

УДК 577.2.04, 577.122.38, 577.122.5, 618.3-06, 612.64, 611.81.013

## НЕЙРОТРОФИНЫ МОЗГА ПЛОДА И ПЛАЦЕНТЫ ПРИ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ\*

© 2020 А.В. Арутюнян<sup>1\*\*</sup>, Ю.П. Милютин<sup>1</sup>, А.Д. Щербицкая<sup>2</sup>,  
Г.О. Керкешко<sup>1</sup>, И.В. Залозня<sup>1</sup>, А.В. Михель<sup>1</sup>

<sup>1</sup> НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,  
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: alexarutiunjan@gmail.com

<sup>2</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 25.09.2019

После доработки 28.10.2019

Принята к публикации 11.11.2019

Пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ) вызывали путем хронической метиониновой нагрузки во время беременности крыс, что приводило к значительному повышению уровня гомоцистеина не только в крови самок, но и крови и мозге их плодов. При проведении морфометрических исследований на 20-й день беременности отмечалось существенное уменьшение массы плаценты, плодов и их мозга. Установлено, что ПГГЦ приводит к активации материнской иммунной системы, сопровождающейся увеличением содержания провоспалительного IL-1 $\beta$  в крови самок крыс и плодной части плаценты. ПГГЦ вызывала увеличение содержания предшественников нейротрофических факторов BDNF (29 кДа) и NGF (31 кДа) и снижение уровня нейрегулина NRG1 в плаценте, а также увеличение содержания изоформы BDNF (29 кДа) и NRG1 в мозге плодов. В мозге плодов, перенесших ПГГЦ, было обнаружено также повышение активности каспазы-3. Предполагается, что изменение процессинга нейротрофинов при ПГГЦ, наряду с окислительным стрессом и инициируемым им воспалительным процессом, а также апоптозом, играет важную роль в нарушениях развития мозга потомства.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** пренатальная гипергомоцистеинемия, нейротрофические факторы, провоспалительные цитокины, плацента, мозг плодов.

DOI: 10.31857/S0320972520020086

Пренатальная гипергомоцистеинемия (ПГГЦ) относится к числу факторов, приводящих к изменению структуры и функции различных клеток, систем органов и путей гомеостаза развивающегося организма, повышая риск возникновения в дальнейшем различных патологических состояний. Несмотря на то, что ключевая роль в

адаптации материнского организма к беременности, росте и развитии плода принадлежит плаценте, достаточно мало известно, какие процессы, характеризующие ее функциональное состояние, наиболее подвержены воздействию нейротоксических соединений, вызывающих нарушения развития нервной системы в раннем неонатальном периоде и зачастую проявляющихся впоследствии у детей и взрослых в виде тяжелых неврологических и психических заболеваний (аутизм, шизофрения) [1–3].

В последнее время расширяется круг исследований, посвященных изучению роли в плаценте нейротрофических факторов, участвующих в формировании нервной системы плода. Известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF) и фактор роста нервов (NGF) принимают участие в жизненно важных процессах роста и дифференциации нейронов центральной и периферической нервной системы развивающегося плода [4–7]. Внимание исследователей, наряду с BDNF и NGF, привлекает изучение нейрегулинов, выполняющих нейротрофическую

Принятые сокращения: BDNF – нейротрофический фактор мозга; IL-1 $\beta$  – интерлейкин-1 $\beta$ ; IL-6 – интерлейкин-6; NGF – фактор роста нервов; NRG1 – нейрегулин 1; p75NTR – рецептор p75 нейротрофинов; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; АФК – активные формы кислорода; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; ГЦ – гомоцистеин; E3 – 3-й день беременности; E7 – 7-й день беременности; E12 – 12-й день беременности; E20 – 20-й день эмбрионального развития; МЧП – материнская часть плаценты; ОС – окислительный стресс; ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия; ПЧП – плодная часть плаценты.

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ19-137, 16.12.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

функцию при развитии плода и новорожденного [8, 9].

Нарушения функций мозга плода под влиянием гомоцистеина (ГЦ) могут быть также связаны с повышением уровня в крови матери провоспалительных цитокинов, способных проникать через фетоплацентарный барьер и вызывать долгосрочные нарушения развития мозга у потомства. Эффект провоспалительных цитокинов обычно опосредован изменением под их влиянием содержания нейротрофических факторов, причем не только в мозге плода, но и в плаценте, где эти факторы, как предполагается, оказывают цитопротекторное действие [4–7].

Целью данной работы было изучение динамики развития ПГГЦ при хронической метиониновой нагрузке крыс и выяснение, какое воздействие оказывает она на содержание провоспалительных цитокинов и наиболее значимых в формировании нервной системы плода нейротрофических соединений (BDNF, NGF, а также нейрегулин 1, NRG1) в плаценте и мозге эмбрионов.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использованы беременные самки крыс линии Вистар (5–6 мес.), которые были разделены на 2 группы. Первая группа состояла из животных, находившихся на стандартном рационе, и их плодов, взятых на 20-й день эмбрионального развития (E20). Вторую группу составили самки крыс, получавшие метиониновую нагрузку на фоне стандартного рациона, и их плоды на тот же день эмбрионального развития. У самок крыс анализировали плаценту и сыворотку крови, у плодов – цельный мозг. При проведении работ использовали разработанный нами ранее метод моделирования гипергомоцистеинемии (ГГЦ) матери, основанный на дозированной метиониновой нагрузке, создаваемой путем принудительного перорального введения экспериментальным животным 0,15%-го водного раствора L-метионина (0,10–0,15 г в расчете на животное, ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения до родоразрешения) [10]. Состояние ГГЦ оценивали путем определения содержания общего L-ГЦ в сыворотке крови самок крыс на иммунохемилюминесцентном анализаторе «Architect i1000» («Abbott», США) через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина. Для отслеживания суточной динамики концентрации ГЦ в крови на 3-й (E3, т.е. до начала введения метионина или воды), 7-й (E7), 12-й (E12) дни беременности у самок забирали кровь из десны [11] и на 20-й день (E20) после декапитации. На E20 у самок обеих

групп были извлечены плоды и плаценты, у плодов был произведен забор ткани мозга и крови в те же временные интервалы после введения метионина или воды. Были проанализированы классические параметры развития, такие как масса плаценты, масса тела и мозга эмбрионов на E20. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (2000 g 10 мин) и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  до начала анализа. Перед началом анализа плаценту отмывали от крови в 0,001M фосфатном буфере (pH 7,4) и разделяли на материнскую (МЧП) и плодную (ПЧП) части.

Содержание провоспалительных цитокинов определяли твердофазным ИФА методом с использованием тест-систем Quantikine Rat IL-6, Quantikine Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine Rat TNF- $\alpha$  («R&D Systems», США), предназначенных для определения крысиного интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) в супернатантах, сыворотке и плазме крови.

Определение содержания NRG1 в плаценте и цельном мозге плодов проводили с помощью тест-системы NRG1-beta 1 ELISA Kit («RayBiotech», США) согласно протоколу производителя.

Для проведения Вестерн-блот анализа гомогенаты тканей мозга и плаценты готовили на 0,001 M фосфатном буфере (pH 7,4) в соотношении 1 к 2 (*m/V*) в стеклянном гомогенизаторе, затем центрифугировали 16 000 g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [12]. Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану. Мембраны блокировали раствором 2%-го альбумина («Sigma-Aldrich Chem. Co.», США) в растворе TBST (50 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Содержание BDNF выявлялось с помощью специфичных первичных антител Anti-BDNF antibody [EPR1292] (rabbit Ab 1:1000, «Abcam», США). Чтобы оценить относительные концентрации NGF в исследуемых образцах, мы использовали Anti-NGF antibody [EP1320Y] (rabbit Ab 1:1000, «Abcam»), которые распознают иммунореактивные формы NGF ~ 30 кДа. После инкубации с соответствующими HRP-конъюгированными козьими антителами (1:1000, «BioRad», США), сигналы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL «BioRad»). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблоттинга, определяли с помощью программного обеспечения ImageLab. Руководствуясь существующими рекомендациями по процедуре нормализации со-

держания белка-мишени [13], полученные данные были нормализованы по глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit Ab, 1:1000, Cell Signaling) и содержанию общего белка в геле, определяемого с помощью технологии *stain-free* («BioRad») согласно инструкции производителя.

Для анализа активности каспазы-3 был использован буфер (20 мМ HEPES; 0,1%-ный CHAPS; 2 мМ EDTA, 5 мМ DTT, pH 7,4). В качестве субстрата использовали 4 мМ раствор синтетического пептида Ac-DEVD-pNA (ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-p-нитроанилид). Пробы, содержащие 120 мкг белка, инкубировали в термостате при 37 °С 10 мин, измерили оптическую плотность при 405 нм, после добавления субстрата инкубировали планшет при 37 °С и измеряли оптическую плотность при 405 нм через каждые 5 мин в течение 25 мин. Активность каспазы выражается в мкмоль продукта реакции pNA/мин/мг белка.

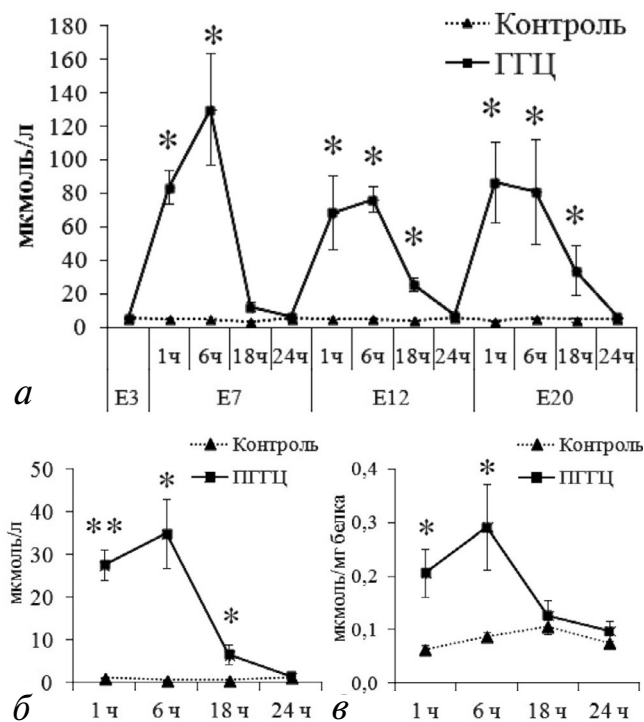
Статистическая обработка осуществлена с использованием программы STATISTICA 10.0 («StatSoft», США). Для сравнения изучаемых показателей применяли непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни либо параметрический *t*-тест для независимых выборок. Характер распределения данных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM или Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили) по меньшей мере шести независимых экспериментов. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

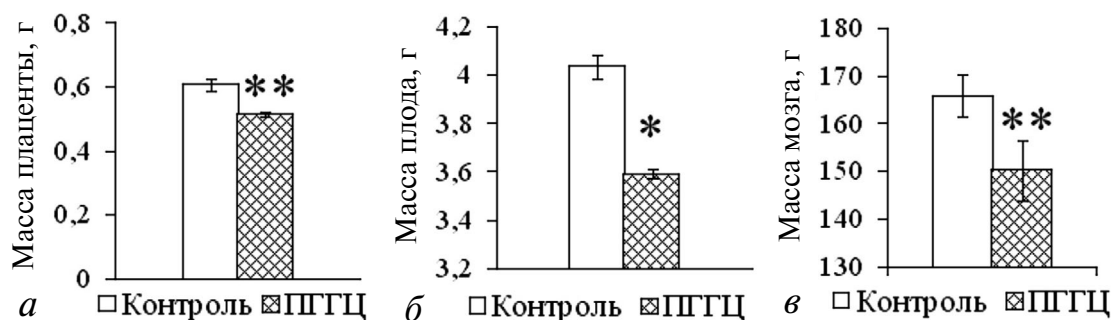
Как показали проведенные исследования, использованная нами модель метиониновой нагрузки приводит к повышению содержания уровня ГЦ в крови беременных самок крыс, крови и мозге плодов (рис. 1). На E3, до начала введения воды (контроль) или метионина, уровень ГЦ в сыворотке крови самок составлял  $5,7 \pm 0,37$  мкмоль/л в контрольной группе и  $5,7 \pm 0,70$  мкмоль/л в подопытной группе крыс. На E7 у самок крыс забирали кровь через 1, 6, 18 и 24 ч после введения метионина. Как видно из рис. 1, а, уже через 1 ч после перорального введения метионина наблюдается значимое ( $p \leq 0,01$ ) повышение содержания ГЦ с максимальной концентрацией через 6 ч ( $130,60 \pm 33,48$  мкмоль/л) по сравнению с контрольной группой животных ( $5,23 \pm 0,10$  мкмоль/л). Однако к 18-ти часам уровень ГЦ в крови крыс подопытной группы снижается до контрольных значений и составляет ( $5,46 \pm 0,14$  мкмоль/л). На E12 и E20 динамика изменений повторяется, однако концентрация ГЦ приходит к норме значительно позже – только к 24-м часам после введения метионина. Таким образом, максимальный уровень ГЦ, превышающий контрольный в десятки раз, наблюдался у беременных самок крыс через 1–6 ч после введения метионина.

Хроническое введение крысам при беременности метионина вызывало повышение уровня ГЦ после каждого сеанса метиониновой нагрузки не только в крови матерей, но и в крови и мозге их плодов на E20. Уровень ГЦ быстро достигал максимальных значений (через 1–6 ч), затем постепенно снижался, становясь через 24 ч статистически не отличимым от контрольных значений (рис. 1, б, в).

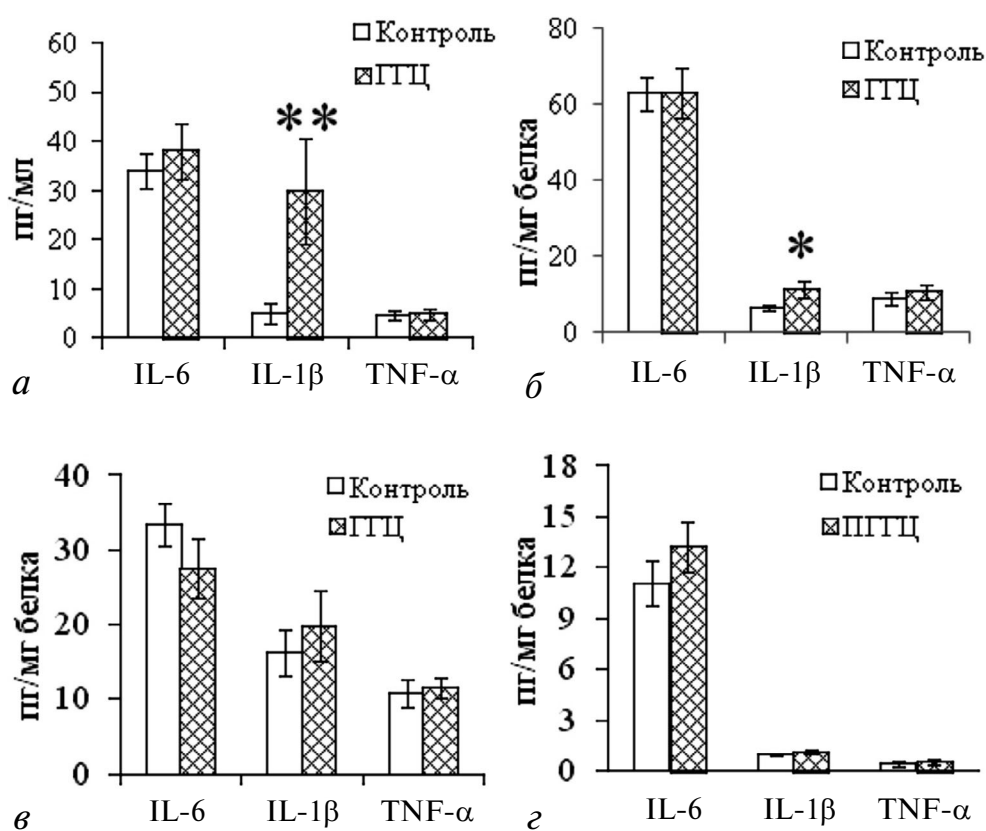
Наряду с повышением уровня ГЦ в крови при ПГГЦ наблюдалось изменение морфометрических показателей. На E20 было зарегистрировано уменьшение массы плаценты и массы



**Рис. 1.** Суточная динамика содержания ГЦ через 1 ч, 6 ч, 18 ч и 24 ч после приема беременными самками метионина (ГГЦ) или воды (контроль). *а* – Суточная динамика содержания ГЦ в сыворотке крови беременных самок крыс на третий (E3), седьмой (E7), двенадцатый (E12) и двадцатый (E20) день беременности ( $n = 5-7$ ); *б* – суточная динамика содержания ГЦ в сыворотке крови плодов на E20 ( $n = 4-6$ ) (ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия); *в* – суточная динамика содержания ГЦ в мозге плодов на E20 ( $n = 4-6$ ) (ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия); \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего ( $M \pm SEM$ )



**Рис. 2.** Масса плаценты на 20-й день беременности ( $n = 80$ ) (а), плода на E20 ( $n = 80$ ) (б) и мозга плода на E20 ( $n = 80$ ) (в) в контрольной группе (Контроль) и в группе с пренатальной гипергомоцистеинемией (ПГГЦ); \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и ошибка среднего ( $M \pm SEM$ )

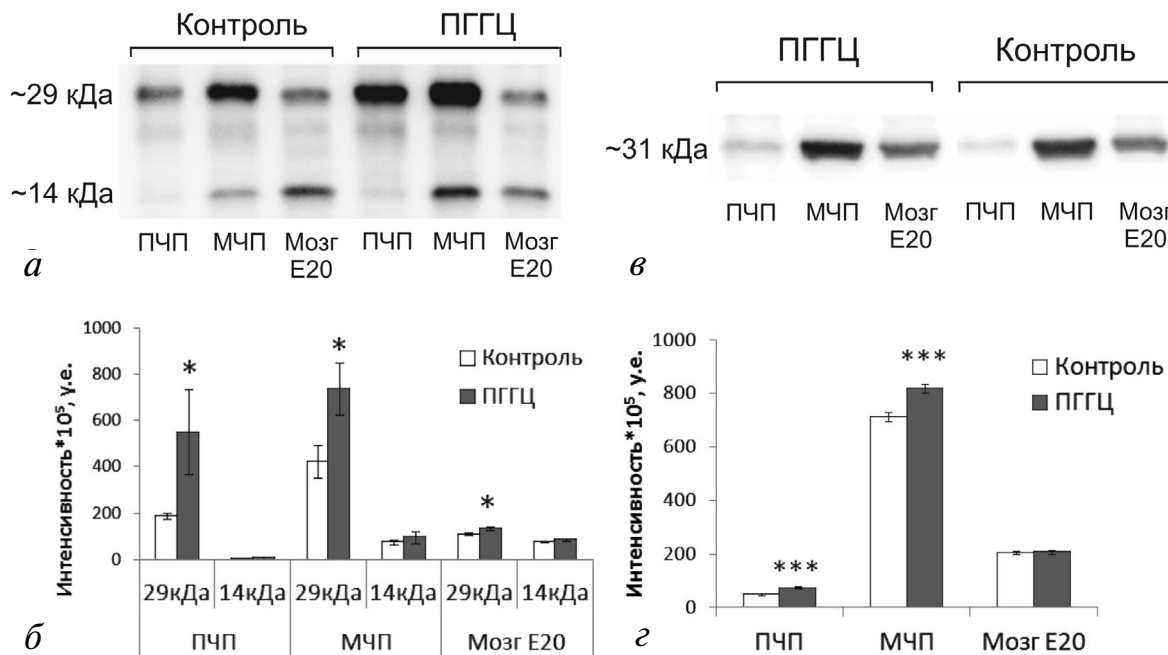


**Рис. 3.** Содержание провоспалительных цитокинов в сыворотке крови беременных самок крыс ( $n = 13$ ) (а), в плодной части плаценты самок крыс на 20-й день беременности ( $n = 13$ ) (б), в материнской части плаценты самок крыс на 20-й день беременности ( $n = 13$ ) (в) в контрольной группе (контроль) и у крыс с экспериментальной гипергомоцистеинемией (ПГЦ). Содержание провоспалительных цитокинов в мозге плодов на E20 (г) в контрольной группе (контроль) и в группе, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемия (ПГГЦ); \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ )

плодов при ПГГЦ ( $p < 0,001$ ). Следует особо подчеркнуть, что были получены данные о значимом снижении массы мозга плодов, подвергшихся влиянию ПГГЦ, почти на 10% (рис. 2).

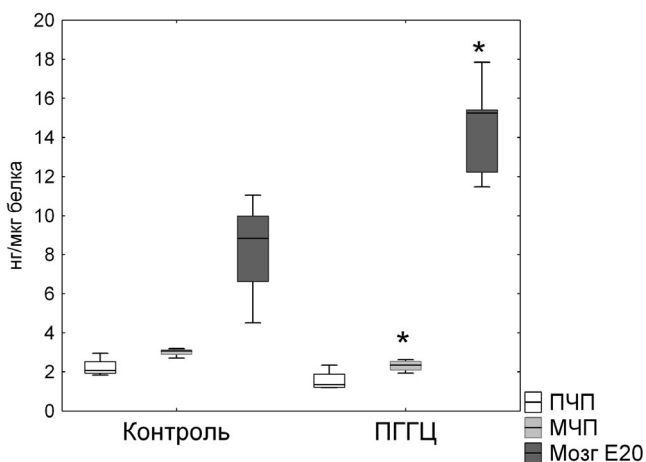
При определении влияния ПГГЦ на уровень провоспалительных цитокинов было установле-

но повышение содержания IL-1β в крови беременных самок крыс и ПЧП через 24 ч после последнего введения метионина. Как показано на рис. 3, а, б, содержание IL-1β в сыворотке крови подопытных животных при этом возрастает в 6 раз, достигая 30 пг/мл ( $p < 0,001$ ), а в ПЧП –



**Рис. 4.** Содержание BDNF и NGF в плодной (ПЧП,  $n = 6$ ) и материнской (МЧП,  $n = 10$ ) частях плаценты крыс на 20-й день беременности и в мозге плодов на E20 ( $n = 10$ ) в контрольной группе (контроль) и группе животных, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ). *а* – репрезентативный Вестерн-блот двух изоформ BDNF (~29 кДа и ~14 кДа); *б* – результаты денситометрического анализа содержания изоформ BDNF (ось ординат – интенсивность полос в пикселях, полученных методом иммуноблоттинга, выраженная в условных единицах); *в* – репрезентативный Вестерн-блот NGF; *г* – результаты денситометрического анализа содержания NGF (ось ординат – интенсивность полос в пикселях, полученных методом иммуноблоттинга, выраженная в условных единицах); \*\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ )

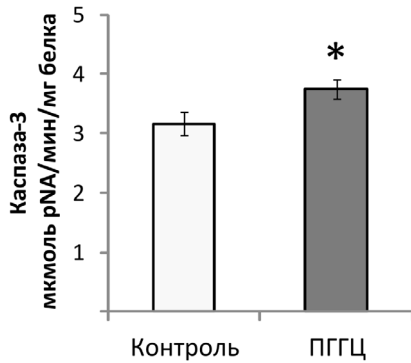
около 2 раз, составляя более 10 пг/мг белка ( $p < 0,05$ ). В МЧП уровень провоспалительных цитокинов при этом не изменялся (рис. 3, в). ГГЦ не оказывала действия также на содержа-



**Рис. 5.** Содержание нейротрофического фактора NRG1 в материнской (МЧП), плодной (ПЧП) частях плаценты крыс и в мозге плодов на E20 ( $n = 8$ ), выявленное иммуноферментным методом в контрольной группе (контроль) и группе животных при экспериментальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ); \*  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как Me [25%, 75%]

ние других провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- $\alpha$ ) в крови матери и плаценте. Следует отметить, что в мозге плодов на E20 при этом отсутствовали изменения в содержании не только IL-6 и TNF- $\alpha$ , но и IL-1 $\beta$  (рис. 3, г).

Использованный нами подход с применением иммуноблоттинга позволил выявить в МЧП и ПЧП, а также в мозге плодов на E20 две полосы окрашивания: ~14 кДа, по мол. массе соответствующую зрелой изоформе BDNF (mBDNF), и ~29 кДа, которая может соответствовать предшественнику BDNF (proBDNF) и/или его усеченной форме (truncated BDNF) (рис. 4, а, б). Полученные результаты указывают на то, что в ПЧП обнаруживаются следовые количества зрелой формы BDNF, тогда как в МЧП она содержится в сопоставимых количествах с мозгом плодов ( $75,6 \pm 11,37$  усл. ед. и  $78,5 \pm 3,22$  усл. ед. соответственно) и не изменяется при ПГГЦ. Наряду с этим, содержание фракции BDNF с мол. массой 29 кДа в ПЧП и МЧП значительно выше, по сравнению со зрелой формой нейротрофина, и увеличивается под влиянием ПГГЦ ( $p < 0,05$ ). В мозге плодов содержание этой изоформы также превышает количество mBDNF и повышается в условиях ПГГЦ. Содержание изоформы BDNF с мол. массой 14 кДа было значи-



**Рис. 6.** Активность каспазы-3 в гомогенате мозга плодов на E20 в контрольной группе (контроль,  $n = 16$ ) и в группе, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию (ПГГЦ,  $n = 21$ ); \*  $p \leq 0,05$ . Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ( $M \pm SEM$ )

тельно снижено по сравнению с изоформой 29 кДа в плаценте (соотношение p14/p29 в МЧП в контрольной группе составило  $0,195 \pm 0,027$ , в подопытной группе —  $0,130 \pm 0,029$ ; соотношение p14/p29 в ПЧП в контрольной группе составило  $0,017 \pm 0,014$ , в подопытной группе —  $0,011 \pm 0,005$ ), в то время как в ткани мозга плодов содержание обеих изоформ различалось не столь заметно (соотношение p14/p29 в контрольной группе составило  $0,707 \pm 0,035$ , в группе с ПГГЦ —  $0,668 \pm 0,037$ ). ПГГЦ вызывала увеличение уровня изоформы 29 кДа как в плаценте, так и в мозге плодов и не влияла на содержание изоформы 14 кДа, следует отметить, что наиболее значительно при этом возрастало содержание изоформы 29 кДа в МЧП. На рис. 4, в, г представлены данные, свидетельствующие о том, что метод иммуноблота, наряду с определением изоформ BDNF, может быть успешно использован для выявления в плаценте фактора роста нервов NGF. Установлено, что изоформа NGF с мол. массой ~ 31 кДа также, как и изоформа BDNF 29 кДа присутствует как в МЧП, так и ПЧП, а также в мозге плодов на E20. Показано, что в МЧП и ПЧП, по аналогии с изоформой BDNF с мол. массой 29 кДа уровень NGF возрастает при ГГЦ, но в мозге плодов на E20 при этом отмечается лишь тенденция к его увеличению, что, возможно, обусловлено значительным разбросом полученных данных.

Исследование содержания нейротрофина NRG1 в ПЧП не выявило достоверных изменений данного показателя в экспериментальной группе по сравнению с контролем. Однако в МЧП в группе с введением метионина обнаружено достоверное снижение содержания данного ростового фактора ( $p < 0,05$ ). Исследование содержания NRG1 выявило его повышение в

ткани мозга плодов на E20, матери которых потребляли метионин, в 1,66 раза по сравнению с плодами контрольной группы (рис. 5).

Обнаружена повышенная активность фермента каспазы-3 в мозге плодов на E20, перенесших ПГГЦ. Данное наблюдение выразилось в повышенном приросте продукта ферментативной реакции, где он составил  $3,74 \pm 0,17$  мкмоль рНА/мин/мг белка, по сравнению с контрольными животными, где данный показатель был равен  $3,16 \pm 0,19$  мкмоль рНА/мин/мг белка ( $p < 0,05$ ) (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то, что ПГГЦ является причиной возникновения глубоких функциональных нарушений ЦНС потомства, о чем свидетельствуют работы, опубликованные ранее нами [14, 15], а также другими отечественными и зарубежными исследователями [16–21], не представляется окончательно ясным, чем вызваны эти нарушения, и в какой мере они обусловлены изменением функционального состояния плаценты. ГГЦ у матери сопровождается, как отмечается в вышеперечисленных экспериментальных исследованиях, повышением содержания ГЦ в крови новорожденных животных. В этой связи важно отметить, что в настоящем исследовании нами впервые обнаружена ПГГЦ эмбрионов, у матерей которых в период беременности уровень ГЦ был повышен. Можно представить, что ГЦ, образующийся в повышенной концентрации вследствие нарушения его метаболизма, легко преодолевает фетоплацентарный барьер путем простой диффузии или связываясь со специфическим белком-транспортером [22]. Нами ранее было установлено, что одной из причин нейротоксического действия ПГГЦ является повышенная чувствительность клеток нервной системы к эксайтотоксическому и окислительному повреждению, о чем можно судить на основании данных о подавлении в этих условиях функции NMDA-рецепторов глутамата [23], снижении выживаемости нейронов при повышенной генерации активных форм кислорода (АФК), уменьшении содержания низкомолекулярных антиоксидантов и ингибировании активности антиоксидантных ферментов [24, 25]. Роль окислительного стресса (ОС) в индуцированных ГГЦ нарушениях развития нервной системы и когнитивной функции потомства подтверждается также тем, что они могут быть устранены путем введения животным во время беременности мелатонина и некоторых коротких пептидов, обладающих антиоксидантными свойствами [14, 17, 26].

Полученные нами результаты о стимулировании под влиянием ОС продукции IL-1 $\beta$  при ПГГЦ согласуются с экспериментальными данными, полученными рядом исследователей на взрослых животных. Установлено, что острая и хроническая ГЦ вызывает повышение содержания провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) в крови и мозге крыс [27, 28]. Предполагается, что одним из механизмов провоспалительного эффекта ГЦ является его воздействие на плацентарные макрофаги, приводящее к усилению ими синтеза и секреции провоспалительных цитокинов [29]. Важная роль в активации этой секреции отводится повышению уровня образования АФК макрофагами и клетками эндотелия сосудов в ответ на повышение уровня ГЦ в крови. В эндотелиальных клетках ГЦ через усиление генерации АФК может вызвать системное воспаление, сопровождающееся высвобождением IL-1 $\beta$  [30]. Полученные нами результаты позволяют рассматривать ПГГЦ в качестве фактора, приводящего к избыточной активации материнской иммунной системы, следствием чего является повышение уровня в крови провоспалительных цитокинов, в частности, IL-1 $\beta$ , способного проникать через фетоплацентарный барьер, что может вызывать нейродегенеративные и другие долгосрочные нарушения развития мозга у потомства [31–33]. Повышенное содержание IL-1 $\beta$  может быть обусловлено индукцией его экспрессии при участии NMDA-рецепторов глутамата, что было показано рядом авторов при фокальной ишемии мозга [34, 35]. Исходя из значения NMDA-рецепторной сигнальной системы в нейротоксичности ГЦ, нельзя исключить функционирования этого механизма в условиях ПГГЦ.

Подобный эффект IL-1 $\beta$  и других провоспалительных цитокинов может быть опосредован изменением под их воздействием содержания нейротрофических факторов, причем как в мозге плодов, так и плаценте, где эти факторы, как предполагается, проявляют цитопротекторный эффект и играют существенную роль в процессах плацентарного ангиогенеза [36–38]. Полученные данные свидетельствуют о существенном изменении уровня нейротрофинов в плаценте. Известно, что в плаценте осуществляется синтез ряда нейроактивных соединений, которые проникают через фетоплацентарный барьер и оказывают влияние на развитие мозга плода [36, 39], причем следует ожидать, что в условиях развития провоспалительного процесса, индуцированного ПГГЦ, их продукция может изменяться. В этой связи следует отметить, что изучению роли нейротрофинов (включая исследуемые нами BDNF и NGF), продуцируемых, в том

числе, и различными клетками иммунной системы, придается большое значение при развитии нейродегенеративных заболеваний [40].

NRG1 (как BDNF и NGF) участвует в регуляции пролиферации, миграции, дифференцировки различных клеток и в процессах синаптогенеза. Как показано в данной работе, уровень NRG1 возрастает в мозге плодов на E20 параллельно со снижением в МЧП. Известно, что NRG1 также принимает участие в регуляции метаболизма метионина, а, следовательно, и ГЦ, в нейронах за счет стимуляции работы метионинсинтазы метилкобаламином и активации синтеза глутатиона [41]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что плацентарный NRG1 может проявлять защитные свойства против нейротоксического влияния ГЦ матери на плод. Несмотря на установленную роль NRG1 в развитии мозга плода [8, 9], исследования, направленные на изучение функций данного фактора в плаценте, единичны. Были показаны экспрессия и секреция нейрегулина NRG1 стромальными децидуальными клетками и высказано предположение о его роли в паракринной регуляции выживаемости, дифференцировки и обеспечении адекватной инвазии клеток вневорсинчатого трофобласта, благодаря активации сигнальных путей, приводящих к подавлению апоптоза [42], который, как известно, усиливается при ГЦ, вызывая гибель клеток трофобласта [43, 44].

Противоапоптотическими свойствами обладают также и нейротрофические факторы BDNF и NGF [45], уровень которых в плаценте при ПГГЦ, согласно полученным нами данным, возрастал. Однако необходимо принять во внимание, что обнаруженное повышение содержания касалось только их незрелых изоформ. Наряду с этим, полученные результаты показывают, что содержание mBDNF, образующегося в результате протеолитического процессинга белка-предшественника proBDNF [46, 47], в плаценте незначительно, и оно не изменится под влиянием ПГГЦ. По мнению некоторых авторов, критические периоды развития плаценты и мозга плода находятся под влиянием схожих биологических сигналов [48]. Тот факт, что BDNF является одним из факторов, который активно участвует в критических процессах развития нервной системы плода, может указывать на возможность наблюдения сходных изменений в содержании BDNF в мозге плода и плаценте на одном и том же этапе пренатального развития [49]. Полученные результаты о сопоставимости уровней нейротрофинов в развивающемся мозге (E20) и плаценте согласуются с данными исследователей, которые указывают на то, что

экспрессия мРНК BDNF в плаценте крыс с увеличением сроков беременности возрастает и достигает максимума к 21 дню гестации [5]. Установлено, что proBDNF оказывает противоположное (по сравнению с mBDNF) влияние на выживание и функционирование нейронов, развитие синаптической пластичности [50], что особенно наглядно проявляется при исследовании нейродегенеративных патологий [51]. В отличие от mBDNF, который взаимодействует с тирозинкиназным Trk-B рецептором тропомиозина, обладающим к нему высоким сродством, proBDNF связывается с рецептором p75 нейротрофинов (p75NTR), активация которого приводит к снижению пролиферации нейронов и усилению процессов апоптоза [52]. При этом полагают, что proBDNF является нейротрофином, представленным преимущественно в раннем постнатальном периоде, тогда как эффекты mBDNF проявляются, в основном, во взрослом организме [53, 54].

Широко используемые методы иммуноферментного анализа не позволяют выявить различные молекулярные изоформы BDNF и других нейротрофинов. Исходной формой нейротрофического фактора BDNF является prepro BDNF с мол. массой 35 кДа, распадающийся с образованием proBDNF (32 кДа). Последующий протеолиз proBDNF при участии внутриклеточных протеолитических ферментов, о чем свидетельствуют результаты многочисленных исследований, приводит к образованию зрелой формы mBDNF с мол. массой 13–15 кДа [55–57] и/или т.н. «усеченной» формы BDNF (28 кДа), функциональное значение которой пока не установлено [58, 59]. Имеются данные о том, что NGF и BDNF экспрессируются неодинаково в разных областях плаценты [60]. Наши данные также указывают на то, что МЧП и ПЧП существенно отличаются по содержанию исследованных нейротрофинов, в частности, показаны более значимые уровни BDNF, NGF и, в особенности, соотношение mBDNF к proBDNF в МЧП. При этом учитывая, что функции изоформ BDNF в развивающемся мозге и различных частях плаценты могут существенно различаться, некоторые исследователи считают более информативным измерение не только их индивидуальных уровней, но и соотношение mBDNF и proBDNF [61]. Преобладание proBDNF, сниженное содержание mBDNF, и, как следствие, более низкие уровни отношения mBDNF к proBDNF в МЧП и особенно в ПЧП, по сравнению с развивающимся мозгом плодов на E20, были впервые обнаружены в нашей работе. Эти различия могут быть следствием либо более низкой скорости превращения пронеи-

ротрофина в зрелую форму и/или быстрого потребления mBDNF в плаценте по сравнению с мозгом плодов.

Анализ литературных данных позволяет прийти к заключению о том, что динамическое равновесие (баланс) между всеми изоформами BDNF, образующимися при процессинге, включая его «усеченную» форму, играет важную роль в проявлении пластичности нервной системы и когнитивных функций, нарушающихся при различных патологических состояниях организма [58].

Процессинг NGF также, как и BDNF, связан с протеолитическим расщеплением предшественников до зрелых форм, обладающих высоким сродством к Trk-киназным рецепторам тропомиозина, связывание с которыми обуславливает их нейротрофическое действие и выживание нервных клеток. Взаимодействие proNGF и proBDNF с p75NTR рецептором приводит к апоптозу и обуславливает его нейротоксические эффекты [62, 63], которые проявляются не только в нейронах, но и в клетках глии, стимулируя в ней воспалительный процесс вследствие интенсивной продукции TNF- $\alpha$  [64]. При исследованиях с помощью иммуноблота NGF (в отличие от BDNF) в мозге грызунов почти полностью обнаруживается в виде предшественника с мол. массой 32 кДа [63], а mNGF вследствие крайне незначительного содержания в нем практически не детектируется [65]. Низкое содержание mNGF может быть связано с тем, что proNGF легко образует стабильный комплекс с присутствующим в тканях растворимым альфа-2-макроглобулином, что приводит к повышению его устойчивости к протеолитическому расщеплению с образованием mNGF [62]. Вместе с тем, полагают, что в секретируемой клеткой пуле NGF содержатся его обе формы (proNGF и mNGF) [63], и использование иммуноферментного анализа ELISA позволяет определить суммарный уровень нейротрофина.

Приведенные в данной работе результаты позволяют утверждать, что ПГГЦ приводит к повышению содержания в плаценте незрелых форм BDNF и NGF, что может быть следствием замедления их дальнейшего процессинга и отрицательно сказываться на развитии плода. При сопоставлении с данными литературы следует полагать, что выявленные нами изоформы BDNF с мол. массой 29 кДа и NGF с мол. массой 31 кДа, скорее всего, являются предшественниками зрелых форм нейротрофинов, обладающих нейротрофическими свойствами. Нельзя исключить при этом, что полоса с мол. массой 29 кДа может быть представлена также усеченной изоформой BDNF. Отличия в измене-



нии содержания нейротрофинов в МЧП и ПЧП под влиянием ГГЦ могут быть рассмотрены с позиций некоторых исследователей, которые считают, что в различных частях плаценты в условиях патологии возникает ОС разной интенсивности, который вызывает компенсаторный ответ в виде повышения содержания нейротрофинов, необходимых в условиях патологии беременности и стрессорных воздействий для формирования жизнеспособного плода [66]. Полученные данные о влиянии ПГГЦ на содержание предшественников нейротрофинов в плаценте нашли подтверждение при исследовании мозга плодов на E20, в котором также наблюдалось их повышенное образование под влиянием перенесенной ГГЦ, статистически значимое при определении BDNF и на уровне тенденции в отношении NGF. Характерно, что также как в плаценте, в мозге плодов в условиях ПГГЦ содержание зрелой формы BDNF не изменялось.

Можно представить наличие нескольких причин, лежащих в основе негативного действия ПГГЦ на развивающийся организм плода. Проявлением токсичности ГЦ при воздействии на плод является обнаруженное нами снижение таких жизненно важных показателей, как масса плаценты, масса плода и масса его мозга. Одним из факторов, приводящих к таким последствиям, может быть вызванный ГГЦ ОС, как было описано ранее в наших исследованиях [25], а также в работах других авторов [14, 17, 19]. Развитию ОС способствует также воспалительная реакция, стимулируемая, как показано в данном исследовании, при ПГГЦ повышенным образованием IL-1 $\beta$  в крови беременных самок и ПЧП. Известно, что одним из механизмов повреждающего действия ОС является индуцируемый им вследствие повышенной генерации АФК апоптоз, вызывающий гибель клеток как в плаценте, так и в мозге плода. Полученные нами ранее результаты о развитии ОС в мозге новорожденных при ПГГЦ [25], а также данные, полученные в настоящем исследовании, о повышении активности ключевой цистеиновой протеазы апоптотического каскада каспазы-3 в мозге плодов согласуются с имеющимися на сегодняшний день представлениями об основных механизмах повреждающего действия ГЦ, в частности, развитии апоптоза при интенсификации ОС. Согласно литературным данным, активация апоптоза при ГГЦ в различных типах клеток может осуществляться как «внешним путем» через взаимодействие внеклеточных сигналов с рецепторами клеточной поверхности, так и «внутренним», связанным с деструкцией митохондрий под воздействием ОС, что

отмечалось, в частности, при воздействии ГЦ на клетки трофобласта [43, 44], а также мозг потомства крыс, перенесших ПГГЦ [16].

В механизме повреждающего действия ГГЦ, помимо перечисленных факторов, существенную роль играют эпигенетические модификации, связанные с реакциями метилирования, в первую очередь ДНК-метилирования, поскольку образование из S-аденозилметионина, являющегося основным донором метильных групп, S-аденозил-ГЦ приводит к ингибированию процессов метилирования в организме [60]. Существуют сведения о том, что фолатная недостаточность при ГГЦ вызывает снижение ДНК-метилирования в плаценте, что может оказывать негативное воздействие на рост и развитие плода [67, 68]. ДНК-метилированию в настоящее время придается большое значение в регуляции экспрессии генов нейротрофинов, в частности BDNF, при развитии нервной системы и ряде нейродегенеративных заболеваний [67, 68]. В связи с этим изучение зависимости между процессингом различных форм нейротрофинов и интенсивности ДНК-метилирования представит безусловный интерес для понимания причин возникновения нарушений функционального состояния плаценты и развития плода при ПГГЦ.

Таким образом, можно сделать заключение, что при экспериментальной ПГГЦ, вызванной хронической метиониновой нагрузкой крыс при беременности, отмечаются существенные изменения морфометрических показателей, содержания интерлейкина-1 $\beta$  и нейротрофических соединений (BDNF, NGF, NRG1) плаценты, которые обуславливают нарушение развития мозга плода. Полученные данные открывают перспективу клинического изучения указанных параметров в плаценте в качестве маркеров неблагоприятных изменений формирования нервной системы новорожденных при ГГЦ, относящейся к числу распространенных осложнений беременности.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (18-015-00099) и Госзадания (АААА-А19-119021290116-1).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором были проведены исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Onore, C., Careaga, M., and Ashwood, P. (2012) The role of immune dysfunction in the pathophysiology of autism, *Brain Behav. Immun.*, **26**, 383–392, doi: 10.1016/j.bbi.2011.08.007.
2. Patterson, P.H. (2009) Immune involvement in schizophrenia and autism: etiology, pathology and animal models, *Behav. Brain Res.*, **204**, 313–321, doi: 10.1016/j.bbr.2008.12.016.
3. Wahlbeck, K., Forsen, T., Osmond, C., Barker, D.J., and Eriksson, J.G. (2001) Association of schizophrenia with low maternal body mass index, small size at birth, and thinness during childhood, *Arch. Gen. Psychiatry*, **58**, 48–52, doi: 10.1001/archpsyc.58.1.48.
4. Dhobale, M.V., Pisal, H.R., Mehendale, S.S., and Joshi, S.R. (2013) Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **31**, 719–723, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.006.
5. Garces, M.F., Sanchez, E., Torres-Sierra, A.L., Ruiz-Parra, A.I., Angel-Muller, E., Alzate, J.P., Sanchez, A.Y., Gomez, M.A., Romero, X.C., Castaneda, Z.E., Sanchez-Rebordelo, E., Dieguez, C., Nogueiras, R., and Caminos, J.E. (2014) 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.)*, **81**, 141–151, doi: 10.1111/cen.12391.
6. Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function, *Front. Neuroendocrinol.*, **25**, 77–107, doi: 10.1016/j.yfrne.2004.04.001.
7. Tometten, M., Blois, S., and Arck, P.C. (2005) Nerve growth factor in reproductive biology: link between the immune, endocrine and nervous system? *Chem. Immunol. Allergy*, **89**, 135–148, doi: 10.1159/000087962.
8. Dammann, O., Bueter, W., Leviton, A., Gressens, P., and Dammann, C.E. (2008) Neuregulin-1: a potential endogenous protector in perinatal brain white matter damage, *Neonatology*, **93**, 182–187, doi: 10.1159/000111119.
9. Esper, R.M., Pankonin, M.S., and Loeb, J.A. (2006) Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease, *Brain Res. Rev.*, **51**, 161–175, doi: 10.1016/j.brainresrev.2005.11.006.
10. Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Пустыгина А.В., Козина Л.С., Корневский А.В. (2012) Использование различных экспериментальных моделей гипергомоцистеинемии в нейробиологических исследованиях, *Нейрохимия*, **29**, 83–88.
11. Зильфян В.Н., Кумкумаджян В.А. (1970) Новый метод взятия крови у мелких лабораторных животных, *Журн. exper. и клин. медицины*, **10**, 12–14.
12. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
13. Bass, J.J., Wilkinson, D.J., Rankin, D., Phillips, B.E., Szewczyk, N.J., Smith, K., and Atherton, P.J. (2017) An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research, *Scand. J. Med. Sci. Sports*, **27**, 4–25, doi: 10.1111/sms.12702.
14. Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pineal protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **5**, 179–185.
15. Shcherbitskaya, A.D., Milyutina, Y.P., Zaloznyaya, I.V., Arutjunyan, A.V., Nalivaeva, N.N., and Zhuravin, I.A. (2017) The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 296–301, doi: 10.1134/s1819712417040080.
16. Koz, S.T., Gouwy, N.T., Demir, N., Nedzvetsky, V.S., Etem, E., and Baydas, G. (2010) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **28**, 325–329, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.02.006.
17. Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., and Nedzvetsky, V.S. (2008) Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats, *J. Pineal Res.*, **44**, 181–188, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00506.x.
18. Baydas, G., Koz, S.T., Tuzcu, M., Nedzvetsky, V.S., and Etem, E. (2007) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **25**, 133–139, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.03.001.
19. Makhro, A.V., Mashkina, A.P., Solenaya, O.A., Trunova, O.A., Kozina, L.S., Arutyunian, A.V., and Bulygina, E.R. (2008) Prenatal hyperhomocysteinemia as a model of oxidative stress of the brain, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 33–35, doi: 10.1007/s10517-008-0233-0.
20. Gerasimova, E., Yakovleva, O., Burkhanova, G., Khaertdinov, N., Sitdikova, G., and Ziyatdinova, G. (2017) Effects of maternal hyperhomocysteinemia on the early physical development and neurobehavioral maturation of rat offspring, *BioNanoScience*, **7**, 155–158, doi: 10.1007/s12668-016-0326-6.
21. Махро А.В., Машкина А.П., Солёная О.А., Трунова О.А., Тюлина О.В., Булыгина Е.Р., Болдырев А.А. (2008) Карнозин защищает от окислительного стресса, вызванного гипергомоцистеинемией, *Нейрохимия*, **2**, 202–208.
22. Tsitsiou, E., Sibley, C.P., D'Souza, S.W., Catanescu, O., Jacobsen, D.W., and Glazier, J.D. (2011) Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 57–65, doi: 10.1007/s10545-010-9141-3.
23. Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. (2010) Токсическое влияние пренатальной гипергомоцистеинемии на потомство (экспериментальное исследование), *Журнал акушерства и женских болезней*, **59**, 16–23.
24. Арутюнян А.В., Пустыгина А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Козина Л.С. (2015) Молекулярные маркеры окислительного стресса у потомства при экспериментальной гипергомоцистеинемии, *Мол. медицина*, **5**, 41–46.
25. Пустыгина А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Арутюнян А.В. (2015) Показатели окислительного стресса в мозге новорожденных крысят, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию, *Нейрохимия*, **32**, 71–77.
26. Gitto, E., Pellegrino, S., Gitto, P., Barberi, I., and Reiter, R.J. (2009) Oxidative stress of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin, *J. Pineal Res.*, **46**, 128–139, doi: 10.1111/j.1600-079X.2008.00649.x.
27. Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., Loureiro, S.O., da Cunha, M.J., Schmitz, F., Netto, C.A., and Wyse, A.T. (2012) Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats, *Neurochem Res.*, **37**, 1660–1669, doi: 10.1007/s11064-012-0769-2.
28. Da Cunha, A.A., Ferreira, A.G., and Wyse, A.T. (2010) Increased inflammatory markers in brain and blood of rats

- subjected to acute homocysteine administration, *Metab. Brain Dis.*, **25**, 199–206, doi: 10.1007/s11011-010-9188-8.
29. Zanin, R.F., Bergamin, L.S., Morrone, F.B., Coutinho-Silva, R., de Souza Wyse, A.T., and Battastini, A.M. (2015) Pathological concentrations of homocysteine increases IL-1beta production in macrophages in a P2X7, NF-kB, and erk-dependent manner, *Purinergic Signal.*, **11**, 463–470, doi: 10.1007/s11302-015-9464-5.
  30. Xu, X., Yang, X.Y., He, B.W., Yang, W.J., and Cheng, W.W. (2016) 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.*, **196**, 69–75, doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.11.017.
  31. Bilbo, S.D., and Schwarz, J.M. (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behav. Neurosci.*, **3**, doi: 10.3389/neuro.08.014.2009.
  32. Jakubowski, H. (2004) Molecular basis of homocysteine toxicity in humans, *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 470–487, doi: 10.1007/s00018-003-3204-7.
  33. Smith, S.E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., and Patterson, P.H. (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6, *J. Neurosci.*, **27**, 10695–10702, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007.
  34. Jander, S., Schroeter, M., and Stoll, G. (2000) Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia, *J. Neuroimmunol.*, **109**, 181–187, doi: 10.1016/S0165-5728(00)00317-9.
  35. Онуфриев М.В., Фрейман С.В., Моисеева Ю.В., Степановичев М.Ю., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. (2017) Аккумуляция кортикостерона и интерлейкина-1 в гиппокампе после фокального ишемического повреждения неокортекса: селективная чувствительность вентрального гиппокампа, *Нейрохимия*, 235–241, doi: 10.7868/s1027813317030086.
  36. Bolton, J.L., and Bilbo, S.D. (2014) Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **16**, 307–320.
  37. Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., and Vadlamudi, S. (2003) Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal-fetal unit of the rat, *J. Neuroimmunol.*, **138**, 49–55, doi: 10.1016/S0165-5728(03)00095-X.
  38. Gilmore, J.H., Jarskog, L.F., and Vadlamudi, S. (2005) 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.*, **159**, 106–112, doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.008.
  39. Hsiao, E.Y., and Patterson, P.H. (2012) Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development, *Dev. Neurobiol.*, **72**, 1317–1326, doi: 10.1002/dneu.22045.
  40. Vêga, J.A., Garcia-Suarez, O., Hannestad, J., Perez-Perez, M., and Germana, A. (2003) Neurotrophins and the immune system, *J. Anat.*, **203**, 1–19, doi: 10.1046/j.1469-7580.2003.00203.x.
  41. Zhang, Y., Hodgson, N., Trivedi, M., and Deth, R. (2016) Neuregulin 1 promotes glutathione-dependent neuronal cobalamin metabolism by stimulating cysteine uptake, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 3849087, doi: 10.1155/2016/3849087.
  42. Fock, V., Plessl, K., Draxler, P., Otti, G.R., Fiala, C., Knofler, M., and Pollheimer, J. (2015) Neuregulin-1-mediated ErbB2-ErbB3 signalling protects human trophoblasts against apoptosis to preserve differentiation, *J. Cell Sci.*, **128**, 4306–4316, doi: 10.1242/jcs.176933.
  43. Di Simone, N., Maggiano, N., Caliendo, D., Riccardi, P., Evangelista, A., Carducci, B., and Caruso, A. (2003) Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features, *Biol. Reprod.*, **69**, 1129–1134, doi: 10.1095/biolreprod.103.015800.
  44. Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S.D., Sadosky, Y., and Nelson, D.M. (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **191**, 563–571, doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.037.
  45. Fujita, K., Tatsumi, K., Kondoh, E., Chigusa, Y., Mogami, H., Fujii, T., Yura, S., Kakui, K., and Konishi, I. (2011) Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors, *Placenta*, **32**, 737–744, doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.001.
  46. Yang, B., Ren, Q., Zhang, J.C., Chen, Q.X., and Hashimoto, K. (2017) Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis, *Transl. Psychiatry*, **7**, e1128, doi: 10.1038/tp.2017.95.
  47. Hashimoto, K. (2016) Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain by serotonin, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **266**, 195–197, doi: 10.1007/s00406-016-0682-9.
  48. Zeltser, L.M., and Leibel, R.L. (2011) Roles of the placenta in fetal brain development, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 15667–15668, doi: 10.1073/pnas.1112239108.
  49. Saenen, N.D., Plusquin, M., Bijnsens, E., Janssen, B.G., Gyselaers, W., Cox, B., Fierens, F., Molenberghs, G., Penders, J., Vrijens, K., De Boever, P., and Nawrot, T.S. (2015) In utero fine particle air pollution and placental expression of genes in the brain-derived neurotrophic factor signaling pathway: an environment birth cohort study, *Environ. Health Perspect.*, **123**, 834–840, doi: 10.1289/ehp.1408549.
  50. Dincheva, I., Lynch, N.B., and Lee, F.S. (2016) The role of BDNF in the development of fear learning, *Depress. Anxiety*, **33**, 907–916, doi: 10.1002/da.22497.
  51. Gerenu, G., Martisova, E., Ferrero, H., Carracedo, M., Rantamaki, T., Ramirez, M.J., and Gil-Bea, F.J. (2017) Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 991–1001, doi: 10.1016/j.bbdis.2017.01.023.
  52. Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., and Blum, R. (2017) Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling, *Pflugers Arch.*, **469**, 593–610, doi: 10.1007/s00424-017-1964-4.
  53. Menshanov, P.N., Lanshakov, D.A., and Dygalo, N.N. (2015) proBDNF is a major product of bdnf gene expressed in the perinatal rat cortex, *Physiol. Res.*, **64**, 925–934.
  54. Patz, S., and Wahle, P. (2004) Neurotrophins induce short-term and long-term changes of cortical neurotrophin expression, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 701–708, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03519.x.
  55. Foltran, R.B., and Diaz, S.L. (2016) BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J. Neurochem.*, **138**, 204–221, doi: 10.1111/jnc.13658.
  56. Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., and Morys, J. (2018) BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **38**, 579–593, doi: 10.1007/s10571-017-0510-4.
  57. Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., and Kojima, M. (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: multi-ligand model of growth factor signaling, *Pharmacol. Res.*, **105**, 93–98, doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.019.
  58. Garcia, K.L., Yu, G., Nigolini, C., Michalski, B., Garzon, D.J., Chiu, V.S., Tongiorgi, E., Szatmari, P., and

- Fahnestock, M. (2012) Altered balance of proteolytic isoforms of pro-brain-derived neurotrophic factor in autism, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **71**, 289–297, doi: 10.1097/NEN.0b013e31824b27e4.
59. Mizui, T., Hattori, K., Ishiwata, S., Hidese, S., Yoshida, S., Kunugi, H., and Kojima, M. (2019) Cerebrospinal fluid BDNF pro-peptide levels in major depressive disorder and schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.*, **113**, 190–198, doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.03.024.
60. Sahay, A.S., Jadhav, A.T., Sundrani, D.P., Wagh, G.N., and Joshi, S.R. (2019) Differential expression of nerve growth factor (NGF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in different regions of normal and preeclampsia placentae, *Clin. Exp. Hypertens.*, 1–5, doi: 10.1080/10641963.2019.1665677.
61. Xiong, J., Zhou, L., Yang, M., Lim, Y., Zhu, Y.H., Fu, D.L., Li, Z.W., Zhong, J.H., Xiao, Z.C., and Zhou, X.F. (2013) ProBDNF and its receptors are upregulated in glioma and inhibit the growth of glioma cells *in vitro*, *Neuro. Oncol.*, **15**, 990–1007, doi: 10.1093/neuonc/not039.
62. Barcelona, P.F., and Saragovi, H.U. (2015) A pro-nerve growth factor (proNGF) and NGF binding protein, alpha2-macroglobulin, differentially regulates p75 and TrkA receptors and is relevant to neurodegeneration *ex vivo* and *in vivo*, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3396–3408, doi: 10.1128/MCB.00544-15.
63. Budni, J., Bellettini-Santos, T., Mina, F., Garcez, M.L., and Zugno, A.I. (2015) The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease, *Aging Dis.*, **6**, 331–341, doi: 10.14336/AD.2015.0825.
64. Lebrun-Julien, F., Bertrand, M.J., De Backer, O., Stellwagen, D., Morales, C.R., Di Polo, A., and Barker, P.A. (2010) ProNGF induces TNFalpha-dependent death of retinal ganglion cells through a p75NTR non-cell-autonomous signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 3817–3822, doi: 10.1073/pnas.0909276107.
65. Fahnestock, M., Michalski, B., Xu, B., and Coughlin, M.D. (2001) The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease, *Mol. Cell. Neurosci.*, **18**, 210–220, doi: 10.1006/mcne.2001.1016.
66. Sahay, A.S., Sundrani, D.P., Wagh, G.N., Mehendale, S.S., and Joshi, S.R. (2015) Neurotrophin levels in different regions of the placenta and their association with birth outcome and blood pressure, *Placenta*, **36**, 938–943, doi: 10.1016/j.placenta.2015.06.006.
67. Kim, K.C., Friso, S., and Choi, S.W. (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging, *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 917–926, doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.008.
68. Kulkarni, A., Dangat, K., Kale, A., Sable, P., Chavan-Gautam, P., and Joshi, S. (2011) Effects of altered maternal folic acid, vitamin B12 and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats, *PLoS One*, **6**, e17706, doi: 10.1371/journal.pone.0017706.

## NEUROTROPHINS OF THE FETAL BRAIN AND PLACENTA IN PRENATAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA\*

A. V. Arutjunyan<sup>1\*\*</sup>, Yu. P. Milyutina<sup>1</sup>, A. D. Shcherbitskaia<sup>2</sup>,  
G. O. Kerkeshko<sup>1</sup>, I. V. Zalozniaia<sup>1</sup>, and A. V. Mikhel<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Ott Institute of Obstetrics, Gynecology, and Reproductology, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: alexarutjunjan@gmail.com*

<sup>2</sup> *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia*

Received September 25, 2019

Revised October 28, 2019

Accepted November 11, 2019

Prenatal hyperhomocysteinemia (PHHC) in pregnant rats was induced by chronic L-methionine loading, resulting in a significant increase in the L-homocysteine content both in the mothers' blood and blood and brain of fetuses. Significant decrease in the weight of the placenta, fetus and fetal brain was detected by the morphometric studies on day 20 of pregnancy. PHHC also activated maternal immune system due to the increase in the content of proinflammatory interleukin-1 $\beta$  in the rat blood and fetal part of the placenta. PHHC elevated the levels of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF, 29 kDa) and nerve growth factor (NGF, 31 kDa) precursors in the placenta and the content of the BDNF isoform (29 kDa) in the fetal brain. The content of neuregulin 1 (NRG1) decreased in the placenta and increased in the fetal brain on day 20 of embryonic development. An increase in the caspase-3 activity was detected in the brains of fetuses subjected to PHHC. It was suggested that changes in the processing of neurotrophins induced by PHHC, oxidative stress, and inflammatory process initiated by it, as well as apoptosis, play an important role in the development of brain disorders in the offspring.

**Keywords:** prenatal hyperhomocysteinemia, neurotrophic factors, proinflammatory cytokines, placenta, fetus brain