008. – V. 121. – № 22. – P. 2265-2271.
264. Gurda D, Handschuh L, Kotkowiak W, et al. Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylated protein induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells. // *Amino Acids.* – 2015. – V. 47. – № 7. – P. 1319-1339.
265. Gurung P, Kanneganti TD. Novel roles for caspase-8 in IL-1beta and inflammasome regulation. // *Am J Pathol.* – 2015. – V. 185. – № 1. – P. 17-25.
266. Hadden C, Fahmi T, Cooper A, et al. Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway. // *J Cell Physiol.* – 2017. – V. 232. – № 12. – P. 3520-3529.
267. Hague WM. Homocysteine and pregnancy. // *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* – 2003. – V. 17. – № 3. – P. 459-469.
268. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. // *J Neurochem.* – 1992. – V. 59. – № 5. – P. 1609-1623.
269. Hamdi Y, Madfai H, Belhareth R, et al. Prenatal exposure to cigarette smoke enhances oxidative stress in astrocytes of neonatal rat. // *Toxicology Mechanisms and Methods.* – 2016. – V. 26. – № 4. – P. 231-237.
270. Han SK, Herbison AE. Norepinephrine suppresses gonadotropin-releasing hormone neuron excitability in the adult mouse. // *Endocrinology.* – 2008. – V. 149. – № 3. – P. 1129-1135.
271. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. // *Lancet.* – 1999. – V. 354. – № 9176. – P. 407-413.
272. Hannibal L, Blom HJ. Homocysteine and disease: Causal associations or epiphenomenons? // *Mol Aspects Med.* – 2017. – V. 53. – P. 36-42.

273. Harik SI, McCracken KA. Age-related increase in presynaptic noradrenergic markers of the rat cerebral cortex. // *Brain Res.* – 1986. – V. 381. – № 1. – P. 125-130.
274. Harlan De Crescenzo A, Panoutsopoulos AA, Tat L, et al. Deficient or Excess Folic Acid Supply During Pregnancy Alter Cortical Neurodevelopment in Mouse Offspring. // *Cereb Cortex.* – 2021. – V. 31 – P. 635-649
275. He W, Wu G. Metabolism of Amino Acids in the Brain and Their Roles in Regulating Food Intake. // *Adv Exp Med Biol.* – 2020. – V. 1265. – P. 167-185.
276. Hemanth Kumar B, Dinesh Kumar B, Diwan PV. Hesperidin, a citrus flavonoid, protects against l-methionine-induced hyperhomocysteinemia by abrogation of oxidative stress, endothelial dysfunction and neurotoxicity in Wistar rats. // *Pharmaceutical Biology.* – 2016. – V. 55. – № 1. – P. 146-155.
277. Hemberger M, Nozaki T, Masutani M, et al. Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion. // *Dev Dyn.* – 2003. – V. 227. – № 2. – P. 185-191.
278. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. // *Nature.* – 2000. – V. 407. – № 6805. – P. 770-776.
279. Heo MJ, Kim TH, You JS, et al. Alcohol dysregulates miR-148a in hepatocytes through FoxO1, facilitating pyroptosis via TXNIP overexpression. // *Gut.* – 2019. – V. 68. – № 4. – P. 708-720.
280. Herlenius E, Lagercrantz H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. // *Early Human Development.* – 2001. – V. 65. – № 1. – P. 21-37.
281. Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptors in rat pregnancy and the effect of increased glucocorticoid exposure. // *Biol Reprod.* – 2006. – V. 74. – № 1. – P. 23-28.
282. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, et al. Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine. // *Neurobiol Dis.* – 2003. – V. 14. – № 1. – P. 32-42.
283. Hooijmans CR, Blom HJ, Oppenraaij-Emmerzaal D, et al. S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the aging brain of APP/PS1 Alzheimer mice. // *Neurol Sci.* – 2009. – V. 30. – № 5. – P. 439-445.
284. Horackova H, Karahoda R, Vachalova V, et al. Functional characterization of dopamine and norepinephrine transport across the apical and basal plasma membranes of the human placental syncytiotrophoblast. // *Scientific Reports.* – 2022. – V. 12. – № 1. – P.
285. Hosny S, Jenness L. Identification of alpha1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurones of the female rat. // *J Neuroendocrinol.* – 1998. – V. 10. – № 9. – P. 687-692.

- 286.Hrabovszky E, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. // *Endocrinology*. – 2000. – V. 141. – № 9. – P. 3506-3509.
- 287.Huang R-FS, Huang S-M, Lin B-S, et al. Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. // *Life Sciences*. – 2001. – V. 68. – № 25. – P. 2799-2811.
- 288.Huang Y, Wu K, Li H, et al. Homocysteine level, body mass index and clinical correlates in Chinese Han patients with schizophrenia. // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 16119.
- 289.Hung TH, Hsieh TT, Wu CP, et al. Mammalian target of rapamycin signaling is a mechanistic link between increased endoplasmic reticulum stress and autophagy in the placentas of pregnancies complicated by growth restriction. // *Placenta*. – 2017. – V. 60. – P. 9-20.
- 290.Hutnick LK, Golshani P, Namihira M, et al. DNA hypomethylation restricted to the murine forebrain induces cortical degeneration and impairs postnatal neuronal maturation. // *Hum Mol Genet*. – 2009. – V. 18. – № 15. – P. 2875-2888.
- 291.Iacobucci S, Padilla N, Gabrielli M, et al. The histone demethylase PHF8 regulates astrocyte differentiation and function. // *Development*. – 2021. – V. 148. – № 12. – P. dev194951
- 292.Idriss AA, Hu Y, Sun Q, et al. Fetal betaine exposure modulates hypothalamic expression of cholesterol metabolic genes in offspring cockerels with modification of promoter DNA methylation. // *Poult Sci*. – 2020. – V. 99. – № 5. – P. 2533-2542.
- 293.Illsley NP. Glucose transporters in the human placenta. // *Placenta*. – 2000. – V. 21. – № 1. – P. 14-22.
- 294.Illsley NP, Wang ZQ, Gray A, et al. Simultaneous preparation of paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human placenta. // *Biochim Biophys Acta*. – 1990. – V. 1029. – № 2. – P. 218-226.
- 295.Imamura K, Takeshima T, Nakaso K, et al. Homocysteine is toxic for dopaminergic neurons in primary mesencephalic culture. // *NeuroReport*. – 2007. – V. 18. – № 13. – P. 1319-1322.
- 296.Isobe C, Murata T, Sato C, et al. Increase of total homocysteine concentration in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease and Parkinson's disease. // *Life Sci*. – 2005. – V. 77. – № 15. – P. 1836-1843.
- 297.Jacobi J, Kristal B, Chezar J, et al. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. // *Free Radic Biol Med*. – 2005. – V. 39. – № 9. – P. 1238-1248.

- 298.Jadavji NM, Deng L, Malysheva O, et al. MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring. // *Neuroscience*. – 2015. – V. 300. – P. 1-9.
- 299.Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. // *Nat Genet*. – 2003. – V. 33 Suppl. – P. 245-254.
- 300.Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. // *Cell Mol Life Sci*. – 2004. – V. 61. – № 4. – P. 470-487.
- 301.Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. // *J Nutr*. – 2006. – V. 136. – № 6 Suppl. – P. 1741S-1749S.
- 302.James-Allan LB, Arbet J, Teal SB, et al. Insulin stimulates GLUT4 trafficking to the syncytiotrophoblast basal plasma membrane in the human placenta. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2019. – V.104. – № 9. – P. 4225-4238
- 303.James SJ, Melnyk S, Jernigan S, et al. A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism. // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. – 2010. – V. 153B. – № 6. – P. 1209-1220.
- 304.James SJ, Melnyk S, Pogribna M, et al. Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. // *J Nutr*. – 2002. – V. 132. – № 8 Suppl. – P. 2361S-2366S.
- 305.Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, et al. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. // *J Physiol*. – 2006. – V. 576. – № Pt 3. – P. 935-946.
- 306.Jansson N, Rosario FJ, Gaccioli F, et al. Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2013. – V. 98. – № 1. – P. 105-113.
- 307.Jansson T. Novel mechanism causing restricted fetal growth: does maternal homocysteine impair placental amino acid transport? // *J Physiol*. – 2009. – V. 587. – № Pt 17. – P. 4123.
- 308.Jansson T, Aye IL, Goberdhan DC. The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. // *Placenta*. – 2012. – V. 33 Suppl 2. – P. e23-29.
- 309.Jansson T, Wennergren M, Illsley NP. Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. // *J Clin Endocrinol Metab*. – 1993. – V. 77. – № 6. – P. 1554-1562.
- 310.Jara-Prado A, Ortega-Vazquez A, Ruano LM, et al. Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: Effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition. // *Neurotoxicity Research*. – 2003. – V. 5. – № 4. – P. 237-243.

- 311.Jarskog LF, Xiao H, Wilkie MB, et al. Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. // *Int J Dev Neurosci.* – 1997. – V. 15. – № 6. – P. 711-716.
- 312.Je HS, Yang F, Ji Y, et al. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2012. – V. 109. – № 39. – P. 15924-15929.
- 313.Je HS, Yang F, Ji Y, et al. ProBDNF and Mature BDNF as Punishment and Reward Signals for Synapse Elimination at Mouse Neuromuscular Junctions. // *Journal of Neuroscience.* – 2013. – V. 33. – № 24. – P. 9957-9962.
- 314.Jebbett NJ, Hamilton JW, Rand MD, et al. Low level methylmercury enhances CNTF-evoked STAT3 signaling and glial differentiation in cultured cortical progenitor cells. // *Neurotoxicology.* – 2013. – V. 38. – P. 91-100.
- 315.Ji LL, Dillon D, Wu E. Myocardial aging: antioxidant enzyme systems and related biochemical properties. // *Am J Physiol.* – 1991. – V. 261. – № 2 Pt 2. – P. R386-392.
- 316.Jia SJ, Lai YQ, Zhao M, et al. Homocysteine-induced hypermethylation of DDAH2 promoter contributes to apoptosis of endothelial cells. // *Pharmazie.* – 2013. – V. 68. – № 4. – P. 282-286.
- 317.Jiang X, Yang F, Brailoiu E, et al. Differential regulation of homocysteine transport in vascular endothelial and smooth muscle cells. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2007. – V. 27. – № 9. – P. 1976-1983.
- 318.Jiang Y, Sun T, Xiong J, et al. Hyperhomocysteinemia-mediated DNA hypomethylation and its potential epigenetic role in rats. // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2007. – V. 39. – № 9. – P. 657-667.
- 319.Jokhi PP, King A, Loke YW. Reciprocal expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and c-erbB2 by non-invasive and invasive human trophoblast populations. // *Cytokine.* – 1994. – V. 6. – № 4. – P. 433-442.
- 320.Jones H, Crombleholme T, Habli M. Regulation of amino acid transporters by adenoviral-mediated human insulin-like growth factor-1 in a mouse model of placental insufficiency in vivo and the human trophoblast line BeWo in vitro. // *Placenta.* – 2014. – V. 35. – № 2. – P. 132-138.
- 321.Jones HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. // *Diabetes.* – 2010. – V. 59. – № 5. – P. 1161-1170.
- 322.Jones HN, Woollett LA, Barbour N, et al. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. // *FASEB J.* – 2009. – V. 23. – № 1. – P. 271-278.

323. Joseph JA, Villalobos-Molina R, Denisova N, et al. Age differences in sensitivity to H₂O₂- or NO-induced reductions in K(+)-evoked dopamine release from superfused striatal slices: reversals by PBN or Trolox. // *Free Radic Biol Med.* – 1996. – V. 20. – № 6. – P. 821-830.
324. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. // *Mol Biol Cell.* – 2009. – V. 20. – № 7. – P. 1992-2003.
325. Kalani A, Kamat PK, Familtseva A, et al. Role of microRNA29b in blood-brain barrier dysfunction during hyperhomocysteinemia: an epigenetic mechanism. // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2014a. – V. 34. – № 7. – P. 1212-1222.
326. Kalani A, Kamat PK, Givvimani S, et al. Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid. // *J Mol Neurosci.* – 2014b. – V. 52. – № 2. – P. 202-215.
327. Kalaria RN. Neuropathological diagnosis of vascular cognitive impairment and vascular dementia with implications for Alzheimer's disease. // *Acta Neuropathol.* – 2016. – V. 131. – № 5. – P. 659-685.
328. Kalinichenko VV, Vaswani K, Hum MW-C, et al. The Effect of Gestational Age on Angiogenic Gene Expression in the Rat Placenta. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – № 12. – P.
329. Kamat PK, Kalani A, Givvimani S, et al. Hydrogen sulfide attenuates neurodegeneration and neurovascular dysfunction induced by intracerebral-administered homocysteine in mice. // *Neuroscience.* – 2013. – V. 252. – P. 302-319.
330. Kamat PK, Kalani A, Tyagi SC, et al. Hydrogen Sulfide Epigenetically Attenuates Homocysteine-Induced Mitochondrial Toxicity Mediated Through NMDA Receptor in Mouse Brain Endothelial (bEnd3) Cells. // *J Cell Physiol.* – 2015a. – V. 230. – № 2. – P. 378-394.
331. Kamat PK, Kyles P, Kalani A, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Homocysteine-Induced Alzheimer's Disease-Like Pathology, Blood-Brain Barrier Disruption, and Synaptic Disorder. // *Molecular Neurobiology.* – 2015b. – V. 53. – № 4. – P. 2451-2467.
332. Kamat PK, Kyles P, Kalani A, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Homocysteine-Induced Alzheimer's Disease-Like Pathology, Blood-Brain Barrier Disruption, and Synaptic Disorder. // *Mol Neurobiol.* – 2016. – V. 53. – № 4. – P. 2451-2467.
333. Kamat PK, Vacek JC, Kalani A, et al. Homocysteine Induced Cerebrovascular Dysfunction: A Link to Alzheimer's Disease Etiology. // *Open Neurol J.* – 2015c. – V. 9. – P. 9-14.
334. Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. // *Blood.* – 2006. – V. 107. – № 2. – P. 591-593.

- 335.Kambe Y, Nakamichi N, Georgiev DD, et al. Insensitivity to glutamate neurotoxicity mediated by NMDA receptors in association with delayed mitochondrial membrane potential disruption in cultured rat cortical neurons. // *Journal of Neurochemistry*. – 2008. – V. 105. – № 5. – P. 1886-1900.
- 336.Kamudhamas A, Pang L, Smith SD, et al. Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2004. – V. 191. – № 2. – P. 563–571.
- 337.Kanai-Azuma M, Kanai Y, Matsuda H, et al. Nerve growth factor promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells in vitro. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – V. 231. – № 2. – P. 309-315.
- 338.Karahoda R, Horackova H, Kastner P, et al. Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. // *Acta Physiologica*. – 2020. – V. 229. – № 4. – P. e13478.
- 339.Kasture VV, Sundrani DP, Joshi SR. Maternal one carbon metabolism through increased oxidative stress and disturbed angiogenesis can influence placental apoptosis in preeclampsia. // *Life Sci.* – 2018. – V. 206. – P. 61–69.
- 340.Kavitha JV, Rosario FJ, Nijland MJ, et al. Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon. // *FASEB J.* – 2014. – V. 28. – № 3. – P. 1294-1305.
- 341.Kawamura K, Kawamura N, Kumazawa Y, et al. Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling regulates human trophoblast growth in an in vivo animal model of ectopic pregnancy. // *Endocrinology*. – 2011. – V. 152. – № 3. – P. 1090-1100.
- 342.Kawamura K, Kawamura N, Sato W, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival. // *Endocrinology*. – 2009. – V. 150. – № 8. – P. 3774-3782.
- 343.Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. // *Journal of Neuroscience Methods*. – 2002. – V. 115. – № 1. – P. 97-105.
- 344.Kennedy TG, Gillio-Meina C, Phang SH. Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. // *Reproduction*. – 2007. – V. 134. – № 5. – P. 635-643.
- 345.Khayati K, Antikainen H, Bonder EM, et al. The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice. // *FASEB J.* – 2017. – V. 31. – № 2. – P. 598-609.
- 346.Khodir SA, Faried MA, Abd-Elhafiz HI, et al. Sitagliptin Attenuates the Cognitive Deficits in L-Methionine-Induced Vascular Dementia in Rats. // *Biomed Res Int.* – 2022a. – V. 2022. – P. 7222590.

347. Khodir SA, Faried MA, Abd-Elhafiz HI, et al. Sitagliptin Attenuates the Cognitive Deficits in L-Methionine-Induced Vascular Dementia in Rats. // *BioMed Research International*. – 2022b. – V. 2022. – P. 1-17.
348. Kim CS, Kim YR, Naqvi A, et al. Homocysteine promotes human endothelial cell dysfunction via site-specific epigenetic regulation of p66shc. // *Cardiovasc Res*. – 2011. – V. 92. – № 3. – P. 466-475.
349. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. // *Nature Cell Biology*. – 2008. – V. 10. – № 8. – P. 935-945.
350. Kim H, Li Q, Hempstead BL, et al. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. // *J Biol Chem*. – 2004. – V. 279. – № 32. – P. 33538-33546.
351. Kim J, Kim H, Roh H, et al. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. // *Archives of Pharmacal Research*. – 2018. – V. 41. – № 4. – P. 372-383.
352. Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. // *Nature Cell Biology*. – 2011. – V. 13. – № 2. – P. 132-141.
353. Kim JM, Hong K, Lee JH, et al. Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats. // *J Nutr Biochem*. – 2009. – V. 20. – № 3. – P. 172-176.
354. Kim KC, Friso S, Choi SW. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. // *J. Nutr. Biochem*. – 2009. – V. 20. – № 12. – P. 917–926.
355. Kim MR, Yon JM, Lee SR, et al. Expression profiles of extracellular superoxide dismutase during mouse organogenesis. // *Gene Expr Patterns*. – 2011. – V. 11. – № 3-4. – P. 207-215.
356. Kim W-K, Pae Y-S. Involvement of N-methyl-d-aspartate receptor and free radical in homocysteine-mediated toxicity on rat cerebellar granule cells in culture. // *Neuroscience Letters*. – 1996. – V. 216. – № 2. – P. 117-120.
357. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. // *J Clin Invest*. – 2015. – V. 125. – № 1. – P. 25-32.
358. Kimball R, Wayment M, Merrill D, et al. Hypoxia reduces placental mTOR activation in a hypoxia-induced model of intrauterine growth restriction (IUGR). // *Physiol Rep*. – 2015. – V. 3. – № 12. – P. e12651.
359. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, et al. Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. // *Blood*. – 2000. – V. 95. – № 1. – P. 189-197.

- 360.Klonisch T, Wolf P, Hombach-Klonisch S, et al. Epidermal Growth Factor-Like Ligands and erbB Genes in the Peri-Implantation Rabbit Uterus and Blastocyst1. // *Biology of Reproduction*. – 2001. – V. 64. – № 6. – P. 1835-1844.
- 361.Knox K, Baker JC. Genomic evolution of the placenta using co-option and duplication and divergence. // *Genome Res*. – 2008. – V. 18. – № 5. – P. 695-705.
- 362.Kobus-Bianchini K, Bourckhardt GF, Ammar D, et al. Homocysteine-induced changes in cell proliferation and differentiation in the chick embryo spinal cord: implications for mechanisms of neural tube defects (NTD). // *Reproductive Toxicology*. – 2017. – V. 69. – P. 167-173.
- 363.Korenevskii AV, Arutyunyan AV. On the role of biogenic amines and reactive oxygen species in the disruption of the hypothalamic regulation of reproductive function in xenobiotic-induced and experimental hyperhomocysteinemia. // *Neurochemical Journal*. – 2016. – V. 10. – № 1. – P. 19-25.
- 364.Korenevskii AV, Arutyunyan AV, Milyutina YP, et al. Pinealon corrects hyperhomocysteinemia-induced disturbances of the diurnal dynamics of hypothalamic norepinephrine content in female rats. // *Neurochemical Journal*. – 2014. – V. 8. – № 3. – P. 205-207.
- 365.Kovalska M, Hnilicova P, Kalenska D, et al. Alzheimer's Disease-like Pathological Features in the Dorsal Hippocampus of Wild-Type Rats Subjected to Methionine-Diet-Evoked Mild Hyperhomocysteinaemia. // *Cells*. – 2023. – V. 12. – № 16. – P.2087.
- 366.Koz ST, Gouwy NT, Demir N, et al. Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain. // *Int J Dev Neurosci*. – 2010. – V. 28. – № 4. – P. 325-329.
- 367.Kraemer BR, Snow JP, Vollbrecht P, et al. A Role for the p75 Neurotrophin Receptor in Axonal Degeneration and Apoptosis Induced by Oxidative Stress. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – № 31. – P. 21205-21216.
- 368.Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. // *Placenta*. – 2011. – V. 32. – № 11. – P. 797-805.
- 369.Kruman, II, Culmsee C, Chan SL, et al. Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity. // *J Neurosci*. – 2000. – V. 20. – № 18. – P. 6920-6926.
- 370.Kruman II, Culmsee C, Chan SL, et al. Homocysteine Elicits a DNA Damage Response in Neurons That Promotes Apoptosis and Hypersensitivity to Excitotoxicity. // *The Journal of Neuroscience*. – 2000. – V. 20. – № 18. – P. 6920-6926.
- 371.Kucharczyk M, Kurek A, Detka J, et al. Chronic mild stress influences nerve growth factor through a matrix metalloproteinase-dependent mechanism. // *Psychoneuroendocrinology*. – 2016. – V. 66. – P. 11-21.

- 372.Kudo Y, Boyd CA. Characterisation of L-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. // *J Physiol.* – 2001. – V. 531. – № Pt 2. – P. 405-416.
- 373.Kulkarni A, Mehendale S, Pisal H, et al. Association of omega-3 fatty acids and homocysteine concentrations in pre-eclampsia☆. // *Clinical Nutrition.* – 2011. – V. 30. – № 1. – P. 60-64.
- 374.Kumar M, Modi M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates homocysteine-induced cognitive deficits and neurochemical alterations by improving endogenous hydrogen sulfide levels. // *BioFactors.* – 2017. – V. 43. – № 3. – P. 434-450.
- 375.Kumar M, Ray RS, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates homocysteine-induced neurotoxicity by preventing mitochondrial dysfunctions and oxidative damage: In vitro and in vivo studies. // *Neurochem Int.* – 2018. – V. 120. – P. 87-98.
- 376.Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide suppresses homocysteine-induced glial activation and inflammatory response. // *Nitric Oxide.* – 2019. – V. 90. – P. 15-28.
- 377.Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced mitochondrial dysfunctions in brain. // *Mitochondrion.* – 2020. – V. 50. – P. 158-169.
- 378.Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced blood-brain barrier permeability by inhibiting MMP-9. // *Int J Neurosci.* – 2021. – V. – P. 1-11.
- 379.Kumar M, Sandhir R. Hydrogen sulfide attenuates hyperhomocysteinemia-induced blood-brain barrier permeability by inhibiting MMP-9. // *Int J Neurosci.* – 2022. – V. 132. – № 11. – P. 1061-1071.
- 380.Kumar P, Yadav U, Rai V. Prevalence of COMT Val158Met polymorphism in Eastern UP population. // *Cellular and Molecular Biology.* – 2017. – V. 63. – № 6. – P. 21-24.
- 381.Kusinski LC, Jones CJ, Baker PN, et al. Isolation of plasma membrane vesicles from mouse placenta at term and measurement of system A and system beta amino acid transporter activity. // *Placenta.* – 2010. – V. 31. – № 1. – P. 53-59.
- 382.Lai WK, Kan MY. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. // *Ann Nutr Metab.* – 2015. – V. 67. – № 1. – P. 1-12.
- 383.Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis. // *Science.* – 2006. – V. 311. – № 5762. – P. 847-851.
- 384.Lalumiere RT, Nguyen LT, McGaugh JL. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. // *Eur J Neurosci.* – 2004. – V. 20. – № 10. – P. 2804-2810.
- 385.Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Caspase-7: A protease involved in apoptosis and inflammation. // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* – 2010. – V. 42. – № 1. – P. 21-24.

- 386.Latacha KS, Rosenquist TH. Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. // *Dev Dyn.* – 2005. – V. 234. – № 2. – P. 323-331.
- 387.Lecuyer M, Laquerriere A, Bekri S, et al. PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure. // *Acta Neuropathol Commun.* – 2017. – V. 5. – № 1. – P. 44.
- 388.Ledesma RD, Valero-Mora P, Macbeth G. The Scree Test and the Number of Factors: a Dynamic Graphics Approach. // *Span J Psychol.* – 2015. – V. 18. – P. E11.
- 389.Lee ES, Chen H, Soliman KF, et al. Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents. // *Neurotoxicology.* – 2005. – V. 26. – № 3. – P. 361-371.
- 390.Lee H, Kim HJ, Choi DK, et al. Dopaminergic cell protection and alleviation of neuropsychiatric disease symptoms by VMAT2 expression through the class I HDAC inhibitor TC-H 106. // *Pharmacology Research & Perspectives.* – 2023. – V. 11. – № 5. – P. e01135.
- 391.Lee H, Kim JM, Kim HJ, et al. Folic acid supplementation can reduce the endothelial damage in rat brain microvasculature due to hyperhomocysteinemia. // *J Nutr.* – 2005. – V. 135. – № 3. – P. 544-548.
- 392.Lee Heather J, Hore Timothy A, Reik W. Reprogramming the Methylome: Erasing Memory and Creating Diversity. // *Cell Stem Cell.* – 2014. – V. 14. – № 6. – P. 710-719.
- 393.Lee HO, Wang L, Kuo YM, et al. Lack of global epigenetic methylation defects in CBS deficient mice. // *J Inherit Metab Dis.* – 2017. – V. 40. – № 1. – P. 113-120.
- 394.Lee J, Lunde-Young R, Naik V, et al. Chronic Binge Alcohol Exposure During Pregnancy Alters mTOR System in Rat Fetal Hippocampus. // *Alcohol Clin Exp Res.* – 2020. – V. 44. – № 6. – P. 1329-1336.
- 395.Lee JJ, Chang CK, Liu IM, et al. Changes in endogenous monoamines in aged rats. // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2001. – V. 28. – № 4. – P. 285-289.
- 396.Lee R, Kermani P, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. // *Science.* – 2001. – V. 294. – № 5548. – P. 1945-1948.
- 397.Lees GJ, Lehmann A, Sandberg M, et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. // *Neurosci Lett.* – 1990. – V. 120. – № 2. – P. 159-162.
- 398.Lévêque R, Corbet C, Aubert L, et al. ProNGF increases breast tumor aggressiveness through functional association of TrkA with EphA2. // *Cancer Letters.* – 2019. – V. 449. – P. 196-206.
- 399.Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. // *Methods Enzymol.* – 1990. – V. 186. – P. 464–478.
- 400.Li B, Chang S, Liu C, et al. Low Maternal Dietary Folate Alters Retrotranspose by Methylation Regulation in Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Fetuses in a Mouse Model. // *Med Sci Monit.* – 2019. – V. 25. – P. 3354-3365.

- 401.Li JG, Barrero C, Gupta S, et al. Homocysteine modulates 5-lipoxygenase expression level via DNA methylation. // *Aging Cell*. – 2017. – V. 16. – № 2. – P. 273-280.
- 402.Li M, Chen J, Li YS, et al. Folic acid reduces adhesion molecules VCAM-1 expression in aortic of rats with hyperhomocysteinemia. // *Int J Cardiol*. – 2006. – V. 106. – № 2. – P. 285-288.
- 403.Li W, Li Z, Zhou D, et al. Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain. // *Int J Dev Neurosci*. – 2019. – V. 72. – P. 6-12.
- 404.Li W, Mata KM, Mazzuca MQ, et al. Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy. // *Biochem Pharmacol*. – 2014. – V. 89. – № 3. – P. 370-385.
- 405.Li X, Wu Z, Zhang Y, et al. Activation of Autophagy Contributes to Sevoflurane-Induced Neurotoxicity in Fetal Rats. // *Front Mol Neurosci*. – 2017. – V. 10. – P. 432.
- 406.Li Y, Gao R, Liu X, et al. Folate Deficiency Could Restrain Decidual Angiogenesis in Pregnant Mice. // *Nutrients*. – 2015. – V. 7. – № 8. – P. 6425-6445.
- 407.Li Y, Liu L, Barger SW, et al. Interleukin-1 Mediates Pathological Effects of Microglia on Tau Phosphorylation and on Synaptophysin Synthesis in Cortical Neurons through a p38-MAPK Pathway. // *The Journal of Neuroscience*. – 2003. – V. 23. – № 5. – P. 1605-1611.
- 408.Li Y, Zhang H, Jiang C, et al. Hyperhomocysteinemia promotes insulin resistance by inducing endoplasmic reticulum stress in adipose tissue. // *J Biol Chem*. – 2013. – V. 288. – № 14. – P. 9583-9592.
- 409.Li Y, Zhang L-N, Chong L, et al. Prenatal ethanol exposure impairs the formation of radial glial fibers and promotes the transformation of GFAP δ -positive radial glial cells into astrocytes. // *Molecular Medicine Reports*. – 2021. – V. 23. – № 4. – P.274.
- 410.Liang KC, Juler RG, McGaugh JL. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. // *Brain Res*. – 1986. – V. 368. – № 1. – P. 125-133.
- 411.Lieu CA, Dewey CM, Chinta SJ, et al. Lithium prevents parkinsonian behavioral and striatal phenotypes in an aged parkin mutant transgenic mouse model. // *Brain Res*. – 2014. – V. 1591. – P. 111-117.
- 412.Lim DK, Kim HS. // *Neurochemical Research*. – 2001. – V. 26. – № 10. – P. 1119-1125.
- 413.Lin N, Qin S, Luo S, et al. Homocysteine induces cytotoxicity and proliferation inhibition in neural stem cells via DNA methylation in vitro. // *FEBS J*. – 2014. – V. 281. – № 8. – P. 2088-2096.

- 414.Lipton SA, Kim WK, Choi YB, et al. Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 11. – P. 5923-5928.
- 415.Liu H, Li Y, Ye H, et al. [Effect of homocysteine on the proliferation and differentiation of rat embryo midbrain cell]. // *Wei Sheng Yan Jiu.* – 2000. – V. 29. – № 1. – P. 43-45.
- 416.Liu H, Yu L, Ding Y, et al. Progesterone Enhances the Invasion of Trophoblast Cells by Activating PI3K/AKT Signaling Pathway to Prevent Preeclampsia. // *Cell Transplantation.* – 2023. – V. 32.
- 417.Liu HY, Liu SM, Zhang YZ. Maternal Folic Acid Supplementation Mediates Offspring Health via DNA Methylation. // *Reprod Sci.* – 2020. – V. 27. – № 4. – P. 963-976.
- 418.Liu Y, Zhang N, Wang Y, et al. Chorionic villus-derived mesenchymal stem cell-mediated NRG1 upregulation promotes HTR-8/SVneo cells proliferation through the activation of the NF- κ B signaling pathway. // *Heliyon.* – 2023. – V. 9. – № 8. – P. e18245.
- 419.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. // *Methods.* – 2001. – V. 25. – № 4. – P. 402-408.
- 420.Lohr KM, Bernstein AI, Stout KA, et al. Increased vesicular monoamine transporter enhances dopamine release and opposes Parkinson disease-related neurodegeneration in vivo. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2014. – V. 111. – № 27. – P. 9977-9982.
- 421.Longoni A, Bellaver B, Bobermin LD, et al. Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. // *Molecular Neurobiology.* – 2017. – V. 55. – № 3. – P. 1966-1976.
- 422.Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease (2013 Grover Conference Series). // *Pulmonary Circulation.* – 2014. – V. 4. – № 2. – P. 169-174.
- 423.Loureiro SO, Romão L, Alves T, et al. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. // *Brain Research.* – 2010. – V. 1355. – P. 151-164.
- 424.Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J Biol Chem.* – 1951. – V. 193. – № 1. – P. 265-275.
- 425.Lu Y, Liu Y, Liao S, et al. Epigenetic modifications promote the expression of the orphan nuclear receptor NR0B1 in human lung adenocarcinoma cells. // *Oncotarget.* – 2016. – V. 7. – № 28. – P. 43162-43176.
- 426.Luo D, Caniggia I, Post M. Hypoxia-inducible regulation of placental BOK expression. // *Biochemical Journal.* – 2014. – V. 461. – № 3. – P. 391-402.

- 427.Luo M, Shi X, Guo Q, et al. 2,5-Hexanedione induced apoptosis in rat spinal cord neurons and VSC4.1 cells via the proNGF/p75NTR and JNK pathways. // *Bioscience Reports*. – 2021. – V. 41. – № 4. – P. BSR20204264.
- 428.Lv Y, Lu C, Ji X, et al. Roles of microRNAs in preeclampsia. // *J Cell Physiol*. – 2019. – V. 234. – № 2. – P. 1052-1061.
- 429.Ma SC, Hao YJ, Jiao Y, et al. Homocysteine-induced oxidative stress through TLR4/NFκB/DNMT1-mediated LOX1 DNA methylation in endothelial cells. // *Mol Med Rep*. – 2017. – V. 16. – № 6. – P. 9181-9188.
- 430.Ma ST, Maier EY, Ahrens AM, et al. Repeated intravenous cocaine experience: development and escalation of pre-drug anticipatory 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. // *Behav Brain Res*. – 2010. – V. 212. – № 1. – P. 109-114.
- 431.Macklin PS, McAuliffe J, Pugh CW, et al. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta. // *Placenta*. – 2017. – V. 56. – P. 8-13.
- 432.MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, et al. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. // *Physiol Genomics*. – 2004. – V. 18. – № 1. – P. 43-50.
- 433.MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, et al. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – № 21. – P. 11853-11858.
- 434.Maghsoudi N, Ghasemi R, Ghaempanah Z, et al. Effect of Chronic Restraint Stress on HPA Axis Activity and Expression of BDNF and Trkb in the Hippocampus of Pregnant Rats: Possible Contribution in Depression during Pregnancy and Postpartum Period. // *Basic Clin Neurosci*. – 2014. – V. 5. – № 2. – P. 131-137.
- 435.Makhro AV, Bulygina ER, Boldyrev AA. Effects of homocysteine and homocysteinic acid on cerebellar granule cells. // *Neurochemical Journal*. – 2007. – V. 1. – № 2. – P. 127-132.
- 436.Mani SK, Allen JM, Clark JH, et al. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. // *Science*. – 1994. – V. 265. – № 5176. – P. 1246-1249.
- 437.Mansoor MA, Seljeflot I, Arnesen H, et al. Endothelial cell adhesion molecules in healthy adults during acute hyperhomocysteinemia and mild hypertriglyceridemia. // *Clin Biochem*. – 2004. – V. 37. – № 5. – P. 408-414.
- 438.Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. // *Braz J Biol*. – 2002. – V. 62. – № 4A. – P. 609-614.

- 439.Martinowich K, Hattori D, Wu H, et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. // *Science*. – 2003. – V. 302. – № 5646. – P. 890-893.
- 440.Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, et al. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. // *Epigenetics*. – 2012. – V. 7. – № 1. – P. 71-82.
- 441.Marx CE, Vance BJ, Jarskog LF, et al. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 levels in human amniotic fluid. // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1999. – V. 181. – № 5. – P. 1225-1230.
- 442.Massri N, Loia R, Sones JL, et al. Vascular changes in the cycling and early pregnant uterus. // *JCI Insight*. – 2023. – V. 8. – № 11. – P. e163422.
- 443.Matsueda S, Niiyama Y. The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats. // *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. – 1982. – V. 28. – № 5. – P. 557-573.
- 444.Matte C, Mackedanz V, Stefanello FM, et al. Chronic hyperhomocysteinemia alters antioxidant defenses and increases DNA damage in brain and blood of rats: protective effect of folic acid. // *Neurochem Int*. – 2009a. – V. 54. – № 1. – P. 7-13.
- 445.Matte C, Pereira LO, Dos Santos TM, et al. Acute homocysteine administration impairs memory consolidation on inhibitory avoidance task and decreases hippocampal brain-derived neurotrophic factor immunocontent: prevention by folic acid treatment. // *Neuroscience*. – 2009b. – V. 163. – № 4. – P. 1039-1045.
- 446.Matuszewich L, Lorrain DS, Hull EM. Dopamine release in the medial preoptic area of female rats in response to hormonal manipulation and sexual activity. // *Behav Neurosci*. – 2000. – V. 114. – № 4. – P. 772-782.
- 447.May JM, Qu Z-c, Nazarewicz R, et al. Ascorbic acid efficiently enhances neuronal synthesis of norepinephrine from dopamine. // *Brain Research Bulletin*. – 2013. – V. 90. – P. 35-42.
- 448.Mayeur S, Lukaszewski MA, Breton C, et al. Do neurotrophins regulate the fetoplacental development? // *Med. Hypotheses*. – 2011. – V. 76. – № 5. – P. 726-728.
- 449.Mayeur S, Silhol M, Moitrot E, et al. Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human. // *Placenta*. – 2010. – V. 31. – № 9. – P. 785-791.
- 450.McGaugh JL, Roozendaal B. Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. // *Current Opinion in Neurobiology*. – 2002. – V. 12. – № 2. – P. 205-210.
- 451.McGee M, Bainbridge S, Fontaine-Bisson B. A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes. // *Nutr Rev*. – 2018. – V. 76. – № 6. – P. 469-478.
- 452.Mei L, Xiong W-C. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2008. – V. 9. – № 6. – P. 437-452.

453. Meinhardt G, Kaltenberger S, Fiala C, et al. ERBB2 gene amplification increases during the transition of proximal EGFR+ to distal HLA-G+ first trimester cell column trophoblasts. // *Placenta*. – 2015. – V. 36. – № 8. – P. 803-808.
454. Melis MR, Argiolas A. Dopamine and sexual behavior. // *Neurosci Biobehav Rev*. – 1995. – V. 19. – № 1. – P. 19-38.
455. Mello PB, Benetti F, Cammarota M, et al. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. // *An Acad Bras Cienc*. – 2008. – V. 80. – № 2. – P. 301-309.
456. Memon SI, Acharya NS. The Association Between Serum Homocysteine Levels and Placenta-Mediated Complications: A Narrative Review. // *Cureus*. – 2022. – V. – P. e31305.
457. Memon SI, Acharya NS, Acharya S, et al. Maternal Hyperhomocysteinemia as a Predictor of Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Two-Year Novel Study. // *Cureus*. – 2023. – V. 15. – № 4. – P. e37461.
458. Mercado CP, Quintero MV, Li Y, et al. A serotonin-induced N-glycan switch regulates platelet aggregation. // *Sci Rep*. – 2013. – V. 3. – P. 2795.
459. Mesiano S. Endocrinology of Human Pregnancy and Fetal-Placental Neuroendocrine Development. / in Strauss JF, Barbieri RL, eds. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*. Elsevier. – 2019. Chapter 11. – P.256-284.e259
460. Meyer U, Nyffeler M, Engler A, et al. The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. // *The Journal of Neuroscience*. – 2006. – V. 26. – № 18. – P. 4752-4762.
461. Miao Z, Mao F, Liang J, et al. Anxiety-Related Behaviours Associated with microRNA-206-3p and BDNF Expression in Pregnant Female Mice Following Psychological Social Stress. // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – V. 55. – № 2. – P. 1097-1111.
462. Míguez JM, Aldegunde M, Paz-Valiñas L, et al. Selective changes in the contents of noradrenaline, dopamine and serotonin in rat brain areas during aging. // *Journal of Neural Transmission*. – 1999. – V. 106. – № 11-12. – P. 1089-1098.
463. Mikael LG, Pancer J, Wu Q, et al. Disturbed One-Carbon Metabolism Causing Adverse Reproductive Outcomes in Mice Is Associated with Altered Expression of Apolipoprotein AI and Inflammatory Mediators PPAR α , Interferon- γ , and Interleukin-10. // *The Journal of Nutrition*. – 2012. – V. 142. – № 3. – P. 411-418.
464. Miller AL. The methylation, neurotransmitter, and antioxidant connections between folate and depression. // *Altern Med Rev*. – 2008. – V. 13. – № 3. – P. 216-226.

465. Miller RR, Hay CM, Striegnitz TR, et al. Exogenous glycine partially attenuates homocysteine-induced apoptosis and membrane peroxidation in chick embryos. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2006. – V. 144. – № 1. – P. 25-33.
466. Miller RR, Leanza CM, Phillips EE, et al. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability. // *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. – 2003. – V. 136. – № 3. – P. 521-532.
467. Milyutina YP, Korenevskii AV, Stepanov MG, et al. Effects of melatonin and epiphysis peptides on the catecholamine link of hypothalamic regulation of the reproductive function of rats. // *Neurochemical Journal*. – 2010. – V. 4. – № 3. – P. 196-203.
468. Minnone G, Soligo M, Caiello I, et al. ProNGF-p75NTR axis plays a proinflammatory role in inflamed joints: a novel pathogenic mechanism in chronic arthritis. // *RMD Open*. – 2017. – V. 3. – № 2. – P. e000441.
469. Mitsui T, Tani K, Maki J, et al. Upregulation of Angiogenic Factors via Protein Kinase C and Hypoxia-induced Factor-1alpha Pathways under High-glucose Conditions in the Placenta. // *Acta Med Okayama*. – 2018. – V. 72. – № 4. – P. 359-367.
470. Mohankumar PS, Thyagarajan S, Quadri SK. Cyclic and age-related changes in norepinephrine concentrations in the medial preoptic area and arcuate nucleus. // *Brain Research Bulletin*. – 1995. – V. 38. – № 6. – P. 561-564.
471. Moll SJ, Jones CJ, Crocker IP, et al. Epidermal growth factor rescues trophoblast apoptosis induced by reactive oxygen species. // *Apoptosis*. – 2007. – V. 12. – № 9. – P. 1611-1622.
472. Molnar Z, Clowry G. Cerebral cortical development in rodents and primates. // *Prog Brain Res*. – 2012. – V. 195. – P. 45-70.
473. Moore KE, Demarest KT, Johnston CA. Influence of prolactin on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus. // *Fed Proc*. – 1980. – V. 39. – № 11. – P. 2912-2916.
474. Moosavi M, Ghasemi R, Maghsoudi N, et al. The relation between pregnancy and stress in rats: considering corticosterone level, hippocampal caspase-3 and MAPK activation. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. – 2011. – V. 158. – № 2. – P. 199-203.
475. Moreira DS, Figueiro PW, Siebert C, et al. Chronic Mild Hyperhomocysteinemia Alters Inflammatory and Oxidative/Nitrative Status and Causes Protein/DNA Damage, as well as Ultrastructural Changes in Cerebral Cortex: Is Acetylsalicylic Acid Neuroprotective? // *Neurotox Res*. – 2018. – V. 33. – № 3. – P. 580-592.
476. Moretti R, Caruso P. The Controversial Role of Homocysteine in Neurology: From Labs to Clinical Practice. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – V. 20. – № 1. – P. 231.

- 477.Mori M, Yamashita Y, Hiroi Y, et al. Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats. // *Asia Pac J Clin Nutr.* – 1999. – V. 8. – № 4. – P. 251-257.
- 478.Morris G, Berk M. The many roads to mitochondrial dysfunction in neuroimmune and neuropsychiatric disorders. // *BMC Medicine.* – 2015. – V. 13. – № 1. – P.68.
- 479.Mostafa MD, ElKomy MA, Othman AI, et al. Epigallocatechin-3-gallate Enhances Cognitive and Memory Performance and Protects Against Brain Injury in Methionine-induced Hyperhomocysteinemia Through Interdependent Molecular Pathways. // *Neurotoxicity Research.* – 2022. – V. 40. – № 6. – P. 2103-2116.
- 480.Mufson EJ, Counts SE, Ginsberg SD, et al. Nerve Growth Factor Pathobiology During the Progression of Alzheimer's Disease. // *Frontiers in Neuroscience.* – 2019. – V. 13. – P.533.
- 481.Muraki K, Tanigaki K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. // *Front Neurosci.* – 2015. – V. 9. – P. 74.
- 482.Murchison CF, Zhang XY, Zhang WP, et al. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. // *Cell.* – 2004. – V. 117. – № 1. – P. 131-143.
- 483.Nadeau-Vallee M, Obari D, Palacios J, et al. Sterile inflammation and pregnancy complications: a review. // *Reproduction.* – 2016. – V. 152. – № 6. – P. R277-R292.
- 484.Najib S, Sanchez-Margalet V. Homocysteine thiolactone inhibits insulin signaling, and glutathione has a protective effect. // *J Mol Endocrinol.* – 2001. – V. 27. – № 1. – P. 85-91.
- 485.Nakashima A, Tsuda S, Kusabiraki T, et al. Current Understanding of Autophagy in Pregnancy. // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2019. – V. 20. – № 9. – P. 2342.
- 486.Nan X, Ng HH, Johnson CA, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. // *Nature.* – 1998. – V. 393. – № 6683. – P. 386-389.
- 487.Naninck EFG, Stijger PC, Brouwer-Brolsma EM. The Importance of Maternal Folate Status for Brain Development and Function of Offspring. // *Adv Nutr.* – 2019. – V. 10. – № 3. – P. 502-519.
- 488.Naqvi SZ, Harris BS, Thomaidou D, et al. The noradrenergic system influences the fate of Cajal-Retzius cells in the developing cerebral cortex. // *Brain Res Dev Brain Res.* – 1999. – V. 113. – № 1-2. – P. 75-82.
- 489.Narumiya H, Zhang Y, Fernandez-Patron C, et al. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. // *Hypertens Pregnancy.* – 2001. – V. 20. – № 2. – P. 185-194.
- 490.Nazio F, Strappazzon F, Antonioli M, et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. // *Nature Cell Biology.* – 2013. – V. 15. – № 4. – P. 406-416.

491. Neumann H, Misgeld T, Matsumuro K, et al. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: involvement of the p75 neurotrophin receptor. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95. – № 10. – P. 5779-5784.
492. Newell-Price J, Clark AJ, King P. DNA methylation and silencing of gene expression. // *Trends Endocrinol Metab.* – 2000. – V. 11. – № 4. – P. 142-148.
493. Ngai YF, Sulistyoningrum DC, O'Neill R, et al. Prenatal alcohol exposure alters methyl metabolism and programs serotonin transporter and glucocorticoid receptor expression in brain. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2015. – V. 309. – № 5. – P. R613-622.
494. Nico B, Mangieri D, Benagiano V, et al. Nerve growth factor as an angiogenic factor. // *Microvasc. Res.* – 2008. – V. 75. – № 2. – P. 135-141.
495. Nicola AC, Leite CM, Nishikawa MMB, et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. // *Experimental Gerontology.* – 2016. – V. 81. – P. 19-27.
496. Niculescu D, Michaelsen-Preusse K, Güner Ü, et al. A BDNF-Mediated Push-Pull Plasticity Mechanism for Synaptic Clustering. // *Cell Reports.* – 2018. – V. 24. – № 8. – P. 2063-2074.
497. Novak D, Lehman M, Bernstein H, et al. SNAT expression in rat placenta. // *Placenta.* – 2006. – V. 27. – № 4-5. – P. 510-516.
498. Nusken E, Gellhaus A, Kuhnel E, et al. Increased Rat Placental Fatty Acid, but Decreased Amino Acid and Glucose Transporters Potentially Modify Intrauterine Programming. // *J Cell Biochem.* – 2016. – V. 117. – № 7. – P. 1594-1603.
499. Obeid R, Herrmann W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. // *FEBS Letters.* – 2006. – V. 580. – № 13. – P. 2994-3005.
500. Obeid R, McCaddon A, Herrmann W. The role of hyperhomocysteinemia and B-vitamin deficiency in neurological and psychiatric diseases. // *Clin Chem Lab Med.* – 2007. – V. 45. – № 12. – P. 1590-1606.
501. Ohgaki R, Ohmori T, Hara S, et al. Essential Roles of L-Type Amino Acid Transporter 1 in Syncytiotrophoblast Development by Presenting Fusogenic 4F2hc. // *Mol Cell Biol.* – 2017. – V. 37. – № 11. – P. e00427-16.
502. Ohtaka-Maruyama C, Okado H. Corrigendum: Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. // *Front Neurosci.* – 2016. – V. 10. – P. 160.

- 503.Ojeda ML, Nogales F, Romero-Herrera I, et al. Fetal Programming Is Deeply Related to Maternal Selenium Status and Oxidative Balance; Experimental Offspring Health Repercussions. // *Nutrients*. – 2021. – V. 13. – № 6. – P.2085.
- 504.Omotoso GO, Kadir RE, Sulaimon FA, et al. Prenatal Exposure to Gestational Nicotine before Neurulation is Detrimental to Neurodevelopment of Wistar Rats' Offspring. // *Malays J Med Sci*. – 2018. – V. 25. – № 5. – P. 35-47.
- 505.Oosterbaan AM, Steegers EA, Ursem NT. The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. // *Microvasc. Res*. – 2012. – V. 83. – № 2. – P. 98-104.
- 506.Ornoy A, Becker M, Weinstein-Fudim L, et al. S-Adenosine Methionine (SAME) and Valproic Acid (VPA) as Epigenetic Modulators: Special Emphasis on their Interactions Affecting Nervous Tissue during Pregnancy. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V. 21. – № 10. – P.3721.
- 507.Orso R, Creutzberg KC, Lumertz FS, et al. A systematic review and multilevel meta-analysis of the prenatal and early life stress effects on rodent microglia, astrocyte, and oligodendrocyte density and morphology. // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2023. – V. 150. – P. 105202.
- 508.Ostrakhovitch EA, Tabibzadeh S. Homocysteine and age-associated disorders. // *Ageing Res Rev*. – 2019. – V. 49. – P. 144–164.
- 509.Owaydhah WH, Ashton N, Verrey F, et al. Differential expression of system L amino acid transporter subtypes in rat placenta and yolk sac. // *Placenta*. – 2020. – V. 103. – P. 188-198.
- 510.Ozmen A, Unek G, Kipmen-Korgun D, et al. Glucocorticoid exposure altered angiogenic factor expression via Akt/mTOR pathway in rat placenta. // *Ann Anat*. – 2015. – V. 198. – P. 34-40.
- 511.Palmer K, Saglam B, Whitehead C, et al. Severe early-onset preeclampsia is not associated with a change in placental catechol O-methyltransferase (COMT) expression. // *Am J Pathol*. – 2011. – V. 178. – № 6. – P. 2484-2488.
- 512.Pan L, Yu G, Huang J, et al. Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling. // *Biosci Rep*. – 2017. – V. 37. – № 5. – P. BSR20170860
- 513.Pansri P, Phanthong P, Suthprasertporn N, et al. Brain-derived neurotrophic factor increases cell number of neural progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cells. // *PeerJ*. – 2021. – V. 9. – P. e11388.
- 514.Pantham P, Rosario FJ, Weintraub ST, et al. Down-Regulation of Placental Transport of Amino Acids Precedes the Development of Intrauterine Growth Restriction in Maternal Nutrient Restricted Baboons. // *Biol Reprod*. – 2016. – V. 95. – № 5. – P. 98.

515. Paredes RG, Agmo A. Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. // *Prog Neurobiol.* – 2004. – V. 73. – № 3. – P. 179-226.
516. Park BH, Kim YJ, Park JS, et al. [Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta]. // *J Prev Med Public Health.* – 2005. – V. 38. – № 4. – P. 437-442.
517. Parrish RR, Buckingham SC, Mascia KL, et al. Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy. // *Ann Clin Transl Neurol.* – 2015. – V. 2. – № 4. – P. 401-416.
518. Parsons RB, Waring RH, Ramsden DB, et al. In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines. // *Neurotoxicology.* – 1998. – V. 19. – № 4-5. – P. 599-603.
519. Patten BA, Peyrin JM, Weinmaster G, et al. Sequential Signaling through Notch1 and erbB Receptors Mediates Radial Glia Differentiation. // *The Journal of Neuroscience.* – 2003. – V. 23. – № 14. – P. 6132-6140.
520. Pau KY, Hess DL, Kohama S, et al. Oestrogen upregulates noradrenaline release in the mediobasal hypothalamus and tyrosine hydroxylase gene expression in the brainstem of ovariectomized rhesus macaques. // *J Neuroendocrinol.* – 2000. – V. 12. – № 9. – P. 899-909.
521. Pentkowski NS, Rogge-Obando KK, Donaldson TN, et al. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* – 2021. – V. 127. – P. 647-658.
522. Pentz R, Iulita MF, Mikutra-Cencora M, et al. A new role for matrix metalloproteinase-3 in the NGF metabolic pathway: Proteolysis of mature NGF and sex-specific differences in the continuum of Alzheimer's pathology. // *Neurobiol Dis.* – 2021. – V. 148. – P. 105150.
523. Pereira RD, De Long NE, Wang RC, et al. Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling. // *Biomed Res Int.* – 2015. – V. 2015. – P. 814543.
524. Perez FP, Ilie JI, Zhou X, et al. Pathomolecular effects of homocysteine on the aging process: a new theory of aging. // *Med Hypotheses.* – 2007. – V. 69. – № 1. – P. 149-160.
525. Perić M, Bečeheli I, Čičin-Šain L, et al. Serotonin system in the human placenta – the knowns and unknowns. // *Frontiers in Endocrinology.* – 2022. – V. 13. – P. 1061317.
526. Perla-Kajan J, Jakubowski H. Dysregulation of Epigenetic Mechanisms of Gene Expression in the Pathologies of Hyperhomocysteinemia. // *Int J Mol Sci.* – 2019. – V. 20. – № 13. – P. 3140.
527. Peterson QP, Goode DR, West DC, et al. Preparation of the caspase-3/7 substrate Ac-DEVD-pNA by solution-phase peptide synthesis. // *Nature Protocols.* – 2010. – V. 5. – № 2. – P. 294-302.
528. Petras M, Tatarkova Z, Kovalska M, et al. Hyperhomocysteinemia as a risk factor for the neuronal system disorders. // *J Physiol Pharmacol.* – 2014. – V. 65. – № 1. – P. 15-23.

529. Phuthong S, Reyes-Hernandez CG, Rodriguez-Rodriguez P, et al. Sex Differences in Placental Protein Expression and Efficiency in a Rat Model of Fetal Programming Induced by Maternal Undernutrition. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – V. 22. – № 1. – P.237.
530. Pi T, Wei S, Jiang Y, et al. High Methionine Diet-Induced Alzheimer's Disease like Symptoms Are Accompanied by 5-Methylcytosine Elevated Levels in the Brain. // *Behav Neurol.* – 2021. – V. 2021. – P. 6683318.
531. Pirchl M, Ullrich C, Humpel C. Differential effects of short- and long-term hyperhomocysteinaemia on cholinergic neurons, spatial memory and microbleedings in vivo in rats. // *Eur J Neurosci.* – 2010. – V. 32. – № 9. – P. 1516-1527.
532. Pittaluga A. Presynaptic release-regulating NMDA receptors in isolated nerve terminals: A narrative review. // *British Journal of Pharmacology.* – 2021. – V. 178. – № 5. – P. 1001-1017.
533. Poddar R, Paul S. Novel crosstalk between ERK MAPK and p38 MAPK leads to homocysteine-NMDA receptor-mediated neuronal cell death. // *Journal of Neurochemistry.* – 2013. – V. 124. – № 4. – P. 558-570.
534. Pogribny IP, Karpf AR, James SR, et al. Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. // *Brain Research.* – 2008a. – V. 1237. – P. 25-34.
535. Pogribny IP, Karpf AR, James SR, et al. Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet. // *Brain Res.* – 2008b. – V. 1237. – P. 25-34.
536. Pogribny IP, Ross SA, Tryndyak VP, et al. Histone H3 lysine 9 and H4 lysine 20 trimethylation and the expression of Suv4-20h2 and Suv-39h1 histone methyltransferases in hepatocarcinogenesis induced by methyl deficiency in rats. // *Carcinogenesis.* – 2006. – V. 27. – № 6. – P. 1180-1186.
537. Ponnaluri VKC, Esteve PO, Ruse CI, et al. S-adenosylhomocysteine Hydrolase Participates in DNA Methylation Inheritance. // *J Mol Biol.* – 2018. – V. 430. – № 14. – P. 2051-2065.
538. Portero-Tresserra M, Rojic-Becker D, Vega-Carbajal C, et al. Caloric restriction modulates the monoaminergic system and metabolic hormones in aged rats. // *Scientific Reports.* – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 19299
539. Powers RW, Gandley RE, Lykins DL, et al. Moderate hyperhomocysteinemia decreases endothelial-dependent vasorelaxation in pregnant but not nonpregnant mice. // *Hypertension.* – 2004. – V. 44. – № 3. – P. 327-333.
540. Prast J, Saleh L, Husslein H, et al. Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. // *Endocrinology.* – 2008. – V. 149. – № 3. – P. 979-987.

- 541.Pyrzanowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, et al. Influence of long-term administration of rutin on spatial memory as well as the concentration of brain neurotransmitters in aged rats. // *Pharmacological Reports*. – 2012. – V. 64. – № 4. – P. 808-816.
- 542.Raaf L, Noll C, Cherifi MEH, et al. Myocardial fibrosis and TGFB expression in hyperhomocysteinemic rats. // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2010. – V. 347. – № 1-2. – P. 63-70.
- 543.Rahat B, Hamid A, Bagga R, et al. Folic Acid Levels During Pregnancy Regulate Trophoblast Invasive Behavior and the Possible Development of Preeclampsia. // *Frontiers in Nutrition*. – 2022. – V. 9. – P. 847136
- 544.Rahat B, Sharma R, Bagga R, et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases. // *Reproduction*. – 2016. – V. 152. – № 1. – P. 11-22.
- 545.Rahman MK, Choudhary MI, Islam MR, et al. Developmental Changes of Catecholamine-mediating Enzyme - Dopamine-beta- Hydroxylase and Its Cofactors in Central and Peripheral Tissues and Serum of Long-Evans Rats. // *Int J Biomed Sci*. – 2012. – V. 8. – № 3. – P. 194-203.
- 546.Rakic P. Specification of Cerebral Cortical Areas. // *Science*. – 1988. – V. 241. – № 4862. – P. 170-176.
- 547.Ramdiel K, Franco MC, Estevez AG. Cellular mechanisms of peroxynitrite-induced neuronal death. // *Brain Research Bulletin*. – 2017. – V. 133. – P. 4-11.
- 548.Ramis MR, Sarubbo F, Terrasa JL, et al. Chronic alpha-Tocopherol Increases Central Monoamines Synthesis and Improves Cognitive and Motor Abilities in Old Rats. // *Rejuvenation Res*. – 2016. – V. 19. – № 2. – P. 159-171.
- 549.Rees WD, McNeil CJ, Maloney CA. The Roles of PPARs in the Fetal Origins of Metabolic Health and Disease. // *PPAR Res*. – 2008. – V. 2008. – P. 459030.
- 550.Regland B, Abrahamsson L, Blennow K, et al. CSF-methionine is elevated in psychotic patients. // *J Neural Transm (Vienna)*. – 2004. – V. 111. – № 5. – P. 631-640.
- 551.Reiter RJ, Tan DX, Pappolla MA. Melatonin Relieves the Neural Oxidative Burden that Contributes to Dementias. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2006. – V. 1035. – № 1. – P. 179-196.
- 552.Rennie MY, Detmar J, Whiteley KJ, et al. Expansion of the fetoplacental vasculature in late gestation is strain dependent in mice. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2012. – V. 302. – № 6. – P. H1261-1273.

- 553.Reynolds CM, Vickers MH, Harrison CJ, et al. Maternal high fat and/or salt consumption induces sex-specific inflammatory and nutrient transport in the rat placenta. // *Physiol Rep*. – 2015. – V. 3. – № 5. – P. e12399.
- 554.Reynolds LP, Borowicz PP, Caton JS, et al. Developmental Programming of Fetal Growth and Development. // *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. – 2019. – V. 35. – № 2. – P. 229-247.
- 555.Rezaei S, Bakhshani NM, Fanaei H, et al. Opium Effect in Pregnancy on the Dynamics of Maternal Behavior: Testing a Neurochemical Model. // *Neuropsychobiology*. – 2021. – V. 80. – № 2. – P. 147-157.
- 556.Riccio AV, Costa BK, Alonso MA, et al. Comparative Assessment of Oxidative and Antioxidant Parameters in Mule and Horse Neonates during Their First Month of Extrauterine Adaptation. // *Animals*. – 2023. – V. 13. – № 24. – P. 3878.
- 557.Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. // *Environ Health Perspect*. – 2000. – V. 108 Suppl 3. – № Suppl 3. – P. 511-533.
- 558.Roberts JM, Escudero C. The placenta in preeclampsia. // *Pregnancy Hypertens*. – 2012. – V. 2. – № 2. – P. 72-83.
- 559.Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B. Review: Nuclear Events in Apoptosis. // *Journal of Structural Biology*. – 2000. – V. 129. – № 2-3. – P. 346-358.
- 560.Rodriguez-Nieto S, Chavarria T, Martinez-Poveda B, et al. Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2002. – V. 293. – № 1. – P. 497-500.
- 561.Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. // *Journal of Pineal Research*. – 2003. – V. 36. – № 1. – P. 1-9.
- 562.Roos S, Jansson N, Palmberg I, et al. Mammalian target of rapamycin in the human placenta regulates leucine transport and is down-regulated in restricted fetal growth. // *J Physiol*. – 2007. – V. 582. – № Pt 1. – P. 449-459.
- 563.Roos S, Kanai Y, Prasad PD, et al. Regulation of placental amino acid transporter activity by mammalian target of rapamycin. // *Am J Physiol Cell Physiol*. – 2009. – V. 296. – № 1. – P. C142-150.
- 564.Rosario FJ, Dimasuay KG, Kanai Y, et al. Regulation of amino acid transporter trafficking by mTORC1 in primary human trophoblast cells is mediated by the ubiquitin ligase Nedd4-2. // *Clin Sci (Lond)*. – 2016a. – V. 130. – № 7. – P. 499-512.

- 565.Rosario FJ, Jansson N, Kanai Y, et al. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. // *Endocrinology*. – 2011. – V. 152. – № 3. – P. 1119-1129.
- 566.Rosario FJ, Kanai Y, Powell TL, et al. Mammalian target of rapamycin signalling modulates amino acid uptake by regulating transporter cell surface abundance in primary human trophoblast cells. // *J Physiol*. – 2013. – V. 591. – № 3. – P. 609-625.
- 567.Rosario FJ, Kanai Y, Powell TL, et al. Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth. // *Obesity (Silver Spring)*. – 2015. – V. 23. – № 8. – P. 1663-1670.
- 568.Rosario FJ, Kramer A, Li C, et al. Reduction of In Vivo Placental Amino Acid Transport Precedes the Development of Intrauterine Growth Restriction in the Non-Human Primate. // *Nutrients*. – 2021. – V. 13. – № 8. – P.2892
- 569.Rosario FJ, Nathanielsz PW, Powell TL, et al. Maternal folate deficiency causes inhibition of mTOR signaling, down-regulation of placental amino acid transporters and fetal growth restriction in mice. // *Sci Rep*. – 2017a. – V. 7. – № 1. – P. 3982.
- 570.Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. Activation of placental insulin and mTOR signaling in a mouse model of maternal obesity associated with fetal overgrowth. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. – 2016b. – V. 310. – № 1. – P. R87-93.
- 571.Rosario FJ, Powell TL, Jansson T. mTOR folate sensing links folate availability to trophoblast cell function. // *J Physiol*. – 2017b. – V. 595. – № 13. – P. 4189-4206.
- 572.Rosenfeld CS. The placenta-brain-axis. // *Journal of Neuroscience Research*. – 2020. – V. 99. – № 1. – P. 271-283.
- 573.Rosenfeld CS. The placenta-brain-axis. // *J Neurosci Res*. – 2021. – V. 99. – № 1. – P. 271-283.
- 574.Rudov A, Balduini W, Carloni S, et al. Involvement of miRNAs in placental alterations mediated by oxidative stress. // *Oxid Med Cell Longev*. – 2014. – V. 2014. – P. 103068.
- 575.Sachdev PS, Valenzuela M, Wang XL, et al. Relationship between plasma homocysteine levels and brain atrophy in healthy elderly individuals. // *Neurology*. – 2002. – V. 58. – № 10. – P. 1539-1541.
- 576.Sahay A, Kale A, Joshi S. Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain development. // *Neuropeptides*. – 2020. – V. – P. 102075.
- 577.Sahay AS, Jadhav AT, Sundrani DP, et al. Differential Expression of Nerve Growth Factor (NGF) and Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in Different Regions of Normal and Preeclampsia Placentae. // *Clin Exp Hypertens*. – 2019. – V. – P. 1-5.

- 578.Sahay AS, Sundrani DP, Joshi SR. Neurotrophins: Role in Placental Growth and Development. // *Vitam. Horm.* – 2017. – V. 104. – P. 243–261.
- 579.Sahay AS, Sundrani DP, Wagh GN, et al. Neurotrophin levels in different regions of the placenta and their association with birth outcome and blood pressure. // *Placenta.* – 2015. – V. 36. – № 8. – P. 938-943.
- 580.Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2017. – V. 360. – № 1. – P. 201-205.
- 581.Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1. // *Science.* – 2008. – V. 320. – № 5882. – P. 1496-1501.
- 582.Sankorakul K, Qian L, Thangnipon W, et al. Is there a role for the p75 neurotrophin receptor in mediating degeneration during oxidative stress and after hypoxia? // *Journal of Neurochemistry.* – 2021. – V. 158. – № 6. – P. 1292-1306.
- 583.Sapehia D, Mahajan A, Srinivasan R, et al. Pre-natal dietary imbalance of folic acid and vitamin B12 deficiency adversely impacts placental development and fetal growth. // *Placenta.* – 2023. – V. 132. – P. 44-54.
- 584.Saper CB, Stornetta RL. Central Autonomic System. // – 2015. – V. – P. 629-673.
- 585.Sarubbo F, Ramis MR, Aparicio S, et al. Improving effect of chronic resveratrol treatment on central monoamine synthesis and cognition in aged rats. // *Age (Dordr).* – 2015. – V. 37. – № 3. – P. 9777.
- 586.Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, et al. Chronic Silymarin, Quercetin and Naringenin Treatments Increase Monoamines Synthesis and Hippocampal Sirt1 Levels Improving Cognition in Aged Rats. // *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* – 2017. – V. 13. – № 1. – P. 24-38.
- 587.Sasaki YF, Saga A, Akasaka M, et al. Organ-specific genotoxicity of the potent rodent colon carcinogen 1,2-dimethylhydrazine and three hydrazine derivatives: difference between intraperitoneal and oral administration. // *Mutat Res.* – 1998. – V. 415. – № 1-2. – P. 1-12.
- 588.Sasi M, Vignoli B, Canossa M, et al. Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. // *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* – 2017. – V. 469. – № 5-6. – P. 593-610.
- 589.Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. // *Cancer Science.* – 2010. – V. 101. – № 4. – P. 843-847.
- 590.Sauls DL, Arnold EK, Bell CW, et al. Pro-thrombotic and pro-oxidant effects of diet-induced hyperhomocysteinemia. // *Thrombosis Research.* – 2007. – V. 120. – № 1. – P. 117-126.

- 591.Sautreuil C, Laquerriere A, Lecuyer M, et al. [Fetal alcohol exposure: when placenta would help to the early diagnosis of child brain impairments]. // *Med Sci (Paris)*. – 2019. – V. 35. – № 11. – P. 859-865.
- 592.Savage DD, Rosenberg MJ, Coquet L, et al. Ethanol-Induced Alterations in Placental and Fetal Cerebrocortical Annexin-A4 and Cerebral Cavernous Malformation Protein 3 Are Associated With Reductions in Fetal Cortical VEGF Receptor Binding and Microvascular Density. // *Front Neurosci*. – 2020. – V. 14. – P. 519.
- 593.Savchenko VL, Nikonenko IR, Skibo GG. Microglial cells of the rat brain in postnatal period (comparative immunocytochemical analysis). // *Neurophysiology*. – 1997. – V. 29. – № 3. – P. 145-152.
- 594.Sawant OB, Meng C, Wu G, et al. Prenatal alcohol exposure and maternal glutamine supplementation alter the mTOR signaling pathway in ovine fetal cerebellum and skeletal muscle. // *Alcohol*. – 2020. – V. 89. – P. 93-102.
- 595.Sawle P, Foresti R, Green CJ, et al. Homocysteine attenuates endothelial haem oxygenase-1 induction by nitric oxide (NO) and hypoxia. // *FEBS Lett*. – 2001. – V. 508. – № 3. – P. 403-406.
- 596.Saygili E, Schauerte P, Pekassa M, et al. Sympathetic Neurons Express and Secrete MMP-2 and MT1-MMP to Control Nerve Sprouting via Pro-NGF Conversion. // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2010. – V. 31. – № 1. – P. 17-25.
- 597.Scherer EB, da Cunha AA, Kolling J, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage. // *Int J Dev Neurosci*. – 2011. – V. 29. – № 7. – P. 693-699.
- 598.Schroecksnadel K, Frick B, Wirleitner B, et al. Moderate hyperhomocysteinemia and immune activation. // *Curr Pharm Biotechnol*. – 2004. – V. 5. – № 1. – P. 107-118.
- 599.Schweinberger BM, Rodrigues AF, Turcatel E, et al. Maternal Hypermethioninemia Affects Neurons Number, Neurotrophins Levels, Energy Metabolism, and Na⁺,K⁺-ATPase Expression/Content in Brain of Rat Offspring. // *Molecular Neurobiology*. – 2017. – V. 55. – № 2. – P. 980-988.
- 600.Scimonelli T, Medina F, Wilson C, et al. Interaction of alpha-melanotropin (alpha-MSH) and noradrenaline in the median eminence in the control of female sexual behavior. // *Peptides*. – 2000. – V. 21. – № 2. – P. 219-223.
- 601.Sedlmeier EM, Meyer DM, Stecher L, et al. Fetal sex modulates placental microRNA expression, potential microRNA-mRNA interactions, and levels of amino acid transporter expression and substrates: INFAT study subpopulation analysis of n-3 LCPUFA intervention during pregnancy and

- associations with offspring body composition. // *BMC Mol Cell Biol.* – 2021. – V. 22. – № 1. – P. 15.
- 602.Seitz G, Gebhardt S, Beck JF, et al. Ascorbic acid stimulates DOPA synthesis and tyrosine hydroxylase gene expression in the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. // *Neuroscience Letters.* – 1998. – V. 244. – № 1. – P. 33-36.
- 603.Semaan SJ, Dhamija S, Kim J, et al. Assessment of epigenetic contributions to sexually-dimorphic Kiss1 expression in the anteroventral periventricular nucleus of mice. // *Endocrinology.* – 2012. – V. 153. – № 4. – P. 1875-1886.
- 604.Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. // *Prog Neurobiol.* – 2013. – V. 106-107. – P. 1-16.
- 605.Shafqat N, Muniz JR, Pilka ES, et al. Insight into S-adenosylmethionine biosynthesis from the crystal structures of the human methionine adenosyltransferase catalytic and regulatory subunits. // *Biochem J.* – 2013. – V. 452. – № 1. – P. 27-36.
- 606.Shah PK, Kaul S, Nilsson J, et al. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. // *Circulation.* – 2001. – V. 104. – № 20. – P. 2498-2502.
- 607.Shallie PD, Naicker T. The placenta as a window to the brain: A review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment. // *Int J Dev Neurosci.* – 2019a. – V. 73. – P. 41-49.
- 608.Shallie PD, Naicker T. The placenta as a window to the brain: A review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment. // *International Journal of Developmental Neuroscience.* – 2019b. – V. 73. – № 1. – P. 41-49.
- 609.Sharma GS, Kumar T, Dar TA, et al. Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration. // *Biochim Biophys Acta.* – 2015. – V. 1850. – № 11. – P. 2239-2245.
- 610.Shcherbitskaia AD, Vasilev DS, Milyutina YP, et al. Prenatal Hyperhomocysteinemia Induces Glial Activation and Alters Neuroinflammatory Marker Expression in Infant Rat Hippocampus. // *Cells.* – 2021. – V. 10. – № 6. – P.1536.
- 611.Shcherbitskaia AD, Vasilev DS, Milyutina YP, et al. Maternal Hyperhomocysteinemia Induces Neuroinflammation and Neuronal Death in the Rat Offspring Cortex. // *Neurotox Res.* – 2020. – V. 38. – № 2. – P. 408-420.
- 612.Shojaei S, Ghavami S, Panjehshahin M, et al. Effects of Ethanol on the Expression Level of Various BDNF mRNA Isoforms and Their Encoded Protein in the Hippocampus of Adult and

- Embryonic Rats. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – V. 16. – № 12. – P. 30422-30437.
- 613.Siennicka A, Zuchowski M, Chelstowski K, et al. Homocysteine-Enhanced Proteolytic and Fibrinolytic Processes in Thin Intraluminal Thrombus and Adjacent Wall of Abdominal Aortic Aneurysm: Study In Vitro. // *BioMed Research International*. – 2018. – V. 2018. – P. 1-10.
- 614.Sifringer M, Genz K, Brait D, et al. Erythropoietin attenuates hyperoxia-induced cell death by modulation of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases. // *Dev Neurosci*. – 2009. – V. 31. – № 5. – P. 394-402.
- 615.Silva E, Rosario FJ, Powell TL, et al. Mechanistic Target of Rapamycin Is a Novel Molecular Mechanism Linking Folate Availability and Cell Function. // *J Nutr*. – 2017. – V. 147. – № 7. – P. 1237-1242.
- 616.Silva JF, Ocarino NM, Serakides R. Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration. // *Reprod Fertil Dev*. – 2017. – V. 29. – № 9. – P. 1774-1786.
- 617.Silva JF, Serakides R. Intrauterine trophoblast migration: A comparative view of humans and rodents. // *Cell Adh Migr*. – 2016. – V. 10. – № 1-2. – P. 88-110.
- 618.Simionescu A, Simionescu DT, Deac RF. Matrix metalloproteinases in the pathology of natural and bioprosthetic cardiac valves. // *Cardiovasc Pathol*. – 1996. – V. 5. – № 6. – P. 323-332.
- 619.Smith S, Francis R, Guilbert L, et al. Growth factor rescue of cytokine mediated trophoblast apoptosis. // *Placenta*. – 2002. – V. 23. – № 4. – P. 322-330.
- 620.Snegovskikh VV, Schatz F, Arcuri F, et al. Intra-Amniotic Infection Upregulates Decidual Cell Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Neuropilin-1 and -2 Expression: Implications for Infection-Related Preterm Birth. // *Reproductive Sciences*. – 2009. – V. 16. – № 8. – P. 767-780.
- 621.Snoeren EM, Chan JS, de Jong TR, et al. A new female rat animal model for hypoactive sexual desire disorder; behavioral and pharmacological evidence. // *J Sex Med*. – 2011. – V. 8. – № 1. – P. 44-56.
- 622.Snoeren EMS. The role of adrenoceptors in the central nervous system in male and female rat sexual behavior. // *European Journal of Pharmacology*. – 2015. – V. 753. – P. 229-245.
- 623.Snoeren EMS. Female Reproductive Behavior. // *Curr Top Behav Neurosci*. – 2019. – V. 43. – P. 1-44.
- 624.Soares MJ, Iqbal K, Kozai K. Hypoxia and Placental Development. // *Birth Defects Research*. – 2017. – V. 109. – № 17. – P. 1309-1329.

- 625.Sodha RJ, Proegler M, Schneider H. Transfer and metabolism of norepinephrine studied from maternal-to-fetal and fetal-to-maternal sides in the in vitro perfused human placental lobe. // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. – 1984. – V. 148. – № 4. – P. 474-481.
- 626.Song Q, Fan C, Wang P, et al. Hippocampal CA1 β CaMKII mediates neuroinflammatory responses via COX-2/PGE2 signaling pathways in depression. // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – V. 15. – № 1. – P.338.
- 627.Sonkar R, Kay MK, Choudhury M. PFOS Modulates Interactive Epigenetic Regulation in First-Trimester Human Trophoblast Cell Line HTR-8/SVneo. // *Chem Res Toxicol*. – 2019. – V. 32. – № 10. – P. 2016-2027.
- 628.Souchet B, Latour A, Gu Y, et al. Molecular rescue of DYRK1A overexpression in cystathionine beta synthase-deficient mouse brain by enriched environment combined with voluntary exercise. // *J Mol Neurosci*. – 2015. – V. 55. – № 2. – P. 318-323.
- 629.Srinivasan R, Benton E, McCormick F, et al. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. // *Clin Cancer Res*. – 1999. – V. 5. – № 10. – P. 2877-2883.
- 630.Stark MJ, Clifton VL, Hodyl NA. Differential effects of docosahexaenoic acid on preterm and term placental pro-oxidant/antioxidant balance. // *Reproduction*. – 2013. – V. 146. – № 3. – P. 243-251.
- 631.Staun-Ram E, Goldman S, Shalev E. Ets-2 and p53 mediate cAMP-induced MMP-2 expression, activity and trophoblast invasion. // *Reproductive Biology and Endocrinology*. – 2009a. – V. 7. – № 1. – P.135.
- 632.Staun-Ram E, Goldman S, Shalev E. p53 Mediates Epidermal Growth Factor (EGF) Induction of MMP-2 Transcription and Trophoblast Invasion. // *Placenta*. – 2009b. – V. 30. – № 12. – P. 1029-1036.
- 633.Stefanovic B, Spasojevic N, Jovanovic P, et al. Melatonin mediated antidepressant-like effect in the hippocampus of chronic stress-induced depression rats: Regulating vesicular monoamine transporter 2 and monoamine oxidase A levels. // *European Neuropsychopharmacology*. – 2016. – V. 26. – № 10. – P. 1629-1637.
- 634.Stemmelin J, Lazarus C, Cassel S, et al. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. // *Neuroscience*. – 2000. – V. 96. – № 2. – P. 275-289.
- 635.Stoof JC, Keabian JW. Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. // *Life Sci*. – 1984. – V. 35. – № 23. – P. 2281-2296.
- 636.Streck EL. // *Metabolic Brain Disease*. – 2003. – V. 18. – № 2. – P. 147-154.

637. Streck EL, Bavaresco CS, Netto CA, et al. Chronic hyperhomocysteinemia provokes a memory deficit in rats in the Morris water maze task. // *Behav Brain Res.* – 2004. – V. 153. – № 2. – P. 377-381.
638. Streck EL, Matte C, Vieira PS, et al. Reduction of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to chemically induced hyperhomocysteinemia. // *Neurochem Res.* – 2002. – V. 27. – № 12. – P. 1593-1598.
639. Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, et al. In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. // *Metab Brain Dis.* – 2003. – V. 18. – № 2. – P. 147-154.
640. Strongin AY, Collier I, Bannikov G, et al. Mechanism Of Cell Surface Activation Of 72-kDa Type IV Collagenase. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1995. – V. 270. – № 10. – P. 5331-5338.
641. Subbotina TF, Zhloba AF. Hyperhomocysteinemia as a Factor of Fibrinolysis Disturbances in Patients with Activated Intravascular Coagulation. // *"Arterial'naya Gipertenziya" ("Arterial Hypertension")*. – 2013. – V. 19. – № 5. – P. 435-441.
642. Suganuma T, Workman JL. Signals and combinatorial functions of histone modifications. // *Annu Rev Biochem.* – 2011. – V. 80. – P. 473-499.
643. Sun T, Hevner RF. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. // *Nat Rev Neurosci.* – 2014. – V. 15. – № 4. – P. 217-232.
644. Suszynska-Zajczyk J, Jakubowski H. Paraoxonase 1 and dietary hyperhomocysteinemia modulate the expression of mouse proteins involved in liver homeostasis. // *Acta Biochim Pol.* – 2014. – V. 61. – № 4. – P. 815-823.
645. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, et al. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. // *Circulation.* – 2010. – V. 122. – № 19. – P. 1919-1927.
646. Swierczewski A, Kobos J, Pasinski J, et al. [Expression of metalloproteinase MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase TIMP-2 in placenta of pregnant women with intrauterine growth restriction]. // *Ginekol Pol.* – 2012. – V. 83. – № 6. – P. 439-445.
647. Sycheva M, Sustarich J, Zhang Y, et al. Pro-Nerve Growth Factor Induces Activation of RhoA Kinase and Neuronal Cell Death. // *Brain Sciences.* – 2019. – V. 9. – № 8. – P.204.
648. Szawka RE, Franci CR, Anselmo-Franci JA. Noradrenaline release in the medial preoptic area during the rat oestrous cycle: temporal relationship with plasma secretory surges of prolactin and luteinising hormone. // *J Neuroendocrinol.* – 2007. – V. 19. – № 5. – P. 374-382.

- 649.Szawka RE, Poletini MO, Leite CM, et al. Release of norepinephrine in the preoptic area activates anteroventral periventricular nucleus neurons and stimulates the surge of luteinizing hormone. // *Endocrinology*. – 2013. – V. 154. – № 1. – P. 363-374.
- 650.Takahashi M, Hayashi Y, Tanaka J. Glutamatergic modulation of noradrenaline release in the rat median preoptic area. // *Brain Res Bull*. – 2017. – V. 130. – P. 36-41.
- 651.Takai H, Katayama K-i, Uetsuka K, et al. Distribution of N-methyl-d-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2003. – V. 75. – № 1. – P. 89-94.
- 652.Tanila H, Taira T, Piepponen TP, et al. Effect of sex and age on brain monoamines and spatial learning in rats. // *Neurobiology of Aging*. – 1994. – V. 15. – № 6. – P. 733-741.
- 653.Tawfik A, Elsherbiny NM, Zaidi Y, et al. Homocysteine and Age-Related Central Nervous System Diseases: Role of Inflammation. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – V. 22. – № 12. – P. 6259.
- 654.Tchantchou F, Goodfellow M, Li F, et al. Hyperhomocysteinemia-Induced Oxidative Stress Exacerbates Cortical Traumatic Brain Injury Outcomes in Rats. // *Cellular and Molecular Neurobiology*. – 2020. – V. 41. – № 3. – P. 487-503.
- 655.Tersigni C, Meli F, Neri C, et al. Role of Human Leukocyte Antigens at the Feto-Maternal Interface in Normal and Pathological Pregnancy: An Update. // *Int J Mol Sci*. – 2020. – V. 21. – № 13. – P. 4756.
- 656.Tersigni C, Redman CW, Dragovic R, et al. HLA-DR is aberrantly expressed at feto-maternal interface in pre-eclampsia. // *J Reprod Immunol*. – 2018. – V. 129. – P. 48-52.
- 657.Thakur P, Bhalerao A. High Homocysteine Levels During Pregnancy and Its Association With Placenta-Mediated Complications: A Scoping Review. // *Cureus*. – 2023. – V.15. №2. – P.e35244
- 658.Thamotharan S, Chu A, Kempf K, et al. Differential microRNA expression in human placentas of term intra-uterine growth restriction that regulates target genes mediating angiogenesis and amino acid transport. // *PLoS One*. – 2017. – V. 12. – № 5. – P. e0176493.
- 659.Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. // *Nature*. – 1995. – V. 374. – № 6523. – P. 643-646.
- 660.Thomas SA, Palmiter RD. Impaired Maternal Behavior in Mice Lacking Norepinephrine and Epinephrine. // *Cell*. – 1997. – V. 91. – № 5. – P. 583-592.
- 661.Thompson GA, Kilpatrick IC. The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. // *Pharmacol Ther*. – 1996. – V. 72. – № 1. – P. 25-36.

662. ThyagaRajan S, MohanKumar PS, Quadri SK. Cyclic changes in the release of norepinephrine and dopamine in the medial basal hypothalamus: effects of aging. // *Brain Research*. – 1995. – V. 689. – № 1. – P. 122-128.
663. Tian Y, Qiu X, Qi X, et al. Electroacupuncture promotes apoptosis and inhibits axonogenesis by activating p75 neurotrophin receptor for triple-negative breast xenograft in mice. // *Journal of Chemical Neuroanatomy*. – 2022. – V. 124. – P. 102133.
664. Ticiani E, Pu Y, Gingrich J, et al. Bisphenol S Impairs Invasion and Proliferation of Extravillous Trophoblasts Cells by Interfering with Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 2. – P.671
665. Todman MG, Han SK, Herbison AE. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. // *Neuroscience*. – 2005. – V. 132. – № 3. – P. 703-712.
666. Tometten M, Blois S, Arck PC. Nerve growth factor in reproductive biology: link between the immune, endocrine and nervous system? // *Chem Immunol Allergy*. – 2005. – V. 89. – P. 135-148.
667. Tometten M, Blois S, Kuhlmei A, et al. Nerve growth factor translates stress response and subsequent murine abortion via adhesion molecule-dependent pathways. // *Biol Reprod*. – 2006. – V. 74. – № 4. – P. 674-683.
668. Tometten M, Klapp BF, Joachim R, et al. Nerve growth factor and its functional receptor TrkA are up-regulated in murine decidual tissue of stress-triggered and substance P-mediated abortion. // *Am J Reprod Immunol*. – 2004. – V. 51. – № 1. – P. 86-93.
669. Topal G, Brunet A, Millanvoye E, et al. Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin. // *Free Radic Biol Med*. – 2004. – V. 36. – № 12. – P. 1532-1541.
670. Toth M, Sohail A, Fridman R. Assessment of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by gelatin zymography. // *Methods Mol Biol*. – 2012. – V. 878. – P. 121-135.
671. Tothova B, Kovalska M, Kalenska D, et al. Histone Hyperacetylation as a Response to Global Brain Ischemia Associated with Hyperhomocysteinemia in Rats. // *Int J Mol Sci*. – 2018. – V. 19. – № 10. – P.3147
672. Toti P, Ciarmela P, Florio P, et al. Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein. // *J. Endocrinol. Invest*. – 2006. – V. 29. – № 4. – P. 337-341.
673. Tran CT, Leiper JM, Vallance P. The DDAH/ADMA/NOS pathway. // *Atheroscler Suppl*. – 2003. – V. 4. – № 4. – P. 33-40.

674. Tremolizzo L, Doueiri MS, Dong E, et al. Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. // *Biol Psychiatry*. – 2005. – V. 57. – № 5. – P. 500-509.
675. Tripathi M, Zhang CW, Singh BK, et al. Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by Vitamin B supplementation. // *Cell Death Dis*. – 2016. – V. 7. – № 12. – P. e2513.
676. Troen AM. The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2005. – V. 29. – № 7. – P. 1140-1151.
677. Trovati M, Mattiello L, Russo I, et al. Homocysteine rapidly increases matrix metalloproteinase-2 expression and activity in cultured human vascular smooth muscle cells. // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2017. – V. 94. – № 12. – P. 1285-1293.
678. Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – № 37. – P. 34295-34302.
679. Tsitsiou E, Sibley CP, D'Souza SW, et al. Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta. // *J Physiol*. – 2009. – V. 587. – № Pt 16. – P. 4001-4013.
680. Tsitsiou E, Sibley CP, D'Souza SW, et al. Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta. // *J Inherit Metab Dis*. – 2011. – V. 34. – № 1. – P. 57-65.
681. Tsunemi A, Utsuyama M, Seidler BK, et al. Age-related decline of brain monoamines in mice is reversed to young level by Japanese herbal medicine. // *Neurochem Res*. – 2005. – V. 30. – № 1. – P. 75-81.
682. Tyagi N, Qipshidze N, Munjal C, et al. Tetrahydrocurcumin ameliorates homocysteinylation of cytochrome-c mediated autophagy in hyperhomocysteinemia mice after cerebral ischemia. // *J Mol Neurosci*. – 2012. – V. 47. – № 1. – P. 128-138.
683. Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, et al. Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2005. – V. 289. – № 6. – P. H2649-2656.
684. Umapathy A, Chamley LW, James JL. Reconciling the distinct roles of angiogenic/anti-angiogenic factors in the placenta and maternal circulation of normal and pathological pregnancies. // *Angiogenesis*. – 2020. – V. 23. – № 2. – P. 105-117.
685. Upchurch GR, Jr., Welch GN, Fabian AJ, et al. Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. // *J Biol Chem*. – 1997. – V. 272. – № 27. – P. 17012-17017.

- 686.Uttara B, Singh A, Zamboni P, et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. // *Current Neuropharmacology*. – 2009. – V. 7. – № 1. – P. 65-74.
- 687.Vallés S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, et al. Ethanol Exposure Affects Glial Fibrillary Acidic Protein Gene Expression and Transcription During Rat Brain Development. // *Journal of Neurochemistry*. – 2002. – V. 69. – № 6. – P. 2484-2493.
- 688.van der Bruggen T, Nijenhuis S, van Raaij E, et al. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway. // *Infect Immun*. – 1999. – V. 67. – № 8. – P. 3824-3829.
- 689.van Raam BJ, Salvesen GS. Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 Hetero or homo: the caspase-8 dimer controls cell fate. // *Biochim Biophys Acta*. – 2012. – V. 1824. – № 1. – P. 113-122.
- 690.Vanmierlo T, De Vry J, Nelissen E, et al. Gestational stress in mouse dams negatively affects gestation and postpartum hippocampal BDNF and P11 protein levels. // *Molecular and Cellular Neuroscience*. – 2018. – V. 88. – P. 292-299.
- 691.Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Tumanova NL, et al. Prenatal Hypoxia in Different Periods of Embryogenesis Differentially Affects Cell Migration, Neuronal Plasticity, and Rat Behavior in Postnatal Ontogenesis. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2016. – V. 10. – P.126.
- 692.Vasilev DS, Shcherbitskaia AD, Tumanova NL, et al. Maternal Hyperhomocysteinemia Disturbs the Mechanisms of Embryonic Brain Development and Its Maturation in Early Postnatal Ontogenesis. // *Cells*. – 2023. – V. 12. – № 1. – P.189.
- 693.Vaswani K, Hum MW, Chan HW, et al. The effect of gestational age on angiogenic gene expression in the rat placenta. // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 12. – P. e83762.
- 694.Veeranki S, Givvimani S, Pushpakumar S, et al. Hyperhomocysteinemia attenuates angiogenesis through reduction of HIF-1alpha and PGC-1alpha levels in muscle fibers during hindlimb ischemia. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2014. – V. 306. – № 8. – P. H1116-1127.
- 695.Vera JC. Measurement of microgram quantities of protein by a generally applicable turbidimetric procedure. // *Anal Biochem*. – 1988. – V. 174. – № 1. – P. 187-196.
- 696.Vitvitsky V, Dayal S, Stabler S, et al. Perturbations in homocysteine-linked redox homeostasis in a murine model for hyperhomocysteinemia. // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2004. – V. 287. – № 1. – P. R39-R46.
- 697.Vogtmann R, Kuhnel E, Dicke N, et al. Human sFLT1 Leads to Severe Changes in Placental Differentiation and Vascularization in a Transgenic hsFLT1/rtTA FGR Mouse Model. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2019. – V. 10. – P. 165.

698. Von Linstow CU, Severino M, Metaxas A, et al. Effect of aging and Alzheimer's disease-like pathology on brain monoamines in mice. // *Neurochemistry International*. – 2017. – V. 108. – P. 238-245.
699. Voronkina IV, Kirpichnikova KM, Smagina LV, et al. [Dynamics of matrix metalloproteinases activity of primary murine embryonic fibroblasts during cultivation]. // *Tsitologiya*. – 2011. – V. 53. – № 1. – P. 49-54.
700. Wang F, Xie N, Zhou J, et al. Molecular mechanisms underlying altered neurobehavioural development of female offspring of mothers with polycystic ovary syndrome: FOS-mediated regulation of neurotrophins in placenta. // *EBioMedicine*. – 2020. – V. 60. – P. 102993.
701. Wang JKT, Andrews H, Thukral V. Presynaptic Glutamate Receptors Regulate Noradrenaline Release from Isolated Nerve Terminals. // *Journal of Neurochemistry*. – 2006. – V. 58. – № 1. – P. 204-211.
702. Wang M, Liang X, Cheng M, et al. Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in in vivo and in vitro model of ischemic stroke. // *Cell Death Dis*. – 2019. – V. 10. – № 8. – P. 561.
703. Wang P, Rothwell NJ, Pinteaux E, et al. Neuronal injury induces the release of pro-interleukin-1 β from activated microglia in vitro. // *Brain Research*. – 2008. – V. 1236. – P. 1-7.
704. Wang XJ, Tian DC, Wang FW, et al. Astaxanthin inhibits homocysteine-induced endothelial cell dysfunction via the regulation of the reactive oxygen species-dependent VEGF-VEGFR2-FAK signaling pathway. // *Mol Med Rep*. – 2019. – V. 19. – № 6. – P. 4753-4760.
705. Wang Y, Zhao S. Vascular Biology of the Placenta. Pages 1-90 in Granger DN, Granger JP, eds. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. – 2010
706. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. // *Nat Genet*. – 2007. – V. 39. – № 4. – P. 457-466.
707. Wegiel J, Gong CX, Hwang YW. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. // *FEBS J*. – 2011. – V. 278. – № 2. – P. 236-245.
708. Wei HJ, Xu JH, Li MH, et al. Hydrogen sulfide inhibits homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and neuronal apoptosis in rat hippocampus via upregulation of the BDNF-TrkB pathway. // *Acta Pharmacol Sin*. – 2014. – V. 35. – № 6. – P. 707-715.
709. Weinstock M. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? // *Neurosci Biobehav Rev*. – 1997. – V. 21. – № 1. – P. 1-10.
710. Wenk GL. Assessment of Spatial Memory Using the Radial Arm Maze and Morris Water Maze. // *Current Protocols in Neuroscience*. – 2004. – V. 26. – № 1.

711. Westermeier F, Saez T, Arroyo P, et al. Insulin receptor isoforms: an integrated view focused on gestational diabetes mellitus. // *Diabetes Metab Res Rev.* – 2016. – V. 32. – № 4. – P. 350-365.
712. White AR, Huang X, Jobling MF, et al. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. // *Journal of Neurochemistry.* – 2001. – V. 76. – № 5. – P. 1509-1520.
713. Williams PJ, Bulmer JN, Innes BA, et al. Possible Roles for Folic Acid in the Regulation of Trophoblast Invasion and Placental Development in Normal Early Human Pregnancy¹. // *Biology of Reproduction.* – 2011. – V. 84. – № 6. – P. 1148-1153.
714. Witucki L. Phf8 mediated epigenetic dysregulation of mTOR/autophagy increases amyloid beta accumulation and cognitive deficits in hyperhomocysteinemic and bleomycin hydrolase deficient mice. // *Scientific program of 13th International Conference One-Carbon Metabolism, B Vitamins and Homocysteine, Poznan.* – 2021. – V.9 – P.12-16
715. Won SB, Han A, Kwon YH. Maternal consumption of low-isoflavone soy protein isolate alters hepatic gene expression and liver development in rat offspring. // *J Nutr Biochem.* – 2017. – V. 42. – P. 51-61.
716. Wong DL, Zager EL, Ciaranello RD. Effects of hypophysectomy and dexamethasone administration on central and peripheral S-adenosylmethionine levels. // *J Neurosci.* – 1982. – V. 2. – № 6. – P. 758-764.
717. Wong L-W, Wang Z, Ang SRX, et al. Fading memories in aging and neurodegeneration: Is p75 neurotrophin receptor a culprit? // *Ageing Research Reviews.* – 2022. – V. 75. – P. 101567.
718. Wu G.. Amino Acids in nutrition, health, and disease. // *Front Biosci (Landmark Ed).* – 2021. – V. 26. – №12. – P. 1386-1392
719. Wu JT. Circulating Homocysteine is an Inflammation Marker and a Risk Factor of Life-Threatening Inflammatory Diseases. // *Journal of Biomedical & Laboratory Sciences.* – 2007. – V. 19. – № 4. – P. 107-112.
720. Wyse AT, Zugno AI, Streck EL, et al. Inhibition of Na(+),K(+)-ATPase activity in hippocampus of rats subjected to acute administration of homocysteine is prevented by vitamins E and C treatment. // *Neurochem Res.* – 2002. – V. 27. – № 12. – P. 1685-1689.
721. Wyse ATS, Bobermin LD, Dos Santos TM, et al. Homocysteine and Gliotoxicity. // *Neurotox Res.* – 2021. – V. 39. – № 3. – P. 966-974.
722. Wyse ATS, Sanches EF, Dos Santos TM, et al. Chronic mild hyperhomocysteinemia induces anxiety-like symptoms, aversive memory deficits and hippocampus atrophy in adult rats: New insights into physiopathological mechanisms. // *Brain Res.* – 2020. – V. 1728. – P. 146592.

723. Xu X, Yang XY, He BW, et al. Placental NRP1 and VEGF expression in pre-eclamptic women and in a homocysteine-treated mouse model of pre-eclampsia. // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2016. – V. 196. – P. 69-75.
724. Xu Y, Sui L, Qiu B, et al. ANXA4 promotes trophoblast invasion via the PI3K/Akt/eNOS pathway in preeclampsia. // *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* – 2019. – V. 316. – № 4. – P. C481-C491.
725. Yakovlev AV, Dmitrieva SA, Krasnova AN, et al. Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia. // *Neurochemical Journal.* – 2022. – V. 16. – № 3. – P. 263-270.
726. Yakovleva O, Bogatova K, Mukhtarova R, et al. Hydrogen Sulfide Alleviates Anxiety, Motor, and Cognitive Dysfunctions in Rats with Maternal Hyperhomocysteinemia via Mitigation of Oxidative Stress. // *Biomolecules.* – 2020. – V. 10. – № 7. – P. 995.
727. Yakovleva OV, Ziganshina AR, Dmitrieva SA, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Developmental Impairments of Rat Offspring with Prenatal Hyperhomocysteinemia. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – V. 2018. – P. 2746873.
728. Yamakura F, Taka H, Fujimura T, et al. Inactivation of Human Manganese-superoxide Dismutase by Peroxynitrite Is Caused by Exclusive Nitration of Tyrosine 34 to 3-Nitrotyrosine. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1998. – V. 273. – № 23. – P. 14085-14089.
729. Yamashita R, Takahashi Y, Takashima K, et al. Induction of cellular senescence as a late effect and BDNF-TrkB signaling-mediated ameliorating effect on disruption of hippocampal neurogenesis after developmental exposure to lead acetate in rats. // *Toxicology.* – 2021. – V. 456. – P. 152782.
730. Yan Z, Jiao F, Yan X, et al. Maternal Chronic Folate Supplementation Ameliorates Behavior Disorders Induced by Prenatal High-Fat Diet Through Methylation Alteration of BDNF and Grin2b in Offspring Hippocampus. // *Mol Nutr Food Res.* – 2017. – V. 61. – № 12.
731. Yang B, Wang L, Nie Y, et al. proBDNF expression induces apoptosis and inhibits synaptic regeneration by regulating the RhoA-JNK pathway in an in vitro post-stroke depression model. // *Translational Psychiatry.* – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 578.
732. Yang M, Li W, Wan Z, et al. Elevated homocysteine levels in mothers with neural tube defects: a systematic review and meta-analysis. // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* – 2016. – V. 30. – № 17. – P. 2051-2057.
733. Yang PF, Li JK, Xiong Q. [Homocysteine decreases the invasion in cultured human trophoblasts: relationship between homocysteine and matrix metalloproteinase-2, -9 expression]. // *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* – 2007. – V. 42. – № 3. – P. 184-186.

734. Yang Z, Yang Y, Yang J, et al. Hyperhomocysteinemia Induced by Methionine Excess is Effectively Suppressed by Betaine in Geese. // *Animals*. – 2020. – V. 10. – № 9. – P. 1642.
735. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2001. – V. 2. – № 2. – P. 127-137.
736. Yardimci A, Ertugrul NU, Ozgen A, et al. Effects of chronic irisin treatment on brain monoamine levels in the hypothalamic and subcortical nuclei of adult male and female rats: An HPLC-ECD study. // *Neurosci Lett*. – 2023. – V. 806. – P. 137245.
737. Yavin E, Glozman S, Green P. Docosahexaenoic acid accumulation in the prenatal brain: prooxidant and antioxidant features. // *J Mol Neurosci*. – 2001. – V. 16. – № 2-3. – P. 229-235; discussion 279-284.
738. Ye Y, Jiang S, Du T, et al. Environmental Pollutant Benzo[a]pyrene Upregulated Long Non-coding RNA HZ07 Inhibits Trophoblast Cell Migration by Inactivating PI3K/AKT/MMP2 Signaling Pathway in Recurrent Pregnancy Loss. // *Reproductive Sciences*. – 2021. – V. 28. – № 11. – P. 3085-3093.
739. Yeh CM, Huang CC, Hsu KS. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. // *The Journal of Physiology*. – 2012. – V. 590. – № 4. – P. 991-1010.
740. Yessoufou A, Hichami A, Besnard P, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. // *Endocrinology*. – 2006. – V. 147. – № 9. – P. 4410-4418.
741. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. // *J Biol Chem*. – 2000. – V. 275. – № 38. – P. 29318-29323.
742. Yin X, Gao R, Geng Y, et al. Autophagy regulates abnormal placentation induced by folate deficiency in mice. // *Mol Hum Reprod*. – 2019. – V. 25. – № 6. – P. 305-319.
743. Young SN, Shalchi M. The effect of methionine and S-adenosylmethionine on S-adenosylmethionine levels in the rat brain. // *J Psychiatry Neurosci*. – 2005. – V. 30. – № 1. – P. 44-48.
744. Yu N, Wu JL, Xiao J, et al. HIF-1alpha regulates angiogenesis via Notch1/STAT3/ETBR pathway in trophoblastic cells. // *Cell Cycle*. – 2019. – V. 18. – № 24. – P. 3502-3512.
745. Zaghoul N, Nasim M, Patel H, et al. Overexpression of extracellular superoxide dismutase has a protective role against hyperoxia-induced brain injury in neonatal mice. // *The FEBS Journal*. – 2012. – V. 279. – № 5. – P. 871-881.

- 746.Zanin JP, Friedman WJ. p75NTR prevents the onset of cerebellar granule cell migration via RhoA activation. // *Elife*. – 2022. – V. 11. – P. e79934.
- 747.Zanin RF, Bergamin LS, Morrone FB, et al. Pathological concentrations of homocysteine increases IL-1 β production in macrophages in a P2X7, NF- κ B, and erk-dependent manner. // *Purinergic Signalling*. – 2015. – V. 11. – № 4. – P. 463-470.
- 748.Zhang D, Chen Y, Xie X, et al. Homocysteine activates vascular smooth muscle cells by DNA demethylation of platelet-derived growth factor in endothelial cells. // *J Mol Cell Cardiol*. – 2012. – V. 53. – № 4. – P. 487-496.
- 749.Zhang D, Hu X, Qian L, et al. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? // *Mol Neurobiol*. – 2010. – V. 41. – № 2-3. – P. 232-241.
- 750.Zhang H, Smith GN, Liu X, et al. Association of MAOA, 5-HTT, and NET promoter polymorphisms with gene expression and protein activity in human placentas. // *Physiol Genomics*. – 2010. – V. 42. – № 1. – P. 85-92.
- 751.Zhang L, Wang K, Wu Q, et al. Let-7 inhibits the migration and invasion of extravillous trophoblast cell via targeting MDM4. // *Molecular and Cellular Probes*. – 2019. – V. 45. – P. 48-56.
- 752.Zhang Q, Bai B, Mei X, et al. Elevated H3K79 homocysteinylation causes abnormal gene expression during neural development and subsequent neural tube defects. // *Nature Communications*. – 2018. – V. 9. – № 1. – P. 3436.
- 753.Zhang Q, Li Q, Chen Y, et al. Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition. // *Front Biosci (Elite Ed)*. – 2012. – V. 4. – P. 2525-2535.
- 754.Zhang QX, Na Q, Song W. Altered expression of mTOR and autophagy in term normal human placentas. // *Rom J Morphol Embryol*. – 2017. – V. 58. – № 2. – P. 517-526.
- 755.Zhang X, Lee W, Bian J-S. Recent Advances in the Study of Na⁺/K⁺-ATPase in Neurodegenerative Diseases. // *Cells*. – 2022. – V. 11. – № 24. – P. 4075.
- 756.Zhang X, Li H, Jin H, et al. Effects of homocysteine on endothelial nitric oxide production. // *Am J Physiol Renal Physiol*. – 2000. – V. 279. – № 4. – P. F671-678.
- 757.Zhang Y, Hodgson N, Trivedi M, et al. Neuregulin 1 Promotes Glutathione-Dependent Neuronal Cobalamin Metabolism by Stimulating Cysteine Uptake. // *Oxid Med Cell Longev*. – 2016. – V. 2016. – P. 3849087.
- 758.Zhang Y, Zhen Y, Dong Y, et al. Anesthetic propofol attenuates the isoflurane-induced caspase-3 activation and A β oligomerization. // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – № 11. – P. e27019.
- 759.Zhao Y, Huang G, Chen S, et al. Homocysteine Aggravates Cortical Neural Cell Injury through Neuronal Autophagy Overactivation following Rat Cerebral Ischemia-Reperfusion. // *Int J Mol Sci*. – 2016. – V. 17. – № 8. – P. 1196.

- 760.Zhou L, Zhang A, Wang K, et al. Folate ameliorates dexamethasone-induced fetal and placental growth restriction potentially via improvement of trophoblast migration. // *Int J Clin Exp Pathol.* – 2015. – V. 8. – № 3. – P. 3008-3014.
- 761.Zhu BT. On the mechanism of homocysteine pathophysiology and pathogenesis: a unifying hypothesis. // *Histol Histopathol.* – 2002. – V. 17. – № 4. – P. 1283-1291.
- 762.Zhu X, Cao Q, Li X, et al. Knockdown of TACC3 inhibits trophoblast cell migration and invasion through the PI3K/Akt signaling pathway. // *Molecular Medicine Reports.* – 2016. – V. 14. – № 4. – P. 3437-3442.
- 763.Zhu Y, Mordaunt CE, Durbin-Johnson BP, et al. Expression Changes in Epigenetic Gene Pathways Associated With One-Carbon Nutritional Metabolites in Maternal Blood From Pregnancies Resulting in Autism and Non-Typical Neurodevelopment. // *Autism Res.* – 2021. – V. 14. – № 1. – P. 11-28.
- 764.Zhu Z, Ge M, Li C, et al. Effects of p38 MAPK signaling pathway on cognitive function and recovery of neuronal function after hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats. // *Journal of Clinical Neuroscience.* – 2020. – V. 78. – P. 365-370.
- 765.Ziemińska E, Stafiej A, Łazarewicz JW. Role of group I metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in homocysteine-evoked acute neurodegeneration of cultured cerebellar granule neurones. // *Neurochemistry International.* – 2003. – V. 43. – № 4-5. – P. 481-492.
- 766.Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling. // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – V. 7. – № 5-6. – P. 547-559.
-