

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова  
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной  
научно-квалификационной работы (диссертации)

**«Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на метаболизм биогенных  
аминов в онтогенезе самок крыс»**

Щербицкая Анастасия Дмитриевна  
06.06.01 - Биологические науки  
03.01.04 - Биохимия

Научные руководители:  
д.б.н. Наливаева Наталия Николаевна,  
д.б.н. Журавин Игорь Александрович

Санкт-Петербург  
2018

## **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Различные неблагоприятные воздействия на материнский организм в период беременности (инфекционные заболевания, действие никотина и алкоголя, гипоксия) могут приводить к нарушению эмбриогенеза, вызывая стойкие отдаленные последствия в период постнатальной жизни потомства. При этом одной из наиболее чувствительных систем организма к действию неблагоприятных факторов является нервная система [Charil et al., 2010; Журавин и др., 2014; Vasilev et al., 2016], от состояния которой зависит развитие поведенческих и адаптивных реакций и реактивность которой определяется содержанием и скоростью метаболизма медиаторов и гормонов.

К числу патологических факторов, способных нарушать процессы развития мозга плода, относится гипергомоцистеинемия (ГГЦ) матери [Арутюнян и др., 2010; Koz et al., 2010]. Благодаря способности проникать через плацентарный барьер гомоцистеин (ГЦ) оказывает свое негативное действие как опосредованно через организм матери, так и непосредственно на плод [Tsitsiou et al., 2011]. При тяжелых формах ГГЦ наблюдаются такие патологии развития, как анэнцефалия и незаращение спинномозгового канала [Blom, 2009; Van der Molen et al., 2000].

Несмотря на это данные о механизмах влияния ГГЦ у матери на функциональное развитие нервной системы плодов и новорожденных, а также в отдаленном периоде, недостаточны и разрознены. Клиническое исследование ГГЦ затруднено, так как начало болезни внезапно и требует немедленной медицинской помощи для предотвращения негативных последствий для матери и плода. Поэтому зоотропные модели ГГЦ могут значительно способствовать получению знаний в этой области.

Сокращения: 5-ОТ – серотонин, СОМТ – катехол-О-метилтрансфераза, МАО – моноаминоксидаза, NRG1 – нейрегулин 1β, ОНдГ – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, ТН – тирозингидроксилаза, VMAT – везикулярный транспортер моноаминов, АД – адреналин, БА – биогенные амины, ГГЦ – гипергомоцистеинемия, ГЦ – гомоцистеин, КА – катехоламины, НА – норадреналин, НТ – нитротирозин, ОИУК – 5-оксииндолуксусная кислота, ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия

ГГЦ у взрослых животных является важным фактором развития когнитивных нарушений [Miller, 2003]. Так, было показано, что хроническое введение крысам ГЦ нарушает краткосрочную и долговременную память [Baydas et al., 2003; Streck et al., 2004; Arutjunyan et al., 2012]. Кроме того, повышение уровня ГЦ в крови матери приводит к аномальному развитию мозга потомства [Rosenquist, Finnell, 2001] вследствие гибели нервных клеток [Boldyrev, 2009; Koz et al., 2010]. Механизм ГЦ-индуцированного апоптоза связан с увеличением содержания внутриклеточного кальция, вызванного чрезмерной активацией NMDA рецепторов [Abushik et al., 2014; Boldyrev et al., 2013]. Более того известно, что ГЦ и продукты его метаболизма стимулируют образование активных форм кислорода [Arutjunyan et al., 2012; Khavinson et al., 2011], также инициирующих механизмы клеточной гибели [Ho et al., 2001].

В настоящее время большая часть исследований проводится на самцах, так как их поведенческие реакции легче поддаются анализу вследствие отсутствия циклических изменений гормонального фона, характерных для самок. Тем не менее, в последние годы накапливается все больше фактов, свидетельствующих о том, что выявляемые у грызунов межполовые различия в поведении и когнитивных функциях находятся под контролем определенных медиаторных систем мозга [Карпова и др., 2014; Aubele et al., 2008; Dalley et al., 2004]. У самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ (ПГГЦ), было обнаружено снижение содержания норадреналина (НА) и повышение дофамина в структурах мозга, ответственных за регуляцию репродуктивных функций [Арутюнян и др., 2016]. В отдельных работах сообщается, что при поражении дофаминергической системы или блокаде передачи серотонина (5-ОТ) нарушается память и обучение самцов крыс [Myhrer, 2000], однако для самок такие данные отсутствуют.

В связи с этим, настоящее исследование было проведено для изучения у самок крыс долгосрочных нейрофизиологических эффектов ПГГЦ на метаболизм биогенных аминов (БА) в гиппокампе и надпочечниках. 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 (КА) непосредственно в сосудистое русло для формирования адекватной реакции организма на изменяющиеся условия среды.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы: исследовать влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на метаболизм биогенных аминов в гиппокампе и надпочечниках самок крыс разного возраста, а также оценить возможные отдаленные эффекты этого воздействия на функциональное состояние мозга в постнатальном онтогенезе.

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

1. Исследовать уровни общего ГЦ в сыворотке крови беременных крыс, мозге и крови потомства после ПГГЦ.
2. Исследовать влияние ГГЦ на баланс биогенных аминов в системе мать-плацента-плод.
3. Исследовать в гиппокампе и надпочечниках содержание биогенных аминов, а также изменение уровня их транспортеров и ферментов метаболизма в онтогенезе самок крыс, перенесших ПГГЦ.
4. Исследовать влияние ПГГЦ на ряд показателей окислительного стресса в крови, а также содержание проапоптотического белка каспазы 3 и нейропротективного нейрегулина 1 в мозге потомства.
5. Исследовать эффекты ПГГЦ на структуру нервной ткани развивающегося гиппокампа и формирование памяти у самок крыс.

### **Научная новизна**

В результате проведенного исследования было впервые выявлено, что ПГГЦ приводит к повышению содержания ГЦ в крови новорожденных, которое постепенно снижается до контрольных величин к 5-му дню постнатального

развития. В результате ГГЦ также происходит снижение активности моноаминоксидазы (МАО) в плаценте беременных крыс, что может приводить к повышенному поступлению материнских КА к плоду. Впервые получены данные о том, что дефицит уровня БА в гиппокампе, который может быть причиной наблюдаемых когнитивных дисфункций, происходит после полового созревания самок крыс, перенесших ПГГЦ. Наряду с этим после ПГГЦ у потомства наблюдалось повышение уровня адреналина (АД) и снижение НА в надпочечниках. Также впервые показано, что выявленные изменения гормонального баланса обусловлены нарушением уровня экспрессии и активности ферментов биосинтеза и деградации БА. Еще одним приоритетным наблюдением является то, что выброс КА в кровь у самок, перенесших ПГГЦ, сопровождается развитием окислительного стресса вплоть до полового созревания.

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

Экспериментальное исследование изменений содержания и метаболизма БА в гиппокампе и надпочечниках самок крыс, рожденных от матерей с ГГЦ, расширяет имеющиеся представления о возможных механизмах нарушения когнитивных функций при патологии пренатального развития. Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты могут лечь в основу разработки нейропротективных стратегий, направленных на ослабление или устранение действия ГГЦ на развивающийся организм.

### **Методология и методы исследования**

Исследование молекулярных механизмов реакций нервной системы в модели ПГГЦ 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,

иммуноблотинг 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. Выявленные при хронической ГЦ беременных крыс метаболические изменения в крови и мозге потомства могут быть обусловлены нарушениями функционального состояния плаценты, вызванными повышением уровня ГЦ в организме матери.

2. Одной из причин нарушений формирования различных видов памяти у половозрелых самок крыс, перенесших ПГЦ, может быть изменение метаболизма БА, а также нарушение цитоархитектуры гиппокампа.

3. Несмотря на нормализацию уровня ГЦ в крови у потомства крыс, перенесшего ПГЦ, в ходе их развития наблюдаются стойкие отдаленные нарушения, выражающиеся в разнонаправленном изменении содержания БА в гиппокампе и надпочечниках за счет изменения экспрессии ферментов метаболизма и увеличения активности MAO.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты исследования получены с помощью современных методов. Объем выборок и число независимых экспериментов позволили оценить значимость результатов после обработки с помощью адекватных методов статистического анализа. Результаты работы представлены и обсуждены на 22 конференциях, в том числе ISN-ESN meeting (Paris, France, 20-24.08.2017), FENS regional meeting (Pécs, Hungary, 20-23.09.2017), 25<sup>th</sup> 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).

## Публикации

По теме диссертации опубликовано 32 работы, из них 4 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, 28 тезисов конференций.

## Методы исследования

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

На 20-й день беременности (E20) у части самок обеих групп (n=10-12) были извлечены плоды, плаценты и надпочечники, у плодов был произведен забор ткани мозга. Также были проанализированы классические параметры развития, такие как вес плаценты на E20, масса тела эмбрионов и новорожденных и масса мозга потомства на P1-5. В надпочечниках матерей были измерены концентрации НА и АД, а также активность MAO. Был проведен анализ содержания каспазы 3 и нейрегулина 1 $\beta$  (NRG1) и активности MAO. В цельном мозге плодов была оценена концентрация НА, 5-ОТ и 5-оксииндолуксусной кислоты (ОИУК), везикулярных транспортеров моноаминов 1 и 2 (VMAT 1 и 2), каспазы 3 и NRG1.

На 3-й день беременности (E3), то есть за день до начала введения метионина или воды, на 7-й (E7), 12-й (E12) дни у крыс забирали кровь из десны для отслеживания суточной динамики концентрации ГЦ. Также на E20 для анализа ГЦ у самок собиралась кровь после декапитации. Забор крови происходил через 1, 6, 18 и 24 часа после введения метионина или воды. Для определения содержания КА у самок на 14-й день беременности брали кровь из десны как до, так и через 3 часа после введения метионина или воды.

Общее количество выживших новорожденных самок, поступивших в эксперимент, – 339. 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); одномесячные (P30); двухмесячные (P60). Всех экспериментальных животных на соответствующем сроке развития декапетировали и забирали кровь, надпочечники и мозг. У самок по достижении возраста P60 отслеживалась нормализация эстрального цикла, после чего проводилась оценка их памяти.

**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 иммунохемилюминиметре «Architect i1000» (Abbott, США).

**Определение содержания БА в гиппокампе** (цельном мозге на E20) осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием. **Количественное определение НА и АД в сыворотке крови** проводили с помощью тест-системы Cat Combi ELISA. **Удельную активность MAO** определяли колориметрическим методом. **Количественное определение уровня мРНК MAO A, тирозингидроксилазы (TH) и катехол-О-метилтрансферазы (COMT)** производилось 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 А.

**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 (ОНдГ) (Enzo Life Sciences). **Определение концентрации нитротирозина (НТ)** в сыворотке крови было произведено с помощью иммуноферментного анализа с использованием тест-системы (Hycult Biotech, Нидерланды). **Количественный анализ аскорбиновой кислоты (АсК)** в сыворотке был произведен с использованием тест-системы Vitamin C (Immundiagnostik). **Для определения активности супероксиддисмутазы (СОД)** использовали тест-систему Cayman's Superoxide Dismutase Assay Kit.

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

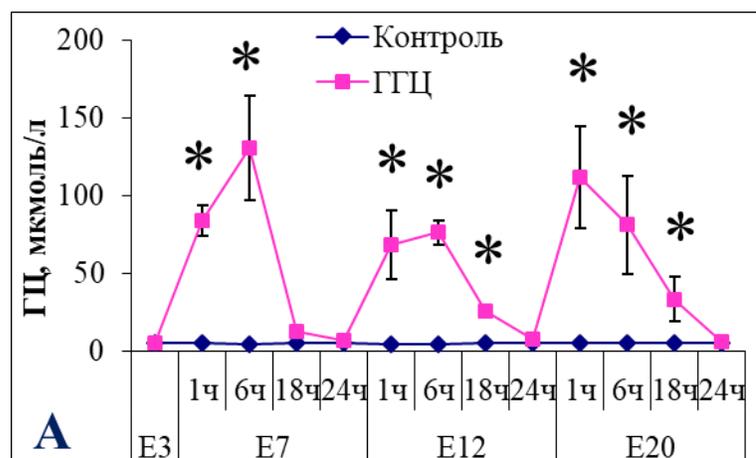
**Анализ клеточного состава в гиппокампе крыс** проводили с помощью светооптического метода Ниссля с использованием программы анализа изображений «ВидеоТест-Мастер-Морфология» (ООО «ВидеоТест», Россия).

**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 крови крыс в норме и при хроническом введении метионина практически не изучена. В связи с этим было проведено исследование, позволяющее узнать, насколько длительно повышение ГЦ в крови самок после введения метионина и как уровень ГЦ изменяется с течением беременности. Также был проведен анализ влияния ГЦ на концентрацию НА и АД в сыворотке крови и содержание данных КА, а также активность MAO в надпочечниках самок во время беременности.

В результате проведенного исследования были получены данные об эффективности создания ГЦ у беременных самок крыс с помощью введения метионина. Как видно из рисунка 1, на E7 уже через 1 час после перорального введения метионина наблюдается достоверное ( $p \leq 0,01$ ) повышение содержания ГЦ с максимальной концентрацией через 6 часов по сравнению с контрольной группой животных и снижением до контрольных значений через 18 часов.



**Рисунок 1.** Концентрация общего гомоцистеина в сыворотке крови беременных крыс до начала введения воды или метионина (E3) и через 1, 6, 18, 24 часа после введения на E7, E12 и E20. Н-критерий Крускала-Уоллеса (13, N= 79) =65,78128  $p=0,0001$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$

На E12 и E20 динамика изменений ГЦ после введения метионина имела сходный характер, однако концентрация ГЦ приходила в норму 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.

**Исследование влияния ГЦ на функциональное состояние плаценты и потомства крыс.** Несмотря на то, что плаценте принадлежит ключевая роль в адаптации материнского организма к беременности, росте и развитии плода, мало известно о том, какие процессы, характеризующие функциональное состояние плаценты, наиболее подвержены воздействию нейротоксических соединений. В связи с этим в данном эксперименте на E20 было проведена оценка массы плаценты, содержания в ней каспазы 3 и NRG1, а также проведено определение активности MAO для анализа метаболизма материнских КА. Исследование показало достоверное ( $p \leq 0,01$ ) 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 (табл. 1).

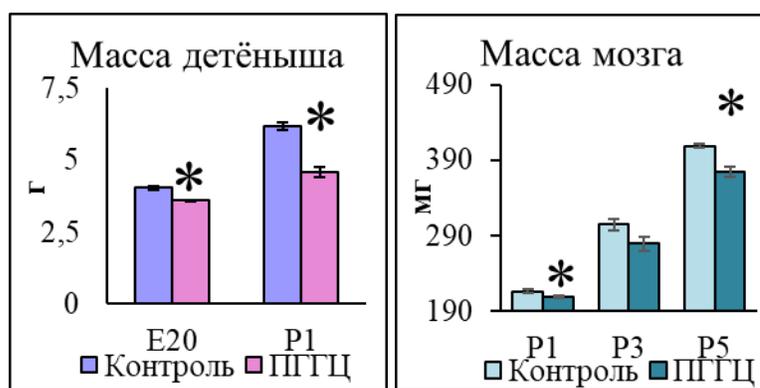
**Таблица 1.** Сравнительный анализ показателей функционального состояния плаценты

Показатель	Контрольная группа		Самки с ГЦ	
	МЧП	ПЧП	МЧП	ПЧП
Масса плаценты, г	0,61±0,02		<b>0,51±0,007**</b>	
Каспаза 3, усл. ед.	66,30±8,02	234,8±36,16	89,29±17,38	262,45±50,91
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 опытной группы от соответствующего контроля ( $p \leq 0,01$ ), \* –  $p \leq 0,05$

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 ( $p \leq 0,05$ ) снижение содержания данного ростового

фактора (табл. 1). Тем не менее ГЦ приводила к статистически значимому ( $p \leq 0,05$ ) снижению активности MAO в плаценте на E20 по сравнению с контрольными животными (табл. 1). При анализе классических параметров развития детенышей показано, что на E20 масса тела плодов с ПГГЦ была в 1,12 раза меньше, чем у потомства контрольной группы (рис. 2.А). Корреляционный анализ выявил весьма тесную связь между массой тела плода и массой плаценты на E20 в экспериментальной группе ( $r=0,246$ ,  $p \leq 0,05$ ). Масса новорожденных, матерям которых во время беременности вводили метионин, составила 74,15% от массы контрольных крысят. При исследовании массы мозга были получены данные о достоверном ( $p \leq 0,05$ ) снижении в среднем на 4% данного показателя у крысят экспериментальной группы. Масса мозга пятидневных крысят подопытной группы была на 8% меньше, чем в контроле (рис. 2.Б).



**Рисунок 2. А:** Масса тела детеныша в норме и при пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) на 20-й день беременности ( $n=80-95$ ) и на P1 ( $n=18-21$ ). **Б:** Динамика массы мозга потомства крыс в норме и после пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ) ( $n=18-42$ ). Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие опытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ )

**Исследование влияния ПГГЦ на содержание ГЦ в крови и мозге потомства.** У новорожденных животных, матери которых принудительно ежедневно в течение беременности получали метионин, уровень ГЦ был в 1,56 раза выше ( $p \leq 0,01$ ), чем у крысят контрольной группы. На 3-й день жизни концентрация ГЦ в сыворотке крови крысят экспериментальной группы была на 59% ( $p \leq 0,01$ ) выше, чем в контроле (табл. 2), а на 5-ый день жизни снижался до

контрольных величин и достоверно не отличался от них на более поздних сроках развития. Важно отметить, что в обеих группах животных уровень ГЦ достоверно ( $p < 0,01$ ) повышается к 30 дню жизни, что согласуется с данными, полученными другими исследователями [Jakubowski, 2004].

При исследовании содержания ГЦ в цельном мозге потомства на P1, P3 и P5 достоверных отличий от контрольных значений обнаружено не было (табл. 2). Тем не менее, у новорожденных крыс экспериментальной группы наблюдалась тенденция к повышению уровня ГЦ по сравнению с контролем, что может косвенно свидетельствовать о возможно более высоком уровне ГЦ в мозге эмбрионов при ГГЦ матери.

	ГЦ в сыворотке, мкМ/л		ГЦ в мозге, мкМ/мг белка	
	Контрольная группа	ПГГЦ	Контрольная группа	ПГГЦ
P1	1,84±0,13	<b>2,88±0,05*</b>	0,22±0,03	0,3±0,02
P3	2,49±0,34	<b>3,95±0,03*</b>	0,068±0,02	0,11±0,01
P5	3,22±0,29	2,99±0,13	0,21±0,01	0,14±0,05
P30	5,87±0,46	4,74±0,87	-	-
P60	4,74±0,28	5,12±0,34	-	-

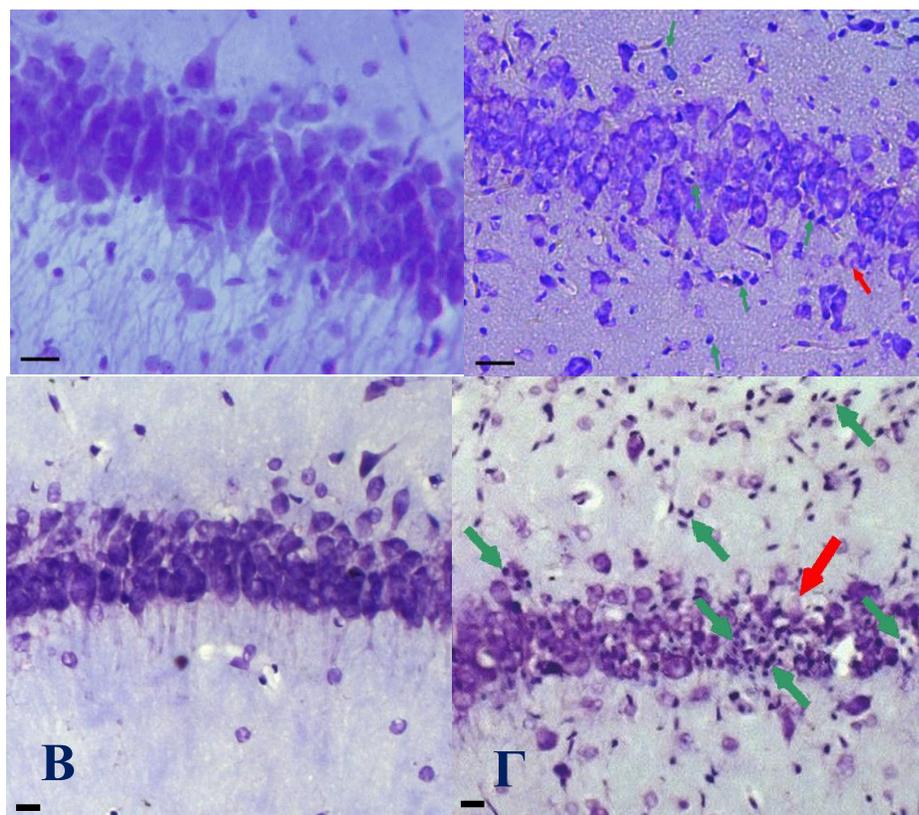
**Таблица 2.** Динамика концентрации общего гомоцистеина в сыворотке крови и мозге самок крыс различного возраста. ПГГЦ – группа с пренатальной ГГЦ. \* – достоверное отличие уровня ГЦ опытной

группы от соответствующего контроля ( $p \leq 0,01$ ). Данные представлены в виде  $M \pm m$

**Влияние ПГГЦ на апоптотические процессы в мозге потомства.** На протяжении первых 20 дней постнатального онтогенеза в гиппокампе самок крыс, перенесших ПГГЦ, наблюдалось увеличение количества клеток, дегенерирующих по типу хроматолиза, по сравнению с контролем, где такие клетки были единичны (рис. 3. А-Г). Такие клетки характеризовались набуханием тел и отростков, появлением неокрашенных областей цитоплазмы, а также дегенерацией апикальных дендритов. Большую часть таких клеток составляли крупные пирамидные нейроны пирамидного слоя аммонова рога зоны СА1 (рис. 3. Б, Г).

Также у крыс, перенесших ПГГЦ, наблюдалось снижение количества нейронов пирамидного слоя в поле СА1 (на P5 оно составляло  $76,7 \pm 5,4\%$  от

уровня интактного контроля, на P20 -  $56,2 \pm 6,6\%$ ), что свидетельствует в пользу возможности гибели нейронов в гиппокампе этих животных. К тому же был выявлен рост числа глиальных клеток в гиппокампе подопытных животных (на P5 в 1,2 раз выше чем у интактного контроля, на P20 в 2,6 раз).



**Рисунок 3.** Срезы СА1 зоны гиппокампа крыс контрольной (А) и подопытной группы (Б) на P5 (n=8). Срезы СА1 зоны гиппокампа крыс контрольной (В) и подопытной группы (Г) на P20 (n=8). Окраска крезильовым фиолетовым по Нисслю. Масштаб 20мкм. Красная стрелка – нейроны пирамидного слоя зоны СА1 гиппокампа в состоянии хроматолиза у крысы с ПГГЦ, что может свидетельствовать о гибели нейронов. Зеленая стрелка – многочисленные глиальные клетки. У животных с ПГГЦ наблюдается активация глии.

При исследовании отношения содержания фрагмента активной каспазы 3 к прокаспазе в цельном мозге плодов на E20, перенесших ПГГЦ, было выявлено статистически значимое ( $p \leq 0,05$ ) повышение данного фермента по сравнению с контрольными животными. На 5-й день постнатального развития данное отношение составило 268% от контроля. Однако на P20 и P60 при исследовании содержания каспазы 3 в гиппокампе достоверных отличий между группами обнаружено не было (табл. 3). Анализ активности каспазы 3 в цельном мозге

потомства на E20 и P5, а также в гиппокампе самок крыс на P20 не выявил значимых изменений (табл. 3).

**Таблица 3.** Показатели про- и антиапоптотических процессов в нервной ткани потомства

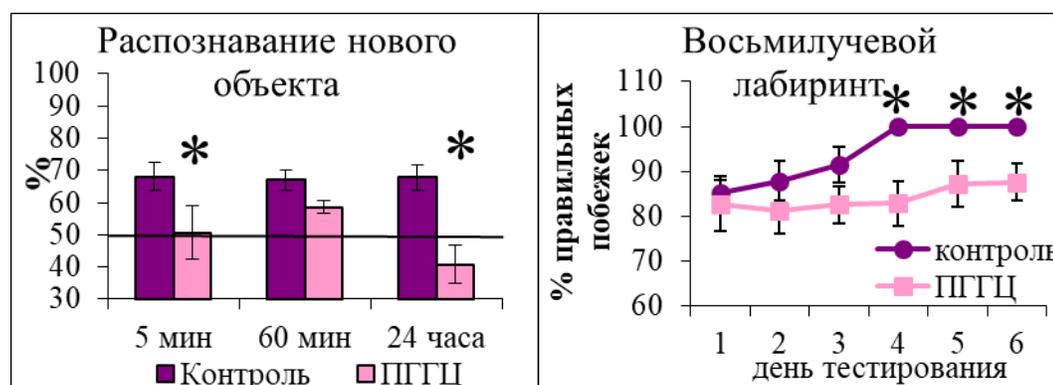
	Цельный мозг				Гиппокамп			
	E20		P5		P20		P60	
	К	ПГГЦ	К	ПГГЦ	К	ПГГЦ	К	ПГГЦ
Каспаза 3, усл. ед.	0,016±0,003	<b>0,066±0,013*</b>	0,017±0,004	<b>0,046±0,001*</b>	0,009±0,001	0,008±0,001	0,005±0,001	0,005±0,002
Активность каспазы 3, усл. ед.	8,056±0,498	8,718±0,310	14,628±0,211	13,661±1,689	5,860±0,431	6,241±0,792	-	-
NRG1, нг/мкг белка	8,277±1,158	<b>13,806±1,549*</b>	-	-	-	-	0,753±0,090	0,713±0,045
NRG1, усл. ед.	-	-	9,048±0,696	<b>20,004±3,748**</b>	6,039±1,672	10,462±2,808	-	-

Примечание: К – крысы из контрольной группы, ПГГЦ – крысы, перенесшие пренатальную ГГЦ. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \*\* – достоверное отличие опытной группы от контроля ( $p \leq 0,01$ ), \* –  $p \leq 0,05$

Исследование содержания NRG1 выявило его повышение в ткани мозга плодов на E20, матери которых потребляли метионин, в 1,66 по сравнению с плодами контрольной группы. Также на P5 обнаружено повышение в 2,21 раза содержания NRG1 в цельном мозге крысят подопытной группы. Как видно из данных, приведенных в таблице 3, в гиппокампе крыс, перенесших ПГГЦ, на P20 и P60 достоверных изменений данного нейротрофического фактора обнаружено не было.

**Влияние ПГГЦ на когнитивные функции самок крыс.** При исследовании поведения в тесте «Распознавание новых объектов» было показано, что половозрелые контрольные самки тратили больше ( $p < 0,05$ ) времени на исследование новых объектов как при тестировании через 5 минут, так и через 24 часа. У крыс, перенесших ПГГЦ, не наблюдалось предпочтения обследованию новых объектов (рис. 4.A). Данные свидетельствуют о том, что у животных, матерям которых вводили метионин во время беременности, происходит нарушение кратковременной и долговременной памяти.

При исследовании рабочей памяти в восьмилучевом лабиринте было обнаружено, что процент правильных посещений кормушек у животных, перенесших ПГГЦ, был достоверно ( $p < 0,05$ ) снижен, начиная с 4-го дня тестирования, и на 6-й день составлял  $87,64 \pm 4,01\%$  по сравнению с контролем (100%) (рис. 4.Б), что также может свидетельствовать о нарушении процессов кратковременной памяти. Положительная динамика обучения с достоверным ( $\chi^2 = 14,91$ ,  $p = 0,01$ ) снижением количества ошибочных побегок наблюдалась в контрольной группе крыс, однако отсутствовала в группе крыс, перенесших ПГГЦ ( $\chi^2 = 2,40$ ,  $p = 0,79$ ).



**Рисунок 4. А:** Длительность распознавания новых объектов через 5, 60 мин и 24 ч после тренировочного предъявления пары объектов. Ордината:  $M \pm m$  времени распознавания нового объекта, выраженная в процентах от общего времени исследования известного и нового объектов ( $n = 10-12$ ). **Б:** Влияние ПГГЦ на поведение взрослых самок крыс в 8-лучевом радиальном лабиринте. Ордината:  $M \pm m$  числа правильных посещений рукавов 8-лучевого лабиринта, выраженное в процентах от общего числа посещений ( $n = 10-12$ ). \* – достоверное отличие подопытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ )

**Влияние ПГГЦ на содержание БА в мозге плодов на E20.** Результаты анализа БА в ткани мозга плодов крыс не показали статистически значимого изменения относительного содержания НА, 5-ОТ и 5-ОИУК у крыс, перенесших ПГГЦ, по сравнению с контролем (табл. 4).

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

**Таблица 4.** Содержание БА и VMAT1 и 2 в цельном мозге плодов на E20. ПГГЦ – плоды с пренатальной ГГЦ. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие опытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ )

Несмотря на это, в ткани мозга плодов, матерям которых вводили метионин, обнаружено повышение ( $p < 0,05$ ) содержания характерного для мозга везикулярного переносчика моноаминов VMAT2 (табл. 4).

**Влияние ПГГЦ на метаболизм БА в гиппокампе самок крыс.** Исследование показало статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение содержания НА, 5-ОТ и 5-ОИУК у половозрелых крыс, перенесших ПГГЦ, по сравнению с контрольной группой. При этом на более ранних сроках постнатального развития (P20 и P30) достоверных отличий между группами обнаружено не было. Для выявления возможных причин снижения БА была проанализирована экспрессия мРНК TH, MAO и COMT, ключевых ферментов метаболизма БА (табл. 5).

**Таблица 5.** Показатели метаболизма БА в гиппокампе самок крыс

	P20		P30		P60	
	Контроль	ПГГЦ	Контроль	ПГГЦ	Контроль	ПГГЦ
НА, нг/мг белка	2,30±0,21	1,91±0,21	1,95±0,19	2,15±0,23	5,31±0,98	<b>2,55±0,26*</b>
5-ОТ, нг/мг белка	13,62±0,45	14,80±1,10	9,20±0,54	9,42±0,95	22,32±3,39	<b>12,23±2,11*</b>
ОИУК, нг/мг белка	23,31±2,00	24,42±1,51	13,74±1,72	11,46±1,56	25,32±2,94	<b>15,52±1,85*</b>
VMAT1, усл. ед.	-	-	-	-	2,11±0,52	4,56±1,25
VMAT2, усл. ед.	-	-	-	-	12,23±2,95	22,23±9,04
ΔCt TH	-	-	11,66±0,28	11,93±0,30	11,81±0,26	11,31±0,37
ΔCt MAO	-	-	<b>6,52±0,28*</b>	8,59±1,05	6,54±0,30	6,72±0,22
ΔCt COMT	-	-	4,78±0,41	4,54±0,38	4,58±0,44	4,32±0,40
Активность MAO, мкМ кин/мг белка*час	-	-	1,41±0,13	<b>1,90±0,07*</b>	0,38±0,04	<b>0,66±0,11*</b>

Примечание: Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие опытной группы от соответствующего контроля ( $p \leq 0,05$ )

Было обнаружено, что экспрессия мРНК MAO значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивается в гиппокампе самок крыс, перенесших ПГГЦ, на P30 в 1,31 раза, однако изменений в гиппокампе животных на P60 не наблюдалось. Самки на P30 и P60 с ПГГЦ также не показали достоверных изменений в уровнях экспрессии

мРНК TH и COMT. При исследовании содержания переносчиков моноаминов VMAT1 и 2 статистически значимых изменений в гиппокампе самок крыс подопытной группы на P60 обнаружено не было (табл. 5). Также обнаружено значительное ( $p < 0,05$ ) увеличение активности MAO в гиппокампе самок крыс после ПГГЦ на P30 на 35% и на P60 на 72% (табл. 5).

**Влияние ПГГЦ на метаболизм КА в надпочечниках самок крыс.** В надпочечниках крыс 30-го дня жизни, перенесших ПГГЦ, было выявлено достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение содержания НА в 1,72 раза (табл. 6). В то же время анализ сыворотки крови самок на P30 показал статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение НА в среднем на 43% (табл. 6). Сходные изменения сохраняются также у животных 60-го дня жизни (152% от контроля). Анализ АД у крыс, перенесших ПГГЦ, выявил достоверные ( $p < 0,05$ ) повышение данного показателя в надпочечниках животных с 10-го по 30-й дни жизни с одновременным увеличением уровня АД в сыворотке крови (табл. 6).

При исследовании содержания везикулярных транспортеров моноаминов в надпочечниках крыс было вычислено отношение VMAT1/VMAT2, которое может меняться при стрессовых воздействиях [Sabban et al., 2012]. В данной работе было обнаружено увеличение ( $p < 0,05$ ) обозначенного выше отношения у новорожденных крыс, перенесших ПГГЦ, в 2,48 раза (табл. 6).

В надпочечниках крыс на P30, матерям которых вводили метионин, было отмечено достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение в 2,04 раза экспрессии мРНК TH и экспрессии мРНК COMT в 1,68 раза, однако у половозрелых самок статистически значимых изменений не наблюдалось (табл. 6). Исследование экспрессии мРНК MAO не выявило достоверных отличий у самок на P30 и P60 (табл. 6). Для оценки скорости биосинтеза АД в надпочечниках самок крыс было вычислено отношение АД/НА, характеризующее активность фенилэтанолламин-N-метилтрансферазы, которое было повышено ( $p < 0,05$ ) в среднем на 76% у подопытной группы крыс на P30 (табл. 6).

Таблица 6. Возрастная динамика показателей метаболизма КА в надпочечниках и сыворотке крови самок крыс

			P1	P5	P10	P20	P30	P60
НА, мкг/мг белка	Надпочечники	Контроль	0,20±0,03	0,25±0,04	0,23±0,04	0,51±0,09	1,02±0,17	0,73±0,08
		ПГГЦ	0,21±0,03	0,23±0,02	0,30±0,03	0,52±0,07	<b>0,59±0,05*</b>	0,60±0,04
	Сыворотка	Контроль	-	1,21±0,18	1,40±0,32	2,56±0,35	1,25±0,18	1,31±0,13
		ПГГЦ	-	1,32±0,32	1,46±0,15	<b>1,71±0,20*</b>	<b>1,79±0,11*</b>	<b>1,99±0,28*</b>
АД, мкг/мг белка	Надпочечники	Контроль	0,61±0,06	1,44±0,16	1,14±0,22	2,05±0,14	2,44±0,17	3,16±0,21
		ПГГЦ	0,64±0,06	1,33±0,12	<b>1,85±0,18*</b>	<b>2,62±0,11*</b>	<b>3,29±0,36*</b>	3,04±0,22
	Сыворотка	Контроль	-	1,53±0,22	1,78±0,30	3,20±0,23	3,35±0,30	5,75±0,59
		ПГГЦ	-	<b>2,41±0,33*</b>	<b>3,21±0,40*</b>	<b>4,90±0,49*</b>	<b>4,79±0,49*</b>	4,71±0,82
VMAT1/2, усл. ед.	Надпочечники	Контроль	0,19±0,02	0,53±0,09	0,70±0,16	1,31±0,41	0,56±0,22	-
		ПГГЦ	<b>0,47±0,07*</b>	0,73±0,26	0,59±0,04	0,90±0,06	0,63±0,17	-
ΔCt TH	Надпочечники	Контроль	-	-	-	-	4,44±0,36	2,28±0,30
		ПГГЦ	-	-	-	-	<b>2,16±0,70*</b>	2,88±0,38
ΔCt MAO	Надпочечники	Контроль	-	-	-	-	6,93±0,18	7,00±0,39
		ПГГЦ	-	-	-	-	7,11±1,12	6,78±0,74
ΔCt COMT	Надпочечники	Контроль	-	-	-	-	5,02±0,38	4,29±0,36
		ПГГЦ	-	-	-	-	<b>2,98±0,38*</b>	3,63±0,75
АД/НА	Надпочечники	Контроль	-	-	-	-	2,87±0,34	4,75±0,21
		ПГГЦ	-	-	-	-	<b>5,06±0,51*</b>	5,15±0,23
Активность MAO, мкМ кин/мкг белка*час	Надпочечники	Контроль	0,05±0,01	-	-	-	0,43±0,05	0,35±0,08
		ПГГЦ	0,07±0,01	-	-	-	<b>0,63±0,08*</b>	<b>0,61±0,10*</b>

Примечание: НА – норадреналин, АД – адреналин, ПГГЦ – самки крыс, перенесшие пренатальную ГГЦ. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \* – достоверное отличие опытной группы от контроля ( $p \leq 0,05$ )

Исследование удельной активности МАО в надпочечниках новорожденных крысят не выявило значимых различий (табл. 6). На P30 и P60 было обнаружено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение активности фермента у крысят, перенесших ПГЦ, по сравнению с контрольными животными.

**Влияние ПГЦ на показатели окислительного стресса.** Для оценки окислительного повреждения белков был проведен анализ уровня содержания НТ в сыворотке крови крысят, согласно которому уровень данного маркера окислительной модификации белков в сыворотке крови крыс после ПГЦ оказался в 2 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе, на P30 и в 1,9 раза на P60 (табл. 7).

Таблица 7. Показатели окислительного стресса в сыворотке крови крыс

	P1		P30		P60	
	Контроль	ПГЦ	Контроль	ПГЦ	Контроль	ПГЦ
ОНдГ, нг/мл			37,86± 2,32	44,69± 2,76	24,52± 1,45	22,78± 1,89
НТ, нМ			7,26± 1,37	<b>14,74±</b> <b>2,23*</b>	8,74± 1,01	<b>16,99±</b> <b>2,85*</b>
Аск. к-та, мг/л			21,4± 1,23	<b>16,9±</b> <b>0,94*</b>	12,8± 0,88	13,0± 0,89
Активность СОД, U/мл	0,32± 0,05	<b>0,19±</b> <b>0,04**</b>	0,62± 0,14	0,48± 0,10	0,19± 0,06	<b>0,41±</b> <b>0,07**</b>

Примечание: U – условная единица активности. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , \*\* – достоверное отличие опытной группы от соответствующего контроля ( $p \leq 0,01$ ), \* –  $p \leq 0,05$

Для оценки окислительного повреждения ДНК был выбран такой показатель, как ОНдГ, уровень которого в сыворотке крови крыс, перенесших ПГЦ, на P30 достоверно не отличался от уровня в контрольной группе, однако наблюдается тенденция к его повышению (табл. 7). На P60 различий в этом показателе между группами также выявлено не было. В качестве показателей антиоксидантной системы были выбраны такие параметры, как содержание АсК и активность СОД. Согласно полученным результатам на P30 концентрация АсК в сыворотке крови крыс, перенесших ПГЦ, оказалась ниже контрольных

значений ( $p < 0,05$ ), однако к двухмесячному возрасту описанные выше изменения исчезают (табл. 7).

Исследование активности СОД в сыворотке крови новорожденных крысят показало достоверное ( $p < 0,01$ ) снижение данного показателя у животных, перенесших ПГГЦ (табл. 7). К 30-му дню жизни описанные изменения имеют лишь характер тенденции. Интересно отметить, что данный показатель к P60 у крыс, матерям которых вводили метионин, растет и превышает нормальные значения более чем в 2 раза ( $p < 0,01$ ).

### **Заключение**

В данной работе впервые показаны суточные изменения содержания ГЦ в крови беременных крыс с пероральным введением метионина на различные сроки беременности. Любопытным остается тот факт, что скорость нормализации содержания ГЦ ухудшается с течением беременности или с увеличением продолжительности введения, приводя к истощению защитных резервов организма матери и плаценты. Полученные в данной работе результаты о снижении в материнской части плаценты содержания нейротрофического фактора NRG1 дают основание предполагать наличие нарушений, приводящих к риску развития патологии плода при ПГГЦ. Поскольку системы моноаминов играют важную роль в регуляции жизнедеятельности трофобласта и дифференцировки клеток плода, снижение активности MAO при повышенном уровне ГЦ может быть признаком серьезных нарушений барьерных функций плаценты. Также в данной работе показано быстрое восстановление нормального уровня ГЦ в онтогенезе потомства в отсутствие поступления экзогенного метионина. Несмотря на это, негативное воздействие ПГГЦ на мозг потомства подкрепляется полученными результатами морфологических исследований гиппокампа крысят, показавших увеличение дегенерирующих нейронов и количества глии, а также нарушением баланса проапоптотического белка каспазы 3 и нейропротективного NRG1. Выявленные изменения клеточного состава

гиппокампа могут быть объяснением наблюдаемых в данном исследовании когнитивных дисфункций у самок крыс, перенесших ПГГЦ. Однако возможной причиной подобных нарушений также может быть изменение нейромедиаторной передачи в нервной ткани вследствие недостаточности биогенных аминов из-за увеличения экспрессии и активности МАО у самок крыс. Исследование АД в надпочечниках показало повышение его уровня вследствие нарушения экспрессии TH и SOMT и активности МАО, а также повышение данного КА в крови у животных подопытной группы, что может служить основой развития тревожного состояния и ошибок в обучении. Выброшенные в кровь КА кроме чрезмерного воздействия на сердечно-сосудистую систему, также могут подвергаться спонтанному окислению, которое в свою очередь может приводить к образованию кислородных радикалов и цитотоксических хинонов [Biasetti, Dawson, 2002]. Данное утверждение подкрепляется полученными в настоящем исследовании результатами о нарушении про- и антиоксидантной системы у самок крыс, перенесших ПГГЦ.

Таким образом, повышение уровня ГЦ у матери во время беременности оказывает существенное негативное влияние на развивающийся плод за счет нарушения функционального состояния плаценты, что является причиной когнитивных дисфункций, изменения клеточного состава гиппокампа и баланса биогенных аминов в организме потомства при постнатальной жизни.

### **Выводы**

1. Хроническая ГГЦ беременных крыс, вызванная введением метионина, приводит к повышению содержания ГЦ в сыворотке крови крысят до 3-го дня жизни и восстановлению его нормальных значений к P5. ПГГЦ не приводит к повышению уровня ГЦ в мозге потомства крыс.

2. В сыворотке крови и надпочечниках беременных самок при ГГЦ не наблюдается достоверного изменения НА и АД, в то время как в плаценте обнаружено снижение активности МАО, что указывает на нарушение

проницаемости плаценты к моноаминам, а также снижение содержания нейротрофического фактора NRG1. У плодов в мозге обнаружено повышение VMAT2, ответственного за перенос в везикулы биогенных аминов, которое, однако, не сопровождается изменением их содержания.

3. ПГГЦ приводит к достоверному снижению массы тела плода и новорожденного и мозга потомства вплоть до 5-го дня жизни. На ранних сроках развития в мозге наблюдается повышение содержания активной формы каспазы 3 и NRG1. При этом на протяжении первых 20-и дней постнатального онтогенеза в гиппокампе самок крыс, перенесших ПГГЦ, увеличивается число дегенерирующих нейронов, а также рост числа глиальных клеток.

4. Несмотря на то, что в гиппокампе самок крыс, перенесших ПГГЦ, на P20-30 не наблюдается изменений в содержании НА, 5-ОТ и ОИУК, у половозрелых крыс (P60) отмечено их снижение, связанное с увеличением экспрессии и активности MAO.

5. У половозрелых самок крыс, перенесших ПГГЦ, выявлено нарушение кратковременной, долговременной и пространственной памяти, что может быть обусловлено как изменениями в формировании гиппокампа, так и изменением в нем содержания биогенных аминов.

6. В надпочечниках крыс, перенесших ПГГЦ, на P10-30 обнаружено достоверное повышение содержания АД и снижение НА (на P30) с одновременным повышением их концентрации в сыворотке крови, что коррелирует с выявленными изменениями экспрессии ферментов их метаболизма (ТН и СОМТ) и повышением активности MAO.

7. У потомства крыс после ПГГЦ наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов в сыворотке крови, приводящая к повышению содержания продуктов окислительной модификации белков, а также изменению уровня АсК и активности СОД.

## Список работ, опубликованных по теме исследования

### Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Милютинa, Ю.П. Содержание катехоламинов в надпочечниках крыс, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию / Ю.П. Милютинa, A.B. Арутюнян, A.B. Пустыгина, **А.Д. Щербицкая**, И.В. Залозная, И.И. Зорина // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2014. –Т.100. – №3. – С. 360-369.
2. Милютинa, Ю.П. Сравнение показателей окислительного стресса в сыворотке крови крыс при различных моделях гипергомоцистеинемии / Ю.П. Милютинa, A.B. Пустыгина, **А.Д. Щербицкая**, И.В. Залозная, A.B. Арутюнян // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – Т. 1. – №3 (II). – С. 120-123.
3. **Щербицкая, А.Д.** Влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на формирование памяти и содержание биогенных аминов в гиппокампе самок крыс / **А.Д. Щербицкая**, Ю.П. Милютинa, И.В. Залозная, A.B. Арутюнян, Н.Н. Наливаева, И.А. Журавин // Нейрохимия. – 2017. – Т. 34. – № 4. – С. 296–302.
4. **Shcherbitskaya, A.D.** The Effects of Prenatal Hyperhomocysteinemia on the Formation of Memory and the Contents of Biogenic Amines in the Rat Hippocampus / **A.D. Shcherbitskaya**, Yu.P. Milyutina, I.V. Zaloznyaya, A.V. Arutjunyan, N.N. Nalivaeva, I.A. Zhuravin // Neurochemical Journal. – 2017. – Vol. 11. – No. 4. – pp. 296–301.
5. Милютинa, Ю.П. Метаболические нарушения в плаценте и мозге плодов беременных крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии / Ю.П. Милютинa, **А.Д. Щербицкая**, Е.Д. Салтыкова, Л.С. Козина, И.А. Журавин, Н.Н. Наливаева, A.B. Арутюнян // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103. – № 11. – С. 1280-1291.