

*На правах рукописи*



**ЩЕРБИЦКАЯ**  
**Анастасия Дмитриевна**

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ  
НА МЕТАБОЛИЗМ БИОГЕННЫХ АМИНОВ В ОНТОГЕНЕЗЕ  
САМОК КРЫС**

03.01.04 - Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2019

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии и патологии центральной нервной системы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

**Научные руководители:** **Наливаева Наталия Николаевна**  
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной физиологии и патологии ЦНС Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

**Журавин Игорь Александрович**  
доктор биологических наук, зав. лабораторией сравнительной физиологии и патологии ЦНС Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

**Официальные оппоненты:** **Ещенко Наталья Дмитриевна**  
доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии Биологического факультета ФГБОУ «Санкт-Петербургский государственный университет»

**Карпенко Марина Николаевна**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Физиологического отдела им. И.П. Павлова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

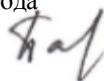
**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Защита состоится «18» июня 2019 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д.44, тел. (812)552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией – на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru>.

Автореферат разослан « \_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета



д.б.н. Р.Г. Парнова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Биогенные амины – адреналин (АД), норадреналин (НА), дофамин, серотонин (5-ОТ) – участвуют в регуляции множества физиологических процессов, включая формирование различных видов памяти и поведения. Изменение серотонинергической и норадреналинергической передачи в мозге, в частности, связывают с поведенческими расстройствами и депрессией у пациентов с болезнью Альцгеймера (Francis et al., 1999). Снижение содержания НА и 5-ОТ при повышении активности ферментов их катаболизма является также причиной развития тревожности у лабораторных животных (Kumar et al., 2017). Моноамины супрахиазматического ядра гипоталамуса опосредуют регуляцию суточных ритмов в организме (Matsumura et al., 2015), а также репродуктивной функции и половой цикличности (Арутюнян и др., 1998). Выброс НА и АД из надпочечников в сосудистое русло осуществляет коррекцию сердечно-сосудистой деятельности, регулируя процессы вазоконстрикции и вазодилатации, а также дыхания и других вегетативных функций.

Биогенные амины обнаруживаются в эмбриогенезе ещё до имплантации и играют важную роль в процессе пре- и постнатального развития. После имплантации на различных стадиях развития эмбриона биогенные амины участвуют в формировании нервной системы (Basu et al., 2008). Они присутствуют во время ранней дифференцировки нейронов и функционируют как гуморальные морфогены в раннем нейрогенезе, регулируют развитие нервных клеток и программируют сложную иннервацию различных органов. На более поздних этапах эмбриональной жизни моноамины проявляют себя в качестве нейротрансмиттеров (Wang et al., 2013). Такая двойственная роль биогенных аминов и точное время переключения их функций важны для пластичности незрелого мозга, а затем для формирования памяти и поддержания интегративной деятельности мозга.

Моноамины, обнаруживаемые в эмбрионе, имеют как эмбриональное, так материнское происхождение. Для защиты эмбриона от воздействия высоких концентраций материнских биогенных аминов, источником которых являются симпатические нервные окончания и надпочечники, в плаценте экспрессируются ферменты инактивации моноаминов (моноаминоксидаза (МАО) и катехол-О-метилтрансфераза (СОМТ)). Эффективность работы данной

системы зависит от состояния материнского организма, ухудшение которого может опосредовать нарушения образования нейронных связей плода и, следовательно, вызывать изменение различных форм поведения в процессе постнатального развития потомства.

К числу патологических факторов, способных нарушать процессы развития мозга плода, относится повышение уровня гомоцистеина (ГЦ) в крови матери (гипергомоцистеинемия, ГГЦ) (Арутюнян и др., 2010; Koz et al., 2010). ГЦ оказывает свое негативное действие на эмбриональный мозг, не только нарушая функционирование материнского организма, но также действуя непосредственно на плод, благодаря его способности проникать через плацентарный барьер (Tsitsiou et al., 2011). Ввиду того, что метаболизм биогенных аминов зависит от доступности метильных групп и кофакторов, поступающих из цикла «метионин-ГЦ», а также того, что ГЦ является ингибитором ферментов биосинтеза и инактивации катехоламинов, значительный интерес представляют исследования влияния высокого уровня ГЦ на обмен моноаминов в организме матери и потомства. Клиническое исследование ГГЦ у беременных женщин затруднено, так как начало болезни внезапно и требует немедленной медицинской помощи для предотвращения негативных последствий для матери и плода. Поэтому зоотропные модели ГГЦ способствуют получению необходимых знаний в этой области. Так, с использованием модели ГГЦ у взрослых грызунов, вызванной введением метионина, было показано изменение содержания катехоламинов и нарушение опосредованных ими когнитивных функций у самцов крыс (Gao et al., 2012) и репродуктивных функций у самок крыс (Арутюнян и др., 2011). Поскольку углубленных исследований влияния пренатальной ГГЦ на систему моноаминов в организме самок крыс и на формирование и функционирование их мозга пока не проводилось, большой интерес представляет изучение долгосрочных эффектов пренатальной ГГЦ на метаболизм биогенных аминов в гиппокампе и надпочечниках самок крыс и развитие их когнитивных функций в процессе постнатального развития. Выбор данных структур определяется тем, что гиппокамп отвечает за формирование и консолидацию памяти, а в мозговом слое надпочечников, являющемся производным нервной ткани, осуществляется синтез, метаболизм и секреция катехоламинов непосредственно в сосудистое русло для формирования адекватной реакции организма на изменяющиеся условия среды.

**Целью работы** явилось исследование влияния пренатальной гипергомоцистеинемии на метаболизм биогенных аминов в гиппокампе и надпочечниках самок крыс разного возраста, а также оценка возможных отдаленных эффектов этого воздействия на функциональное состояние мозга в постнатальном онтогенезе.

Для достижения данной цели были поставлены и последовательно решены следующие задачи:

1. Провести анализ содержания общего ГЦ в сыворотке крови беременных крыс при создании у них экспериментальной ГГЦ, а также в мозге и крови их потомства на разных этапах развития.
2. Исследовать влияние ГГЦ на баланс биогенных аминов в системе мать-плацента-плод.
3. Выявить изменения содержания биогенных аминов, а также экспрессии и содержания их транспортеров и ферментов метаболизма в гиппокампе и надпочечниках в онтогенезе самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ.
4. Изучить влияние пренатальной ГГЦ на содержание проапоптотического фермента каспазы 3 и нейропротективного белка нейрегулина 1 в плаценте беременных крыс и мозге потомства, а также на ряд показателей про- и антиоксидантной системы в крови потомства.
5. Оценить эффекты пренатальной ГГЦ на структуру нервной ткани развивающегося гиппокампа и формирование памяти у самок крыс.

**Научная новизна.** В результате проведенного исследования было впервые показано, что пренатальная ГГЦ приводит к повышению содержания ГЦ в крови новорожденных крыс, которое постепенно снижается до контрольных величин к 5-му дню постнатального развития. В результате ГГЦ также происходит снижение активности MAO в плаценте беременных крыс, что может приводить к повышенному поступлению материнских катехоламинов к плоду. Впервые получены данные о том, что дефицит уровня биогенных аминов в гиппокампе, который коррелирует с нарушением памяти и может быть причиной наблюдаемых когнитивных дисфункций, наблюдается после полового созревания самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ. Наряду с этим после пренатальной ГГЦ у потомства наблюдается повышение уровня АД и снижение НА в надпочечниках. Также впервые показано, что выявленные изменения медиаторного и гормонального баланса в гиппокампе и надпочечниках

обусловлены нарушением уровня экспрессии и активности ферментов биосинтеза и деградации биогенных аминов. Еще одним приоритетным наблюдением является то, что повышение содержания катехоламинов в крови у самок крыс, перенесших пренатальную ГПЦ, сопровождается нарушением баланса про- и антиоксидантной системы вплоть до полового созревания.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Экспериментальное исследование изменений содержания и метаболизма биогенных аминов в гиппокампе и надпочечниках самок крыс, рожденных от матерей с ГПЦ, расширяет имеющиеся представления о возможных механизмах нарушения развития мозга и когнитивных функций при пренатальной патологии. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты могут лечь в основу разработки нейропротективных стратегий, направленных на ослабление или устранение действия ГПЦ на развивающийся организм. Обнаруженные в плаценте беременных крыс с ГПЦ изменения активности МАО и содержания нейрегулина 1 могут быть использованы для создания стратегий защиты развивающегося плода от неблагоприятного действия высоких концентраций ГЦ в организме матери.

**Методология и методы исследования.** Исследование молекулярных механизмов изменений метаболизма биогенных аминов и реакции нервной системы у самок крыс, перенесших пренатальную ГПЦ, вызванную метиониновой нагрузкой у беременных крыс, проведено *in vivo* на потомстве крыс различного возраста. Для решения поставленных экспериментальных задач были применены современные биохимические, молекулярно-биологические, гистологические и физиологические методы, в частности ПЦР в реальном времени, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг и морфометрический анализ нервной ткани, анализ разных видов памяти в тестах распознавания новых объектов и в двухуровневом 8-лучевом лабиринте.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Хроническая гипергомоцистеинемия беременных крыс приводит к нарушению функционального состояния плаценты, а также метаболизма и транспорта биогенных аминов в системе «мать-плацента-плод».

2. Пренатальная гипергомоцистеинемия приводит к стойким отдаленным нарушениям в онтогенезе самок крыс, что выражается в разнонаправленном изменении содержания биогенных аминов в гиппокампе и надпочечниках за счет изменения экспрессии ферментов их метаболизма и, в частности, увеличения активности моноаминоксидазы.
3. Нарушение различных видов памяти у половозрелых самок крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемия, обусловлены изменениями метаболизма биогенных аминов, а также клеточного состава гиппокампа.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Результаты исследования получены с помощью современных методов биохимии, молекулярной биологии, иммуноцитохимии и анализа поведения животных. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить степень достоверности полученных результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы представлены и обсуждены на 23 конференциях, в том числе ISN-ESN meeting (Paris, France, 20-24.08.2017), FENS regional meeting (Pécs, Hungary, 20-23.09.2017), 25th International "Stress and Behavior" Neuroscience and Biopsychiatry Conference (St.Petersburg, Russia, 16-19.05.2018), FENS Forum 2018 (Berlin, Germany, 7-11.07.2018), XXVI European Congress of Perinatal Medicine (St. Petersburg, Russia, 5-8.09.2018), Australasian Neuroscience Society 2018 Annual Scientific Meeting (Brisbane, Australia, 3-5.12.2018).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 33 работы, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 29 тезисов конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Текст диссертации изложен на 162 страницах, содержит 2 таблицы и иллюстрирован 24 рисунками. Указатель литературы содержит 327 источника, из которых отечественных – 28, зарубежных – 299.

**Личный вклад автора.** Автор самостоятельно планировала диссертационное исследование, разрабатывала дизайн экспериментов, осуществляла всю работу с животными, включая моделирование состояния гипергомоцистеинемии у самок крыс и забор биологического

материала. Автор лично проводила все биохимические, молекулярно-биологические и поведенческие исследования. Также автор производила статистический анализ полученных данных, написание и оформление рукописи, участвовала в подготовке основных публикаций по теме диссертации, представляла результаты на всероссийских и международных конференциях.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Моделирование пренатальной ГЦ проводили на самках крыс линии Wistar в возрасте 3-4 месяца массой 180-220 г. Крысы содержались в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым режимом освещения (день 6.45–18.45) и имели постоянный доступ к пище и воде. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований.

Животные были разделены на две группы:

1. контрольная группа – самки, находившиеся с 4-го дня беременности до родоразрешения на ежедневном принудительном пероральном введении воды (n=29);
2. экспериментальная группа – самки, находившиеся с 4-го дня беременности до родоразрешения на ежедневном принудительном пероральном введении раствора метионина в концентрации 0,6 мг/кг массы животного (n=33).

Для отслеживания суточной динамики концентрации ГЦ в крови на 3-й день беременности, то есть до начала введения метионина или воды, а также на 7-й и 12-й дни у крыс забирали кровь из десны, а на 20-й день – после декапитации части животных. Забор крови проводили через 1, 6, 18 и 24 часа после введения метионина или воды. Для определения содержания катехоламинов в крови у самок на 14-й день беременности брали кровь из десны как до, так и через 3 часа после введения метионина или воды.

На 20-й день беременности у части самок обеих групп (n=10-12) были извлечены плоды, плаценты и надпочечники. У плодов был произведен забор ткани мозга. В надпочечниках беременных крыс проводилось измерение концентрации НА и АД, а также активность MAO. В их плацентах был проведен анализ содержания проапоптотического белка каспазы 3, нейропротективного NRG1 и



активности MAO. В цельном мозге плодов оценивалась концентрация НА, 5-ОТ и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК), VMAT 1 и 2, каспазы 3 и NRG1.

В дальнейших экспериментах было использовано 339 рожденных самок на разных сроках постнатального онтогенеза. Они составили следующие возрастные группы: новорожденные (P1); 3-й день жизни (P3); 5-й день жизни (P5); 10-й день жизни (P10); 20-й день жизни (P20); однемесячные (P30); двухмесячные (P60). Всех экспериментальных животных на соответствующем сроке развития декапитировали и забирали кровь, надпочечники и мозг. У самок по достижении возраста P60 отслеживалась нормализация эстрального цикла, после чего проводилась оценка их памяти с последующим биохимическим анализом.

**Определение общего L-ГЦ в сыворотке крови** проводилось с помощью тест-системы Axis Homocysteine EIA (Axis-Shield Diagnostics Limited, Великобритания). **Определение общего L-ГЦ в ткани мозга** проводили на иммунохемилюминетре «Architect i1000» (Abbott, США).

**Определение содержания биогенных аминов** в гиппокампе (цельном мозге на E20) и надпочечниках осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. **Количественное определение НА и АД в сыворотке крови** проводили с помощью тест-системы Cat Combi ELISA (IBL, Германия). **Удельную активность MAO** определяли колориметрическим методом. **Количественное определение уровня мРНК MAO A, тирозингидроксилазы (TH) и COMT** проводилось методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, последовательности которых доступны в открытой печати (Li et al., 2014; Wang et al., 2009). Для определения относительного количества мРНК в исследуемых образцах, полученные значения  $C_t$  для генов интереса нормировались по кДНК гена циклофилина A.

**Оценку содержания VMAT1 и 2, NRG1 и каспазы 3** в ткани плаценты, мозга и надпочечников проводили с помощью электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблоттингом. **Активность каспазы 3** в исследуемых образцах определяли, используя протокол тест-системы «Caspase 3 Colorimetric Kit» (R&D System, США). **Определение содержания NRG1** в тканях гиппокампа

(цельного мозга на E20) и плаценты проводили с помощью тест-системы NRG1-beta 1 ELISA Kit (RayBiotech, США).

**Для определения уровня повреждения ДНК** в сыворотке крови использовали тест-систему для анализа концентрации 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (DNA damage ELISA kit, Enzo Life Sciences, США).

**Определение концентрации нитротирозина** в сыворотке крови проводилось с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы (HK501-02, Hycult Biotech, Нидерланды).

**Количественный анализ аскорбиновой кислоты** в сыворотке проводили с использованием тест-системы Vitamin C (K 4000, Immundiagnostik, Германия). **Для определения активности супероксиддисмутазы** использовали тест-систему Superoxide Dismutase Assay Kit (706002, Cayman chemical, США).

**Количественное определение белка в пробах** проводилось методами Лоури и Бредфорда.

**Анализ клеточного состава ткани мозга крыс** проводили с помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа и светоптического метода Ниссля с использованием программы анализа изображений «ВидеоТест-Мастер-Морфология» (ООО «ВидеоТест», Россия).

**Поведенческие тесты.** Оценка кратковременной и долговременной памяти проводилась в модифицированном тесте «Распознавание новых объектов». Для оценки пространственной памяти проводили тестирование в двухуровневом 8-лучевом лабиринте. Тестирования самок начинались в стадии диэструса.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Исследование влияния ГЦ на беременных крыс.** Динамика изменения уровня ГЦ в норме и при хроническом введении метионина практически не изучена. В связи с этим было проведено исследование, позволяющее узнать, насколько длительным является повышение ГЦ в крови самок после введения метионина, и как уровень ГЦ изменяется с течением беременности. В результате проведенного анализа были получены данные, свидетельствующие об эффективности применения описанной модели для создания ГЦ у беременных самок крыс. Как видно из Рис. 1, на 7-й день беременности уже через 1 час после перорального введения метионина наблюдается достоверное повышение содержания ГЦ в сыворотке крови с максимальной

концентрацией через 6 часов по сравнению с контрольной группой и последующим снижением до контрольных значений через 18 часов. На 12-й и 20-й день беременности динамика изменений ГЦ после введения метионина имела сходный характер, однако концентрация ГЦ приходила в норму только к 24-м часам после введения метионина.

Анализ концентрации НА и АД в сыворотке крови беременных самок крыс не показал достоверных отличий при повышении содержания ГЦ в крови, а также в содержании КА и активности MAO в надпочечниках.



**Рисунок 1.** Концентрация гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови беременных крыс до начала введения воды или метионина (3-й день) и через 1, 6, 18, 24 часа после введения на 7-й, 12-й и 20-й дни беременности. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля ( $p \leq 0,01$ ).

**Исследование влияния ГЦ на функциональное состояние плаценты и потомства крыс.** Несмотря на то, что плаценте принадлежит ключевая роль в адаптации материнского организма к беременности, а также в обеспечении нормального роста и развития плода, мало известно о том, какие процессы в плаценте, характеризующие ее функциональное состояние, наиболее подвержены воздействию нейротоксических соединений.

Проведенное нами исследование показало достоверное снижение массы плаценты в экспериментальной группе животных по сравнению с контролем (Табл. 1). Денситометрический анализ содержания проапоптотического белка каспазы 3 не выявил изменений данного фермента ни в материнской, ни в плодной частях плаценты крыс с ГЦ.

Исследование содержания нейротрофического фактора NRG1 в плодной части плаценты также не выявило достоверных изменений в

экспериментальной группе по сравнению с контролем, однако в материнской части плаценты было обнаружено достоверное снижение его содержания (Табл. 1). Кроме того ГГЦ приводила к статистически значимому снижению активности MAO в плаценте на 20-й день беременности (Табл. 1).

**Таблица 1 – Сравнительный анализ показателей функционального состояния плаценты**

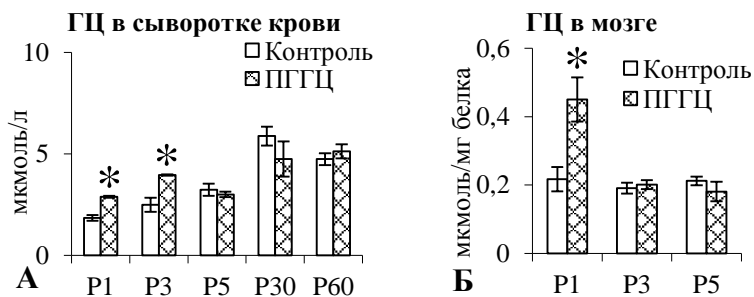
Показатель	Контрольная группа		Самки с ГГЦ	
	МЧП	ПЧП	МЧП	ПЧП
Масса плаценты, г	0,61±0,02		<b>0,51±0,01**</b>	
NRG1, нг/мкг белка	3,01±0,10	2,23±0,24	<b>2,31±0,14*</b>	1,55±0,26
Активность MAO, мкМ кин/мкг белка*час	5,70±0,51		<b>4,03±0,49*</b>	

Примечание: МЧП – материнская часть плаценты, ПЧП – плодная часть плаценты. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \*\* – достоверное отличие подопытной группы от соответствующего контроля ( $p \leq 0,01$ ), \* –  $p \leq 0,05$ .

При анализе классических параметров развития детенышей показано, что на E20 масса тела плодов самок с ГГЦ была в 1,12 раза меньше, чем в контрольной группе. Корреляционный анализ выявил весьма тесную связь между массой тела плода на E20 и массой плаценты в экспериментальной группе ( $\tau=0,246$ ,  $p \leq 0,05$ ). Масса новорожденных с пренатальной ГГЦ составила 74,15% от массы контрольных крысят. При исследовании массы мозга крысят на P1 были получены данные о достоверном снижении в среднем на 4% данного показателя у крысят подопытной группы. Масса мозга крысят подопытной группы на P5 была на 8% меньше, чем в контроле.

**Исследование влияния пренатальной ГГЦ на содержание ГЦ в крови и мозге потомства.** У новорожденных животных, матери которых в течение беременности получали метионин, уровень ГЦ был в 1,56 раза выше, чем у крысят контрольной группы. На P3 концентрация ГЦ в сыворотке крови крысят подопытной группы была на 59% выше, чем в контроле (Рис. 2А), а на P5 снижалась до контрольных величин и достоверно не отличалась от них на более поздних сроках развития.

При исследовании содержания ГЦ в цельном мозге потомства на P1, P3 и P5 достоверные отличия от контрольных значений были выявлены лишь у новорожденных крысят (Рис. 2Б). Возможно, отсутствие различий в уровне ГЦ в мозге на P3 связано с тем, что после рождения его концентрация в крови недостаточно высока, чтобы привести к накоплению ГЦ в тканях мозга, хотя он и присутствует в сыворотке крови в более высокой концентрации, чем у контрольных животных.



**Рисунок 2.** А: Динамика изменения концентрации общего гомоцистеина (ГЦ) в сыворотке крови самок крыс. Б: Концентрация общего гомоцистеина (ГЦ) в цельном мозге самок крыс на P1, P3, P5. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие уровня ГЦ опытной группы от контроля ( $p \leq 0,01$ ).

**Влияние пренатальной ГГЦ на апоптотические процессы в мозге потомства.** На протяжении первых 20 дней постнатального онтогенеза в гиппокампе самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, наблюдалось увеличение количества клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза, по сравнению с контролем, где такие клетки единичны. Эти клетки характеризовались набуханием тел и отростков, появлением неокрашенных областей цитоплазмы, а также дегенерацией апикальных дендритов. Большую часть таких клеток составляли крупные нейроны пирамидного слоя аммонова рога зоны CA1.

Также у крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, наблюдалось снижение количества нейронов пирамидного слоя в поле CA1 (Табл. 2), что свидетельствует о возможной гибели нейронов в гиппокампе этих животных. Более того, в гиппокампе подопытных животных выявлен рост числа глиальных клеток (Табл. 2).

**Таблица 2 – Количество клеток различных популяций CA1 зоны гиппокампа потомства крыс**

	P5		P20	
	Нейроны	Глия	Нейроны	Глия
Контроль	383,67±13,48	405,84±15,13	299,95±12,60	320,88±23,73
ПГГЦ	<b>294,38±20,81</b> **	<b>499,85±19,09</b> *	<b>168,71±19,72</b> **	<b>848,40±43,81</b> **

Примечание: ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля при  $p \leq 0,05$ , \*\* – при  $p \leq 0,01$ .

Исследование отношения содержания фрагмента активной формы каспазы 3 к прокаспазе в цельном мозге плодов на E20, перенесших пренатальную ГГЦ, выявило статистически значимое повышение данного показателя в 4 раза по сравнению с контрольными животными. На P5 данное отношение составило 268% от контроля. Однако в гиппокампе самок крыс на P20 и P60 достоверных отличий между группами обнаружено не было. Анализ активности каспазы 3 в цельном мозге потомства на E20 и P5, а также в гиппокампе самок крыс на P20 не выявил значимых изменений.

Исследование содержания NRG1 на E20 выявило его повышение в ткани мозга плодов, матери которых потребляли метионин, в 1,66 раза по сравнению с плодами контрольной группы. Также на P5 обнаружено повышение в 2,21 раза содержания NRG1 в цельном мозге крысят подопытной группы. В гиппокампе крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, на P20 и P60 достоверных изменений в содержании данного нейротрофического фактора обнаружено не было.

**Влияние пренатальной ГГЦ на содержание биогенных аминов в мозге плодов на E20.** Результаты анализа биогенных аминов в ткани мозга плодов крыс не показали статистически значимого изменения относительного содержания НА, 5-ОТ и 5-ОИУК у крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, по сравнению с контролем (Табл. 3). Несмотря на это, в ткани мозга плодов, матерям которых вводили метионин, обнаружено повышение содержания характерного для мозга везикулярного переносчика моноаминов VMAT2 (Табл. 3).

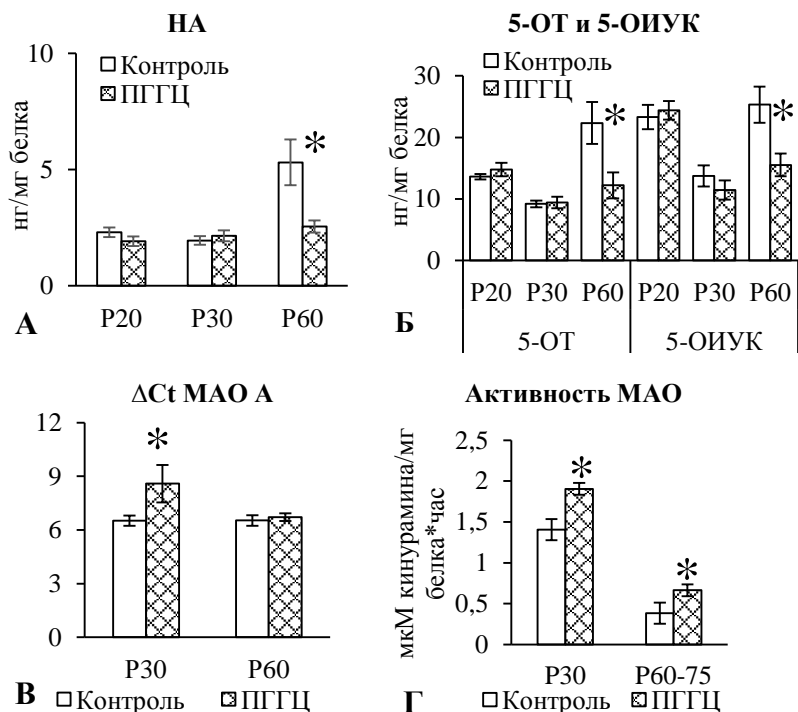
**Таблица 3 – Содержание биогенных аминов и VMAT1 и 2 в целомном мозге плодов на E20**

	Контроль	ПГГЦ
НА, нг/мкг белка	0,212±0,013	0,204±0,018
5-ОТ, нг/мкг белка	1,161±0,163	1,400±0,221
5-ОИУК, нг/мкг белка	1,183±0,259	0,925±0,147
VMAT1, усл. ед.	37,799±9,418	92,152±52,105
VMAT2, усл. ед.	37,809±9,399	<b>80,603±20,232*</b>

ПГГЦ – плоды с пренатальной ГГЦ.  
\* – достоверное отличие подопытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ )

**Влияние пренатальной ГГЦ на метаболизм биогенных аминов в гиппокампе самок крыс.** Исследование содержания НА, 5-ОТ и 5-ОИУК показало статистически значимое снижение этих показателей у половозрелых крыс (P60), перенесших пренатальную ГГЦ, по сравнению с контрольной группой. При этом на более ранних сроках постнатального развития (P20 и P30) достоверных отличий между группами обнаружено не было (Рис. 3А, Б). Для выявления возможных причин снижения уровня биогенных аминов была проанализирована экспрессия мРНК TH, MAO и COMT, ключевых ферментов их метаболизма. Было обнаружено, что на P30 экспрессия мРНК MAO в гиппокампе самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, значимо увеличивается в 1,31 раза, однако изменений в гиппокампе животных на P60 не наблюдалось (Рис. 3В). Также обнаружено значительное увеличение активности MAO в гиппокампе самок крыс после пренатальной ГГЦ на P30 на 35% и на P60 на 72% (Рис. 3Г).

В гиппокампе самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, достоверных изменений в уровнях экспрессии мРНК TH и COMT на P30 и P60 выявлено не было. Также не было обнаружено статистически значимых изменений при исследовании содержания переносчиков моноаминов VMAT1 и 2 в гиппокампе самок крыс подопытной группы на P60.

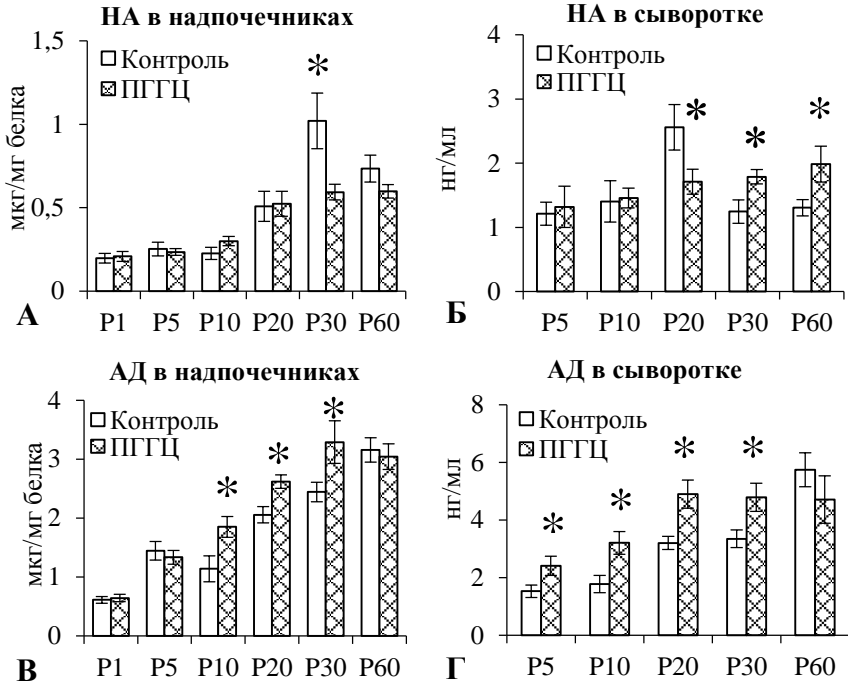


**Рисунок 3.** Содержание норадреналина (НА) (А), серотонина (5-ОТ) и 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) (Б) в гиппокампе самок крыс на P20, P30 и P60. Уровень экспрессии мРНК (В) и удельная активность (Г) моноаминоксидазы (MAO) в гиппокампе самок крыс на P30 и P60. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие опытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ ).

**Влияние пренатальной ГГЦ на метаболизм катехоламинов в надпочечниках самок крыс.** В надпочечниках крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, было выявлено достоверное снижение содержания НА в 1,72 раза на P30 (Рис. 4А). В то же время анализ сыворотки крови самок на P30 показал статистически значимое повышение НА в среднем на 43% (Рис. 4Б). Сходные изменения наблюдались также у животных 60-го дня жизни (152% от контроля). Анализ АД у крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, выявил достоверные повышение данного показателя в надпочечниках животных с 10-го по 30-й дни жизни с одновременным увеличением уровня АД в сыворотке крови (Рис. 4В,



Г). Таким образом, можно предположить, что у самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, наблюдается повышенный выброс АД из надпочечников в кровь.

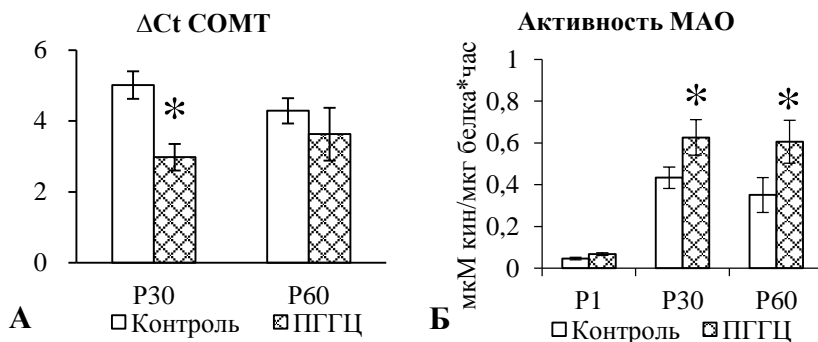


**Рисунок 4.** Возрастная динамика концентрации норадреналина (НА) в надпочечниках (А) и сыворотке крови (Б) самок крыс. Возрастная динамика концентрации адреналина (АД) в надпочечниках (В) и сыворотке крови (Г) самок крыс. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ ).

При исследовании содержания везикулярных транспортеров моноаминов в надпочечниках крыс было рассчитано отношение VMAT1/VMAT2, которое может меняться при стрессовых воздействиях (Sabban et al., 2012). У новорожденных крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, было обнаружено увеличение данного отношения в 2,48 раза.

В надпочечниках крыс, матерям которых вводили метионин, на P30 было отмечено достоверное снижение в 2,04 раза экспрессии мРНК

ТН и экспрессии мРНК COMT в 1,68 раза, однако у половозрелых самок статистически значимых изменений уже не наблюдалось (Рис. 5А). Исследование экспрессии мРНК MAO не выявило достоверных отличий у самок на P30 и P60. Анализ удельной активности MAO в надпочечниках новорожденных крысят также не выявил значимых различий (Рис. 5Б). Однако на P30 и P60 у крысят, перенесших пренатальную ГГЦ, было обнаружено достоверное повышение активности фермента по сравнению с контрольными животными.

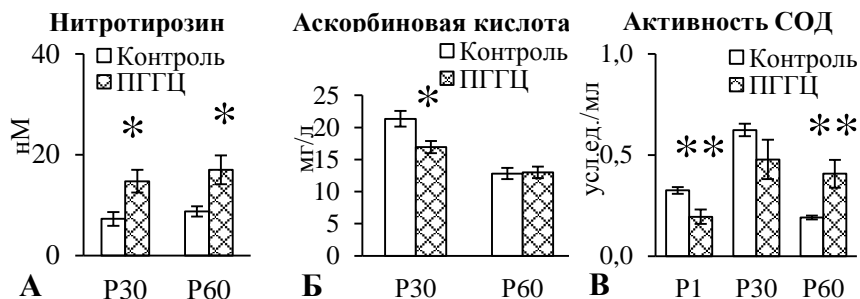


**Рисунок 5. А:** Уровень экспрессии катехол-О-метилтрансферазы (COMT) в надпочечниках самок крыс на P30 и P60. **Б:** Удельная активность моноаминоксидазы (MAO) в надпочечниках самок крыс на P1, P30 и P60. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ ).

**Влияние пренатальной ГГЦ на показатели окислительного стресса.** Для оценки окислительного повреждения белков был проведен анализ содержания нитротирозина в сыворотке крови крысят. Согласно полученным данным, уровень данного маркера окислительной модификации белков в сыворотке крови крыс после пренатальной ГГЦ был выше в 2 раза на P30, и в 1.9 раза на P60 по сравнению с контрольной группой (Рис. 6А).

Для оценки окислительного повреждения ДНК было исследовано содержание 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина. Анализ показал, что в сыворотке крови крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, этот показатель на P30 достоверно не отличается от уровня в контрольной группе, однако наблюдается тенденция к его повышению. На P60 различий в этом маркере повреждения ДНК между группами также выявлено не было.

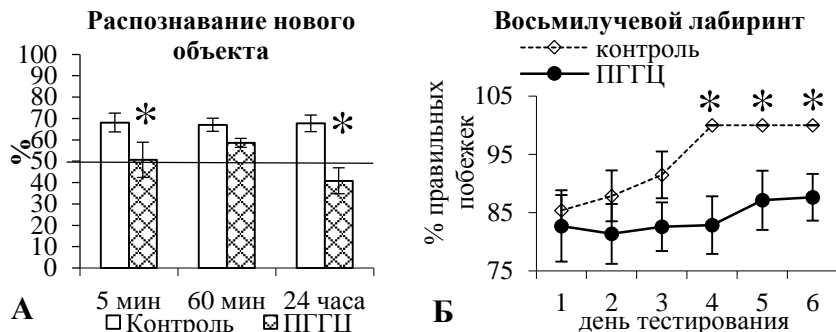
В качестве показателей антиоксидантной системы были выбраны такие параметры, как содержание аскорбиновой кислоты и активность супероксиддисмутазы. Согласно полученным результатам на P30 концентрация аскорбиновой кислоты в сыворотке крови крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, была ниже контрольных значений, однако на P60 эти изменения исчезали (Рис. 6Б). Исследование активности супероксиддисмутазы в сыворотке крови показало достоверное снижение данного показателя у новорожденных крысят, перенесших пренатальную ГГЦ (Рис. 6В). На P30 описанные изменения имели лишь характер тенденции, а к P60 данный показатель возрастал и превышал контрольные значения более чем в 2 раза.



**Рисунок 6.** А: Концентрация нитротирозина в сыворотке крови крыс на P30 и P60. Б: Концентрация аскорбиновой кислоты в сыворотке крови крыс на P30 и P60. В: Активность супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови крыс на P1, P30 и P60. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля при  $p \leq 0,05$ , \*\* – при  $p \leq 0,01$ .

**Влияние пренатальной ГГЦ на когнитивные функции самок крыс.** При исследовании поведения в тесте «Распознавание новых объектов» было показано, что у крыс, перенесших пренатальную ГГЦ, не наблюдалось предпочтения обследованию новых объектов, тогда как контрольные самки тратили больше времени на исследование новых объектов. (Рис. 7А). При анализе рабочей памяти в 8-лучевом лабиринте было обнаружено, что процент правильных посещений кормушек у животных, перенесших пренатальную ГГЦ, был достоверно снижен, начиная с 4-го дня тестирования (Рис. 7Б). Полученные в этих тестах данные свидетельствуют о том, что у животных, матерям которых вводили метионин во время беременности, происходит нарушение кратковременной и долговременной памяти.

Корреляционный анализ по методу Кендалла также позволил установить связь между процентом правильных посещений рукавов восьмилучевого лабиринта и содержанием НА в гиппокампе половозрелых самок крыс обеих групп ( $\tau=0,471$ ,  $p\leq 0,05$ ).



**Рисунок 7. А:** Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) на память самок крыс при анализе с использованием теста «Распознавание нового объекта». Ордината:  $M\pm m$  времени распознавания нового объекта, выраженного в процентах от общего времени исследования известного и нового объектов у контрольной группы и у крыс после ПГГЦ через 5, 60 мин и 24 ч после тренировочного предъявления пары объектов. **Б:** Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) на поведение взрослых самок крыс в 8-лучевом радиальном лабиринте. Ордината:  $M\pm m$  числа правильных посещений рукавов 8-лучевого лабиринта, выраженного в процентах от общего числа посещений для каждой группы животных ( $M\pm m$ ,  $n=10-12$ ). \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля при  $p\leq 0,05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые показаны суточные изменения содержания ГЦ на различных сроках беременности в крови крыс с пероральным введением метионина. В частности, выявлено, что скорость нормализации содержания ГЦ ухудшается с течением беременности или с увеличением продолжительности введения метионина, приводя к истощению защитных резервов организма матери и плаценты. Поскольку системы моноаминов играют важную роль в регуляции жизнедеятельности трофобласта и дифференцировки клеток плода, выявленное нами снижение активности MAO при повышенном уровне ГЦ может быть признаком серьезных нарушений барьерных

функций плаценты, в частности, для переноса катехоламинов матери к плоду. Полученные в данной работе результаты о снижении содержания NRG1 в материнской части плаценты ставят вопрос о важности изучения других трофических факторов и маркеров гибели клеток и их роли в развитии патологии плода при пренатальной ГЦ.

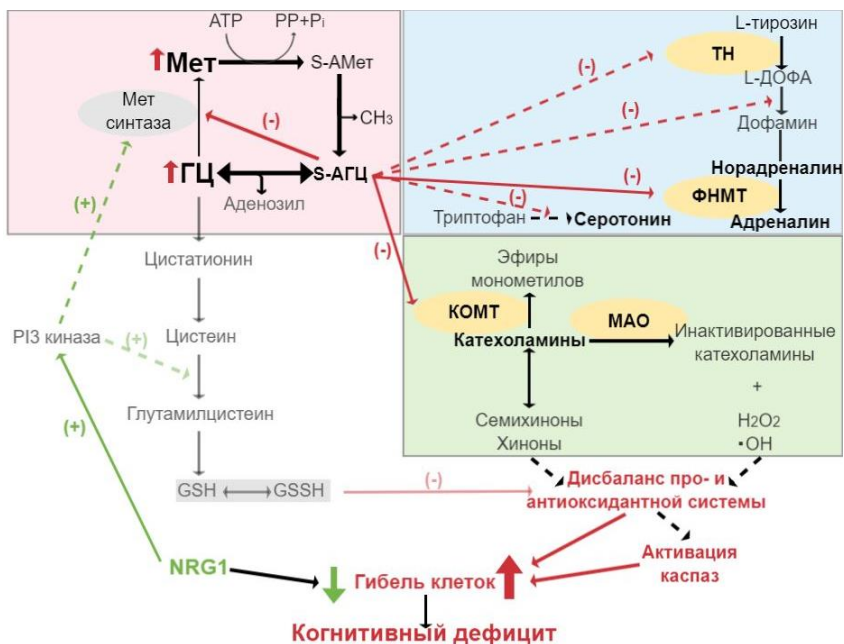
Выявленное нами повышение содержания ГЦ в мозге плодов и сыворотке крови новорожденных животных при пренатальной ГЦ свидетельствует о переносе данного токсического соединения из организма матери в ткани плода. Несмотря на быстрое восстановление уровня ГЦ в сыворотке крови потомства, негативное действие пренатальной ГЦ прослеживается в течение длительного периода после рождения. В частности, результаты морфологических исследований гиппокампа крысят свидетельствуют об увеличении числа дегенерирующих нейронов и количества клеток глии. Также имеет место нарушение баланса проапоптотического белка каспазы 3 и нейропротективного NRG1 в ткани мозга потомства. Выявленные изменения клеточного состава гиппокампа являются предпосылками для формирования когнитивных дисфункций у самок крыс, перенесших пренатальную ГЦ. Еще одной возможной причиной выявленных нами нарушений памяти у самок крыс может быть изменение нейромедиаторной передачи в нервной ткани вследствие снижения содержания биогенных аминов, вызванного увеличением экспрессии и активности MAO. Более того, повышение содержания АД в надпочечниках и крови самок крыс после пренатальной ГЦ вследствие нарушения экспрессии TH и COMT и повышения активности MAO может служить основой развития тревожного состояния и увеличения ошибок в процессе обучения.

Повышенное содержание катехоламинов в крови и, как следствие, их спонтанное окисление может приводить к развитию окислительного стресса за счет образования кислородных радикалов и цитотоксических хинонов (Biasetti, Dawson, 2002). Данное утверждение подкрепляется полученными в настоящем исследовании результатами о нарушении баланса про- и антиоксидантной системы у самок крыс, перенесших пренатальную ГЦ.

Таким образом, повышение уровня ГЦ у матери во время беременности, приводит к нарушениям функционального состояния плаценты и оказывает существенное негативное влияние на развивающийся плод, что проявляется в дисбалансе содержания

биогеиных аминов в надпочечниках и гиппокампе, изменении клеточного состава гиппокампа и нарушении когнитивных функций в ходе постнатальной жизни потомства.

На Рис. 8 представлена обобщенная схема метаболизма биогеиных аминов (по цитируемым литературным и полученным нами данным) с основными метаболитами и ферментами, исследованными в данной работе при повышении содержания ГЦ, а также приведен ряд процессов, которые изменяются при действии пренатальной ГЦ и могут приводить к нарушению развития мозга и когнитивному дефициту потомства.



**Рисунок 8.** Схема влияния повышенных концентраций гомоцистеина (ГЦ) и его метаболитов на биохимические процессы и функциональное состояние нервной ткани.

## ВЫВОДЫ

1. Хроническая гипергомоцистеинемия беременных крыс, вызванная введением метионина, приводит к развитию пренатальной гипергомоцистеинемии у потомства, характеризующейся повышением содержания ГЦ в сыворотке крови и мозге новорожденных крысят до 3-го дня постнатальной жизни.
2. Повышение уровня гомоцистеина не вызывает изменений в содержании катехоламинов в надпочечниках и сыворотке крови беременных самок, однако приводит к снижению активности моноаминоксидазы и содержания нейротрофического фактора нейрегулина 1 в плаценте. В мозге плодов на E20 повышается содержание везикулярного транспортера моноаминов VMAT2 при неизменном содержании биогенных аминов.
3. Пренатальная гипергомоцистеинемия приводит к повышению содержания активной формы каспазы 3 в мозге плодов (E20) и потомства крыс, а также к увеличению числа дегенерирующих нейронов и количества глиальных клеток в гиппокампе на протяжении первых 20-и дней постнатального онтогенеза.
4. В гиппокампе половозрелых самок крыс (P60), перенесших пренатальную гипергомоцистеинемия, имеет место снижение содержания норадреналина, серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты, а также повышение экспрессии мРНК и активности моноаминоксидазы, что сопровождается нарушением кратковременной и долговременной памяти.
5. В надпочечниках крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемия, на P10-30 происходит повышение содержания адреналина и снижение норадреналина (на P30) с одновременным повышением их концентрации в сыворотке крови, что коррелирует с выявленными изменениями экспрессии ферментов их метаболизма (тирозингидроксилазы и катехол-О-метилтрансферазы) и повышением активности моноаминоксидазы.
6. Пренатальная гипергомоцистеинемия приводит к нарушению баланса про- и антиоксидантной систем в крови потомства, что выражается в повышении содержания продуктов окислительной модификации белков, а также снижению уровня аскорбиновой кислоты и активности супероксиддисмутазы.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Милютина Ю.П., Арутюнян А.В., Пустыгина А.В., Щербицкая А.Д., Залозная И.В., Зорина И.И. Содержание катехоламинов в надпочечниках крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2014; 100(3): 360-369.
2. Милютина Ю.П., Пустыгина А.В., Щербицкая А.Д., Залозная И.В., Арутюнян А.В. Сравнение показателей окислительного стресса в сыворотке крови крыс при различных моделях гипергомоцистеинемии. *Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН*. 2016; 1(3-Ц): 120-123.
3. Щербицкая А.Д., Милютина Ю.П., Залозная И.В., Арутюнян А.В., Наливаева Н.Н., Журавин И.А. Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на формирование памяти и содержание биогенных аминов в гиппокампе самок крыс. *Нейрохимия*. 2017;34(4):296–302. (Shcherbitskaya A.D., Milyutina Yu.P., Zaloznyaya I.V., Arutjunyan A.V., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A. The Effects of Prenatal Hyperhomocysteinemia on the Formation of Memory and the Contents of Biogenic Amines in the Rat Hippocampus. *Neurochemical Journal*. 2017; 11(4): 296–301).
4. Милютина Ю.П., Щербицкая А.Д., Салтыкова Е.Д., Козина Л.С., Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Арутюнян А.В. Метаболические нарушения в плаценте и мозге плодов беременных крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2017; 103(11): 1280-1291.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- СОМТ** – катехол-О-метилтрансфераза  
**МАО** – моноаминоксидаза  
**NRG1** – нейрегулин 1 $\beta$   
**ТН** – тирозингидроксилаза  
**VMAT** – везикулярный транспортер моноаминов  
**АД** – адреналин  
**ГГЦ** – гипергомоцистеинемия  
**ГЦ** – гомоцистеин  
**НА** – норадреналин  
**5-ОИУК** – 5-оксииндолуксусная кислота  
**5-ОТ** – серотонин  
**ПГГЦ** – пренатальная гипергомоцистеинемия