

ТРАНСПОРТ АМИНОКИСЛОТ В ПЛАЦЕНТЕ КРЫС ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ МЕТИОНИНОВОЙ НАГРУЗКОЙ

© 2024 Ю.П. Милютин^{1*}, Г.О. Керкешко¹, Д.С. Васильев^{1,2}, Н.Л. Туманова²,
И.В. Залозная¹, С.К. Бочковский¹, А.Д. Щербицкая¹, А.В. Михель¹,
Г.Х. Толибова¹, А.В. Арутюнян¹

¹ ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: milyutina1010@mail.ru

² ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 02.12.2023

После доработки 11.04.2024

Принята к публикации 02.05.2024

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) в период беременности связана с риском развития задержки роста плода, одним из предполагаемых механизмов которой является снижение плацентарного транспорта питательных веществ. В настоящей работе исследовано влияние экспериментальной ГГЦ, вызванной ежедневным введением метионина беременным крысам, на содержание свободных аминокислот в крови матери и плода. Наряду с этим, изучены морфологические и биохимические показатели, от которых зависит интенсивность транспорта аминокислот через плаценту. Под влиянием ГГЦ на 20-й день беременности в крови матерей наблюдалось повышение уровня большинства свободных аминокислот, при этом в крови плодов концентрация ряда аминокислот снижалась. В лабиринтной области плаценты, где происходит обмен между кровеносными системами матери и плода, при ГГЦ наблюдалось сужение материнских синусов, сопровождавшееся застоем крови и агрегацией эритроцитов. В зоне лабиринта также отмечалось повышение уровня белка транспортеров нейтральных аминокислот (LAT1, SNAT2), а также активация нижележащего эффектора комплекса mTORC1 белка 4E-BP1, являющегося положительным регулятором экспрессии плацентарных транспортеров. Материнская ГГЦ вызывала увеличение проницаемости плацентарного барьера, о чем свидетельствует усиление переноса красителя Эванса голубого от матери к плоду. Дисбаланс уровней аминокислот в крови матери и плода в условиях ГГЦ может быть обусловлен конкуренцией гомоцистеина с другими аминокислотами за общие транспортеры, а также уменьшением площади поверхности зоны обмена и снижением скорости кровотока в лабиринтной области плаценты. Повышение экспрессии транспортеров аминокислот в лабиринтной части плаценты, возможно, является компенсаторным ответом на недостаточное поступление аминокислот к плоду и снижение его роста.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: материнская гипергомоцистеинемия, плацента, плацентарный транспорт, плацентарный барьер, аминокислоты, mTOR, транспортеры аминокислот.

DOI: 10.31857/S0320972524100027 EDN: IQKNEH

ВВЕДЕНИЕ

Одним из последствий повышенного содержания метаболита метионина непротеиногенной аминокислоты гомоцистеина (ГЦ) в крови матери во время беременности является задержка роста плода и снижение массы новорожденного [1–3]. Причины негативного влияния материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на рост и развитие

плода, вероятно, связанные с токсическими эффектами высокого уровня ГЦ, до сих пор остаются недостаточно изученными.

Важнейшую роль в регулировании распределения питательных ресурсов между матерью и плодом во время беременности играет плацента, которая интегрирует сигналы об уровне доступных питательных веществ со стороны матери и плода [4]. Основным плацентарным датчиком, распознающим уровень питательных веществ в крови матери, является комплекс mTORC1, катали-

* Адресат для корреспонденции.

тической основой которого служит киназа mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) [5, 6]. Недостаточное питание матери, стресс и плацентарная гипоксия приводят к уменьшению активности комплекса mTORC1 в плаценте и соответствующему снижению экспрессии плацентарных переносчиков питательных веществ [7]. Избыток питательных веществ в крови матери, напротив, вызывает активацию плацентарного mTORC1, сопровождаемую увеличением числа плацентарных транспортеров [8]. Предполагают, что, помимо сигналов со стороны матери, транспортная функция плаценты может также регулироваться сигналами о потребностях плода, что позволяет скомпенсировать снижение доступных питательных веществ в крови плода за счет повышения экспрессии и активности плацентарных транспортеров [7, 9].

Адекватный плацентарный транспорт аминокислот (АК) от матери к плоду критически важен для роста плода [10]. Скорость транспорта АК через плаценту определяется скоростью маточно-плацентарного кровотока, площадью зоны обмена между кровеносными системами матери и плода, а также активностью и количеством расположенных в этой зоне транспортеров АК [10]. У грызунов, так же как и у человека, такой зоной обмена и одновременно плацентарным барьером служит непрерывный слой синцитиотрофобласта (СТБ), выстилающий заполненные материнской кровью лакуны в лабиринтной области плаценты. Важную роль в транспорте АК от матери к плоду играют транспортеры нейтральных АК систем А и L, уровень экспрессии и активности которых на мембранах СТБ регулируется комплексом mTORC1 [11].

Экспериментальные данные свидетельствуют об изменениях профиля свободных АК в крови взрослых животных и их плодов под влиянием ГГЦ [12–16]. Высказано предположение, что ГГЦ может затруднять транспорт АК от матери к плоду, конкурируя с ними за общие транспортеры АК в плаценте [17, 18]. В последние годы получены данные о влиянии повышенного уровня ГЦ на активность комплекса mTORC1, при этом в различных экспериментальных условиях отмечалась как активация [19–21], так и ингибирование этого комплекса [22, 23]. Отмечено, что метионин и, возможно, ГЦ способны модулировать активность mTORC1 через изменение внутриклеточного уров-

ня производного метионина S-аденозилметионина [24, 25]. Вместе с тем влияние материнской ГГЦ на активность mTORC1 и уровень транспортеров АК в плаценте остается малоизученным. В опытах *in vitro* под влиянием ГЦ не было обнаружено изменения активности комплекса mTORC1 в клетках трофобласта [26], с другой стороны, введение метионина животным *in vivo* вызывало повышение активности mTORC1 и экспрессии генов транспортеров АК в ткани плаценты [27, 28].

Таким образом, состояние ГГЦ может влиять на транспорт АК от матери к плоду как через конкуренцию ГЦ с другими АК за общие плацентарные транспортеры, так и через изменение активности комплекса mTORC1 и регулируемой им экспрессии транспортеров АК на мембранах СТБ. С другой стороны, благодаря наличию обратной регуляции со стороны плода, в ответ на возможное уменьшение концентраций АК в крови плода и снижение его роста при материнской ГГЦ может происходить компенсаторное увеличение экспрессии и/или активности плацентарных транспортеров АК. При этом следует учитывать возможность непосредственного токсического воздействия высокого уровня ГЦ на клетки плаценты, приводящего к нарушению ее развития и снижению ее транспортной и барьерной функции. Для проверки этих гипотез в данной работе нами было изучено влияние ГГЦ, вызванной хронической метиониновой нагрузкой, на содержание свободных АК в крови самок крыс и их плодов, активность в плаценте зависимых от mTORC1 сигнальных путей, экспрессию переносчиков АК в ее лабиринтной области, а также на морфологические характеристики плаценты и проницаемость плацентарного барьера.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Эксперимент проводили на 33 самках крыс линии Wistar (питомник лабораторных животных «Рапполово», Ленинградская обл., Россия) в возрасте 3–4 месяца с исходной массой 220–290 г и стабильным эстральным циклом, равным четырем дням. Животные содержались в виварии с искусственной вентиляцией и контролируемым 12-часовым циклом света и темноты (день 7.00–19.00; ночь 19.00–7.00) при постоянной температуре 20–21 °C и влажности 75–85%.

Принятые сокращения: АК – аминокислоты; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; ГЦ – гомоцистеин; МЧП – материнская часть плаценты; ПЧП – плодная часть плаценты; СТБ – синцитиотрофобласт; 4E-BP1 – эукариотический фактор инициации трансляции 4E-связывающий белок 1; 5-HT – серотонин; LAT – переносчик больших нейтральных аминокислот; mTOR – мишень рапамицина млекопитающих; mTORC1 – комплекс 1 мишени рапамицина млекопитающих; S6 – рибосомальный белок S6; SNAT – натрий-зависимый переносчик нейтральных аминокислот.

Самки крыс получали стандартный лабораторный корм (полнорационный комбикорм рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных (ГОСТ 34566-2019); «Провими», Россия) и фильтрованную водопроводную 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. Для создания экспериментальной материнской ГГЦ использовали разработанный нами ранее метод, основанный на дозированной хронической метиониновой нагрузке беременным животным [29, 30]. Первым днем беременности (соответствует первому дню эмбрионального развития плодов) считали следующий день после обнаружения сперматозоидов во влагалищном мазке. Экспериментальным животным ежедневно, начиная с 4-го дня беременности и до 19-го дня беременности, предшествующего выводу животных из эксперимента, перорально через желудочный зонд вводили 1 мл водного раствора L-метионина (AJI92, USP30 (TLC); «Химмед», Россия), приготовленного *ex tempore* из расчета 0,6 г/кг массы животного. Контрольным животным в течение того же периода тем же способом вводили 1 мл воды. Для дальнейших анализов были сформированы 2 группы беременных животных: контрольная ($n = 15$) и подопытная (ГГЦ) ($n = 18$).

Оценка общей прибавки веса самок крыс во время беременности. С целью оценки общей прибавки веса самок взвешивали перед подсадкой самцов, на 4-й, 10-й, 14-й и 20-й день беременности. Для каждого животного на основании полученных данных рассчитывалась линейная функция зависимости веса от срока беременности. В контрольной группе и группе с потреблением метионина проводили сравнение k -угловых коэффициентов (тангенс угла наклона) полученных прямых. В анализ вошли животные с общим количеством плодов от 11 до 16, при этом среднее количество плодов в помете у одной самки в группе контроля и в группе с метиониновой нагрузкой не отличалось.

Подготовка ткани к анализу. На 20-й день беременности, через 24 ч после последнего введения метионина, самок обеих групп декапитировали без анестезии при помощи гильотины для лабораторных грызунов («Open Science», Россия) и отбирали кровь, слитую из туловища. Плоды и плаценты извлекали и анализировали их массу. Плоды декапитировали, отбирали слитую из туловищ кровь, пулирую ее от помета одной самки. Плаценты, предназначенные для проведения гистологического исследования, сразу же помещали в 10%-ный нейтральный забуференный (pH 7,2)

формалин («Синтакон», Россия). Сыворотку крови отделяли путем центрифугирования (10 мин при 2300 g). Образцы сыворотки крови и ткани плаценты для биохимического анализа хранили при -80°C .

Анализ содержания свободных аминокислот методом ВЭЖХ. Для количественного определения содержания свободных АК в сыворотке крови за основу был взят метод, описанный А.Д. Аскретковым и др. [31]. Для дериватизации АК применяли набор AccQ-Fluor Reagent Kit («Waters», США). Использовали стандартный 2,5 мМ раствор 17 АК («Waters»); Asn, Gln, Trp, пептид аланил-глутамин в качестве внутреннего стандарта, ацетат натрия, фосфорную и хлористоводородную кислоты («Sigma-Aldrich», США); ацетонитрил («Panreac AppliChem», Испания). Анализ проводили при помощи хроматографической системы ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 («Thermo Fisher Scientific», Германия) с флуориметрическим детектором FLD-3100. Для анализа биологических образцов смешивали 50 мкл раствора внутреннего стандарта и 50 мкл сыворотки крови. Осаждение белков в полученном растворе осуществляли путем добавления ацетонитрила в соотношении 1/1, перемешивания и центрифугирования 5 мин при 10 000 g . Отбирали в вials 10 мкл супернатанта, добавляли 35 мкл поставляемого в составе набора для дериватизации боратного буфера AccQ-Fluor Borate Buffer («Waters») и 10 мкл 10 мМ раствора 6-аминохинолин-N-гидроксисукцинимидил карбамата (AQC; «Waters») в ацетонитриле, перемешивали; инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре, затем 10 мин при 50°C . Вials помещали в автосамплер хроматографа и проводили анализ на обращенно-фазовой колонке AccQ-Tag $3,9 \times 150$ мм с зернением сорбента 4 мкм («Waters») в градиентном режиме с расходом подвижной фазы 1 мл/мин, инъектируемый объем – 2 мкл, температура колонки – 37°C . Детектирование проводили флуориметрически при длинах волн возбуждения $\lambda_{\text{ex}} = 250$ нм и эмиссии $\lambda_{\text{em}} = 395$ нм. Хроматограммы обрабатывали в ПО Chromeleon 7.0 («Thermo Scientific», США) и Microsoft Office Excel. Определяли содержание 17 отдельных АК: His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Ser, Tyr, Pro. Условия хроматографического анализа не позволяли осуществить разделение Ala и Arg, поэтому определяли их суммарное содержание Ala + Arg. Вычисляли средние величины исследуемых показателей в крови самок и пулированной крови плодов от каждой самки в каждой группе.

Иммуоблоттинг. Для исследования влияния материнской ГГЦ на содержание в плаценте транспортеров АК, а также активацию сигнальных путей, контролируемых комплексом mTORC1,

был использован метод иммуноблоттинга. От одной самки в группу для анализа отбирали 1 плаценту. Перед началом анализа замороженную ткань плаценты промывали от крови в холодном 10 мМ фосфатном буфере (pH 7,4) и разделяли на материнскую часть плаценты (МЧП), включающую базальную часть (спонгиотрофобласт) и редуцированную децидуальную оболочку, и плодную часть плаценты (ПЧП), содержащую зону лабиринта. Ткани плаценты гомогенизировали при помощи стеклянного гомогенизатора Даунса в буфере RIPA (1/2, w/v) (50 мМ Tris-HCl (pH 8,1); 1% Triton X-100; 0,1% додецилсульфата натрия (SDS); 0,5% дезокси-холата натрия; 1 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl), содержащем коктейль ингибиторов протеаз (S8820; «Sigma-Aldrich») и фосфатаз (P5726; «Sigma-Aldrich»), центрифугировали 20 мин при 16 000 g и +4 °C; супернатант подвергали анализу. Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда [32] на спектрофотометре NanoDrop One («Thermo Scientific»). Образцы, содержащие по 50 мкг белка, разделяли в 10%-ном ПААГ в денатурирующих условиях по Лэммли в камере для электрофореза белков Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) с источником питания PowerPac HC («Bio-Rad») и переносили на PVDF-мембрану («Bio-Rad») при помощи системы полусухого переноса белков Trans-Blot Turbo Transfer System («Bio-Rad»). Мембраны блокировали раствором 3%-ного бычьего сывороточного альбумина («Sigma-Aldrich») в буфере TBST (50 мМ Tris-HCl; 150 мМ NaCl; 0,1% (v/v) Tween 20; pH 7,5). Содержание белков интереса в исследуемых образцах выявляли с помощью специфичных первичных антител к SNAT1 (SNAT1 (H-9) Mouse mAb, sc-137032; «Santa Cruz Biotechnology», США; 1 : 1000) (55 кДа); SNAT2 (SNAT2 (G-8) Mouse mAb, sc-166366; «Santa Cruz Biotechnology»; 1 : 1000) (60 кДа); LAT1 (LAT1 (D-10) Mouse mAb, sc-374232; «Santa Cruz Biotechnology», 1 : 1000) (45 кДа); LAT2 (LAT2 Rabbit Ab, ab75610; «Abcam», UK; 1 : 1000) (58 кДа); mTOR (mTOR (7C10) Rabbit mAb, 2983S; «Cell Signaling», США; 1 : 1000) (289 кДа); phospho-mTOR (phospho-mTOR (Ser2448) Rabbit Ab, 2971S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (289 кДа); 4E-BP1 (4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb, 9644S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (15–20 кДа); phospho-4E-BP1 (Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) Rabbit mAb, 2855S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (15–20 кДа); S6 (S6 Ribosomal Protein (5G10) Rabbit mAb, 2217S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (32 кДа); phospho-S6 (Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) Rabbit mAb, 4858S; «Cell Signaling»; 1 : 1000) (32 кДа). Инкубацию проводили при +4 °C в течение ночи. После инкубации с соответствующими вторичными антителами козы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (1 : 1000; «Bio-Rad»), сигналы визуализировали, используя усиленную хемилюминес-

ценцию 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 5.2.1. Полученные данные были нормализованы либо по уровню глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (GAPDH (14C10) Rabbit mAb, 2118S; «Cell Signaling»; 1 : 1000), либо по содержанию общего белка в геле [33], определяемому с применением технологии stain-free («Bio-Rad»), согласно инструкции производителя. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по самкам в каждой группе.

Световая микроскопия. Плаценты фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине в течение 24 ч. Гистологическую проводку тканей осуществляли с помощью гистологического процессора для вакуумной инфильтрации Histo-Tek VP1 («Sakura», Япония), формировали парафиновые блоки на приборе модульной системы заливки TES99 («Medite», Германия). Из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм на микротоме Rotary 3002 («PFM», Германия). Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин. При световой микроскопии оценивали: лабиринтную часть плаценты, базальную часть (спонгиотрофобласт), слой гигантских клеток трофобласта и кровяные клетки. Микрофотографии были получены при помощи системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из светового микроскопа Olympus CX43 («Olympus», Япония), цветной цифровой камеры VideoZavr Standart VZ-18C23-B и базы данных для изображений VideoZavr Catalog («АТМ-практика», Россия). Из фотосъемки были исключены поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты. Фотосъемку производили на увеличениях 200× и 400×. Количественный морфометрический анализ проводили с помощью программы VideoTest-Morphology 5.2 («Видеотест», Россия). При анализе площади балок трофобласта между лакунами и капиллярами в лабиринтном отделе плаценты, а также площади ядер гигантских клеток трофобласта, в каждом срезе в 5–7 полях зрения оценивали относительную площадь исследуемого компонента (отношение площади компонента к общей площади препарата) по формуле:

$$S (\%) = (S \text{ компонента} / S \text{ общая}) \times 100.$$

Анализ площади агрегатов эритроцитов в лабиринтном отделе плаценты осуществляли на участке шириной 1 мм в 3–4 полях зрения. Оценивали суммарную площадь агрегатов агглютинированных клеток, содержащих в первую очередь эритроциты. В анализ не включались отдельные

клетки крови; дифференцировка сосудов на сосуды матери и плода не проводилась. Толщину базальной части и лабиринтной области плаценты измеряли на изображениях, включающих все части плаценты в середине ее поперечного среза, сделанного на уровне крепления пуповины. Вычисляли отношение толщины базальной части к толщине лабиринтной области. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по плацентам в каждой группе.

Электронная микроскопия. Ткань плаценты промывали физраствором для удаления крови, погружали на 2 ч в фиксатор (0,1 М PBS (рН 7,4), содержащий 1% глутаральдегида и 1% формальдегида), затем дополнительно фиксировали в 1%-ном OsO₄ в течение 1 ч. Ткань контрастировали уранилацетатом, обезвоживали и заливали в эпоновую смолу по протоколу, описанному в наших предыдущих работах [34, 35]. Ультратонкие срезы толщиной 50 нм изготавливали на ультрамикротоме Leica («Leica Microsystems», Германия) и анализировали на просвечивающем электронном микроскопе FEI Tecnai Spirit V2 («FEI», США). Анализировали по 2 плаценты (каждая от отдельной самки) в контрольной и подопытной группе.

Проницаемость плацентарного барьера. Используемый протокол основан на флуориметрическом определении количества проникшего в ткани плода красителя Эванса синего [36, 37]. На 20-й день беременности, за 3 ч до декапитации, самкам контрольной и подопытной группы под золетилловым наркозом (золетил 100; «Virbac», Франция; 30 мг/кг массы тела) делали однократную инъекцию раствора Эванса синего (45 мг красителя в 0,5 мл воды) через катетер хвостовой вены. Самок декапитировали, плоды извлекали и выделяли мозг плода, а также блок органов брюшной полости плода (кишечник, желудок, поджелудочная железа и т.п., за исключением печени) для дальнейшего исследования. Выделенные образцы органов плода погружали в формамид (6 мл на 1 г массы ткани), гомогенизировали в нем и инкубировали в течение 18 ч при 60 °С для экстрагирования красителя Эванса. После этого образцы центрифугировали 30 мин при 10 000 об./мин на центрифуге Microspin12 («BioSan», Латвия) и отбирали надосадочную жидкость, содержащую формамид с экстрагированным красителем Эванса. Интенсивность флуоресценции измеряли в дублях на планшетном ридере CLARIOstar plus («BMG Labtech», Германия) с длиной волны возбуждения 620 нм и эмиссии – 670 нм. Среднее значение флуоресценции для каждого образца корректировали по холостой пробе (чистый формамид). Образец лизатов соответствующих тканей плода от матери, которой вводили 0,5 мл физиологического раствора без красителя, использо-

вали в качестве отрицательного контроля, чтобы исключить возможность ошибочного измерения автофлуоресценции тканей. Вычисляли средние величины исследуемых показателей по плацентам в каждой группе.

Статистическая обработка данных. Для выявления статистически значимых различий данные обрабатывали с помощью программ STATISTICA 10.0 и GraphPad Prism 8. Анализ выбросов проводился при помощи критерия Граббса. Данные были проверены на нормальность распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка, для оценки однородности дисперсий использовали тест Левена. В зависимости от характера распределения признаков в выборках сравнение экспериментальной и контрольной групп проводилось с использованием *t*-критериев Стьюдента (нормальное распределение, дисперсии однородны) и Уэлча (нормальное распределение, дисперсии неоднородны) или непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни (распределение, отличное от нормального). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Результаты на рисунках и в таблицах представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$) либо как медиана и квартили ($Me (Q_1; Q_3)$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние вызванной метиониновой нагрузкой гипергомоцистеинемии на вес беременных самок крыс и массу их плацент и плодов. Метиониновая нагрузка не вызывала значительных изменений прибавки веса беременных самок крыс. В контрольной и в опытной группе животных *k*-угловые коэффициенты наклона кривой зависимости веса от срока беременности составили $5,20 \pm 1,17$ и $5,30 \pm 1,24$ соответственно.

Таблица 1. Влияние материнской гипергомоцистеинемии на массу плода и плаценты самок крыс на 20-й день беременности

Контроль	ГГЦ
Масса плода (мг)	
4182,2 ± 79,7	3491,3 ± 101,9 ***
Масса плаценты (мг)	
570,1 ± 17,4	472,1 ± 8,1 ***

Примечание. Данные представлены как $M \pm SEM$ от среднеарифметической массы всех плодов или плацент в помете каждой самки; $n = 13$ самок в контрольной группе, $n = 16$ самок в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ); *** $p < 0,001$, *t*-критерий Стьюдента.

Вместе с тем материнская ГГЦ приводила к значительному снижению массы плодов и плацент на 20-й день беременности (табл. 1).

Изменение содержания свободных аминокислот в крови самок крыс и их плодов под воздействием материнской гипергомоцистеинемии, вызванной введением метионина. У самок крыс на 20-й день беременности на фоне ГГЦ, вызванной введением метионина, в сыворотке крови показано повышение содержания боль-

шинства незаменимых (His, Ile, Val, Lys, Phe, Trp) и заменимых АК (Ala + Arg, Asp, Gln, Tyr, Pro), что отражалось на их суммарном уровне, который также увеличивался (табл. 2). Снижение содержания в крови матери под влиянием ГГЦ было отмечено только для Asn. В сыворотке крови плода в условиях ГГЦ наблюдалось снижение содержания некоторых незаменимых (Met, Trp) и заменимых АК (Gln, Ser), а также повышение уровня незаменимых АК Val и Lys. Сумма неза-

Таблица 2. Концентрации свободных аминокислот в сыворотке крови самок крыс и их плодов на 20-й день беременности в норме и при материнской гипергомоцистеинемии

Аминокислота, мкмоль/литр		Мать, контроль	Мать, ГГЦ	Плод, контроль	Плод, ГГЦ
Незаменимые аминокислоты	His	27,4 ± 3,0	40,4 ± 3,7 *	69,0 ± 12,2	84,9 ± 10,1
	Ile	90,1 ± 4,5	132,1 ± 7,5 ***	255,5 ± 15,2	262,9 ± 15,2
	Leu	107,3 ± 8,6	120,3 ± 5,8	249,3 ± 14,9	295,1 ± 11,6 *
	Val	117,1 ± 9,6	153,5 ± 11,3 *	373,7 ± 19,5	445,8 ± 11,6 **
	Lys	462,1 ± 28,4	552,2 ± 24,8 *	867,2 ± 45,1	1023,4 ± 38,5 *
	Met	44,4 ± 1,6	42,9 ± 1,2	133,9 ± 5,8	102,4 ± 4,5 ***
	Thr	530,5 ± 28,2	619,0 ± 46,3	1063,4 ± 51,7	1133,1 ± 45,1
	Phe	58,0 ± 2,8	65,6 ± 2,5 *	247,6 ± 11,3	241,5 ± 10,6
	Trp	51,1 ± 6,7	74,4 ± 6,7 *	143,1 ± 9,9	102,9 ± 5,1 **
	Разветвленные (Ile + Leu + Val)	301,2 ± 17,7	405,9 ± 23,1 *	878,4 ± 43,7	1003,7 ± 31,7 *
Сумма незаменимых АК		1434,0 ± 69,7	1800,4 ± 98,8 *	3402,5 ± 86,2	3682,9 ± 105,1*
Заменимые аминокислоты	Ala + Arg	845,0 ± 28,4	993,6 ± 43,3 *	1464,0 ± 55,6	1562,2 ± 78,7
	Asp	22,2 ± 2,8	36,7 ± 3,0 **	68,6 ± 5,6	55,4 ± 3,3
	Asn	79,5 ± 2,7	50,3 ± 3,6 **	103,2 ± 6,3	123,3 ± 9,4
	Glu	120,7 ± 9,8	131,9 ± 7,0	362,4 ± 25,8	339,8 ± 21,6
	Gln	859,3 ± 31,9	1069,5 ± 54,6 **	1655,9 ± 79,1	1377,3 ± 90,9 *
	Gly	170,9 ± 11,3	201,2 ± 15,1	356,5 ± 24,2	355,1 ± 24,2
	Ser	290,1 ± 12,4	314,5 ± 4,8	441,3 ± 18,4	380,8 ± 13,2 *
	Tyr	30,2 ± 2,0	40,1 ± 2,7 *	171,7 ± 18,7	172,9 ± 7,6
	Pro	206,4 ± 9,9	317,0 ± 15,3 ***	536,4 ± 18,9	559,7 ± 25,0
	Сумма заменимых АК	2624,2 ± 68,3	3154 ± 86,5 **	5160,0 ± 163,1	4926,5 ± 205,6
Сумма всех АК		4109,7 ± 127,5	4955,1 ± 115,5 ***	8562,5 ± 203,8	8618,2 ± 245,3

Примечание. Данные представлены как М ± SEM; n = 11 самок в контрольной группе, n = 10 самок в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ); * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с контролем; t-критерий или U-критерий Манна-Уитни.

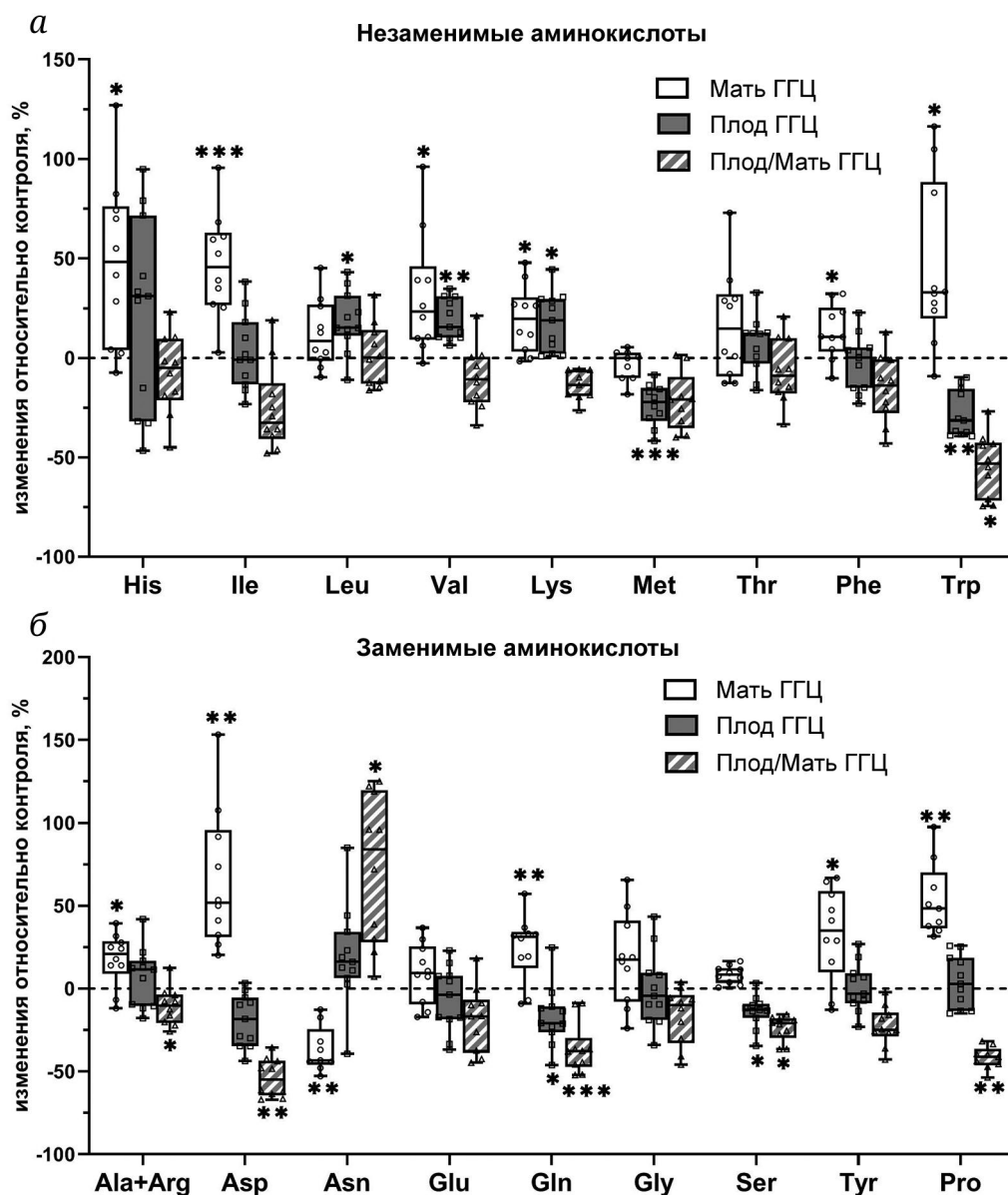


Рис. 1. Изменения под влиянием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) содержания свободных аминокислот (АК) в сыворотке крови беременных крыс (Мать ГГЦ) и их плодов (Плод ГГЦ), а также отношения уровня АК в крови плода к содержанию в крови матери (Плод/Мать ГГЦ) на 20-й день беременности. а – Незаменимые АК; б – заменимые АК. Изменения выражены в процентах относительно уровня в контрольной группе; данные представлены как Ме (Q_1 ; Q_3); $n = 11$ самок в контрольной группе, $n = 10$ самок в группе ГГЦ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с контролем; t -критерий или U -критерий Манна-Уитни

менимых АК в сыворотке крови плодов при ГГЦ была выше, чем в контроле, при этом суммарное содержание заменимых АК, а также общая сумма всех АК достоверно не изменялись. В условиях материнской ГГЦ наблюдалось преимущественно снижение отношения содержания АК в крови плода к уровню в крови матери (Ile, Met, Trp, Asp, Gln, Pro), исключение составил Asn, для которого установлено повышение данного показателя (рис. 1).

Изменение количества транспортеров аминокислот в лабиринтной области плаценты

крыс под влиянием материнской гипергомоцистеинемии. В условиях ГГЦ, вызванной введением метионина, у беременных крыс на 20-й день беременности в ПЧП (лабиринтная область) наблюдалось повышение содержания натрий-зависимого переносчика нейтральных АК 2 (SNAT2; $p < 0,01$), а также переносчика больших нейтральных АК 1 (LAT1; $p < 0,05$) по сравнению с контрольными животными (рис. 2, а и б). При этом уровень белка транспортеров SNAT1 и LAT2 в ПЧП в подопытной и контрольной группах значительно не различался (рис. 2, а и б).

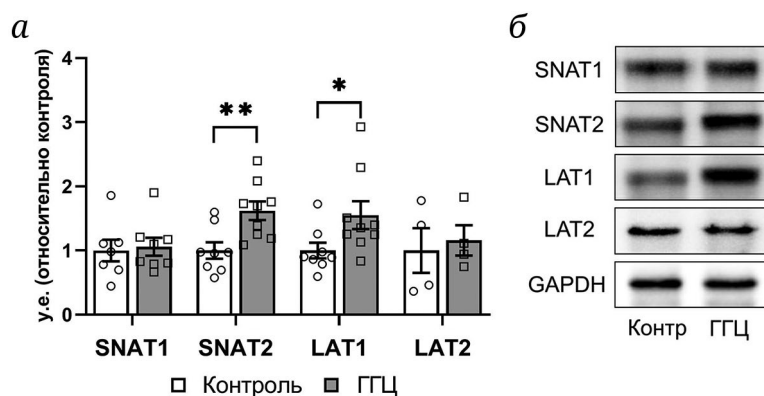


Рис. 2. Влияние экспериментальной гипергомоцистеинемии на содержание транспортеров аминокислот в лабиринтной области плаценты крыс на 20-й день беременности. Содержание (а) и репрезентативный иммуноблот (б) белков SNAT1, SNAT2, LAT1, LAT2 в плодной части плаценты крыс в контроле и под воздействием материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ); ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; данные представлены как $M \pm SEM$; $n = 4-8$ самок в каждой группе; * $p < 0,05$, U -критерий Манна-Уитни; ** $p < 0,01$, t -критерий Стьюдента

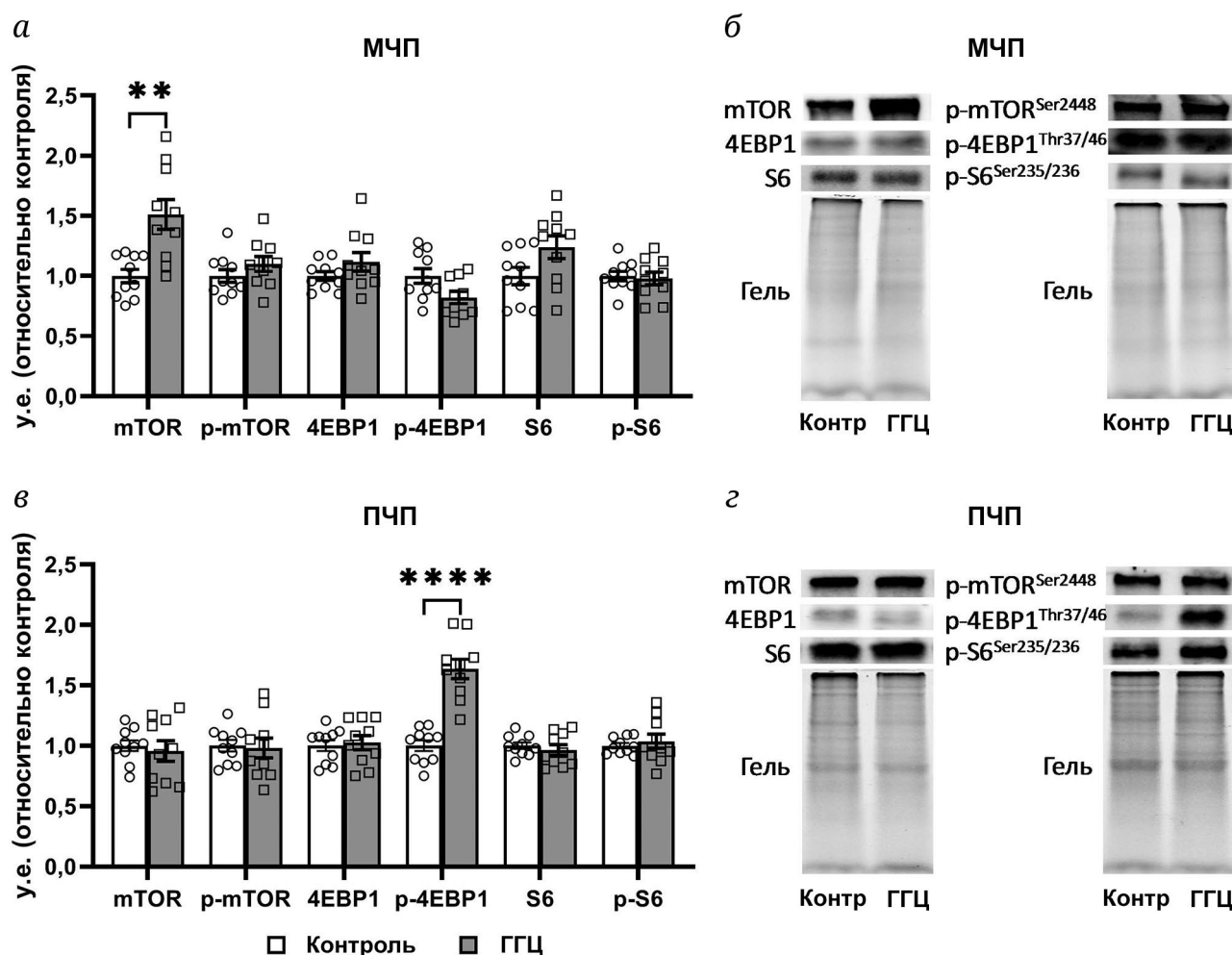


Рис. 3. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на активность киназы mTOR и нижележащих компонентов сигнальной системы mTORC1 в плаценте крыс на 20-й день беременности. Содержание и репрезентативный иммуноблот белков mTOR, 4E-BP1 и S6, а также их фосфорилированных форм p-mTOR^{Ser2448}, p-4E-BP1^{Thr37/46} и p-S6^{Ser235/236} в материнской (МЧП) (а и б) и плодной части (ПЧП) (в и г) плаценты крыс в контроле и под воздействием материнской ГГЦ; ось ординат – выраженная в условных единицах интенсивность полос, полученных методом иммуноблоттинга; данные представлены как $M \pm SEM$; $n = 10$ самок в каждой группе; ** $p < 0,05$, t -критерий Уэлча; *** $p < 0,001$, t -критерий Стьюдента

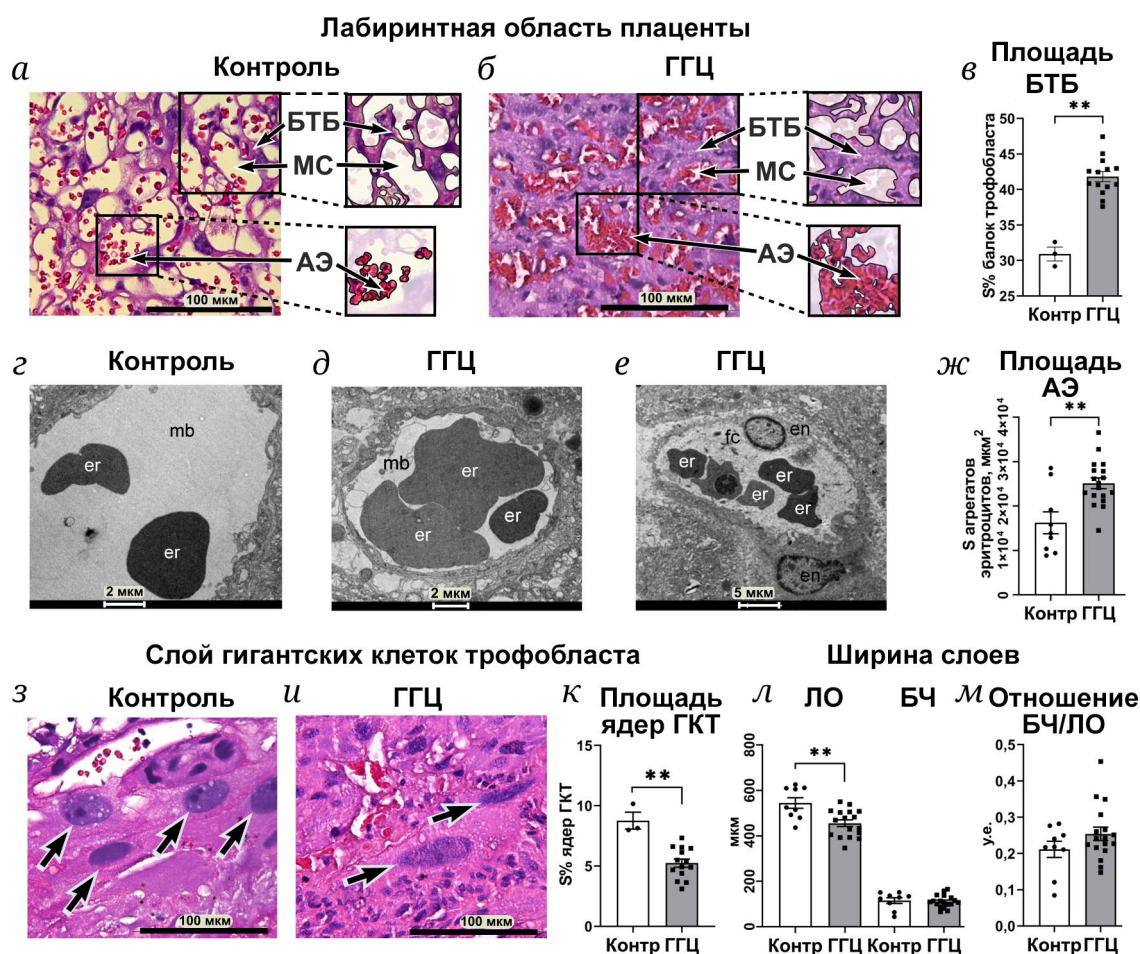


Рис. 4. Морфологические изменения в плаценте крыс на 20-й день беременности под влиянием материнской гипергонадотропиемии (ГГЦ). *а, б* – Лабиринтная область плаценты с балками трофобласта (БТБ) и материнскими синусоидами (МС) в контрольной (*а*) и подопытной (*б*) группе. В выносках обозначены области БТБ и агрегатов эритроцитов (АЭ), площадь которых количественно анализировалась; окраска гематоксилин-эозин, $\times 200$. *в* – Относительная площадь (S%) БТБ от общей площади области лабиринта. *г–е* – Электронограммы ткани плаценты контрольной (*г*) и подопытной (*д* и *е*) группы; mb – кровь матери (материнская синусоида), fc – капиллярный сосуд плода, er – эритроциты в просвете сосуда, на панелях *д* и *е* видны агрегаты эритроцитов, заполняющие просвет сосуда, en – эндотелиальные клетки стенки капилляра плода. *ж* – Площадь АЭ в лабиринтной области плаценты. *з, и* – Гигантские клетки трофобласта (ГКТ) в контрольной группе (*з*) и группе ГГЦ (*и*); окраска гематоксилин-эозин, $\times 400$; стрелками обозначены ядра ГКТ; *к* – относительная площадь (S%) ядер ГКТ от общей площади слоя ГКТ. *л* – Толщина лабиринтной области (ЛО) и базальной части (БЧ) плаценты. *м* – Отношение толщины БЧ к толщине ЛО. На всех графиках данные представлены как $M \pm SEM$. Для панелей *в* и *к*: $n = 3$ плаценты от 3 самок в контрольной группе, $n = 14$ плацент от 4 самок в группе ГГЦ; *ж, л* и *м*: $n = 9$ плацент от 5 самок в контрольной группе, $n = 18$ плацент от 6 самок в группе ГГЦ; ** $p < 0,01$, t -критерий Стьюдента

Влияние индуцированной метионином материнской гипергонадотропиемии на активность сигнальной системы mTORC1 в различных отделах плаценты крыс. При экспериментальной ГГЦ на 20-й день беременности в МЧП было отмечено повышение содержания белка mTOR ($p < 0,05$), при этом изменений содержания или степени активации нижележащих компонентов сигнальной системы mTORC1 не наблюдалось (рис. 3, *а* и *б*). В ПЧП под влиянием ГГЦ не было обнаружено изменений в содержании и уровне фосфорилирования белка mTOR, а также нижележащего эффектора комплекса mTORC1, рибосомального бел-

ка S6. Вместе с тем показана активация другой нижележащей мишени mTORC1, эукариотического фактора инициации трансляции 4E-связывающего белка 1 (4E-BP1), что выражалось в повышении уровня его фосфорилированной по Thr37/46 формы ($p < 0,001$; рис. 3, *в* и *г*).

Структурные изменения в ткани плаценты в условиях материнской гипергонадотропиемии. Лабиринтная область (соответствует ПЧП) является зоной обмена между кровеносными системами матери и плода. В норме на 20-й день беременности она состоит из перекрещивающихся между собой тонких тяжей (балок), образованных

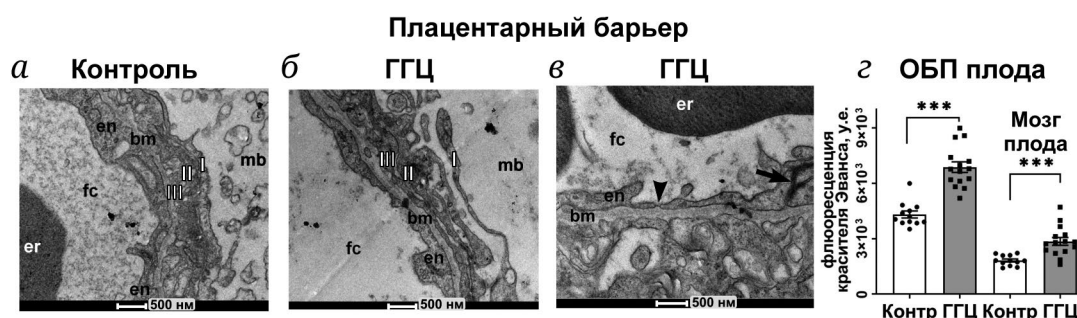


Рис. 5. Влияние материнской гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на ультраструктуру плацентарного барьера и проницаемость плаценты крыс на 20-й день беременности. а–в – Электронограммы зоны обмена между кровеносными системами матери и плода в лабиринтной области; mb – кровь матери (материнская синусоида), fc – капиллярный сосуд плода; слои плацентарного барьера: I – слой цитотрофобласта, контактирующий с материнской кровью, II и III – два слоя синцитиотрофобласта, bm – базальная мембрана, выстилающая слой клеток эндотелия (en) стенки капилляра плода, er – эритроцит в просвете сосуда, стрелка – плотный контакт между эндотелиальными клетками, наконечник стрелки – фенестра эндотелия капилляра плода. г – Уровень интенсивности флуоресценции красителя Эванса синего в тканях органов брюшной полости (ОБП) и головного мозга плодов через 3 ч после его введения самкам крыс; $n = 12$ плацент от 2 самок в контрольной группе, $n = 15$ плацент от 2 самок в группе ГГЦ; *** $p < 0,001$, t -критерий Уэлча

клетками трофобласта, внутри которых проходят выстланные эндотелием кровеносные капилляры плода (рис. 4, а и б). Широкие пространства между балками, синусоиды, заполнены материнской кровью и лишены эндотелия (рис. 4, а и б). В группе ГГЦ в лабиринтной области плаценты наблюдалось утолщение (увеличение площади) балок трофобласта по сравнению с контролем ($p < 0,01$; рис. 4, б и в); соответственно, снижалась площадь заполненного материнской кровью синусоидального пространства. Сужение материнских синусоид при ГГЦ сопровождалось нарушением циркуляции, застоем крови и агрегацией эритроцитов (рис. 4, а и б). Скопление эритроцитов в просветах мельчайших материнских синусоид и капилляров плода было отмечено и при изучении ультраструктуры лабиринтного слоя (рис. 4, г–е). Увеличение площади агрегатов эритроцитов в лабиринтной области подтверждалось данными морфометрии ($p < 0,01$; рис. 4, ж).

Базальная часть плаценты включает три вида клеток: спонгиозотрофобласт, гликогеновые клетки и гигантские клетки трофобласта, располагающиеся тонким слоем на границе базальной части и децидуальной оболочки и выполняющие эндокринную функцию. В контрольной группе гигантские клетки формировали слой толщиной в 2–3 клетки с оксифильной цитоплазмой, округло-овальным ядром и равномерным распределением хроматина (рис. 4, з). В группе с материнской ГГЦ слой гигантских клеток утончался, составляя толщину 1–2 клетки, в клетках отмечалась вакуольная дистрофия цитоплазмы (рис. 4, и). Ядра гигантских клеток в ряде образцов подопытной группы не прослеживались, в отдельных клетках отмечался кариолизис, суммарная площадь ядер гигантских клеток при ГГЦ снижалась ($p < 0,01$; рис. 4, к).

При изучении воздействия материнской ГГЦ на толщину основных частей плаценты на 20-й день беременности наблюдалось уменьшение толщины лабиринтной области ($p < 0,05$; рис. 4, л), при этом толщина базальной части, а также соотношение толщины базальной части к области лабиринта достоверно не изменялись (рис. 4, л и м).

Влияние материнской гипергомоцистеинемии на проницаемость плацентарного барьера. При изучении зоны обмена между кровеносными системами матери и плода в лабиринтной области на ультраструктурном уровне в группе ГГЦ в ряде случаев отмечалась дезинтеграция трех слоев, составляющих плацентарный барьер: I (клетки цитотрофобласта, контактирующие с материнской кровью), II (первый слой СТБ) и III (второй слой СТБ, соприкасающийся с эндотелием сосудов плода), с образованием зазоров между их мембранами (рис. 5, а и б). В эндотелии сосудов плода наблюдалось увеличение количества фенестр, закрытых диафрагмами (рис. 5, в). Проникновение через плацентарный барьер красителя Эванса синего в условиях ГГЦ было достоверно выше, чем в контроле, что подтверждается усилением флуоресценции этого красителя в тканях органов брюшной полости и головного мозга плодов в подопытной группе по сравнению с контрольной ($p < 0,001$; рис. 5, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время введение метионина (с пищей, питьевой водой или через зонд) является одним из наиболее распространенных способов моделирования ГГЦ у животных [38, 39].

По сравнению с введением непосредственно ГЦ, введение метионина обеспечивает более высокий внутриклеточный уровень ГЦ, характерный для клинической картины ГГЦ у человека [40]. Однако неизбежной особенностью данной модели является повышение, наряду с уровнем ГЦ, содержания метионина и его метаболитов в крови, что может оказывать дополнительное влияние на баланс свободных АК [41]. В нашем предыдущем исследовании была охарактеризована динамика уровня ГЦ в крови самок крыс и их плодов в используемой нами модели ГГЦ, вызванной ежедневным введением через желудочный зонд метионина матерям [29]. Концентрация ГЦ в крови беременных крыс на 20-й день беременности ($5,7 \pm 0,2$ мкмоль/литр) значительно повышалась уже через 1 ч после перорального введения метионина ($87,2 \pm 24,2$ мкмоль/литр), сохранялась на сходном высоком уровне через 6 ч после его введения ($81,4 \pm 31,3$ мкмоль/литр), затем постепенно снижалась, оставаясь значительно выше контроля вплоть до 18 ч после метиониновой нагрузки ($34,1 \pm 14,7$ мкмоль/литр), и только через 24 ч к моменту повторного введения метионина достигала значений, близких к нормальным ($6,6 \pm 0,5$ мкмоль/литр) [29]. Сходная динамика уровня ГЦ после введения матерям метионина отмечалась и в крови плодов [29]. Повышению уровня ГЦ в крови при метиониновой нагрузке должно предшествовать поступление метионина в клетки, его метаболическое превращение в ГЦ и транспорт образовавшегося ГЦ в кровь. Вследствие этого уровень самого метионина достигает пика в крови и снижается до нормальных значений раньше уровня ГЦ [42]. Таким образом, наблюдаемое в настоящем исследовании отсутствие повышенного содержания метионина в крови самок крыс и их плодов через 24 ч после метиониновой нагрузки является вполне закономерным. Мы предполагаем, что в используемой нами модели воздействие на изучаемые показатели и процессы повышенного уровня ГЦ, как более длительно действующего фактора, превосходит эффект более краткого повышения уровня метионина.

Потребление с пищей ряда АК в дозах, значительно превышающих потребности в них, вызывает у животных токсический эффект [43]. При этом эффект избытка в пище метионина в крови наиболее выражен, по сравнению с влиянием избытка других АК, и проявляется в первую очередь в уменьшении потребления пищи и снижении роста организма [43]. Задержка роста наблюдалась и у плодов беременных животных, получавших пищу с избытком метионина [13, 44]. В нашем исследовании прибавка веса самками крыс, которым вводили метионин, не отличалась

от наблюдаемой у контрольных животных, что указывает на отсутствие значительных различий в потреблении пищи между группами. Вместе с тем, как и в предыдущих наших исследованиях [29, 30], токсический эффект ГГЦ, вызванной метиониновой нагрузкой, проявлялся в снижении веса плодов.

Согласно полученным нами данным, после хронического введения метионина у самок крыс на 20-й день беременности наблюдалось повышение в крови содержания большинства незаменимых (His, Ile, Val, Lys, Phe, Trp) и заменимых АК (Ala + Arg, Asp, Asn, Gln, Tyr, Pro), что отражалось на суммарном уровне незаменимых и заменимых АК, который также увеличивался. Действительно, имеются свидетельства о том, что у животных с ГГЦ, вызванной генетическими дефектами ферментов метаболизма ГЦ или потреблением обогащенной метионином пищи, повышаются уровни АК в крови [12, 14–16]. Диета, обогащенная метионином, вызывала в крови мышей увеличение уровня ГЦ уже при 1,6-кратном превышении содержания метионина относительно нормы, в то время как для повышения концентрации в крови самого метионина, а также других АК требовалось повышение содержания метионина в пище в 7–10 раз [16]. Данный факт говорит о наличии у организма адаптивных возможностей для устранения избытка метионина в крови, в первую очередь путем его превращения в ГЦ, и подчеркивает значение ГЦ как ключевого токсического агента при метиониновой нагрузке.

Можно предположить, что в повышении уровня свободных АК при метиониновой нагрузке играют роль метаболические механизмы. Например, катаболизм метионина через ГЦ включает ферменты (пропионил-КоА-карбоксилаза) и промежуточные продукты (пропионил-КоА), общие с разветвленными АК [45]. Избыток одного или нескольких подобных промежуточных соединений, образующихся при метаболизме метионина, может замедлять катаболизм других АК, разделяющих с метионином данный метаболический путь. Однако в нашем исследовании в крови матерей отмечалось повышение уровня не только разветвленных, но и прочих незаменимых и заменимых АК, пути метаболизма которых напрямую не связаны с метаболизмом метионина и ГЦ. Предполагается, что избыток метионина и ГЦ в крови может затруднять транспорт в клетки других АК, использующих те же транспортеры [16, 17, 46]. Гипотеза о снижении под влиянием ГГЦ, вызванной метиониновой нагрузкой, транспорта АК в клетки материнского организма и/или их переноса через плаценту к плоду, следствием чего является накопление АК в материнской крови, более соответствует полученным нами данным.

В крови плода суммарный уровень всех АК при воздействии ГГЦ не изменялся. Хотя в группе ГГЦ в крови плодов отмечалось сходное с наблюдавшимся в крови матери повышение концентрации двух незаменимых АК (Val, Lys), содержание Met, Gln, Trp и Ser в крови плодов в этой группе было значительно снижено по сравнению с контролем. Кроме того, в подопытной группе наблюдалось снижение отношения уровня Pro и Ala + Arg в крови плода к содержанию в крови матери. За перенос через мембраны СТБ АК, уровень которых был снижен в крови плода, ответственны транспортеры LAT1 и LAT2 транспортной системы L (Met, Gln, Trp, Ala, Ser), транспортеры SNAT1 и SNAT2 системы A (Met, Gln, Ala, Ser, Pro) и транспортеры y^+LAT1 и y^+LAT2 системы y^+L (Arg, Gln, Met) [17, 47]. Предполагается, что ГЦ также может переноситься плацентарными переносчиками систем A, L и y^+L [17, 18], поэтому снижение в крови плода содержания АК, являющихся субстратами этих же транспортеров, согласуется с гипотезой о возможности конкурентного ингибирования их плацентарного транспорта под влиянием материнской ГГЦ.

Глутамин (Gln) и его предшественник Glu жизненно важны для роста и развития плода, концентрация Gln в крови матери и плода, а также скорость его транспорта от матери к плоду являются одними из самых высоких среди прочих АК [48, 49]. Адекватный уровень Gln и Glu в крови плода поддерживается благодаря способности этих АК к взаимопревращению и рециркуляции между плацентой и печенью плода [48]. Наблюдаемое нами снижение уровня Gln в крови плодов могло явиться следствием повышенного его расходования для компенсации задержки роста плода при материнской ГГЦ.

Отрицательно заряженные АК Asp и Glu транспортируются от матери к плоду переносчиками возбуждающих АК группы EAAT, относящимися к транспортной системе X^{AG} [47]. При метиониновой нагрузке наблюдалось повышение концентрации Asp в крови матери, которое сопровождалось снижением отношения уровня Asp в крови плода к содержанию в крови матери. Метионин и ГЦ не являются субстратами транспортеров группы EAAT, поэтому изменение уровня Asp не может быть связано с конкуренцией с этими АК за общие транспортеры. Следует предполагать, что повышение уровня Asp с одновременным снижением содержания Asn в крови матерей под воздействием ГГЦ связано со снижением синтеза Asn из Asp. Поскольку для синтеза Asn из Asp используется группа NH_2 Gln [50], уменьшение в условиях ГГЦ содержания Gln в крови плода и одновременное снижение отношения уровня Asp в крови плода к содержанию в крови матери,

сопровожаемое повышением этого отношения для Asn, могут быть взаимосвязаны.

Материнский Trp, как предшественник серотонина (5-НТ), имеет исключительно важное значение для развития нервной системы плода. У грызунов плацента начинает синтезировать 5-НТ из материнского Trp, начиная с 10-го дня беременности, и вплоть до 15-го дня эмбрионального развития плацентарный 5-НТ является основным, и, возможно, единственным источником этого нейромедиатора для мозга плода [51, 52]. Отмеченное нами снижение концентрации Trp в крови плодов могло привести к уменьшению синтеза 5-НТ в мозге плода, тем самым оказывая негативное воздействие на его развитие. Поскольку в плаценте грызунов 5-НТ синтезируется главным образом в гигантских клетках трофобласта [53], наблюдавшееся нами уменьшение количества этих клеток могло внести свой вклад в снижение уровня доступного плоду 5-НТ.

Помимо возможной конкуренции ГЦ с другими АК за общие транспортеры, важной причиной, вызывающей снижение транспорта АК от матери к плоду в условиях материнской ГГЦ, может являться морфологическое нарушение плаценты [54]. В данном исследовании нами отмечены снижение веса плацент, уменьшение толщины их лабиринтной области и относительной площади материнских синусоид в этом отделе, сопровождаемое застоем материнской крови и повышенной агрегацией эритроцитов, что является фактором риска образования микротромбов [55]. Уменьшение площади синусоид, где происходит контакт материнской крови со слоем СТБ, как и замедление плацентарного кровотока, приводят к снижению транспорта питательных веществ через расположенные на мембранах СТБ переносчики [10]. Нарушение формирования сосудистой системы области лабиринта, обеспечивающей транспорт питательных веществ от матери к плоду, часто приводит к задержке роста плода [54]. Обнаруженные в данном исследовании в зоне лабиринта морфологические изменения могут, в частности, являться следствием отмеченного нами ранее дисбаланса ангиогенных и ростовых факторов в плаценте в условиях материнской ГГЦ [30].

Как было отмечено выше, в плаценте человека и грызунов перенос нейтральных аминокислот от матери к плоду осуществляется в первую очередь транспортерами систем A и L, уровень активности и экспрессии которых на мембранах СТБ регулируется системой mTOR [7, 17, 56]. Ограничение количества питательных веществ в пище матери в период беременности приводит к снижению активности комплекса mTORC1 в плаценте, уменьшению экспрессии и активности транспортеров АК на мембранах СТБ, что сопро-

вождается снижением веса плодов [7]. С другой стороны, избыток питательных веществ в крови матери вызывает в плаценте активацию комплекса mTORC1, повышение экспрессии транспортеров АК и приводит к увеличению веса плодов [57, 58]. Влияние же состояния материнской ГЦ, характеризующейся избытком ГЦ и, возможно, других АК в крови матери, но одновременно сопровождаемой снижением роста плода [1, 44], на активность плацентарного комплекса mTORC1 до сих пор не было исследовано.

В данном исследовании впервые была предпринята попытка в модели хронической метиониновой нагрузки оценить влияние материнской ГЦ на активность комплекса mTORC1 в различных частях плаценты, используя в качестве функциональных маркеров передачи сигналов mTORC1 уровень фосфорилирования его ключевых нижележащих эффекторов, белков 4E-BP1 и S6. В МЧП, не связанной напрямую с транспортом питательных веществ к плоду, белок mTOR играет в большей степени роль стимулятора роста и функционального созревания через активацию синтеза белка [59]. Обнаруженное нами повышение под влиянием ГЦ уровня белка mTOR в МЧП, возможно, является компенсаторным ответом на снижение эндокринной функции этого отдела плаценты, требующей постоянно высокого уровня синтеза белка [60]. Основными эндокринными клетками в МЧП являются гигантские клетки трофобласта [61], количество которых снижалось при воздействии материнской ГЦ. В ПЧП, соответствующей лабиринтной области плаценты, нами было установлено повышение уровня фосфорилирования белка 4E-BP1, при этом не наблюдалось изменения экспрессии общего белка mTOR и его фосфорилированной по Ser2448 формы, а также активации другой мишени mTOR, белка S6. В настоящее время известно несколько сайтов фосфорилирования mTOR, функциональное значение которых еще недостаточно изучено [62]. Показано, что фосфорилирование mTOR по Ser2448 осуществляется лежащей ниже mTOR в сигнальном каскаде киназой S6K1, ответственной также и за фосфорилирование белка S6 [63]. Поэтому отсутствие изменения уровня p-mTOR^{Ser2448} и p-S6 может наблюдаться вследствие неизменной активности киназы S6K1. Активация 4E-BP1 могла произойти как по причине активации mTOR через другие сайты фосфорилирования, так и под воздействием другой, независимой от mTOR, киназы [64]. Следует отметить, что в многочисленных исследованиях влияния на рост плода активности системы mTOR и ее нижележащих мишеней в плаценте также не всегда наблюдались однонаправленные и одновременные изменения уровня p-mTOR, p-4E-BP1 и p-S6 [5].

Обнаруженное в ПЧП повышение экспрессии транспортеров АК LAT1 (система L) и SNAT2 (система A) могло явиться следствием активации сигнального пути 4E-BP1, приводящей к усилению синтеза соответствующих белков и их транспорта на мембраны СТБ [11]. С другой стороны, предполагается, что повышение экспрессии транспортеров АК в плаценте может служить компенсаторным ответом на уменьшение транспорта АК от матери к плоду [7]. Компенсаторное повышение экспрессии LAT1, транспортирующего Gln, отмечалось для плацент со сниженной массой и вследствие этого уменьшенной площадью зоны обмена между кровью матери и плода [48]. Однако эта адаптация не всегда может полностью возместить недостаточное поступление АК к плоду, в результате чего на фоне повышенного уровня транспортеров АК и относительного увеличения транспортной способности плаценты задержка роста плода все равно сохраняется [48].

Зона обмена между кровью матери и плода в лабиринтной области плаценты крыс состоит из трех слоев трофобласта: контактирующего с материнской кровью проникаемого слоя цитотрофобласта и двух расположенных под ним непрерывных синцитиальных слоев СТБ, которые и составляют структурную основу плацентарного барьера или «интерфейса мать–плод» [7, 56, 65]. Целостность плацентарного барьера имеет решающее значение для роста и нормального развития плода. Отмеченное нами увеличение во внутренних органах и мозге плода уровня красителя Эванса синего, переносимого в крови матери альбумином и другими белками [66], может являться следствием повышения проницаемости плаценты для макромолекул [67]. Известным индуктором проницаемости плацентарного барьера является проангиогенный фактор VEGF-A [65, 67], увеличение уровня которого в ПЧП на 20-й день беременности при воздействии ГЦ было нами показано в предыдущем исследовании [30]. Морфологической основой повышения проницаемости плацентарного барьера может являться наблюдавшаяся нами в ряде случаев дезинтеграция слоев плацентарного барьера, а также увеличение количества фенестр эндотелия. Показано, что некоторые материнские белки могут переноситься через плацентарный барьер в кровь плода путем эндоцитоза/экзоцитоза, а также параклеточным путем через поры в СТБ [68, 69]. Захваченные путем эндоцитоза белки могут катаболизироваться в лизосомах СТБ и служить дополнительным источником АК для плаценты и плода [70]. Такой метаболический путь показан в плаценте человека для захватываемого мембраной СТБ альбумина, при этом переносимые этим белком молекулы высвобождаются в СТБ и могут транспортиро-

ваться далее в кровеносную систему плода [71]. Поэтому увеличение проникновения Эванса синего в ткани плода могло также явиться следствием увеличения захвата мембраной СТБ альбумина и других белков, с которыми связывается этот краситель, для возмещения потребностей в АК плаценты и плода в условиях снижения их роста.

Настоящее исследование опиралось на гипотезу о возможном конкурентном ингибировании высокими концентрациями ГЦ транспорта АК, являющихся вместе с ГЦ общими субстратами транспортеров нейтральных АК систем А и L. За пределами проведенного исследования осталось возможное влияние ГГЦ на активность транспортеров системы y^+L , субстратом которых, как предполагают, также является ГЦ [17]. Также в данной статье не рассматривалось возможное влияние образующихся в ходе метаболизма ГЦ серосодержащих соединений на плацентарный транспорт АК. Основным метаболитом, образующимся в процессе катаболического транссульфирования ГЦ, является Cys. Отмечено, что повышение уровня общего ГЦ в крови может сопровождаться снижением содержания общего Cys [16, 72]. В крови Cys находится преимущественно в виде окисленной димерной формы – цистина, который транспортируется через обращенную в сторону матери мембрану СТБ при помощи транспортера xCT/SLC7A11 транспортной системы Xc^- [73]. В СТБ цистин восстанавливается до Cys и служит предшественником для синтеза глутатиона (GSH), таким образом, усиливая антиоксидантную защиту плаценты [73]. Хотя в процессе транссульфирования ГЦ может образовываться GSH, при ГГЦ наблюдается снижение восстановленной формы этого антиоксиданта и/или снижение отношения его восстановленной формы к окисленной в крови и мозге, что связывают с окислением GSH в условиях вызванного ГГЦ окислительного стресса [16, 74]. Снижение содержания общего Cys и восстановленной формы GSH в крови матери, сопровождающееся на уровне плаценты уменьшением уровня GSH и усилением индуцируемого ГГЦ окислительного стресса [30], может являться одним из компонентов негативного влияния материнской ГГЦ на развитие и транспортную функцию плаценты.

Полученные в работе результаты показывают, что материнская ГГЦ вызывает нарушение развития лабиринтной области плаценты крыс, снижение уровня некоторых АК в крови плода и увеличение проницаемости плацентарного барьера. К причинам снижения уровня АК в крови плода под влиянием ГГЦ можно отнести ингибирование их транспорта от матери к плоду из-за конкуренции ГЦ с другими АК за общие транспортеры, а также уменьшение площади контакта материнской крови со слоем СТБ и замедление плацентарного кровотока вследствие уменьшения площади материнских синусов. Сигналы со стороны плода о снижении его массы и уменьшении содержания некоторых АК в его крови могут являться причиной адаптивного ответа со стороны плаценты, выражающегося в активации нижележащего эффектора комплекса mTORC1, белка 4E-BP, и повышения количества аминокислотных транспортеров LAT1 и SNAT2 в лабиринтной области плаценты.

Вклад авторов. А.В. Арутюнян – руководство работой, редактирование текста; Ю.П. Милютин, Г.О. Керкешко – концепция и написание текста; Ю.П. Милютин, Г.О. Керкешко, Д.С. Васильев – обсуждение результатов исследования; И.В. Залозная, С.К. Бочковский, А.В. Михель, Г.Х. Толибова, Н.Л. Туманова, Д.С. Васильев – проведение экспериментов и сбор данных; Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, Д.С. Васильев – формальный анализ.

Финансирование. Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 22-15-00393).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Каденову А.Н., Горбовой А.В., Поды В.А., принимавшим участие в проводимых экспериментах.

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. 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, <https://doi.org/10.1155/2021/6652231>.
2. Gaiday, A., Balash, L., and Tussupkaliyev, A. (2022) The role of high concentrations of homocysteine for the development of fetal growth restriction, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, **44**, 352-359, <https://doi.org/10.1055/s-0042-1743093>.

3. Memon, S.I., Acharya, N. S., Acharya, S., Potdar, J., Karnik, M., and Mohammad, S. (2023) Maternal hyperhomocysteinemia as a predictor of placenta-mediated pregnancy complications: a two-year novel study, *Cureus*, **15**, e37461, <https://doi.org/10.7759/cureus.37461>.
4. Gaccioli, F., Lager, S., Powell, T. L., and Jansson, T. (2013) Placental transport in response to altered maternal nutrition, *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **4**, 101-115, <https://doi.org/10.1017/S2040174412000529>.
5. Dong, J., Shin, N., Chen, S., Lei, J., Burd, I., and Wang, X. (2020) Is there a definite relationship between placental mTOR signaling and fetal growth? *Biol. Reprod.*, **103**, 471-486, <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa070>.
6. Jansson, T., Aye, I. L., and Gberghdan, D. C. (2012) The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing, *Placenta*, **33 Suppl 2**, e23-9, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.010>.
7. Chassen, S., and Jansson, T. (2020) Complex, coordinated and highly regulated changes in placental signaling and nutrient transport capacity in IUGR, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165373, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.024>.
8. Kramer, A. C., Jansson, T., Bale, T. L., and Powell, T. L. (2023) Maternal-fetal cross-talk via the placenta: influence on offspring development and metabolism, *Development*, **150**, dev202088, <https://doi.org/10.1242/dev.202088>.
9. Sibley, C. P., Brownbill, P., Dilworth, M., and Glazier, J. D. (2010) Review: adaptation in placental nutrient supply to meet fetal growth demand: implications for programming, *Placenta*, **31**, S70-S74, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.020>.
10. Lewis, R. M., Brooks, S., Crocker, I. P., Glazier, J., Hanson, M. A., Johnstone, E. D., Panitchob, N., Please, C. P., Sibley, C. P., Widdows, K. L., and Sengers, B. G. (2013) Review: modelling placental amino acid transfer – from transporters to placental function, *Placenta*, **34 Suppl**, S46-S51, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.010>.
11. Rosario, F. J., Dimasuy, K. G., Kanai, Y., Powell, T. L., and Jansson, T. (2016) Regulation of amino acid transporter trafficking by mTORC1 in primary human trophoblast cells is mediated by the ubiquitin ligase Nedd4-2, *Clin. Sci. (Lond)*, **130**, 499-512, <https://doi.org/10.1042/CS20150554>.
12. Matsueda, S., and Niiyama, Y. (1982) The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **28**, 557-573, <https://doi.org/10.3177/jnsv.28.557>.
13. 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, <https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00094.x>.
14. Akahoshi, N., Kamata, S., Kubota, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Yamazaki, C., Yoshida, Y., Yamada, H., Ishizaki, Y., Suematsu, M., Kasahara, T., and Ishii, I. (2014) Neutral aminoaciduria in cystathionine beta-synthase-deficient mice; an animal model of homocystinuria, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **306**, F1462-F1476, <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00623.2013>.
15. Akahoshi, N., Yokoyama, A., Nagata, T., Miura, A., Kamata, S., and Ishii, I. (2019) Abnormal amino acid profiles of blood and cerebrospinal fluid from cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1054-1057, <https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00127>.
16. Ishii, I., Kamata, S., Ito, S., Shimonaga, A., Koizumi, M., Tsushima, M., Miura, A., Nagata, T., Tosaka, Y., Ohtani, H., Kamichatani, W., and Akahoshi, N. (2022) A high-methionine diet for one-week induces a high accumulation of methionine in the cerebrospinal fluid and confers bipolar disorder-like behavior in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 928, <https://doi.org/10.3390/ijms23020928>.
17. 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, <https://doi.org/10.1007/s10545-010-9141-3>.
18. Tsitsiou, E., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., Catanescu, O., Jacobsen, D. W., and Glazier, J. D. (2009) Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Physiol.*, **587**, 4001-4013, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.173393>.
19. Tripathi, M., Zhang, C. W., Singh, B. K., Sinha, R. A., Moe, K. T., DeSilva, D. A., and Yen, P. M. (2016) Hyperhomocysteinemia causes ER stress and impaired autophagy that is reversed by Vitamin B supplementation, *Cell Death Dis.*, **7**, e2513, <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.374>.
20. Witucki, L., and Jakubowski, H. (2023) Homocysteine metabolites inhibit autophagy, elevate amyloid beta, and induce neuropathy by impairing Phf8/H4K20me1-dependent epigenetic regulation of mTOR in cystathionine beta-synthase-deficient mice, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **46**, 1114-1130, <https://doi.org/10.1002/jimd.12661>.
21. Khayati, K., Antikainen, H., Bonder, E. M., Weber, G. F., Kruger, W. D., Jakubowski, H., and Dobrowolski, R. (2017) The amino acid metabolite homocysteine activates mTORC1 to inhibit autophagy and form abnormal proteins in human neurons and mice, *FASEB J.*, **31**, 598-609, <https://doi.org/10.1096/fj.201600915R>.
22. Wang, M., Liang, X., Cheng, M., Yang, L., Liu, H., Wang, X., Sai, N., and Zhang, X. (2019) Homocysteine enhances neural stem cell autophagy in *in vivo* and *in vitro* model of ischemic stroke, *Cell Death Dis.*, **10**, 561, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1798-4>.

23. Zhao, Y., Huang, G., Chen, S., Gou, Y., Dong, Z., and Zhang, X. (2016) Homocysteine aggravates cortical neural cell injury through neuronal autophagy overactivation following rat cerebral ischemia-reperfusion, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1196, <https://doi.org/10.3390/ijms17081196>.
24. Kitada, M., Xu, J., Ogura, Y., Monno, I., and Koya, D. (2020) Mechanism of activation of mechanistic target of rapamycin complex 1 by methionine, *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 715, <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00715>.
25. Ouyang, Y., Wu, Q., Li, J., Sun, S., and Sun, S. (2020) S-adenosylmethionine: a metabolite critical to the regulation of autophagy, *Cell Prolif.*, **53**, e12891, <https://doi.org/10.1111/cpr.12891>.
26. Rosario, F. J., Powell, T. L., and Jansson, T. (2017) mTOR folate sensing links folate availability to trophoblast cell function, *J. Physiol.*, **595**, 4189-4206, <https://doi.org/10.1113/JP272424>.
27. Chen, Q., Dai, W., Sun, Y., Zhao, F., Liu, J., and Liu, H. (2018) Methionine partially replaced by methionyl-methionine dipeptide improves reproductive performance over methionine alone in methionine-deficient mice, *Nutrients*, **10**, 1190, <https://doi.org/10.3390/nu10091190>.
28. Batistel, F., Alharthi, A. S., Wang, L., Parys, C., Pan, Y. X., Cardoso, F. C., and Loor, J. J. (2017) Placentome nutrient transporters and mammalian target of rapamycin signaling proteins are altered by the methionine supply during late gestation in dairy cows and are associated with newborn birth weight, *J. Nutr.*, **147**, 1640-1647, <https://doi.org/10.3945/jn.117.251876>.
29. 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, <https://doi.org/10.1134/S000629792002008X>.
30. Arutjunyan, A. V., Kerkeshko, G. O., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Zalozniaia, I. V., Mikhel, A. V., Inozemtseva, D. B., Vasilev, D. S., Kovalenko, A. A., and Kogan, I. Y. (2023) Imbalance of angiogenic and growth factors in placenta in maternal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 262-279, <https://doi.org/10.1134/S0006297923020098>.
31. Аскретков А. Д., Клишин А. А., Зыбин Д. И., Орлова Н. В., Холодова А. В., Лобанова Н. В., Серегин Ю. А. (2020) Определение двадцати протеиногенных аминокислот и добавок в культуральной жидкости методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, *Журнал аналитической химии*, **75**, 721-729, <https://doi.org/10.31857/S0044450220080034>.
32. 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, <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
33. 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, <https://doi.org/10.1111/sms.12702>.
34. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Mikhel, A. V., Zalozniaia, I. V., and Arutjunyan, A. V. (2021) Prenatal hyperhomocysteinemia induces glial activation and alters neuroinflammatory marker expression in infant rat hippocampus, *Cells*, **10**, 1536, <https://doi.org/10.3390/cells10061536>.
35. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Zalozniaia, I. V., Kerkeshko, G. O., and Arutjunyan, A. V. (2020) Maternal hyperhomocysteinemia induces neuroinflammation and neuronal death in the rat offspring cortex, *Neurotox. Res.*, **38**, 408-420, <https://doi.org/10.1007/s12640-020-00233-w>.
36. Wang, H. L., and Lai, T. W. (2014) Optimization of Evans blue quantitation in limited rat tissue samples, *Sci. Rep.*, **4**, 6588, <https://doi.org/10.1038/srep06588>.
37. Wick, M. J., Harral, J. W., Loomis, Z. L., and Dempsey, E. C. (2018) An optimized Evans blue protocol to assess vascular leak in the mouse, *J. Vis. Exp.*, **139**, 57037, <https://doi.org/10.3791/57037>.
38. Dayal, S., and Lentz, S. R. (2008) Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1596-1605, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.166421>.
39. Nieraad, H., Pannwitz, N., Bruin, N., Geisslinger, G., and Till, U. (2021) Hyperhomocysteinemia: metabolic role and animal studies with a focus on cognitive performance and decline – a review, *Biomolecules*, **11**, 1546, <https://doi.org/10.3390/biom11101546>.
40. Sauls, D. L., Arnold, E. K., Bell, C. W., Allen, J. C., and Hoffman, M. (2007) Pro-thrombotic and pro-oxidant effects of diet-induced hyperhomocysteinemia, *Thrombosis Res.*, **120**, 117-126, <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.08.001>.
41. Ditscheid, B., Funfstuck, R., Busch, M., Schubert, R., Gerth, J., and Jahreis, G. (2005) Effect of L-methionine supplementation on plasma homocysteine and other free amino acids: a placebo-controlled double-blind cross-over study, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **59**, 768-775, <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602138>.
42. Andersson, A., Brattstrom, L., Israelsson, B., Isaksson, A., and Hultberg, B. (1990) The effect of excess daily methionine intake on plasma homocysteine after a methionine loading test in humans, *Clin. Chim. Acta*, **192**, 69-76, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90273-u](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90273-u).

43. Benevenga, N. J., and Steele, R. D. (1984) Adverse effects of excessive consumption of amino acids, *Annu. Rev. Nutr.*, **4**, 157-181, <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.04.070184.001105>.
44. Terstappen, F., Tol, A. J. C., Gremmels, H., Wever, K. E., Paauw, N. D., Joles, J. A., Beek, E. M. V., and Lely, A. T. (2020) Prenatal amino acid supplementation to improve fetal growth: a systematic review and meta-analysis, *Nutrients*, **12**, 2535, <https://doi.org/10.3390/nu12092535>.
45. Stanescu, S., Belanger-Quintana, A., Fernandez-Felix, B. M., Ruiz-Sala, P., Del Valle, M., Garcia, F., Arrieta, F., and Martinez-Pardo, M. (2022) Interorgan amino acid interchange in propionic acidemia: the missing key to understanding its physiopathology, *Amino Acids*, **54**, 777-786, <https://doi.org/10.1007/s00726-022-03128-6>.
46. Benevenga, N. J. (1974) Toxicities of methionine and other amino acids, *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 2-9, <https://doi.org/10.1021/jf60191a036>.
47. Cleal, J. K., Lofthouse, E. M., Sengers, B. G., and Lewis, R. M. (2018) A systems perspective on placental amino acid transport, *J. Physiol.*, **596**, 5511-5522, <https://doi.org/10.1113/JP274883>.
48. McIntyre, K. R., Hayward, C. E., Sibley, C. P., Greenwood, S. L., and Dilworth, M. R. (2019) Evidence of adaptation of maternofetal transport of glutamine relative to placental size in normal mice, and in those with fetal growth restriction, *J. Physiol.*, **597**, 4975-4990, <https://doi.org/10.1113/JP278226>.
49. Hussain, T., Tan, B., Murtaza, G., Metwally, E., Yang, H., Kalhoro, M. S., Kalhoro, D. H., Chughtai, M. I., and Yin, Y. (2020) Role of dietary amino acids and nutrient sensing system in pregnancy associated disorders, *Front. Pharmacol.*, **11**, 586979, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.586979>.
50. Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Bierhansl, L., Zecchin, A., Bruning, U., Visnagri, A., Yuldasheva, N., Goveia, J., Cruys, B., Brepoels, K., Wyns, S., Rayport, S., Ghesquiere, B., Vinckier, S., Schoonjans, L., Cubbon, R., Dewerchin, M., Eelen, G., and Carmeliet, P. (2017) Role of glutamine and interlinked asparagine metabolism in vessel formation, *EMBO J.*, **36**, 2334-2352, <https://doi.org/10.15252/embj.201695518>.
51. Bonnini, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S., and Levitt, P. (2011) A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain, *Nature*, **472**, 347-350, <https://doi.org/10.1038/nature09972>.
52. Bonnini, A., and Levitt, P. (2011) Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain, *Neuroscience*, **197**, 1-7, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.005>.
53. Mao, J., Jain, A., Denslow, N. D., Nouri, M. Z., Chen, S., Wang, T., Zhu, N., Koh, J., Sarma, S. J., Sumner, B. W., Lei, Z., Sumner, L. W., Bivens, N. J., Roberts, R. M., Tuteja, G., and Rosenfeld, C. S. (2020) Bisphenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta-brain axis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 4642-4652, <https://doi.org/10.1073/pnas.1919563117>.
54. Woods, L., Perez-Garcia, V., and Hemberger, M. (2018) Regulation of placental development and its impact on fetal growth-new insights from mouse models, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **9**, 570, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00570>.
55. Baskurt, O. K., and Meiselman, H. J. (2012) Iatrogenic hyperviscosity and thrombosis, *Semin. Thromb. Hemost.*, **38**, 854-864, <https://doi.org/10.1055/s-0032-1325616>.
56. Winterhager, E., and Gellhaus, A. (2017) Transplacental nutrient transport mechanisms of intrauterine growth restriction in rodent models and humans, *Front. Physiol.*, **8**, 951, <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00951>.
57. Rosario, F. J., Kanai, Y., Powell, T. L., and Jansson, T. (2015) Increased placental nutrient transport in a novel mouse model of maternal obesity with fetal overgrowth, *Obesity (Silver Spring)*, **23**, 1663-1670, <https://doi.org/10.1002/oby.21165>.
58. Aye, I. L., Rosario, F. J., Powell, T. L., and Jansson, T. (2015) Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 12858-12863, <https://doi.org/10.1073/pnas.1515484112>.
59. Huang, Z., Huang, S., Song, T., Yin, Y., and Tan, C. (2021) Placental angiogenesis in mammals: a review of the regulatory effects of signaling pathways and functional nutrients, *Adv. Nutr.*, **12**, 2415-2434, <https://doi.org/10.1093/advances/nmab070>.
60. Yung, H. W., Hemberger, M., Watson, E. D., Senner, C. E., Jones, C. P., Kaufman, R. J., Charnock-Jones, D. S., and Burton, G. J. (2012) Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction, *J. Pathol.*, **228**, 554-564, <https://doi.org/10.1002/path.4068>.
61. Cross, J. C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani, M., and Adamson, S. L. (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta, *Mol. Cell Endocrinol.*, **187**, 207-212, [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00703-1](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00703-1).
62. Wang, Y., Engel, T., and Teng, X. (2024) Post-translational regulation of the mTORC1 pathway: a switch that regulates metabolism-related gene expression, *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.*, **1867**, 195005, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2024.195005>.

63. Kavitha, J. V., Rosario, F. J., Nijland, M. J., McDonald, T. J., Wu, G., Kanai, Y., Powell, T. L., Nathanielsz, P. W., and Jansson, T. (2014) Down-regulation of placental mTOR, insulin/IGF-I signaling, and nutrient transporters in response to maternal nutrient restriction in the baboon, *FASEB J.*, **28**, 1294-1305, <https://doi.org/10.1096/fj.13-242271>.
64. Qin, X., Jiang, B., and Zhang, Y. (2016) 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein, *Cell Cycle*, **15**, 781-786, <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1151581>.
65. Pang, V., Bates, D. O., and Leach, L. (2017) Regulation of human feto-placental endothelial barrier integrity by vascular endothelial growth factors: competitive interplay between VEGF-A(165)a, VEGF-A(165)b, PIGF and VE-cadherin, *Clin. Sci. (Lond)*, **131**, 2763-2775, <https://doi.org/10.1042/CS20171252>.
66. Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Mollgard, K., and Habgood, M. D. (2015) Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front. Neurosci.*, **9**, 385, <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>.
67. Haghighi Poodeh, S., Salonurmi, T., Nagy, I., Koivunen, P., Vuoristo, J., Rasanen, J., Sormunen, R., Vainio, S., and Savolainen, M. J. (2012) Alcohol-induced premature permeability in mouse placenta-yolk sac barriers *in vivo*, *Placenta*, **33**, 866-873, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.07.008>.
68. Lewis, R. M., Baskaran, H., Green, J., Tashev, S., Palaiologou, E., Lofthouse, E. M., Cleal, J. K., Page, A., Chatelet, D. S., Goggin, P., and Sengers, B. G. (2022) 3D visualization of trans-syncytial nanopores provides a pathway for paracellular diffusion across the human placental syncytiotrophoblast, *iScience*, **25**, 105453, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105453>.
69. Sibley, C. P., Brownbill, P., Glazier, J. D., and Greenwood, S. L. (2018) Knowledge needed about the exchange physiology of the placenta, *Placenta*, **64**, S9-S15, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.01.006>.
70. Shao, X., Cao, G., Chen, D., Liu, J., Yu, B., Liu, M., Li, Y. X., Cao, B., Sadovsky, Y., and Wang, Y. L. (2021) Placental trophoblast syncytialization potentiates macropinocytosis via mTOR signaling to adapt to reduced amino acid supply, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, <https://doi.org/10.1073/pnas.2017092118>.
71. Cooke, L. D. F., Tumbarello, D. A., Harvey, N. C., Sethi, J. K., Lewis, R. M., and Cleal, J. K. (2021) Endocytosis in the placenta: an undervalued mediator of placental transfer, *Placenta*, **113**, 67-73, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.04.014>.
72. Elshorbagy, A. K., Graham, I., and Refsum, H. (2020) Body mass index determines the response of plasma sulfur amino acids to methionine loading, *Biochimie*, **173**, 107-113, <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.03.001>.
73. Lofthouse, E. M., Manousopoulou, A., Cleal, J. K., O'Kelly, I. M., Poore, K. R., Garbis, S. D., and Lewis, R. M. (2021) N-acetylcysteine, xCT and suppression of Maxi-chloride channel activity in human placenta, *Placenta*, **110**, 46-55, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.05.009>.
74. Da Silva, V. C., Fernandes, L., Haseyama, E. J., Agamme, A. L., Guerra Shinohara, E. M., Muniz, M. T., and D'Almeida, V. (2014) Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring, *PLoS One*, **9**, e92683, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092683>.

AMINO ACID TRANSPORT IN THE RAT PLACENTA IN METHIONINE-INDUCED HYPERHOMOCYSTEINEMIA

**Yu. P. Milyutina^{1*}, G. O. Kerkeshko¹, D. S. Vasiliev^{1,2}, N. L. Tumanova²,
I. V. Zalozniaia¹, S. K. Bochkovskii¹, A. D. Shcherbitskaia¹, A. V. Mikhel¹,
G. H. Tolibova¹, and A. V. Arutjunyan¹**

¹ D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine,
199034 St. Petersburg, Russia; e-mail: milyutina1010@mail.ru

² I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia

Maternal hyperhomocysteinemia (HHcy) is a risk factor for the development of intrauterine growth restriction, a proposed mechanism of which is a decrease in transplacental nutrient transport. In this study, we have investigated the effect of experimental HHcy caused by daily methionine administration to pregnant rats on the free amino acid content in the mother and fetal blood. The morphological and biochemical parameters on which amino acid transport through the placenta depends have also been studied. Under the influence of HHcy on the 20th day of pregnancy, an increase in the levels

of most free amino acids was observed in the mother blood, while some amino acid concentrations in the fetal blood were decreased. Under conditions of HHcy in the placental labyrinth, which is an exchange site between mother and fetal circulations, the maternal sinusoids narrowed, being accompanied by blood stagnation and red blood cell aggregation. In the labyrinth zone, we also observed an increase in the protein level of neutral amino acid transporters (LAT1, SNAT2) and an activation of the downstream effector of the mTORC1 complex, 4E-BP1, which is a positive regulator of the placental transporter expression. Maternal HHcy caused an increase in the placental barrier permeability, as evidenced by an intensification in the mother to fetus transfer of the Evans blue dye. The imbalance of the free amino acid levels in the mother and fetal blood under conditions of HHcy may be due to the competition of homocysteine with other amino acids for their common transporters, as well as a decreased exchange zone area and reduced blood flow in the placental labyrinth. An increase in the amino acid transporter expression in the labyrinth zone may be a compensatory response to an insufficient intrauterine amino acid supply and a fetal growth decrease.

Keywords: maternal hyperhomocysteinemia, placenta, placental transport, placental barrier, amino acids, mTOR, amino acid transporters