

ДИСБАЛАНС ПЛАЦЕНТАРНЫХ АНГИОГЕННЫХ И РОСТОВЫХ ФАКТОРОВ ПРИ МАТЕРИНСКОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

© 2023 А.В. Арутюнян^{1*}, Г.О. Керкешко¹, Ю.П. Милютина^{1,2}, А.Д. Щербицкая^{1,3},
И.В. Залозня¹, А.В. Михель¹, Д.Б. Иноземцева¹, Д.С. Васильев^{1,3},
А.А. Коваленко³, И.Ю. Коган¹

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

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет Минздрава России, 194100 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 23.09.2022

После доработки 23.12.2022

Принята к публикации 11.01.2023

Многочисленными исследованиями установлено, что влияние на плаценту неблагоприятных воздействий различной природы и механизма действия приводит, как правило, к общему конечному результату – недостаточности ее кровоснабжения. Одним из факторов риска развития осложненной беременности с плацентарной этиологией является повышенный уровень аминокислоты гомоцистеина в крови беременных, однако воздействие гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на развитие плаценты и, в частности, на формирование ее сосудистой сети, остается до сих пор мало изученным. Целью настоящей работы явилось исследование влияния материнской ГГЦ на экспрессию в плаценте крыс ангиогенных и ростовых факторов (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF и NGF), а также их рецепторов (VEGFR-2, TrkB и p75NTR). Влияние ГГЦ изучалось в двух морфологически и функционально различных отделах – материнской и плодной частях плаценты, на двух сроках развития – 14-й и 20-й дни беременности. Под влиянием материнской ГГЦ в исследуемых отделах плаценты наблюдалось повышение уровней маркеров окислительного стресса и апоптоза, а также нарушение баланса изучаемых ангиогенных и ростовых факторов, в большинстве случаев выразившееся в снижении содержания белка (VEGF-A), ферментативной активности (MMP-2), экспрессии генов (*VEGFB*, *NGF*, *TRKB*), а также накоплении незрелых форм (proBDNF). В ряде случаев эффекты ГГЦ различались в зависимости от отдела плаценты и срока ее развития. Влияние материнской ГГЦ на сигнальные пути и процессы, контролируемые изученными ангиогенными и ростовыми факторами, может приводить к неполному развитию сосудистой сети плаценты и снижению трансплацентарного транспорта, результатом чего являются задержка роста плода и нарушение развития его мозга, наблюдаемые при материнской ГГЦ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: материнская гипергомоцистеинемия, плацента, ангиогенные факторы, нейротрофины.

DOI: 10.31857/S0320972523020057, EDN: QGFASA

ВВЕДЕНИЕ

Неблагоприятные факторы во время беременности могут осуществлять негативное влияние на плаценту посредством различных механизмов. Вместе с тем общим конечным итогом их воздействия оказывается, как пра-

вило, недостаточное кровоснабжение плаценты [1]. Следствием нарушения плацентарного кровоснабжения является состояние гипоксии и окислительного стресса (ОС), вызывающее подавление пролиферативной активности и увеличение клеточной гибели в различных отделах плаценты, что, в свою очередь, приводит

Принятые сокращения: ГЦ – гомоцистеин; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; МДА – малоновый диальдегид; MMP – матриксные металлопротеиназы; МЧП – материнская часть плаценты; ОС – окислительный стресс; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ПЧП – плодная часть плаценты; ПЭ – преэклампсия; СОД – супероксиддисмутаза; BDNF – нейротрофический фактор мозга; NGF – фактор роста нервов; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

* Адресат для корреспонденции.

к задержке роста плаценты, недостаточному развитию ее сосудистого дерева и в итоге — к нарушению транспортной и других плацентарных функций [2].

Формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети имеет решающее значение для морфологического и функционального созревания плаценты, и, как следствие, для физиологического роста и развития плода [3, 4]. Процессы плацентарного васкулогенеза (образование сосудов *de novo*) и ангиогенеза (удлинение и разветвление уже существующих сосудов) находятся под контролем ряда ангиогенных факторов, соотношение между которыми в различных отделах плаценты на разных сроках беременности изменяется, обеспечивая скоординированную смену различных стадий развития сосудистой сети [5]. Ключевым проангиогенным фактором, регулирующим все стадии плацентарного васкуло- и ангиогенеза, является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF-A, в дальнейшем — VEGF), который осуществляет свои эффекты во взаимодействии с другими ангиогенными факторами [6].

Наряду с развитием сосудистого дерева важную роль в обеспечении адекватного кровоснабжения плаценты играет процесс ремоделирования материнских спиральных артерий, в ходе которого выстилающие их стенки эндотелиальные и гладкомышечные клетки заменяются мигрирующими клетками трофобласта, благодаря чему диаметр этих сосудов расширяется и приток материнской крови к плаценте усиливается [7]. VEGF совместно с другими проангиогенными факторами, такими как матриксные металлопротеиназы (ММП), участвует в процессе ремоделирования, усиливая миграционные и инвазивные свойства клеток трофобласта [8].

Недавно было показано, что факторы семейства нейротрофинов, в первую очередь нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) и фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), экспрессируются в плаценте и играют там роль ростовых факторов, ингибируя процессы апоптоза и усиливая пролиферацию и инвазивные способности клеток трофобласта [9–14]. Высказаны предположения, что плацента является источником нейротрофических факторов для развивающегося плода [15, 16], вследствие чего снижение их уровня в плаценте может приводить к задержке роста плода и нарушениям развития его мозга [17].

Одним из основных первичных механизмов, обуславливающих патологические эффекты

гипергомоцистеинемии (ГГЦ), то есть повышенного уровня аминокислоты гомоцистеин (ГЦ) в крови, является ОС [18, 19]. Предполагается, что активация под влиянием материнской ГГЦ процессов ОС, сопровождающаяся усилением процессов апоптоза в плаценте, способна вызывать нарушения необходимого для развития плаценты и ее сосудистого дерева баланса плацентарных ангиогенных и ростовых факторов [20, 21], в частности, за счет изменения уровня экспрессии транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию VEGF, ММП и других белков, вовлеченных в процессы ангиогенеза и инвазии трофобласта [22].

Хотя антиангиогенные свойства ГЦ подтверждены во многочисленных опытах на моделях *in vitro* [23–25] и *in vivo* [25–27], существуют лишь единичные сообщения о влиянии ГГЦ на уровень экспрессии ангиогенных факторов, а также играющих роль ростовых факторов BDNF и NGF в плаценте животных и человека [28–30]. Вызванные материнской ГГЦ критические изменения структуры и функций плаценты могут привести к снижению трансплацентарного транспорта и, как следствие, к задержке роста плода [31]. Высказаны предположения, что исходной причиной многих нейроповеденческих расстройств у потомства являются патофизиологические изменения в плаценте матери, сопровождающиеся нарушениями развития мозга плода, который особенно уязвим к последствиям плацентарной дисфункции [32, 33]. Эти гипотезы, до сих пор недостаточно подкрепленные клиническими и экспериментальными данными, обуславливают актуальность дальнейшего изучения воздействия материнской ГГЦ на сигнальные пути, контролирующие морфологическое и функциональное созревание плаценты, в частности развитие ее сосудистой сети. Выяснение механизмов негативного влияния ГГЦ на уровне плаценты будет способствовать лучшему пониманию этиологии осложнений беременности и патологий развития плода, характеризующихся повышенным уровнем ГЦ в крови матери и нарушениями плацентарного кровоснабжения, в частности, преэклампсии (ПЭ) и задержки внутриутробного развития плода (ЗВУР) [34, 35], а также когнитивных нарушений, наблюдающихся у потомства матерей с ГГЦ [36–39].

В настоящей работе в экспериментах на самках крыс исследовано влияние материнской ГГЦ на уровни маркеров ОС и апоптоза, проангиогенных и ростовых факторов (VEGF, ММП-2, VEGF-B, BDNF и NGF) и их рецеп-

торов (VEGFR-2, TrkB и p75NTR) в плодной части плаценты (ПЧП), являющейся основной зоной обмена между кровеносными системами матери и плода, а также материнской части плаценты (МЧП), выполняющей в первую очередь эндокринную функцию. Исследуемые показатели определялись на 14-й день эмбрионального развития (E14), соответствующий началу второго триместра беременности у человека и характеризующийся активацией процессов ангиогенеза и миграции трофобласта в плаценте крыс, а также в конце беременности на 20-й день эмбрионального развития (E20, соответствует концу второго триместра у человека), когда сосудистое русло плаценты крыс уже полностью сформировано.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

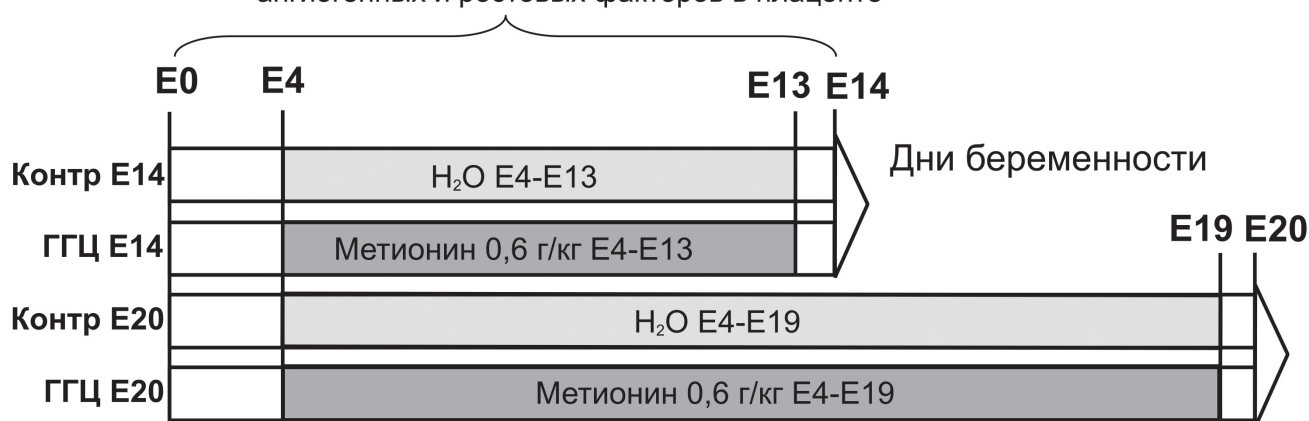
Животные. Эксперимент проводили на 62 самках крыс линии Wistar (Биопитомник «СМК Стезар», Владимирская обл., РФ) в возрасте 3–4 месяца массой 180–220 г. Животных содержали в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым 12-часовым циклом света и темноты при постоянной комнатной температуре. Самки крыс получали стандартный лабораторный корм и воду *ad libitum*. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского Сообщества (86/609/ЕЕС)

об использовании животных для экспериментальных исследований.

Модель материнской ГГЦ. Стадии эстрального цикла у самок определяли по влагалищным мазкам. В эксперимент отбирали самок с четырехдневным эстральным циклом, стабильным на протяжении как минимум 2–3 циклов. Подсадку самцов к самкам осуществляли на стадии проэструса, первым днем беременности (E1) считали следующий день после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Для создания экспериментальной материнской ГГЦ использовали разработанный нами ранее метод, основанный на дозированной хронической метиониновой нагрузке, начиная с четвертого дня беременности (E4) до дня, предшествующего выводу животных из эксперимента (E13 или E19) [30]. Экспериментальным животным ежедневно перорально через желудочный зонд вводили 1 мл водного раствора L-метионина, приготовленного *ex tempora* из расчета 0,6 г/кг массы животного; контрольным животным в течение того же периода времени тем же способом вводили 1 мл воды. Эксперимент включал 4 группы животных: контроль E14 ($n = 15$), контроль E20 ($n = 15$), ГГЦ E14 ($n = 16$) и ГГЦ E20 ($n = 16$) (рис. 1).

Подготовка ткани к анализу. На сроках беременности E14 и E20, через сутки после последнего введения метионина, самок обеих групп декапитировали без анестезии и отбирали

E14: Декапитация, извлечение и морфометрия плацент/плодов, биохимический анализ: экспрессия генов и уровень белков ангиогенных и ростовых факторов в плаценте



E20: Декапитация, забор крови, извлечение и морфометрия плацент/плодов, биохимический анализ: маркеры окислительного стресса в крови и плаценте, маркеры апоптоза в плаценте, экспрессия генов и уровень белков ангиогенных и ростовых факторов в плаценте

Рис. 1. Схема эксперимента

кровь, слитую из туловища. Плоды и плаценты извлекали и анализировали их массу. Плоды декапитировали, отбирали кровь, слитую из туловищ, пулируя кровь от помета одной самки. Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (10 мин при 2300 g). Образцы сыворотки крови и ткани плаценты для биохимического анализа хранили при -80°C . Перед началом анализа замороженную ткань плаценты промывали от крови в холодном 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) и разделяли на МЧП (базальную часть) и ПЧП (лабиринтную часть). Ткани плаценты гомогенизировали в 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,4), центрифугировали 20 мин при 16 000 g и $+4^{\circ}\text{C}$, супернатант подвергали анализу. В группах E14 для иммуноблоттинга и зимографии в качестве образцов для анализа брали пулированные гомогенаты МЧП или ПЧП от 3–4 плацент, в остальных случаях использовались гомогенаты МЧП или ПЧП от отдельных плацент. От одной самки в группу для анализа отбирали 1 плаценту, в группах E14 – 1 пулированный образец. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [40] на спектрофотометре NanoDrop One («Thermo Scientific», США).

Оценка показателей окислительного стресса.

Показатели ОС исследовались на сроке E20. В сыворотке крови беременных самок МЧП и ПЧП оценивали перекисное окисление липидов (ПОЛ) путем определения малонового диальдегида (МДА) по стандартной методике с использованием тиобарбитуровой кислоты [41]. В тех же объектах исследования, а также в сыворотке крови плодов измеряли активность супероксиддисмутазы (СОД) с использованием набора Superoxide Dismutase Assay Kit («Cayman Chemical», США), согласно инструкции производителя. Окислительная модификация белков исследовалась в МЧП и ПЧП при помощи набора OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit («Merck Millipore», США), как описано нами ранее [42].

Иммуноблоттинг. Содержание в МЧП и ПЧП белков VEGF (на сроках E14 и E20), NGF и BDNF (на сроке E14), каспазы-3 и каспазы-8 (на сроке E20) оценивали методом иммуноблоттинга. Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad», США). Мембраны блокировали раствором 2%-ного бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich Chem. Co.», США) в буфере TBST (50 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20 (pH 7,5)). Содержание бел-

ков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к VEGF (Anti-VEGF rabbit Ab, 1/1000), NGF (Anti-NGF rabbit Ab, 1/1000), BDNF (Anti-BDNF rabbit Ab, 1/1000) производства «Abcam», США и к каспазе-3 (Caspase-3 rabbit Ab, 1/1000) и каспазе-8 (Caspase-8 mouse Ab, 1/1000) производства «Cell Signaling», США. Инкубацию проводили при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. После инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1/1000, «Bio-Rad»), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминесценцию Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad»). Мембраны сканировали в гель-документирующей системе ChemiDoc™ Touch Imaging system («Bio-Rad»), интенсивность полос определяли при помощи программного обеспечения ImageLab. Руководствуясь существующими рекомендациями по процедуре нормализации содержания белка-мишени [43], полученные данные были нормализованы по содержанию общего белка в геле, определяемого с применением технологии stain-free («Bio-Rad»), согласно инструкции производителя.

Зимография. Оценку протеолитической активности ММП-2 (желатиназы) в МЧП и ПЧП на сроках E14 и E20 проводили методом зимографии [44] с собственными модификациями [42]. При проведении анализа в качестве субстрата использовали желатин («Sigma-Aldrich», США). Пробы, содержащие 15–28 мкг белка, смешивали с буфером Лэммли («Bio-Rad») без нагревания, после чего проводили электрофорез в 10%-ном ПААГ, содержащем 1 мг/мл желатина, в невозобновляющих и неденатурирующих условиях. После проведения электрофореза гели промывали 3 раза по 30 мин в нагретом до 37°C буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, 5 мМ CaCl_2 и 2,5% (w/v) Triton X-100 (pH 7,6)) для удаления SDS и ренатурации ММП в геле. Затем гели инкубировали в течение 18 ч при 37°C в буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, 0,2 М NaCl, 5 мМ CaCl_2 , 1 мкМ ZnCl_2 и 0,02% Brij-35 (pH 7,6)) для индукции лизиса желатина. Для анализа активности фермента гели окрашивали 0,5%-ным Кумасси бриллиантовым синим R-250 («Bio-Rad») и обесцвечивали в 25%-ном растворе этанола, содержащем 10% уксусной кислоты. При этом зоны, содержащие ММП-2, проявлялись в виде белых полос на синем фоне. Количественный анализ проводили так же, как при оценке данных иммуноблоттинга.

Количественная ПЦР в реальном времени. Для анализа экспрессии генов в МЧП и ПЧП

на сроках E14 и E20 использовали метод количественной ПЦР в реальном времени. Выделение тотальной РНК из клеток МЧП и ПЧП производили с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя, с модификациями. Для удаления возможной примеси геномной ДНК образцы РНК дополнительно подвергали ДНКазной обработке с использованием свободной от РНКаз RQ1-ДНКазы («Promega», США). Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop Lite («Thermo Fisher Scientific», США). Обратную транскрипцию выполняли с использованием 1 мкг РНК, смеси случайных 9-мерных и олиго-dT-праймеров («ДНК-Синтез», Россия) и MMLV-обратной транскриптазы («Евроген»). Определение мРНК *VEGFA*, *VEGFB*, *KDR* (*VEGFR-2*), *BDNF*, *NGF*, *TRKA* (*NTRK1*), *TRKB* (*NTRK2*) и *P75NTR* (*NGFR*), а также генов домашнего хозяйства *YWHAZ* (белок активации тирозин-3-монооксигеназы/триптофан-5-монооксигеназы, полипептид ζ) и *PGK1* (фосфоглицераткиназа 1) было про-

ведено методом ПЦР в реальном времени. Для количественной ПЦР в реальном времени готовили реакционную смесь, содержащую 0,8 мкл образца кДНК; 0,75 ед. TaqM-полимеразы («Алкор-Био», Россия); 200 нМ специфических прямых и обратных праймеров; 100 нМ зонда TaqMan; 3,5 mM MgCl₂ и 250 мкМ dATP/dTTP/dCTP/dGTP в 6 мкл общего объема 1×TaqM-реакционного буфера. Для анализа генов были использованы мультиплексные системы: *VEGFA* + *KDR*, *TRKB* + *P75NTR*, *YWHAZ* + *PGK1*. В случае анализа экспрессии *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* вместо зондов использовали интеркалирующий краситель 50× SYBR Green I («Евроген»). Также для *BDNF*, *NGF*, *VEGFB* и *TRKA* проводился анализ кривых плавления. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов («ДНК-Синтез») представлены в табл. 1. Реакцию проводили на амплификаторе C1000 Touch™ Thermal Cycler с детектирующей системой CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad»). Каждую пробу ставили в трех параллелях. Дополнительно

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности использовавшихся праймеров и зондов

Ген	Нуклеотидные последовательности (5'→3')
<i>VEGFA</i> NM_031836.3	F: AGGGTCAAAAACGAAAGCGC R: CGCGAGTCTGTGTTTTGCA Зонд: ROX-CCTGGAGCGTTCACCTGTGAGCCT-BHQ2
<i>VEGFB</i> NM_053549.1	F: TGGTACCTCTGAGCATGGAA R: GAGGATCTGCATTCGGACTT
<i>KDR</i> (<i>VEGFR-2</i>) NM_013062.2	F: TTCCCGTCCTCAAAGCATCA R: TGTACGCTGTGCAGGTGTAT Зонд: FAM-CCCTTCCTGGGACTGTGGCAAAGA-BHQ1
<i>BDNF</i> NM_001270638.1	F: CAGGTCGATTAGGTGGCTTCA R: CATAAACCACCGACATGGAGC
<i>NGF</i> NM_001277055.1	F: TGCATAGCGTAATGTCCATGTTG R: CTGTGTCAAGGGGAATGCTGAA
<i>TRKA</i> (<i>NTRK1</i>) NM_021589.1	F: GACCCCATCCCTGTCTCCTT R: CCACAGAGACCCCAAAAGGT
<i>TRKB</i> (<i>NTRK2</i>) NM_012731.3	F: GACAGTCCTCTGTGGCCAGG R: TGGCTCTCCCTGGACTCTTT Зонд: ROX-CCCCAGCCCTGAGGTGCGCA-BHQ2
<i>P75NTR</i> (<i>NGFR</i>) NM_012610.2	F: AGAGGGCACATACTCAGACG R: TCGACCAGGGATCTCTTCGC Зонд: FAM-TGCACGCCCTGGGCTGATGCTGAA-BHQ1
<i>YWHAZ</i> NM_013011	F: GATGAAGCCATTGCTGAACTTG R: GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC Зонд: ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ2
<i>PGK1</i> NM_053291	F: ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC R: AGCCACAGCCTCAGCATATTC Зонд: HEX-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2

Таблица 2. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на массу плода и плаценты самок крыс

Срок беременности	Масса плода (мг)		Масса плаценты (мг)	
	Контроль	ГГЦ	Контроль	ГГЦ
E14	174,4 ± 4,0	165,7 ± 3,1	170,1 ± 4,4	160,5 ± 5,8
E20	4104,8 ± 92,9	3518,2 ± 60,3 ***	567,6 ± 14,6	486,7 ± 12,6 ***

Примечание. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) от среднеарифметической массы всех плодов или плацент в помете каждой самки ($n = 12$ самок для всех групп); *** $p < 0,001$.

в качестве контролей были использованы образцы РНК, с которыми не проводили обратную транскрипцию, а также отрицательный контроль ПЦР без добавления кДНК. Относительная продукция мРНК рассчитывалась по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [45]. Данные, полученные для генов интереса, нормировали по среднему геометрическому значению двух генов домашнего хозяйства. Выбор референсных генов был обусловлен их участием в различных звеньях кле-

точного гомеостаза, а также тем, что их экспрессия достаточно стабильна в плаценте.

Статистическая обработка данных. Для выявления статистически значимых различий данные обрабатывали с помощью программы STATISTICA 10.0. Для сравнения исследованных показателей был использован непараметрический U-критерий Манна–Уитни и t-тест для независимых выборок. Выбор статистического метода основывался на оценке харак-

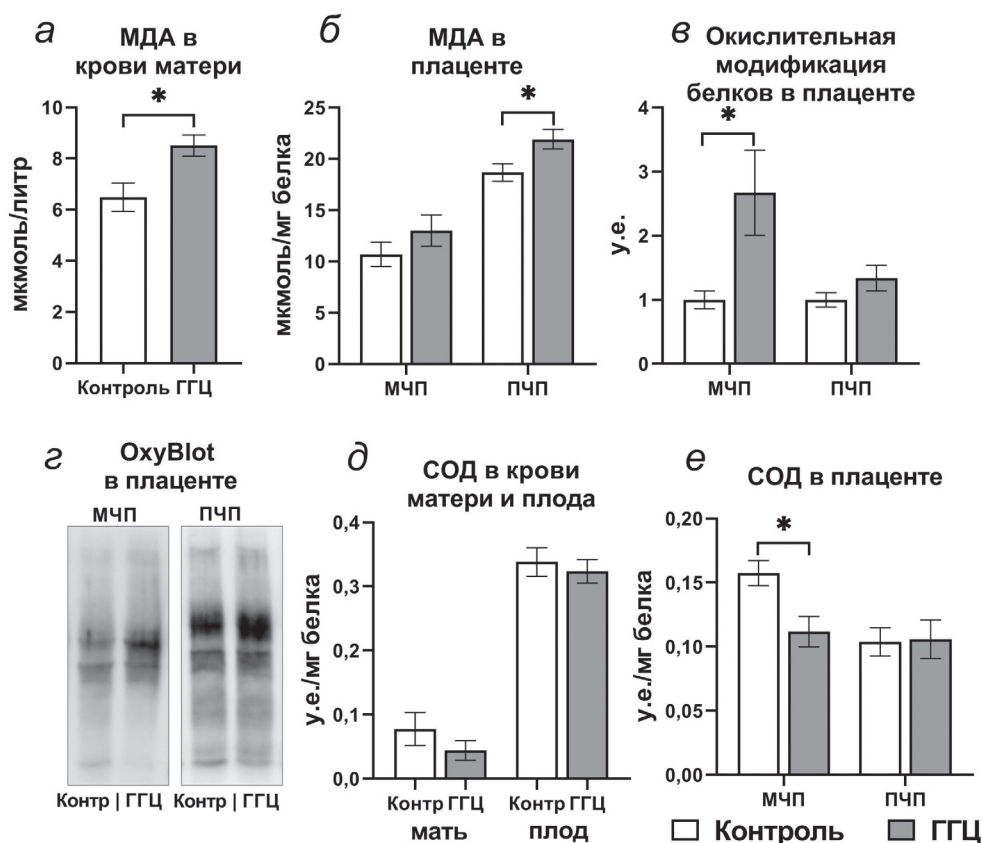


Рис. 2. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на показатели окислительного стресса у самок крыс и их плодов на 20-й день беременности (E20). *a* – Уровень перекисного окисления липидов (содержание малонового диальдегида, МДА) в крови беременных самок крыс ($n = 8-11$); *b* – содержание МДА в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плацент ($n = 10-16$); *c* – относительный уровень окислительной модификации белка (оценен при помощи набора OxyBlot™) в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты крыс ($n = 10-11$), ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученным методом иммуноблоттинга, за условную единицу (у.е.) принят уровень окислительной модификации белка в данной части плаценты в контроле; *d* – репрезентативный OxyBlot продуктов окислительной модификации белков в плаценте; *e* – активность супероксиддисмутазы (СОД) в крови беременных самок крыс и их плодов ($n = 6$); *e* – активность СОД в материнской (МЧП) и плодной (ПЧП) частях плаценты ($n = 8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

тера распределения признаков. Данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Расчет корреляций проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Результаты на рисунках и в табл. 2 представлены как среднее арифметическое (M) \pm стандартная ошибка среднего (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На сроке беременности E14 не было отмечено значительных изменений массы тела плодов и плаценты под влиянием материнской ГГЦ, вместе с тем в конце беременности на сроке E20 наблюдалось выраженное снижение этих морфометрических показателей (табл. 2).

Материнская ГГЦ приводила к повышению на сроке E20 уровня маркера ПОЛ МДА в сыворотке крови самок крыс (рис. 2, а)

и ПЧП (рис. 2, б) ($p < 0,05$). Под влиянием ГГЦ было обнаружено также увеличение степени окислительной модификации белков в МЧП ($p < 0,05$) (рис. 2, в и г). В обеих исследуемых частях плаценты отмечалась положительная корреляция между уровнем МДА и степенью окислительной модификации белков (МЧП: $r = 0,683$; $p < 0,01$; ПЧП: $r = 0,468$; $p < 0,05$). В условиях материнской ГГЦ активность одного из основных антиоксидантных ферментов (СОД) на сроке E20 в крови матерей и плодов не претерпевала значительных изменений (рис. 2, д), вместе с тем в МЧП наблюдалось снижение активности этого фермента ($p < 0,05$) (рис. 2, е).

На сроке E20 в контроле в МЧП содержание активной расщепленной изоформы эффекторной каспазы-3 было сопоставимо с уровнем белка ее неактивного предшественника прокаспазы-3 (рис. 3, а и д), в то время как в ПЧП наблюдалось значительное преобладание неактивной прокаспазы-3 над ее активной формой (рис. 3, б и д). Под влиянием материнской ГГЦ

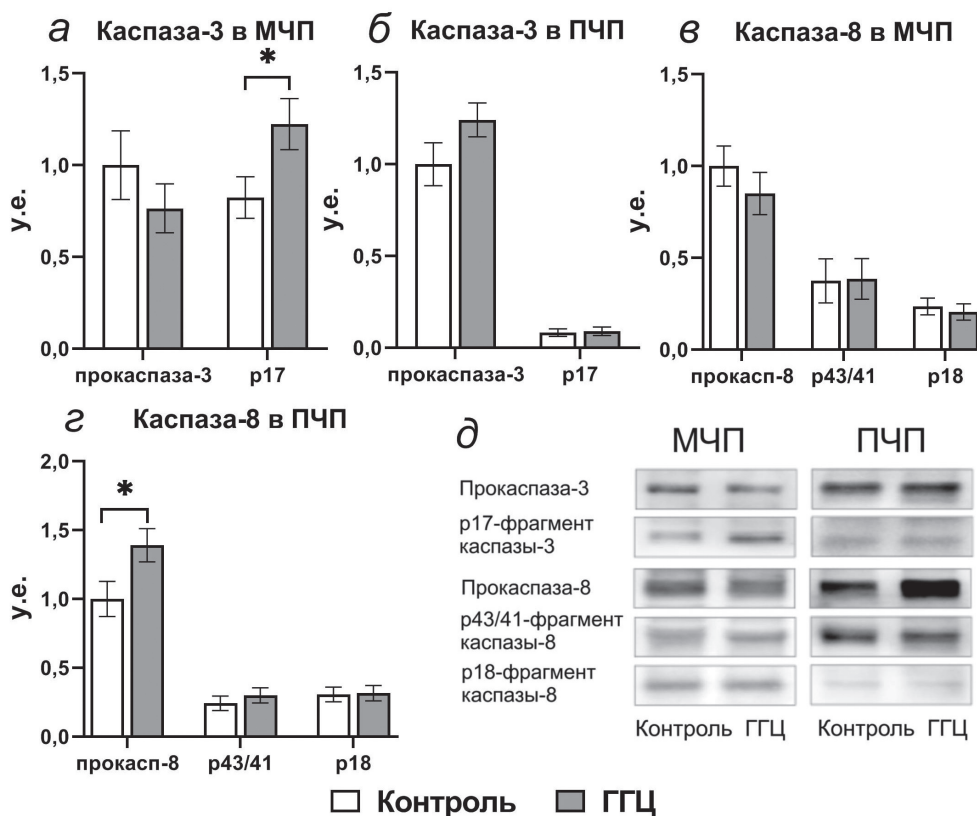


Рис. 3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание изоформ каспазы-3 и каспазы-8 в плаценте крыс на 20-й день беременности (E20). Содержание активной формы каспазы-3 (p17-фрагмент, ~17кДа) и ее неактивного предшественника (прокаспазы-3, ~35кДа) в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плаценты ($n = 8-11$); содержание активной формы каспазы-8 (p18-фрагмент, ~18кДа) и ее неактивных предшественников (прокаспазы-8, ~57кДа; фрагмент промежуточного расщепления p43/p41, ~43/41кДа) в материнской (МЧП) (в) и плодной (ПЧП) (г) частях плаценты ($n = 10-11$); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; за условную единицу (у.е.) принято содержание прокаспазы-3 (а и б) или прокаспазы-8 (в и г) в контроле; д – репрезентативный вестерн-блот изоформ каспаз-3 и -8. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

содержание активной изоформы каспазы-3 повышалось в МЧП ($p < 0,05$) (рис. 3, а и д) и не изменялось в ПЧП (рис. 3, б), уровень неактивной прокаспазы-3 в обеих исследуемых отделах плаценты не претерпевал достоверных изменений. ГГЦ не оказывала влияния на содержание активной изоформы инициаторной каспазы-8 (p18) и ее предшественников (прокаспазы-8, фрагмент p43/41) в МЧП (рис. 3, в), вместе с тем в ПЧП наблюдалось повышение уровня прокаспазы-8 ($p < 0,05$) (рис. 3, з).

В МЧП достоверное снижение содержания белка VEGF под влиянием материнской ГГЦ наблюдалось только на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 4, а и д). В ПЧП отмечалось разнонаправленное влияние ГГЦ на уровень белка VEGF – снижение на сроке E14 ($p < 0,05$) и повышение на сроке E20 ($p < 0,01$) (рис. 4, б и д). Материнская ГГЦ сопровождалась достоверным снижением активности ММП-2 в МЧП на обоих исследуемых сроках ($p < 0,05$) (рис. 4, в и д), а в ПЧП – на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 4, з и д).

Под влиянием материнской ГГЦ в МЧП не было отмечено значительных изменений в экспрессии генов *VEGFA*, *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* на обоих исследуемых сроках (E14 и E20) (рис. 5, а). В ПЧП при воздействии ГГЦ уровень экспрессии *VEGFA* на сроках E14 и E20 также не изменялся, вместе с тем в этой части плаценты на сроке E20 наблюдалось снижение экспрессии *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* ($p < 0,05$) (рис. 5, б).

На сроке беременности E14 под влиянием материнской ГГЦ в МЧП наблюдалось повышение уровня proBDNF ($p < 0,05$) (рис. 6, а и е), сопровождавшееся снижением отношения mBDNF/proBDNF в этой структуре ($p < 0,05$) (рис. 6, в). При этом не было отмечено изменения уровня обеих изоформ и отношения mBDNF/proBDNF в ПЧП (рис. 6, б, в и е). Содержание proNGF в МЧП и ПЧП при воздействии ГГЦ на сроке E14 не изменялось (рис. 6, г, д и е).

В МЧП под влиянием материнской ГГЦ не наблюдалось изменений в экспрессии генов

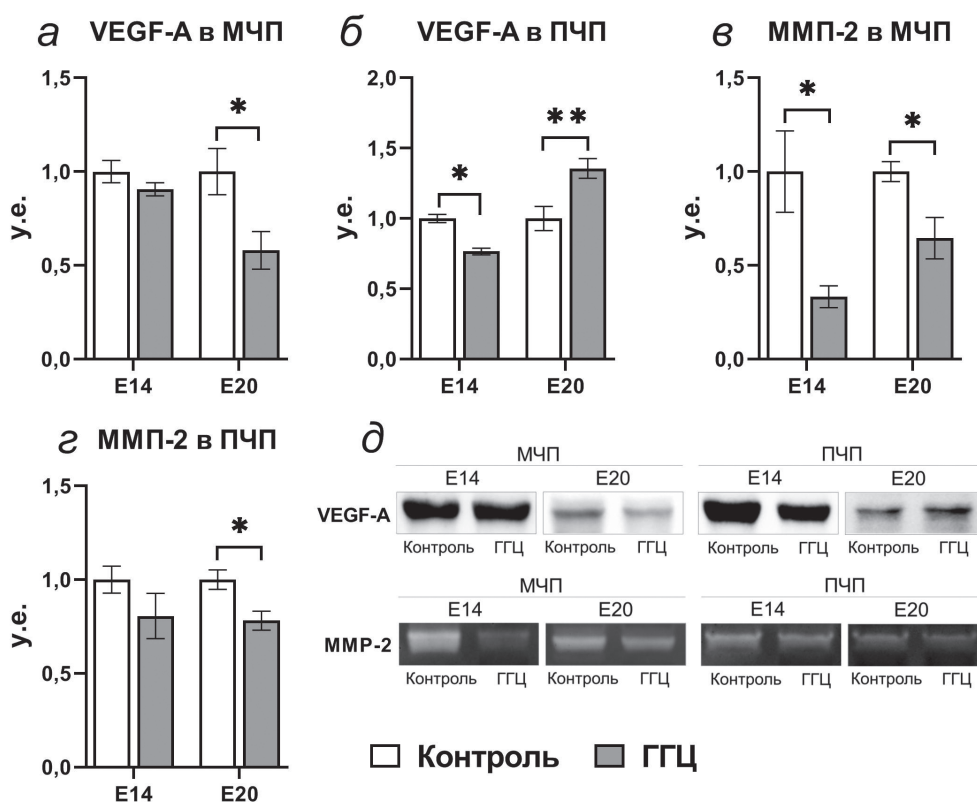


Рис. 4. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание и активность ангиогенных факторов в плаценте крыс. Содержание VEGF, выраженное в условных единицах, в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плаценты на 14-й (E14) ($n = 4$) и на 20-й день беременности (E20) ($n = 6-9$); желатиназная активность матриксной металлопротеиназы 2 (ММП-2) в материнской (МЧП) (в) и в плодной (ПЧП) (г) частях плаценты крыс на 14-й (E14) ($n = 5-6$) и на 20-й день беременности (E20) ($n = 4-8$); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга или зимографии; за условную единицу (у.е.) принято содержание VEGF или активность ММП-2 в контроле; д – репрезентативный вестерн-блот VEGF (~44 кДа) и репрезентативная зимограмма ММП-2 (~67 кДа). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

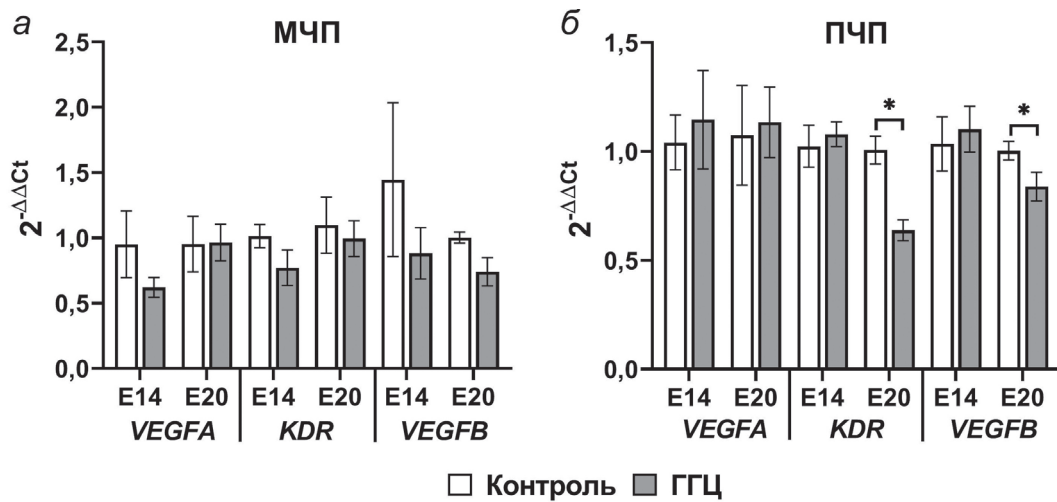


Рис. 5. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на уровень экспрессии генов ангиогенных факторов в плаценте крыс. Уровень экспрессии генов *VEGFA*, *KDR* (*VEGFR-2*) и *VEGFB* в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плацент крыс на 14-й (E14) и 20-й (E20) дни беременности ($n = 4-8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

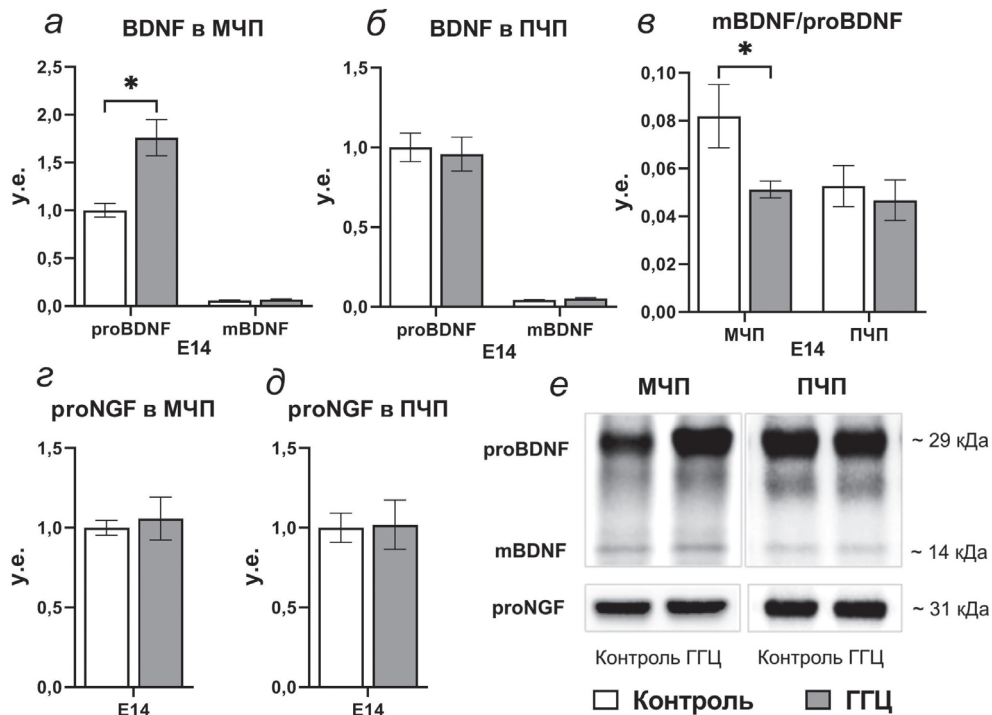


Рис. 6. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на содержание нейротрофинов в плаценте крыс. Содержание изоформ proBDNF и mBDNF в материнской (МЧП) (а) и плодной (ПЧП) (б) частях плацент и отношение mBDNF/proBDNF (в) на 14-й день беременности (E14) ($n = 14-15$); содержание изоформы proNGF в материнской (МЧП) (г) и плодной (ПЧП) (д) частях плацент на 14-й день беременности (E14) ($n = 13-15$); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; за условную единицу (у.е.) принято содержание proBDNF (а и б) или proNGF (г и д) в контроле; е – репрезентативный вестерн-блот proBDNF (~29 кДа), mBDNF (~14 кДа) и proNGF (~31 кДа). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой

BDNF, *NGF* и *TRKB* на обоих исследуемых сроках (E14 и E20) (рис. 7, а). В ПЧП в группе ГГЦ экспрессия генов *NGF* и *TRKB* оказалась сниженной на сроке E20 ($p < 0,05$) (рис. 7, б), в то время как уровень экспрессии *BDNF* и

P75NTR в этом отделе плаценты при воздействии ГГЦ не изменялся (рис. 7, б). Экспрессия гена *TRKA* в обеих частях плаценты не была выявлена ни в одной из исследуемых групп животных.

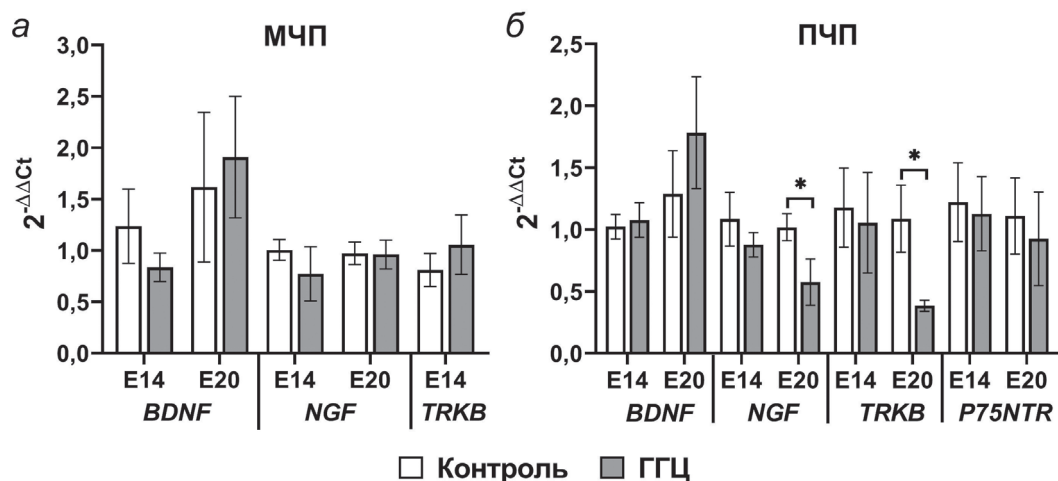


Рис. 7. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на уровень экспрессии генов нейротрофинов и их рецепторов в плаценте крыс. Уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецептора *TRKB* (*NTRK2*) в материнской части плаценты (МЧП) (а), а также уровень экспрессии генов *BDNF*, *NGF* и рецепторов *TRKB* (*NTRK2*), *P75NTR* (*NGFR*) в плодной части плаценты крыс (ПЧП) (б) на 14-й (E14) и 20-й (E20) дни беременности ($n = 4-8$). Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$); * $p < 0,05$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ряде клинических и экспериментальных исследований было отмечено, что материнская ГГЦ вызывает задержку роста плода у человека и животных [31, 46, 47]. Полученные нами в настоящей работе и в предыдущих исследованиях [30] данные подтверждают эти наблюдения и дополняют их тем, что снижение массы плодов крыс под влиянием ГГЦ в нашей модели происходит не в период органогенеза, завершающийся к сроку беременности E14 [8], а на этапе усиленного роста плода в период с E14 по E20. В этот же период, когда в физиологических условиях происходит значительное увеличение содержащего сосуды матери и плода лабиринтного слоя плаценты [48], в группе с воздействием ГГЦ нами наблюдалась задержка роста плаценты, приводящая к уменьшению ее массы, возможно, за счет снижения толщины ее лабиринтного слоя.

Одним из основных механизмов токсических эффектов ГГЦ, как в отношении сердечно-сосудистой системы, так и ЦНС, является ОС, обусловленный усилением продукции активных форм кислорода и снижением активности основных антиоксидантных систем [49]. Развитие ОС и активация процессов апоптоза в системе мать—плацента—плод под влиянием материнской ГГЦ изучалось в основном в отношении мозга плода [30, 50, 51], обладающего повышенной чувствительностью к свободнорадикальному окислению и низкой активностью антиоксидантной защиты [52]. В предыдущих исследованиях было показано, что материнская ГГЦ вызывает повышение уровня ПОЛ,

окислительной модификации ДНК, снижение активности одного из важнейших антиоксидантных ферментов, СОД, и общей антиоксидантной активности в мозге новорожденных крысят [50, 53].

Плацента представляет собой особый и до сих пор малоизученный объект воздействия ГГЦ, основную клеточную массу ее составляют клетки трофобласта, отличающиеся по своим свойствам от клеток сосудов и нейрональных клеток, в отношении которых в основном изучались токсические эффекты ГЦ. По нашим сведениям, изучение непосредственного влияния материнской ГГЦ на показатели ОС, антиоксидантной защиты и на пути активации апоптоза в ткани плаценты *in vivo* до сих пор не проводилось, хотя подобные показатели в плаценте человека исследовались при состоянии ПЭ [20, 21]. Также в ряде исследований *in vitro* было обнаружено усиление процессов апоптоза клеток трофобласта под влиянием высоких концентраций ГЦ [54, 55]. На развитие ОС в организме матери в наших экспериментальных условиях указывает интенсификация ПОЛ в материнской крови. При изучении воздействия ГГЦ на плаценту нами было отмечено увеличение ПОЛ в ПЧП и усиление окислительной модификации белков в МЧП. Несмотря на то что повышение уровня МДА в МЧП и степени окислительной модификации белков в ПЧП не достигало требуемого уровня значимости, при анализе корреляционных зависимостей как в МЧП, так и в ПЧП отмечалась положительная корреляция между этими двумя маркерами ОС. Полученные результаты дают возможность полагать,

что материнская ГЦ вызывает ОС в плаценте. Отмеченная разная чувствительность к ОС маркеров ПОЛ и окислительной модификации белков в двух исследованных частях плаценты может объясняться различиями их морфологической структуры, определяющей степень доступности ГЦ тем или иным клеткам, а также неодинаковым липидным и белковым составом клеток в МЧП и ПЧП. В крови матерей и плодов, а также в ПЧП под влиянием ГЦ не наблюдалось повышения активности СОД, а в МЧП уровень активности СОД даже снижался, что может указывать на отсутствие активации или даже снижение активности антиоксидантной системы. Следует отметить, что во многих исследованиях под действием ГЦ отмечалось сходное снижение уровня общей антиоксидантной защиты, однако влияние ГЦ на экспрессию генов, уровень белка и активность отдельных антиоксидантных ферментов в различных тканях не носило однонаправленного характера [56]. Можно предположить, что спектр индуцируемых под влиянием ГЦ активных форм кислорода в МЧП и ПЧП различается, в связи с чем в их устранении принимают преимущественное участие различные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты. Для более полного изучения механизмов развития ОС и нитрозативного стресса в плаценте при материнской ГЦ необходимо в дальнейшем провести исследования более широкого диапазона маркеров окислительного повреждения макромолекул и показателей антиоксидантной защиты, изучив также влияние ГЦ на продукцию и биодоступность оксида азота как фактора, играющего важную роль в процессах плацентарного ангиогенеза [57].

Полученные в данном исследовании результаты впервые показали, что материнская ГЦ, наряду со стимулированием ОС, способна вызывать активацию процессов апоптоза в плаценте грызунов. Увеличение в МЧП содержания активной формы эффекторной каспазы-3 и отсутствие повышения активной формы инициаторной каспазы-8 позволяет предполагать, что активация апоптоза в данном случае происходит по внутреннему митохондриальному пути, как уже было отмечено в отношении воздействия ГЦ на клетки мозга [58]. Повышение уровня активной каспазы-3 в сочетании с данными о повышении окислительной модификации белков и снижении уровня активности СОД в МЧП указывают на связь между ОС и активацией процессов апоптоза в данном отделе плаценты. Усиление под влиянием ГЦ ОС, запускающего процессы апоптоза, может приводить к гибели проду-

цирующих ангиогенные и ростовые факторы клеток плаценты, тем самым вызывая снижение уровня и нарушение необходимого для нормального формирования плацентарной сосудистой сети баланса этих факторов.

К наиболее вероятным механизмам негативного воздействия материнской ГЦ на функциональное состояние плаценты относят нарушения плацентарного васкуло- и ангиогенеза [21, 26, 27, 59]. Как отмечалось выше, этому могут способствовать инициируемые ГЦ процессы ОС и апоптоза в плаценте, способные вызывать нарушения морфологического созревания плацентарной сосудистой сети [20–22]. На наличие у ГЦ антиангиогенных эффектов указывают и его васкулотоксические свойства, характеризующиеся развитием в эндотелиальных клетках ОС и стресса эндоплазматического ретикулума, уменьшением биодоступности продуцируемого этими клетками оксида азота, а также снижением количества эндотелиоцитов вследствие их апоптотической гибели, что приводит к развитию эндотелиальной дисфункции [49, 60]. Косвенным доказательством возможного негативного воздействия повышенного уровня ГЦ в крови матери на ангиогенез в плаценте служит тот факт, что ГЦ рассматривается в качестве фактора риска развития ПЭ и ЗВУР [61, 62], этиология которых, как предполагают, связана с неполным формированием сосудистой сети плаценты и нарушением ремоделирования материнских спиральных артерий [34, 35]. Вместе с тем исследования, в которых изучалось воздействие ГЦ на уровень ангиогенных факторов и процессы ангиогенеза непосредственно на уровне плаценты, крайне немногочисленны. В модели материнской ГЦ, вызванной диетой с дефицитом фолатов, у беременных самок мышей на сроке E6–E8 (после имплантации, но до образования плаценты) в материнской децидуальной оболочке наблюдалось снижение экспрессии на уровне мРНК и белка ангиогенных факторов VEGF, VEGFR-2 и плацентарного фактора роста (PlGF), сопровождавшееся задержкой децидуального ангиогенеза [59]. В другой работе, выполненной также на самках мышей, было показано снижение уровня мРНК и белка VEGF в цельной плаценте на сроке E17,5 после однократного введения ГЦ [28]. На модели экстраэмбриональной сосудистой сети куриного эмбриона было показано ингибирующее воздействие ГЦ на васкуло- и ангиогенез, сопровождающееся снижением экспрессии генов и уровня белков VEGF и VEGFR-2 [26, 27].

В настоящей работе было впервые изучено влияние хронической материнской ГГЦ на уровень VEGF в различных функциональных частях плаценты на разных сроках ее формирования. Полученные данные позволяют предположить, что эффект ГГЦ может различаться в зависимости от срока беременности и исследуемого отдела плаценты. При воздействии ГГЦ на сроке E14 нами наблюдалось снижение уровня VEGF в ПЧП и отсутствие значительных изменений содержания этого фактора в МЧП, в то время как к концу беременности, на сроке E20, снижение содержания VEGF в МЧП сопровождалось повышением его уровня в ПЧП. Возможными причинами различий в характере изменений уровня VEGF под действием ГГЦ в двух исследованных отделах плаценты могут являться как различие функций, которые, как предполагается, выполняет VEGF в МЧП и ПЧП [3, 63], так и изменение характера проангиогенного действия VEGF на разных сроках созревания плаценты [64], что подробнее обсуждается ниже.

Зрелая плацента грызунов представлена двумя морфологически и функционально различными зонами. Находящаяся в непосредственной близости к плоду лабиринтная часть плаценты (ПЧП) содержит сосуды матери и плода и является основной зоной трансплацентарного обмена. Прилегающая к ней с материнской стороны базальная губчатая часть или спонгиозотрофобласт (МЧП) гораздо менее васкуляризирована, содержит только сосуды матери и играет, как предполагается, эндокринную роль [1]. Синтезируемый в ПЧП клетками трофобласта и эндотелия VEGF является ключевым фактором развития плацентарной сети в данном отделе плаценты [5, 65]. Предполагается, что VEGF, синтезируемый в МЧП, осуществляет в большей степени эндокринную функцию либо непосредственно, высвобождаясь в материнский кровоток, либо путем влияния на эндокринную активность клеток трофобласта [63]. Характер ангиогенного действия VEGF в плаценте в процессе ее развития изменяется. У человека в первом триместре беременности VEGF инициирует формирование первичной плацентарной сосудистой сети; во втором триместре он, наряду с другими проангиогенными факторами, индуцирует разветвление первичных сосудов; в последнем же триместре разветвляющее действие VEGF ингибируется, что приводит к удлинению сформированных сосудов и увеличению площади обмена питательными веществами между матерью и плодом [3, 4].

Срок беременности E14 у грызунов соответствует началу второго триместра беременности у человека и характеризуется завершением процессов органогенеза и началом интенсивного роста плода. К этому сроку МЧП является уже полностью сформированной, в ПЧП же процессы пролиферации и ангиогенеза активно продолжают вплоть до последних дней внутриутробного развития, что позволяет адаптировать плацентарную кровеносную систему ко все возрастающим потребностям плода в кислороде и питательных веществах [7, 48, 66]. Усиленный рост ПЧП в период E14–E20 отражается на соотношении обеих зон плаценты: если на сроке E14 МЧП и ПЧП сопоставимы по толщине, то к концу беременности (E21) толщина ПЧП значительно превосходит толщину МЧП [48]. В этот период в ПЧП происходит как удлинение сосудов, так и их усиленное ветвление [66, 67], сопровождающееся значительным изменением экспрессии генов, в том числе контролирующих ангиогенез [68]. Получены данные, что в плаценте крыс на сроке E14 наблюдается повышение экспрессии гена *VEGF* по сравнению с E10, а к сроку E19 уровень экспрессии *VEGF* и *VEGFR-1 (FLT-1)* снижается [64], в другом исследовании показано, что экспрессия *VEGF* между E17 и E20 не претерпевает значительных изменений [68]. Следует предположить, что в период E14–E17 VEGF принимает наиболее важное участие в процессах плацентарного ангиогенеза, к сроку же окончания беременности (E20), когда плацентарное сосудистое дерево практически сформировано, его значение, как ангиогенного фактора, в ПЧП снижается. Другими активно начинающимися в период E13–E14 процессами, в которых VEGF, наряду с ММП, играет важную роль, является миграция клеток трофобласта и ремоделирование материнских спиральных артерий, необходимые для усиления кровоснабжения плода [7, 48, 64].

Отмеченное нами снижение под воздействием ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на сроке E14, в ключевой момент для процессов формирования разветвленной сосудистой сети и ремоделирования материнских спиральных артерий, согласуется с данными других исследований [28, 59]. Повышение под влиянием материнской ГГЦ уровня VEGF в ПЧП на конечном сроке беременности (E20) могло явиться компенсаторной реакцией на недостаточное формирование разветвленной плацентарной сосудистой сети и возникающие вследствие него нарушения плацентарного кровообращения и гипоксию [35, 69], а также ответом на

отмеченное снижение экспрессии рецептора *KDR (VEGFR-2)* в этой части плаценты. Увеличение содержания VEGF в ПЧП может быть также связано с повышением уровня стимулирующих экспрессию VEGF провоспалительных цитокинов [70], отмеченным нами ранее при воздействии ГГЦ в этой зоне плаценты [30].

Наблюдавшееся при воздействии ГГЦ снижение уровня VEGF в МЧП на E20 могло оказаться следствием уменьшения количества продуцирующих VEGF клеток, в частности, гигантских клеток трофобласта [71], и/или снижения в них синтеза VEGF вследствие отмеченной нами активации ОС и апоптотических процессов в данном отделе плаценты. С другой стороны, снижение уровня VEGF, обладающего антиапоптотической активностью [21], могло внести вклад в наблюдаемую в МЧП активацию процессов апоптоза. Роль VEGF в МЧП пока мало исследована, но, исходя из гипотезы, что VEGF, синтезируемый в МЧП, может высвобождаться в кровь матери и сигнализировать материнскому организму о функциональном состоянии плаценты [63], можно предположить, что снижение уровня VEGF в МЧП с последующим возможным уменьшением его секреции в кровь матери является одним из сигналов материнскому организму о нарушении развития плаценты под влиянием ГГЦ.

VEGF усиливает экспрессию и активность ММП-2 и -9, которые разрушают внеклеточный матрикс, освобождают от закоривания клетки эндотелия и трофобласта, позволяя им мигрировать, и посредством этих механизмов участвуют в процессах развития плаценты, плацентарного ангиогенеза, инвазии трофобласта и ремоделирования плацентарных артерий [8, 26, 65, 72–74]. Предполагается, что ММП совместно с VEGF вовлечены в патогенез плацентарных осложнений беременности, связанных с нарушением ангиогенеза, в частности, ПЭ [72]. Данные о влиянии ГЦ на содержание и ферментативную активность ММП в плаценте немногочисленны и неоднозначны: в культуре клеток цитотрофобласта человека ГЦ вызывал снижение синтеза и активности ММП-2 и -9 [75], в то время как в плаценте женщин с преждевременными родами и легкой ГГЦ уровень белка ММП-2 и -9 оказался повышенным [29]. Возможность разнонаправленного воздействия ГЦ на желатиназную активность ММП-2 подтверждено в опытах *in vitro*, показавших, что эффект ГЦ зависит от молярного соотношения ГЦ к ММП-2 – при молярном соотношении ГЦ/ММП-2 в пределах 1/1–100/1 наблюдается активация неактив-

ной формы предшественника проММП-2, при повышении уровня ГЦ (молярное соотношение ГЦ/ММП-2 больше 1000/1) происходит ингибирование активной формы ММП-2 [76].

В данной работе нами впервые было изучено влияние ГЦ на активность ММП в плаценте крыс и показано, что под влиянием материнской ГГЦ в обеих изученных частях плаценты наблюдается снижение активности ММП-2, особенно четко проявляющееся в МЧП на обоих изучаемых сроках беременности (E14 и E20). Снижение активности ММП-2 в плаценте может являться следствием прямого ингибирующего воздействия высоких концентраций ГЦ [76], а также быть связано с уменьшением уровня VEGF, которое в МЧП совпадает со снижением активности ММП-2, а в ПЧП – предшествует этому снижению. Характерно, что сходное снижение уровней VEGF и ММП-2 в децидуальной оболочке и плаценте мышей, сопровождавшееся нарушением плацентарного ангиогенеза и задержкой роста плода, наблюдалось при пренатальном воздействии алкоголя, который, подобно ГЦ, способен индуцировать развитие ОС [65, 77].

Фактор VEGF-B, связывающийся с рецептором VEGFR-1 (Flt-1), по-видимому, имеет не столь решающее значение для развития плода, как VEGF. Выключение у мышей гена *VEGFB* не вызывало серьезных отклонений в развитии, в то время как инактивация гена *VEGFA* приводила к эмбриональной гибели на сроке E11–E12 [6, 78]. Возможная ангиогенная роль фактора VEGF-B в плаценте остается невыясненной, вместе с тем отмечено, что уровень белка VEGF-B, наряду с ключевыми ангиогенными факторами VEGF и PlGF, в плаценте мышей снижается в модели задержки роста плода, вызванного гиперэкспрессией sFlt-1, являющегося антагонистом VEGF [79]. Установлено, что VEGF-B может выполнять антиоксидантные функции, повышая активность ключевых антиоксидантных ферментов [80]. Отмеченное нами снижение экспрессии фактора *VEGFB* в ПЧП на сроке E20 может быть связано как с нарушениями ангиогенеза, так и с наблюдаемым под влиянием материнской ГГЦ снижением уровней антиоксидантов и общей антиоксидантной защиты [53].

В процессе развития нейротрофины BDNF и NGF, помимо своей основной роли регуляторов жизненно значимых процессов роста и дифференциации нейронов ЦНС, выполняют также проангиогенную функцию, усиливая пролиферацию и миграцию клеток эндотелия [9, 81–83]. Предполагается, что в плаценте человека и грызунов нейротрофины, так же

как и в ЦНС, выступают в качестве важных ростовых и проангиогенных факторов [9, 13, 84–87]. BDNF, NGF и их специфические рецепторы TrkB и TrkA, а также рецептор p75NTR, с которым селективно связываются предшественники нейротрофинов proBDNF и proNGF, обнаруживаются на уровне белка и/или мРНК как в материнских децидуальных и эндотелиальных клетках, так и в клетках трофобласта и эндотелия сосудов плода [10, 11, 13, 14, 88–93]. Показано, что активация сигнального пути BDNF/TrkB усиливает пролиферацию и дифференциацию клеток трофобласта и снижает в них уровень апоптоза [10, 92], в том числе вызванного ОС [11]. Установлено участие системы NGF в формировании плаценты и становлении иммунологической толерантности матери к плоду [93, 94], хотя сигнальные пути и механизмы, обеспечивающие эффекты NGF в плаценте, остаются недостаточно выясненными. Также остается неизученной самостоятельная сигнальная роль в плаценте предшественников нейротрофинов proBDNF и proNGF, способных в ЦНС через рецептор p75NTR оказывать антипролиферативное и проапоптотическое действие [95, 96]. Поэтому изучение роли нейротрофинов в плаценте и их взаимодействия с плацентарными ангиогенными факторами оставляет широкое поле для дальнейших исследований [9].

Ранее нами было показано, что материнская ГГЦ приводит к увеличению на сроке E20 содержания предшественников нейротрофических факторов proBDNF (29 кДа) и proNGF (31 кДа) в МЧП и ПЧП при неизменном уровне зрелой изоформы mBDNF (14 кДа), что могло явиться следствием как усиления синтеза этих нейротрофинов, так и нарушения процессинга их незрелых форм [30]. В качестве продолжения предыдущего исследования в данной работе было изучено влияние ГГЦ на содержание белков proBDNF, mBDNF и proNGF на сроке E14, а также на экспрессию генов изучаемых нейротрофинов и их рецепторов на сроках E14 и E20 в МЧП и ПЧП. Под влиянием материнской ГГЦ в МЧП на сроке E14 отмечалось повышение содержания proBDNF, аналогичное наблюдавшемуся на сроке E20 в МЧП и ПЧП [30]. Отсутствие значительных изменений экспрессии гена *BDNF* в обеих исследованных частях плаценты под влиянием материнской ГГЦ, а также повышение уровня proBDNF и снижение отношения mBDNF/proBDNF в МЧП дают основание предположить, что в данном случае материнская ГГЦ вызывает замедление расщепления proBDNF с образованием mBDNF. Это пред-

положение косвенно подтверждается и наблюдаемым снижением при воздействии ГГЦ активности ММП-2, поскольку известно, что ММП, наряду с другими протеазами, участвуют в расщеплении незрелых форм нейротрофинов [97]. Кроме того, показано, что состояние ОС вызывает окислительную модификацию белков proBDNF и proNGF, препятствующую их процессингу при участии протеаз [98].

В отношении экспрессии NGF в плаценте грызунов имеются скудные и неоднозначные данные. У мышей на ранних сроках беременности (E7,5–E12,5) экспрессия мРНК *NGF* и рецептора *TRKA* отмечалась только в материнской децидуальной оболочке, но не в тканях плаценты, вместе с тем клетки трофобласта экспрессировали рецептор *P75NTR* и подвергались трансформации в гигантские клетки под воздействием NGF, вследствие чего авторы предположили, что на дифференциацию этих клеток оказывает влияние NGF материнского происхождения [93, 94]. В подтверждение этих данных в нашем исследовании также не наблюдалась экспрессия *TRKA* в обеих изученных частях плаценты, вместе с тем в ПЧП обнаруживалась экспрессия *P75NTR*. В ряде работ белок NGF определялся в цельной плаценте крыс на поздних сроках беременности (E16–E21) [15, 99, 100], однако его содержание в отдельных частях плаценты не было изучено. В данной работе, наряду с нашим предыдущим исследованием [30], впервые было исследовано содержание изоформы белка proNGF (31 кДа) в МЧП и ПЧП. В наших экспериментальных условиях зрелая форма mNGF (13,5 кДа) в обеих частях плаценты не обнаруживалась. Следует отметить, что в ЦНС и периферических тканях mNGF является минорной изоформой этого нейротрофина и не всегда определяется, основную же часть пула NGF составляет именно proNGF, который способен оказывать сходные со зрелой формой mNGF эффекты [95]. С другой стороны, в ЦНС proNGF через рецептор p75NTR может усиливать процессы апоптоза, поэтому предполагается, что характер действия этого нейротрофина определяется соотношением рецепторов TrkA и p75NTR в клетке [95]. Поскольку ранее нами было отмечено повышение под влиянием материнской ГГЦ уровня белка proNGF в обеих частях плаценты на сроке E20 [30], а в настоящем исследовании было показано отсутствие экспрессии *TRKA* в МЧП и ПЧП при наличии экспрессии *P75NTR*, можно предположить, что повышение уровня изоформы proNGF может вносить вклад в усиление процессов апоптоза в плаценте.

На сроке E14 изменений уровня белка proNGF в МЧП и ПЧП под действием ГГЦ не наблюдалось, экспрессия гена *NGF* также значительно не изменялась, вместе с тем на более позднем сроке (E20) в ПЧП происходило снижение экспрессии гена *NGF* при неизменном уровне его экспрессии в МЧП. Повышение содержания белков BDNF и NGF в различных отделах плаценты при отсутствии изменений экспрессии их мРНК было показано в условиях ПЭ [89, 90], что предполагает наличие посттранскрипционных механизмов изменения содержания этих нейротрофинов. Другим объяснением их повышенного содержания в плаценте при отсутствии увеличения или даже снижения уровня экспрессии соответствующих генов является предполагаемая возможность транспорта нейротрофинов в плаценту из организма матери [15, 16, 87, 93, 94].

В ПЧП на сроке E20 наблюдалось снижение уровня экспрессии гена рецептора BDNF *TRKB*. Уменьшение количества рецепторов TrkB при неизменном уровне mBDNF может привести к снижению активности сигнального пути BDNF/TrkB, что может негативно повлиять на процессы ангиогенеза, вызывая в эндотелиальных клетках активацию апоптоза и снижение экспрессии рецептора KDR (VEGFR-2) [83], которое на уровне мРНК наблюдалось и в нашем исследовании. В предшествующих работах было показано, что ингибирование сигналинга BDNF/TrkB приводит к уменьшению толщины лабиринтного слоя, веса плаценты и плода, а также активации апоптоза во всех отделах плаценты [10]. Усилению апоптоза может способствовать и повышение уровня предшественника proBDNF, через рецептор p75NTR оказывающего проапоптотическое действие [96]. Поэтому наблюдаемые нами в условиях материнской ГГЦ снижение веса плаценты и активация процессов апоптоза могут являться следствием воздействия ГЦ на сигнальные пути BDNF в плаценте.

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

ют в зависимости от морфологического и функционального отдела плаценты и срока ее развития. Выявленное нарушение баланса проангиогенных и ростовых факторов в плаценте под влиянием ГГЦ может привести к замедлению ее роста и нарушениям процессов плацентарного ангиогенеза. В свою очередь, снижение поступления питательных веществ и кислорода от матери к плоду, являющееся следствием неполного развития плацентарной сосудистой сети, может служить одной из причин отмечаемых при материнской ГГЦ нарушений развития мозга плода и снижения когнитивных функций потомства.

Вклад авторов. И.Ю. Коган, А.В. Арутюнян – концепция и руководство работой; И.В. Залозная, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая, А.В. Михель, Д.Б. Иноземцева – проведение экспериментов; Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная, А.В. Михель, Д.Б. Иноземцева, Г.О. Керкешко, Д.С. Васильев, А.А. Коваленко – обработка образцов; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая – обсуждение результатов исследования; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко – написание текста; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютина, А.Д. Щербицкая – редактирование финального текста статьи.

Финансирование. Исследование воздействия ГГЦ на молекулярно-клеточные процессы, обуславливающие развитие плаценты, поддержано Российским научным фондом (проект № 22-15-00393), исследование параметров окислительного стресса и апоптоза в плаценте проведено в рамках Госзадания ФГБУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» (1021062812133-0-3.2.2).

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 проводились исследования (одобрены комитетом по этике Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, протокол № 88 от 08.12.2017), и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burton, G. J., Fowden, A. L., and Thornburg, K. L. (2016) Placental origins of chronic disease, *Physiol. Rev.*, **96**, 1509-1565, doi: 10.1152/physrev.00029.2015.
2. Roberts, J. M., and Escudero, C. (2012) The placenta in preeclampsia, *Pregnancy Hypertens*, **2**, 72-83, doi: 10.1016/j.preghy.2012.01.001.

3. Umapathy, A., Chamley, L. W., and James, J. L. (2020) Reconciling the distinct roles of angiogenic/anti-angiogenic factors in the placenta and maternal circulation of normal and pathological pregnancies, *Angiogenesis*, **23**, 105-117, doi: 10.1007/s10456-019-09694-w.
4. Chen, D. B., and Zheng, J. (2014) Regulation of placental angiogenesis, *Microcirculation*, **21**, 15-25, doi: 10.1111/micc.12093.
5. Wang, Y., and Zhao, S. (2010) *Vascular Biology of the Placenta* (Granger D. N., and Granger, J. P., eds) Morgan & Claypool Life Sciences, San Rafael (CA), p. 1-90.
6. Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, *Endocr. Rev.*, **25**, 581-611, doi: 10.1210/er.2003-0027.
7. Silva, J. F., and Serakides, R. (2016) Intrauterine trophoblast migration: A Comparative view of humans and rodents, *Cell Adh. Migr.*, **10**, 88-110, doi: 10.1080/19336918.2015.1120397.
8. Gualdoni, G. S., Jacobo, P. V., Barril, C., Ventureira, M. R., and Cebal, E. (2021) Early abnormal placentation and evidence of vascular endothelial growth factor system dysregulation at the feto-maternal interface after periconceptional alcohol consumption, *Front. Physiol.*, **12**, 815760, doi: 10.3389/fphys.2021.815760.
9. Sahay, A. S., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2017) Neurotrophins: role in placental growth and development, *Vitam. Horm.*, **104**, 243-261, doi: 10.1016/bs.vh.2016.11.002.
10. Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., and Tanaka, T. (2009) Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival, *Endocrinology*, **150**, 3774-3782, doi: 10.1210/en.2009-0213.
11. 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.
12. Kawamura, K., Kawamura, N., Okamoto, N., and Manabe, M. (2013) Suppression of choriocarcinoma invasion and metastasis following blockade of BDNF/TrkB signaling, *Cancer Med.*, **2**, 849-861, doi: 10.1002/cam4.158.
13. Toti, P., Ciarmela, P., Florio, P., Volpi, N., Occhini, R., and Petraglia, F. (2006) Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein, *J. Endocrinol. Invest.*, **29**, 337-341, doi: 10.1007/BF03344105.
14. Mayeur, S., Silhol, M., Moitrot, E., Barbaux, S., Breton, C., Gabory, A., Vaiman, D., Dutriez-Casteloot, I., Fajardy, I., Vambergue, A., Tapia-Arancibia, L., Bastide, B., Storme, L., Junien, C., Vieau, D., and Lesage, J. (2010) Placental BDNF/TrkB signaling system is modulated by fetal growth disturbances in rat and human, *Placenta*, **31**, 785-791, doi: 10.1016/j.placenta.2010.06.008.
15. 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.
16. Kodomari, I., Wada, E., Nakamura, S., and Wada, K. (2009) Maternal supply of BDNF to mouse fetal brain through the placenta, *Neurochem. Int.*, **54**, 95-98, doi: 10.1016/j.neuint.2008.11.005.
17. Briana, D. D., and Malamitsi-Puchner, A. (2018) Developmental origins of adult health and disease: The metabolic role of BDNF from early life to adulthood, *Metabolism*, **81**, 45-51, doi: 10.1016/j.metabol.2017.11.019.
18. Boldyrev, A. A. (2009) Molecular mechanisms of homocysteine toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 589-598, doi: 10.1134/s0006297909060017.
19. Skovierova, H., Vidomanova, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., Cervenova, T., Halasova, E., and Lehotsky, J. (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1733, doi: 10.3390/ijms17101733.
20. Kasture, V., Sundrani, D., Randhir, K., Wagh, G., and Joshi, S. (2021) Placental apoptotic markers are associated with placental morphometry, *Placenta*, **115**, 1-11, doi: 10.1016/j.placenta.2021.08.051.
21. Kasture, V. V., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2018) Maternal one carbon metabolism through increased oxidative stress and disturbed angiogenesis can influence placental apoptosis in preeclampsia, *Life Sci.*, **206**, 61-69, doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.029.
22. Pereira, R. D., De Long, N. E., Wang, R. C., Yazdi, F. T., Holloway, A. C., and Raha, S. (2015) Angiogenesis in the placenta: the role of reactive oxygen species signaling, *Biomed. Res. Int.*, **2015**, 814543, doi: 10.1155/2015/814543.
23. Zhang, Q., Li, Q., Chen, Y., Huang, X., Yang, I. H., Cao, L., Wu, W. K., and Tan, H. M. (2012) Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition, *Front. Biosci. (Elite Ed)*, **4**, 2525-2535, doi: 10.2741/e563.
24. Rodriguez-Nieto, S., Chavarria, T., Martinez-Poveda, B., Sanchez-Jimenez, F., Rodriguez Quesada, A., and Medina, M. A. (2002) Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 497-500, doi: 10.1016/S0006-291X(02)00232-2.
25. Pan, L., Yu, G., Huang, J., Zheng, X., and Xu, Y. (2017) Homocysteine inhibits angiogenesis through cytoskeleton remodeling, *Biosci. Rep.*, **37**, BSR20170860, doi: 10.1042/BSR20170860.
26. Latacha, K. S., and Rosenquist, T. H. (2005) Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular develop-

- ment in the avian embryo, *Dev. Dyn.*, **234**, 323-331, doi: 10.1002/dvdy.20527.
27. Oosterbaan, A. M., Steegers, E. A., and Ursem, N. T. (2012) The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development, *Microvasc. Res.*, **83**, 98-104, doi: 10.1016/j.mvr.2011.11.001.
 28. 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.
 29. Bala, R., Verma, R., Budhwar, S., Prakash, N., and Sachan, S. (2022) Fetal hyperhomocysteinemia is associated with placental inflammation and early breakdown of maternal-fetal tolerance in pre-term birth, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **88**, e13589, doi: 10.1111/aji.13589.
 30. Arutjunyan, A. V., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Kerkeshko, G. O., Zalozniaia, I. V., and Mikhel, A. V. (2020) Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 248-259, doi: 10.1134/S000629792002008X.
 31. Dai, C., Fei, Y., Li, J., Shi, Y., and Yang, X. (2021) A novel review of homocysteine and pregnancy complications, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 6652231, doi: 10.1155/2021/6652231.
 32. Rosenfeld, C. S. (2021) The placenta-brain-axis, *J. Neurosci. Res.*, **99**, 271-283, doi: 10.1002/jnr.24603.
 33. Shallice, P. D., and Naicker, T. (2019) The placenta as a window to the brain: a review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **73**, 41-49, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.01.003.
 34. Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2018) Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **218**, S745-S761, doi: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
 35. Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M., and Moffett, A. (2019) Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications, *BMJ*, **366**, 12381, doi: 10.1136/bmj.12381.
 36. Yakovleva, O., Bogatova, K., Mukhtarova, R., Yakovlev, A., Shakhmatova, V., Gerasimova, E., Ziyatdinova, G., Hermann, A., and Sitdikova, G. (2020) Hydrogen sulfide alleviates anxiety, motor, and cognitive dysfunctions in rats with maternal hyperhomocysteinemia via mitigation of oxidative stress, *Biomolecules*, **10**, 995, doi: 10.3390/biom10070995.
 37. Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pineal on protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **5**, 179-185.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. Гаврилов В. Б., Гаврилова А. Р., Мажуль Л. М. (1987) Анализ методов определения продуктов ПОЛ в сыворотке крови по тесту с ТБК, *Вопр. мед. химии*, **33**, 118-122.
 42. Vasilev, D.S., Shcherbitskaia, A.D., Tumanova, N.L., Mikhel, A.V., Milyutina, Y.P., Kovalenko, A.A., Dubrovskaya, N.M., Inozemtseva, D.B., Zalozniaia, I.V., and Arutjunyan, A.V. (2023) Maternal hyperhomocysteinemia disturbs the mechanisms of embryonic brain development and its maturation in early postnatal ontogenesis, *Cells*, **12**, 189, doi: 10.3390/cells12010189.
 43. 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.
 44. Воронкина И. В., Кирпичникова К. М., Смагина Л. В., Кожухарова И. В., Гамалей И. А. (2011) Изменение активности матриксных металлопротеиназ первичных эмбриональных фибробластов мыши в процессе культивирования, *Цитология*, **53**, 49-54.
 45. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
 46. Mori, M., Yamashita, Y., Hiroi, Y., Shinjo, S., Asato, R., Hirai, K., Suzuki, K., and Yamamoto, S. (1999) Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **8**, 251-257, doi: 10.1046/j.1440-6047.1999.00094.x.
 47. Yakovleva, O. V., Ziganshina, A. R., Dmitrieva, S. A., Arslanova, A. N., Yakovlev, A. V., Minibayeva, F. V., Khaertdinov, N. N., Ziyatdinova, G. K., Giniatullin, R. A., and Sitdikova, G. F. (2018) Hydrogen sulfide ameliorates developmental impairments of rat offspring with prenatal hyperhomocysteinemia, *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2018**, 2746873, doi: 10.1155/2018/2746873.
 48. Furukawa, S., Tsuji, N., and Sugiyama, A. (2019) Morphology and physiology of rat placenta for toxicological evaluation, *J. Toxicol. Pathol.*, **32**, 1-17, doi: 10.1293/tox.2018-0042.

49. Esse, R., Barroso, M., Tavares de Almeida, I., and Castro, R. (2019) The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 867, doi: 10.3390/ijms20040867.
50. 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.
51. Li, W., Li, Z., Zhou, D., Zhang, X., Yan, J., and Huang, G. (2019) Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **72**, 6-12, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.11.002.
52. Ikonomidou, C., and Kaindl, A. M. (2011) Neuronal death and oxidative stress in the developing brain, *Antioxid. Redox Signal*, **14**, 1535-1550, doi: 10.1089/ars.2010.3581.
53. Pustygina, A. V., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., and Arutyunyan, A. V. (2015) Indices of oxidative stress in the brain of newborn rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia, *Neurochem. J.*, **9**, 60-65, doi: 10.1134/s1819712415010079.
54. 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.
55. Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S. D., Sadovsky, 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.
56. Faverzani, J. L., Hammerschmidt, T. G., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., and Vargas, C. R. (2017) Oxidative stress in homocystinuria due to cystathionine ss-synthase deficiency: findings in patients and in animal models, *Cell Mol. Neurobiol.*, **37**, 1477-1485, doi: 10.1007/s10571-017-0478-0.
57. Krause, B. J., Hanson, M. A., and Casanello, P. (2011) Role of nitric oxide in placental vascular development and function, *Placenta*, **32**, 797-805, doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.025.
58. Baydas, G., Reiter, R. J., Akbulut, M., Tuzcu, M., and Tamer, S. (2005) Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels, *Neuroscience*, **135**, 879-886, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.05.048.
59. Li, Y., Gao, R., Liu, X., Chen, X., Liao, X., Geng, Y., Ding, Y., Wang, Y., and He, J. (2015) Folate deficiency could restrain decidual angiogenesis in pregnant mice, *Nutrients*, **7**, 6425-6445, doi: 10.3390/nu7085284.
60. Lai, W. K., and Kan, M. Y. (2015) Homocysteine-induced endothelial dysfunction, *Ann. Nutr. Metab.*, **67**, 1-12, doi: 10.1159/000437098.
61. Chen, Y. Y., Gupta, M. B., Grattton, R., Powell, T. L., and Jansson, T. (2018) Down-regulation of placental folate transporters in intrauterine growth restriction, *J. Nutr. Biochem.*, **59**, 136-141, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.003.
62. Hague, W. M. (2003) Homocysteine and pregnancy, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, **17**, 459-469.
63. Li, H., Qu, D., McDonald, A., Isaac, S. M., Whiteley, K. J., Sung, H. K., Nagy, A., and Adamson, S. L. (2014) Trophoblast-specific reduction of VEGFA alters placental gene expression and maternal cardiovascular function in mice, *Biol. Reprod.*, **91**, 87, doi: 10.1095/biolreprod.114.118299.
64. Silva, J. F., Ocarino, N. M., and Serakides, R. (2017) Spatiotemporal expression profile of proteases and immunological, angiogenic, hormonal and apoptotic mediators in rat placenta before and during intrauterine trophoblast migration, *Reprod. Fertil. Dev.*, **29**, 1774-1786, doi: 10.1071/RD16280.
65. Gualdoni, G. S., Ventureira, M. R., Coll, T. A., Palomino, W. A., Barbeito, C. G., and Cebal, E. (2021) Perigestational alcohol consumption induces altered early placentation and organogenic embryo growth restriction by disruption of trophoblast angiogenic factors, *Reprod. Biomed. Online*, **42**, 481-504, doi: 10.1016/j.rbmo.2020.10.015.
66. Rennie, M. Y., Detmar, J., Whiteley, K. J., Jurisicova, A., Adamson, S. L., and Sled, J. G. (2012) Expansion of the fetoplacental vasculature in late gestation is strain dependent in mice, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **302**, H1261-H1273, doi: 10.1152/ajpheart.00776.2011.
67. Coan, P. M., Ferguson-Smith, A. C., and Burton, G. J. (2004) Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology, *Biol. Reprod.*, **70**, 1806-1813, doi: 10.1095/biolreprod.103.024166.
68. Vaswani, K., Hum, M. W., Chan, H. W., Ryan, J., Wood-Bradley, R. J., Nitert, M. D., Mitchell, M. D., Armitage, J. A., and Rice, G. E. (2013) The effect of gestational age on angiogenic gene expression in the rat placenta, *PLoS One*, **8**, e83762, doi: 10.1371/journal.pone.0083762.
69. Mesiano, S. (2019) Endocrinology of Human Pregnancy and Fetal-Placental Neuroendocrine Development, in *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology (Eighth Edition)*, Elsevier, p. 256-284.e9.
70. Choi, S. J., Park, J. Y., Lee, Y. K., Choi, H. I., Lee, Y. S., Koh, C. M., and Chung, I. B. (2002) Effects of cytokines on VEGF expression and secretion by human first trimester trophoblast cell line, *Am. J. Reprod. Immunol.*, **48**, 70-76, doi: 10.1034/j.1600-0897.2002.01071.x.
71. Hemberger, M., Nozaki, T., Masutani, M., and Cross, J. C. (2003) Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells

- depending on depth of invasion, *Dev. Dyn.*, **227**, 185-191, doi: 10.1002/dvdy.10291.
72. Chen, J., and Khalil, R. A. (2017) Matrix metalloproteinases in normal pregnancy and preeclampsia, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **148**, 87-165, doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001.
73. Funahashi, Y., Shawber, C. J., Sharma, A., Kanamaru, E., Choi, Y. K., and Kitajewski, J. (2011) Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing matrix metalloprotease activity, *Vasc. Cell*, **3**, 2, doi: 10.1186/2045-824X-3-2.
74. Li, W., Mata, K. M., Mazzuca, M. Q., and Khalil, R. A. (2014) Altered matrix metalloproteinase-2 and -9 expression/activity links placental ischemia and anti-angiogenic sFlt-1 to uteroplacental and vascular remodeling and collagen deposition in hypertensive pregnancy, *Biochem. Pharmacol.*, **89**, 370-385, doi: 10.1016/j.bcp.2014.03.017.
75. Yang, P. F., Li, J. K., and Xiong, Q. (2007) Homocysteine decreases the invasion in cultured human trophoblasts: relationship between homocysteine and matrix metalloproteinase-2, -9 expression [in Chinese], *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **42**, 184-186.
76. Bescond, A., Augier, T., Chareyre, C., Garcon, D., Hornebeck, W., and Charpiot, P. (1999) Influence of homocysteine on matrix metalloproteinase-2: activation and activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **263**, 498-503, doi: 10.1006/bbrc.1999.1391.
77. Almeida-Toledano, L., Andreu-Fernandez, V., Aras-Lopez, R., Garcia-Algar, O., Martinez, L., and Gomez-Roig, M. D. (2021) Epigallocatechin gallate ameliorates the effects of prenatal alcohol exposure in a fetal alcohol spectrum disorder-like mouse model, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, doi: 10.3390/ijms22020715.
78. Bry, M., Kivela, R., Leppanen, V. M., and Alitalo, K. (2014) Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease, *Physiol. Rev.*, **94**, 779-794, doi: 10.1152/physrev.00028.2013.
79. Vogtmann, R., Kuhnle, E., Dicke, N., Verkaik-Schakel, R. N., Plosch, T., Schorle, H., Stojanovska, V., Herse, F., Koninger, A., Kimmig, R., Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2019) Human sFLT1 leads to severe changes in placental differentiation and vascularization in a transgenic hsFLT1/rtTA FGR mouse model, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **10**, 165, doi: 10.3389/fendo.2019.00165.
80. Chen, R., Lee, C., Lin, X., Zhao, C., and Li, X. (2019) Novel function of VEGF-B as an antioxidant and therapeutic implications, *Pharmacol. Res.*, **143**, 33-39, doi: 10.1016/j.phrs.2019.03.002.
81. Nico, B., Mangieri, D., Benagiano, V., Crivellato, E., and Ribatti, D. (2008) Nerve growth factor as an angiogenic factor, *Microvasc. Res.*, **75**, 135-141, doi: 10.1016/j.mvr.2007.07.004.
82. Caporali, A., and Emanuelli, C. (2009) Cardiovascular actions of neurotrophins, *Physiol. Rev.*, **89**, 279-308, doi: 10.1152/physrev.00007.2008.
83. Kim, H., Li, Q., Hempstead, B. L., and Madri, J. A. (2004) Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells, *J. Biol. Chem.*, **279**, 33538-33546, doi: 10.1074/jbc.M404115200.
84. Sahay, A., Kale, A., and Joshi, S. (2020) Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain development, *Neuropeptides*, **83**, 102075, doi: 10.1016/j.npep.2020.102075.
85. Dhobale, M. (2014) Neurotrophins: role in adverse pregnancy outcome, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **37**, 8-14, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.06.005.
86. Dhobale, M. (2017) Neurotrophic factors and maternal nutrition during pregnancy, *Vitam. Horm.*, **104**, 343-366, doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.011.
87. Mayeur, S., Lukaszewski, M. A., Breton, C., Storme, L., Vieau, D., and Lesage, J. (2011) Do neurotrophins regulate the feto-placental development? *Med. Hypotheses*, **76**, 726-728, doi: 10.1016/j.mehy.2011.02.008.
88. 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.
89. 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.
90. 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*, **42**, 360-364, doi: 10.1080/10641963.2019.1665677.
91. 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.
92. Kawamura, K., Kawamura, N., Kumazawa, Y., Kumagai, J., Fujimoto, T., and Tanaka, T. (2011) Brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling regulates human trophoblast growth in an *in vivo* animal model of ectopic pregnancy, *Endocrinology*, **152**, 1090-1100, doi: 10.1210/en.2010-1124.
93. Frank, P., Barrientos, G., Tirado-Gonzalez, I., Cohen, M., Moschansky, P., Peters, E. M., Klapp, B. F., Rose, M., Tometten, M., and Blois, S. M. (2014) Balanced levels of nerve growth factor are required for normal pregnancy progression, *Reproduction*, **148**, 179-189, doi: 10.1530/REP-14-0112.

94. Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Matsuda, H., Kurohmaru, M., Tachi, C., Yazaki, K., and Hayashi, Y. (1997) Nerve growth factor promotes giant-cell transformation of mouse trophoblast cells *in vitro*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 309-315, doi: 10.1006/bbrc.1996.6032.
95. Fahnstock, M., and Shekari, A. (2019) ProNGF and neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Front. Neurosci.*, **13**, 129, doi: 10.3389/fnins.2019.00129.
96. Teng, K. K., Felice, S., Kim, T., and Hempstead, B. L. (2010) Understanding proneurotrophin actions: Recent advances and challenges, *Dev. Neurobiol.*, **70**, 350-359, doi: 10.1002/dneu.20768.
97. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins, *Science*, **294**, 1945-1948, doi: 10.1126/science.1065057.
98. Fleitas, C., Pinol-Ripoll, G., Marfull, P., Rocandio, D., Ferrer, I., Rampon, C., Egea, J., and Espinet, C. (2018) proBDNF is modified by advanced glycation end products in Alzheimer's disease and causes neuronal apoptosis by inducing p75 neurotrophin receptor processing, *Mol. Brain*, **11**, 68, doi: 10.1186/s13041-018-0411-6.
99. 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.
100. Fornes, R., Hu, M., Maliqueo, M., Kokosar, M., Benrick, A., Carr, D., Billig, H., Jansson, T., Manni, L., and Stener-Victorin, E. (2016) Maternal testosterone and placental function: Effect of electroacupuncture on placental expression of angiogenic markers and fetal growth, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **433**, 1-11, doi: 10.1016/j.mce.2016.05.014.

IMBALANCE OF ANGIOGENIC AND GROWTH FACTORS IN THE PLACENTA IN MATERNAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

A. V. Arutjunyan^{1*}, G. O. Kerkeshko¹, Yu. P. Milyutina^{1,2}, A. D. Shcherbitskaia^{1,3},
I. V. Zalozniaia¹, A. V. Mikhel¹, D. B. Inozemtseva¹, D. S. Vasilev^{1,3},
A. A. Kovalenko³, and I. Yu. Kogan¹

¹ D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: alexarutjunjan@gmail.com

² St. Petersburg State Pediatric Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, 194100 St. Petersburg, Russia

³ I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia

Numerous studies have shown that various adverse factors of different nature and action mechanisms have similar negative influence on placental angiogenesis, resulting in insufficiency of placental blood supply. One of the risk factors for pregnancy complications with placental etiology is an increased level of homocysteine in the blood of pregnant women. However, the effect of hyperhomocysteinemia (HHcy) on the development of the placenta and, in particular, on the formation of its vascular network is at present poorly understood. The aim of this work was to study the effect of maternal HHcy on the expression of angiogenic and growth factors (VEGF-A, MMP-2, VEGF-B, BDNF, NGF), as well as their receptors (VEGFR-2, TrkB, p75NTR), in the rat placenta. The effects of HHcy were studied in the morphologically and functionally different maternal and fetal parts of the placenta on the 14th and 20th day of pregnancy. The maternal HHcy caused increase in the levels of oxidative stress and apoptosis markers accompanied by an imbalance of the studied angiogenic and growth factors in the maternal and/or fetal part of the placenta. The influence of maternal HHcy in most cases manifested in a decrease in the protein content (VEGF-A), enzymatic activity (MMP-2), gene expression (*VEGFB*, *NGF*, *TRKB*), and accumulation of precursor form (proBDNF) of the studied factors. In some cases, the effects of HHcy differed depending on the placental part and stage of development. The influence of maternal HHcy on signaling pathways and processes controlled by the studied angiogenic and growth factors could lead to incomplete development of the placental vasculature and decrease in the placental transport, resulting in fetal growth restriction and impaired fetal brain development.

Keywords: maternal hyperhomocysteinemia, placenta, angiogenic factors, neurotrophins