

РОЛЬ МОЗГОВОГО И ГЛИАЛЬНОГО НЕЙРОТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИУТРОБНОЙ КИСЛОРОДНОЙ ДЕПРИВАЦИИ ПЛОДА

DOI: 10.17691/stm2020.12.1.03
 УДК 577.25:612.82:618.33–001.8
 Поступила 30.04.2019 г.

© **Н.А. Щелчкова**, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; зав. отделом молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины²;
А.А. Кокая, к.м.н., акушер-гинеколог³;
В.Ф. Беженарь, д.м.н., профессор, зав. кафедрой акушерства, гинекологии и репродуктологии³;
О.В. Рождественская, старший лаборант кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии³;
М.А. Мамедова, к.м.н., ассистент кафедры акушерства, гинекологии и репродуктологии³;
Т.А. Мищенко, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины²;
Е.В. Митрошина, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины¹; старший научный сотрудник лаборатории по разработке методов нейропротекции Центра трансляционных технологий¹; старший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Института фундаментальной медицины²;
М.В. Ведунова, д.б.н., ведущий научный сотрудник Института биологии и биомедицины¹; директор Института биологии и биомедицины¹

¹Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, проспект Гагарина, 23, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;

³Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, ул. Льва Толстого, 6-8, Санкт-Петербург, 197022

Цель исследования — определение роли нейротрофических факторов BDNF и GDNF в реализации компенсаторно-приспособительных механизмов организма новорожденного при действии гипоксии.

Материалы и методы. Эксперименты *in vivo* были выполнены на беременных самках мышей линии C57BL/6 (n=36). В разных триместрах беременности проводили моделирование хронической гипобарической гипоксии. На 19–20-й дни гестации в крови беременных самок определяли концентрацию нейротрофических факторов BDNF, GDNF методом иммуноферментного анализа. В дальнейшем оценивали количество новорожденных мышат и их массо-ростовые характеристики.

В клинических исследованиях принимали участие роженицы (n=88) и их новорожденные дети, наблюдаемые в клинике акушерства и гинекологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова. В пуповинной крови плодов методом иммуноферментного анализа определяли концентрации нейротрофических факторов BDNF, GDNF, нейрон-специфической енолазы (NSE) и гипоксия-индуцированного фактора (HIF-1 β). Полученные данные ретроспективно сопоставляли с показателями кардиоотографии, доплерометрии, с наличием меконияльно окрашенных околоплодных вод, а также с состоянием ребенка при рождении, оценкой по шкале Апгар, течением периода адаптации.

Результаты. Хроническая гипобарическая гипоксия у беременных самок мышей в I и II триместрах приводила к достоверному снижению уровня нейротрофических факторов BDNF, GDNF, сокращению числа эмбрионов, а также к значимым изменениям массо-ростовых характеристик у новорожденных детенышей.

Согласно клиническим наблюдениям, повышенная экспрессия данных нейротрофических факторов обеспечивает защиту новорожденного даже при наличии и реализации факторов гипоксии. Низкое содержание нейротрофических факторов BDNF, GDNF наблюдалось в группе младенцев с высоким риском развития неблагоприятных последствий гипоксического повреждения.

Для контактов: Щелчкова Наталья Александровна, e-mail: natalia-shelchkova@rambler.ru

Заключение. Экспериментально и клинически установлена защитная роль нейротрофических факторов BDNF, GDNF в регуляции гомеостаза у плода в условиях хронической гипоксии.

Ключевые слова: нейротрофический фактор головного мозга; BDNF; глиальный нейротрофический фактор; GDNF; нейронспецифическая енолаза; NSE; гипоксия-индуцированный фактор; HIF-1 β ; пренатальная гипоксия.

Как цитировать: Shchelchkova N.A., Kokaya A.A., Bezhenar' V.F., Rozhdestvenskaya O.V., Mamedova M.A., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Vedunova M.V. The role of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor in chronic fetal oxygen deprivation. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2020; 12(1): 25–33, <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.1.03>

English

The Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Chronic Fetal Oxygen Deprivation

N.A. Shchelchkova, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Head of Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine²;

A.A. Kokaya, MD, PhD, Obstetrician-Gynecologist³;

V.F. Bezhenar', MD, DSc, Professor, Head of the Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology³;

O.V. Rozhdestvenskaya, Senior Laboratory Assistant, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology³;

M.A. Mamedova, MD, PhD, Assistant, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductology³;

T.A. Mishchenko, PhD, Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine²;

E.V. Mitroshina, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnologies, Institute of Biology and Biomedicine¹; Senior Researcher, Laboratory for Neuroprotection Methods Development, Center for Translational Technologies¹; Senior Researcher, Molecular and Cellular Technologies Department, Institute of Fundamental Medicine²;

M.V. Vedunova, DSc, Leading Researcher, Institute of Biology and Biomedicine¹; Director of Institute of Biology and Biomedicine¹

¹National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

³Pavlov University, 6-8 L'va Tolstogo St., Saint Petersburg, 197022, Russia

The aim of the study was to define the role of brain-derived and glial cell line-derived neurotrophic factors (BDNF and GDNF) in realization of compensative and adaptive mechanisms of a neonatal organism to hypoxia.

Materials and Methods. The experiments *in vivo* have been carried out on pregnant C57BL/6 mice (n=36). Chronic hypobaric hypoxia has been modeled in different pregnancy trimesters. On gestation days E19–20, concentration of BDNF and GDNF in the blood of the pregnant females was determined by enzyme immunoassay. Further, the number of neonatal mice, their weight and body length parameters have been assessed.

Parturient mothers (n=88) and their newborn babies followed up at the Clinic of Obstetrics and Gynecology of Pavlov University took part in the clinical investigations. Concentration of BDNF, GDNF, neuron-specific enolase (NSE), and hypoxia-inducible factor (HIF-1 β) in the fetal cord blood has been determined by ELISA. The obtained data were retrospectively compared with cardiotocography, dopplerometry, presence of meconium-stained amniotic fluid and the neonate state at birth, assessment according to the Apgar score, and the course of adaptation period.

Results. Chronic hypobaric hypoxia in pregnant mice in trimester I and II resulted in the significant decrease of BDNF and GDNF level, decrease in the number of embryos, and in significant changes in weight/height characteristics of the newborn pups.

According to the clinical observations, an increased expression of the neurotrophic factors BDNF, GDNF provides protection to a neonate even if hypoxia factors are present and realized. A low content of BDNF and GDNF was observed in the group of infants with a high risk of developing unfavorable hypoxic damaging effects.

Conclusion. The protective role of BDNF and GDNF in the regulation of fetal homeostasis in chronic hypoxia has been established experimentally and clinically.

Key words: brain-derived neurotrophic factor; BDNF; glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF; neuron-specific enolase; NSE; hypoxia-inducible factor; HIF-1 β ; prenatal hypoxia.

Введение

Особое место среди гипоксических состояний различного генеза занимает пренатальная гипоксия. Проблема оценки компенсаторно-приспособительных механизмов у плода в условиях патологически протекающей беременности и в родах сформировалась еще в 50-е годы прошлого века [1] и актуальна до настоящего времени. Осложнения, связанные с пренатальной гипоксией плода, развиваются в 10% случаев от общего числа родов. Диагностика и в особенности лечение гипоксии в акушерстве и неонатологии сопряжены со значительными трудностями, что прежде всего обусловлено недостаточным пониманием молекулярных механизмов гипоксического повреждения.

В последние годы пристальный интерес исследователей направлен на изучение диагностической и прогностической ценности определения концентраций нейротрофических факторов в тканях и жидкостях организма. Данные регуляторные белки принимают активное участие в формировании и росте отростков нервных клеток, развитии коры больших полушарий и в процессах синаптической пластичности [2, 3]. Нейротрофические факторы играют решающую роль в нейропротекции, способствуют выживанию нервных клеток, препятствуют развитию апоптотических реакций во многих нейрональных популяциях и, следовательно, могут оказывать влияние на пре- и постнатальное развитие головного мозга [4, 5].

Одной из основных функций нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) является поддержание жизнеспособности нейронов, не включенных в состав нейронных сетей, в раннем постнатальном периоде. Для зрелых нейронов, не имеющих достаточного количества связей с другими нейронами, характерна активация процесса апоптоза и последующая гибель. BDNF способен поддерживать структурно-функциональную организацию нейронов до момента завершения формирования нейронных сетей под действием афферентных стимулов в постнатальный период [6–8].

Глиальный нейротрофический фактор (GDNF) известен как эффективный нейропротектор при развитии различных патологий, в том числе ишемии, способный сохранять как жизнеспособность нервных клеток, так и функциональную метаболическую активность нейронных сетей и структуру синаптического аппарата в условиях стресса [9, 10].

Так как нейротрофические факторы помимо локальных эффектов играют значимую роль во взаимодействии нервной и висцеральных систем и оказывают системное действие на организм, они способны проходить через гематоэнцефалический барьер и определяться в кровотоке в любом возрасте. Определение содержания нейротрофических факторов и других белков нервной системы в сыворотке крови может значимо расширить диагностические возможности оценки состояния ЦНС.

В качестве маркера степени повреждения нейронов перспективным является количественное определение уровня нейронспецифической енолазы (NSE). Данный специфический нейрональный фермент в норме имеет внутриклеточную локализацию и детектируется в межклеточном пространстве и кровотоке только при разрушении клеточной мембраны и гибели нейронов. При этом концентрация NSE коррелирует с количеством погибших клеток [11, 12].

В последнее время при исследованиях механизмов гипоксического повреждения особое значение придается изучению белков семейства HIF. Данные белки определяют устойчивость клеток, в том числе нейронов, к условиям кислородной недостаточности и рассматриваются в качестве ключевых участников молекулярных триггерных механизмов устойчивости клеток к гипоксии [13].

Поскольку проведение клинических исследований имеет множество ограничений, изучение патологических механизмов, запускаемых при хронической внутриутробной гипоксии, осуществляется с использованием специальных экспериментальных моделей на животных. Проведение фундаментальных исследований дает возможность сформировать более четкое представление о природе и степени поражения ЦНС при гипоксических состояниях, что позволит в недалеком будущем разработать новую стратегию терапевтической коррекции данной патологии [14–16]. В связи с этим мы полагаем, что определение концентраций нейротрофических факторов BDNF, GDNF в тканях и биологических жидкостях может позволить оценить адаптивно-компенсаторные возможности новорожденного, перенесшего гипоксию.

Цель исследования — определение роли нейротрофических факторов BDNF и GDNF в реализации компенсаторно-приспособительных механизмов организма новорожденного при действии гипоксии.

Материалы и методы

Исследования *in vivo*. Эксперименты проводили на беременных самках мышей линии C57BL/6 разного срока гестации (n=36). Содержание животных в сертифицированном виварии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета соответствовало требованиям приказов №1179 МЗ СССР от 11.10.1983 и №267 МЗ РФ от 19.06.2003. Работа выполнялась в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals» (National Research Council, 2011), при этом неукоснительно соблюдались требования Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 2006). Исследование было согласовано с Этическим комитетом Национального исследовательского Нижегородского государственного университета.

В качестве удобной экспериментальной модели

для исследования антенатальной гипоксии использовалась хроническая гипобарическая (высотная) гипоксия (ХГГ). Снижение концентрации кислорода, создаваемое в барокамере, является физиологически адекватным воздействием, поддается корректировке, что создает возможности для применения ХГГ в различных режимах.

В *первой серии* экспериментов моделирование ХГГ выполняли на беременных самках разных сроков гестации: I триместр — 1–7-й дни (n=6); II триместр — 7–14-й дни (n=6); III триместр — 14–21-й дни (n=6). Проведение данных работ позволило определить срок беременности, при котором эмбрион наиболее уязвим к неблагоприятным последствиям гипоксического повреждения. Животных ежедневно в течение 7 дней помещали в гипобарическую барокамеру, в которой на протяжении 40 мин поддерживали давление 405–350 мм рт. ст., что соответствует высоте 5500–6000 м над уровнем моря. Контрольную группу составляли беременные самки, не подвергавшиеся воздействию ХГГ (n=6). На 19-е сутки гестации у беременных самок проводили изъятие и оценку количества эмбрионов.

Во *второй серии* экспериментов моделирование ХГГ у беременных самок мышей (n=6) проводили в I, II триместрах беременности (с 5-го по 15-й день), для чего в течение 10 дней по 30 мин с помощью барокамеры создавали условия, соответствующие подъему на высоту 6500–7000 м. Контрольную группу составили беременные самки без воздействия ХГГ (n=6). На 19–20-й дни гестации у самок проводили забор крови для определения концентрации нейротрофических факторов BDNF, GDNF методом иммуноферментного анализа. С этой целью использовали коммерческие наборы BDNF DY248 (R&D Systems, США) и GDNF CSB-E07341M (Cusabio, США). В дальнейшем подсчитывали число новорожденных мышат и их массоростовые характеристики.

Клинические исследования. В этих исследованиях принимали участие роженицы (n=88) и их новорожденные дети, наблюдаемые в клинике акушерства и гинекологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова. В сыворотке пуповинной крови плода методом иммуноферментного анализа определяли

нейротрофические факторы с использованием коммерческих наборов BDNF DY248 (R&D Systems) и GDNF DY212 (R&D Systems). Аналогичным способом в собранных образцах крови пациенток определяли содержание NSE (кат. 8476, «Вектор-бест», Россия) и HIF-1 β (ARNT) (SED470Hu, Cloud-Clone, Китай). Полученные данные ретроспективно сопоставляли с показателями кардиотокографии, доплерометрии, с наличием мекониально окрашенных околоплодных вод, а также с состоянием ребенка при рождении, оценкой по шкале Апгар, течением периода адаптации, которые являются значимыми клиническими факторами риска развития гипоксии плода.

Статистическая обработка данных. Результаты представлены как среднее (M) \pm стандартная ошибка среднего (m). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью пакета Statistica 10.0 с применением непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При моделировании ХГГ у беременных самок мышей в I, II и III триместрах беременности было установлено, что наиболее неблагоприятные последствия для закладки эмбрионов (их количества) возникают при воздействии гипоксии в I и II триместрах внутриутробного развития. В этих экспериментальных группах количество новорожденных мышей было статистически значимо меньше по сравнению с контрольными значениями. При воздействии ХГГ у самок мышей в III триместре подобных эффектов не обнаружено: количество эмбрионов было сопоставимо с контрольной группой (табл. 1). Таким образом, установлено, что максимально уязвимыми по отношению к недостатку кислорода являются эмбрионы, период развития которых соответствуют I и II триместрам беременности.

После определения критических периодов онтогенеза, при которых нарушение поступления кислорода приводит к снижению количества эмбрионов, во второй серии экспериментов исследовали влияние ХГГ на морфометрические параметры новорожденных мышат при более выраженном гипоксическом повреждении. В период I–II триместров беременности (5–15-й дни гестации) самок мышей ежедневно «поднимали» в барокамере на моделируемую высоту 6500–7000 м с экспозицией 30 мин с последующим наблюдением за потомством в течение 3 сут (табл. 2).

Обнаружено, что воздействие ХГГ в I–II триместрах беременности приводило к статистически значимому снижению числа эмбрионов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$; критерий Манна–Уитни). Установлены выраженные изменения массоростовых характеристик у родившегося потомства. Средняя масса новорожденных

Т а б л и ц а 1

Среднее число плодов в группе мышей линии C57BL/6 на 19–20-й день гестации после моделирования хронической гипобарической гипоксии в различные триместры беременности (M \pm m)

Группы	I триместр — 1–7-й дни (n=6)	II триместр — 7–14-й дни (n=6)	III триместр — 14–21-й дни (n=6)
Контроль (n=6)	10,9 \pm 0,8	11,2 \pm 0,7	9,8 \pm 0,6
Опыт (n=18)	5,8 \pm 1,2*	6,2 \pm 1,7*	8,6 \pm 1,6

* — различия статистически значимы относительно значений контрольной группы; $p < 0,05$, критерий Манна–Уитни.

Таблица 2

Морфометрические характеристики новорожденных мышат, подвергшихся воздействию хронической гипобарической гипоксии в I–II триместре беременности (в среднем по группе) (M±m)

Группы	Число плодов	При рождении		3-и сутки постнатального периода	
		масса тела, г	длина, см	масса тела, г	длина, см
Контроль (n=6)	11,2±1,2	0,81±0,02	2,19±0,12	4,14±0,35	4,15±0,53
Опыт (n=6)	5,8±0,9*	0,17±0,04*	0,68±0,06*	2,0±0,08*	3,09±0,42*

* — различия статистически значимы относительно значений контрольной группы; p<0,05, критерий Манна–Уитни.

мышат, подвергшихся ХГГ, составляла 0,17±0,04 г, что более чем в 4 раза ниже показателей контрольной группы (0,81±0,02 г). Также в опытной группе обнаружено уменьшение длины тела детеныша в среднем в 3 раза (0,68±0,06 см) по сравнению с контролем (2,19±0,12 см) (p<0,05; критерий Манна–Уитни).

На 3-и сутки постнатального периода масса тела детенышей постепенно увеличивалась, однако в опытной группе она не превышала 2,0 г, в то время как у контрольных животных составила 4,14±0,35 г. Длина тела мышат, подвергшихся ХГГ, также оставалась статистически значимо ниже контрольных значений (3,09±0,42 против 4,15±0,53 см).

На 19–20-й день гестации в плазме крови беременных самок мышей методом иммуноферментного анализа были определены концентрации нейротрофических факторов BDNF, GDNF (табл. 3). Установлено, что воздействие ХГГ приводит к достоверному снижению концентрации обоих факторов в крови самок. Уровень BDNF составил 0,08±0,01 пкг/мл, уровень GDNF — 0,05±0,02 пкг/мл, в то время как в контрольной группе они равнялись 0,37±0,08 и 0,15±0,06 пкг/мл соответственно.

Таким образом, хроническая пренатальная гипоксия влияет не только на количество и морфометрические характеристики новорожденных мышей, но и вызывает угнетение синтеза нейротрофических факторов BDNF и GDNF, что, несомненно, оказывает влияние на их способность реализовывать адаптогенные механизмы в постнатальном периоде.

Следующий этап исследования был направлен на изучение уровня нейротрофических факторов BDNF, GDNF в пуповинной крови детей в условиях пренатальной гипоксии различного генеза, протекающей преимущественно в I и II триместрах беременности.

Анализ данных по концентрации BDNF и GDNF в пуповинной крови новорожденных позволил разделить всех участвовавших в исследовании рожениц на две подгруппы (40 и 48 человек соответственно) с высоким и низким уровнем нейротрофических факторов у новорожденных. При этом разница между концентрациями данных факторов в группах в среднем составляла 98% для показателей GDNF и 40% — для BDNF (табл. 4).

Таблица 3

Уровень нейротрофических факторов BDNF, GDNF в плазме крови беременных самок мышей линии C57BL/6 на 19–20-й день гестации после моделирования хронической гипобарической гипоксии, пг/мл (M±m)

Группы	BDNF	GDNF
Контроль (n=6)	0,37±0,08	0,15±0,06
Опыт (n=6)	0,08±0,01*	0,05±0,02*

* — различия статистически значимы относительно значений контрольной группы; p<0,05, критерий Манна–Уитни.

Таблица 4

Уровень нейротрофических факторов BDNF, GDNF в плазме пуповинной крови новорожденных (M±m)

Подгруппы	BDNF, нг/мл	GDNF, пг/мл
Подгруппа 1 (n=40)	9,40±1,40	4,77±0,04
Подгруппа 2 (n=48)	5,67±1,20*	0,10±0,01*

* — различия статистически значимы относительно значений 1-й подгруппы; p<0,05, критерий Манна–Уитни.

Последующий ретроспективный анализ историй родов с выделением значимых факторов риска развития гипоксии плода показал, что в подгруппе с высоким содержанием нейротрофических факторов BDNF, GDNF в 69,5% случаев факторы гипоксии были высокими, в 21,7% случаев — сомнительными, а в 8% случаев данные факторы не выявлены, однако исход для плода был во всех случаях благоприятным.

В подгруппе с низкими значениями нейротрофических факторов BDNF, GDNF ретроспективный анализ выявил высокие факторы гипоксии в 75% случаев, а в 25% случаев — сомнительные. Исход для плодов был в разной степени неблагоприятным в 75% случаев и требовал применения интенсивной терапии, перевода в больницу и/или дополнительной консультации неонатолога.

Регуляция адаптации к гипоксии тесно связана с различными процессами, протекающими на молекулярно-

Таблица 5

Уровень нейротрофических факторов BDNF, GDNF с учетом маркеров гипоксии NSE и HIF в плазме пуповинной крови новорожденных (M±m)

Подгруппы	BDNF, нг/мл	GDNF, пг/мл	NSE, нг/мл	HIF, нг/мл
Подгруппа 1 (n=10)	9,81±1,70	4,45±0,50	10,60±0,70	0,14±0,005
Подгруппа 2 (n=12)	10,62±1,00	5,10±1,80	27,60±2,30*	0,35±0,06*
Подгруппа 3 (n=8)	6,20±0,70*	0,01±0,001*	12,0±2,0	0,27±0,08*

* — статистически значимые различия с показателями 1-й подгруппы; p<0,05, критерий Манна–Уитни.

клеточном уровне, в которых одна из главных ролей принадлежит транскрипционному комплексу фактора гипоксии HIF. С другой стороны, гипоксия, вызывая активацию ряда патологических процессов, связанных с гибелью клеток, приводит к увеличению в сосудистом русле специфических внутриклеточных белков, в том числе и NSE, уровень которых коррелирует со степенью повреждения тканей/органов.

В связи с этим для 30 из 88 пациенток, отобранных случайным образом, были дополнительно определены концентрации гипоксия-индуцированного фактора HIF-1β и NSE в пуповинной крови новорожденных. По результатам анализа было проведено ранжирование участников исследования на три подгруппы (табл. 5).

В подгруппу 1 низкого риска развития гипоксии (n=10) были отнесены новорожденные, для которых экспериментально выявлены высокие значения нейротрофических факторов BDNF, GDNF и низкие показатели факторов гипоксии HIF, NSE. Ретроспективный анализ истории родов показал, что в 70% случаев факторов риска развития гипоксии не выявлено, а в 30% случаев они присутствовали. Однако для всех новорожденных данной подгруппы исход родов был благоприятный, постгипоксических осложнений не наблюдалось.

В подгруппу 2 умеренного риска развития гипоксии (n=12) отнесены новорожденные, у которых экспериментально определены высокие показатели как нейротрофических факторов BDNF, GDNF, так и факторов гипоксии HIF, NSE. На основании ретроспективного анализа истории родов в 75% случаев были выявлены факторы, ассоциированные с развитием гипоксии у плода, в 25% случаев их не обнаружено. Для всех новорожденных подгруппы 2 исход родов был благоприятный.

В подгруппу 3 высокого риска развития гипоксии (n=8) отнесены новорожденные, для которых характерны минимальные значения нейротрофического фактора GDNF, сниженные показатели BDNF и NSE и высокий уровень HIF. В данной подгруппе факторы риска развития гипоксии во время беременности и в родах присутствовали в 100% случаев. В 75% случаев исход для новорожденных был неблагоприятный: оценка по шкале Апгар составляла 7 баллов и менее, отмечались нарушения периода адаптации, некото-

рым пациентам при рождении потребовались реанимационные мероприятия и в дальнейшем — перевод в детскую больницу.

Обсуждение

Центральная нервная система является наиболее уязвимым звеном, которое определяет порог устойчивости всего организма к гипоксическим условиям. Гипоксия плода влечет за собой длительно текущий стадийный патологический процесс, особая опасность которого связана с глубокими нарушениями роста и дифференцировки клеточных элементов головного и спинного мозга.

Гипоксия влияет на плод через организм матери и плаценту. При недостатке кислорода запускается молекулярный каскад реакций, приводящий к выбросу гормонов стресса в кровь матери и структурно-функциональным изменениям в материнской и фетальной частях плаценты. Внутриутробная гипоксия приводит к нарушению формирования органов, одним из признаков которого является их гипотрофия. Как видно из представленных экспериментальных данных *in vivo*, масса и длина тела новорожденных мышат достоверно снижены по сравнению с контрольными значениями, что отражает зависимость их развития от обеспечения организма матери кислородом.

Неоспоримым аргументом влияния ХГГ I–II триместров на течение беременности явилось снижение количества потомства, а также низкие массо-ростовые характеристики новорожденных детенышей. ХГГ сопровождалась стойким снижением экспрессии нейротрофических факторов BDNF, GDNF в крови беременных самок мышей.

Диагностика поражений мозга у новорожденных, причиной которых является пренатальная гипоксия/ишемия, в большинстве случаев затруднительна. Невозможность применения методов диагностики и интерпретации результатов, отработанных на взрослых пациентах, оставляет проблему внутриутробной гипоксии открытой: требуется разработка собственного арсенала маркеров и критериев.

Одним из современных направлений в решении этой проблемы является исследование роли специфических белков нервной системы в формировании приспособительно-адаптационных возможностей но-

ворожденного организма. Нейротрофическая сигнализация критична для пре- и постнатального развития мозга в силу ее влияния на процесс развития нейронов и реакции на перинатальный стресс [5].

Проведенные экспериментальные исследования выявили снижение содержания нейротрофических факторов BDNF, GDNF в сыворотке крови беременных самок мышей линии C57BL/6 относительно контрольных показателей, что может говорить о срыве адапционно-приспособительных механизмов в условиях ХГГ. При этом максимальное снижение концентрации в условиях ХГГ показал нейротрофический фактор GDNF, который является экскреторным белком клеток глии (астроцитов). Необходимо отметить, что в последнее время патологии клеток глии придается важнейшее значение при возникновении дегенеративных процессов в ЦНС человека, в том числе ишемического/гипоксического генеза [17, 18].

Результаты проведенных исследований определили целесообразность сравнения эффектов экспериментальной и клинической гипоксии, а также оценки роли специфических белков нервной системы в качестве предикторов гипоксического поражения головного мозга у новорожденных.

Важно иметь в виду, что изменения на кривой кардиоотографии или ЭКГ, а также меконияльно окрашенные околоплодные воды — клинические признаки гипоксии — не всегда определяют состояние новорожденного, тогда как появление нейроспецифических белков в крови плода, как показало наше исследование, может служить показателем «истинной» гипоксии.

Привлечение интегральных белковых маркеров NSE и HIF как участников патологических гипоксических процессов на молекулярном уровне позволило более четко соотнести концентрационную зависимость нейротрофических факторов с реализацией адаптивно-приспособительных процессов у новорожденных.

Ретроспективный анализ историй родов с выделением значимых факторов риска развития гипоксии плода показал, что в большей степени устойчивость организма новорожденного к хронической перинатальной гипоксии зависит от генетически детерминированного уровня нейротрофических факторов — BDNF и GDNF.

Использование данного подхода позволило нам сделать заключение о том, что относительно высокие концентрации нейротрофических факторов BDNF, GDNF, но при этом низкие значения маркеров гипоксии NSE, HIF формируют группу новорожденных с низким уровнем риска развития последствий гипоксии у младенца, даже на фоне присутствия факторов гипоксии во время беременности.

Вторая группа новорожденных характеризуется высокими значениями гипоксия-индуцируемых белков NSE и HIF в пуповинной крови. Отметим, что концентрация NSE не превышала 40 мкг/л — значения, которое у новорожденных, по данным литературы, сви-

детельствует о наличии церебральной ишемии [19]. Следует предположить, что рост экспрессии генов повреждающих факторов был остановлен активными адаптационными возможностями организма плода за счет увеличения синтеза нейротрофических факторов BDNF, GDNF. Ранее в экспериментальных работах было показано, что нейротрофический фактор BDNF способен проникать через гематоэнцефалический барьер [20] и у новорожденных его уровень в сыворотке крови коррелирует с таковым в коре головного мозга [21]. Значимая элиминация нейротрофических факторов в периферический кровоток младенцев происходит, по-видимому, за счет активации экспрессии данных белков, а также вследствие незрелости барьерной функции гематоэнцефалического барьера. Однако имеются сведения, что возможна передача BDNF плоду от матери через кровь, амниотическую жидкость и плаценту, где нейротрофические факторы участвуют в процессах плацентарного ангиогенеза и созревания, а также определяют исход беременности [22–24].

Новорожденные, для которых установлены высокие концентрации NSE и HIF, а также нейротрофических факторов BDNF и GDNF, были объединены в группу умеренного риска и имели высокую вероятность развития гипоксических последствий. Однако исход родов для данной группы был благоприятным, что, по всей видимости, связано с активацией компенсаторных механизмов, в том числе регуляторной системы нейротрофических факторов.

Третья группа новорожденных характеризовалась относительно высоким значением маркера гипоксии HIF, но низкими значениями NSE и нейротрофических факторов BDNF, GDNF. У таких новорожденных запускаются молекулярно-патологические механизмы гипоксии, однако реализации нейропротективных каскадов с участием нейротрофических факторов не происходит. В итоге данных пациентов следует отнести к высокой группе риска, в которой развитие гипоксия-индуцированных повреждений регистрируется в 100% случаев, а в 75% случаев исход для плода — неблагоприятный.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, согласно которым низкий уровень нейротрофического фактора BDNF в пуповинной крови детей следует рассматривать как неблагоприятный для периодов особой чувствительности головного мозга к действию гормонов и пептидных регуляторов во время беременности и родов. Данные по содержанию нейротрофического фактора GDNF в пуповинной крови новорожденных разнятся в зависимости от гестационного возраста плода, а также течения беременности и родов [25]. Концентрация нейротрофического фактора GDNF может быть снижена в ответ на повышение уровня цитокинов или хемокинов в паренхиме головного мозга [26].

Таким образом, для выяснения значения нейротрофических факторов в пренатальном периоде и особенно факторов, которые могут вызывать

неврологические нарушения в развивающемся мозге и предрасполагать к нейро- и психопатологии в дальнейшей жизни, существует необходимость экспериментальных и клинических исследований.

Заключение

Хроническая гипобарическая гипоксия у беременных самок мышей в I и II триместрах приводит к достоверному снижению уровня нейротрофических факторов BDNF, GDNF, сокращению числа эмбрионов и значимым изменениям массо-ростовых характеристик новорожденных детенышей.

Согласно клиническим наблюдениям, повышенная экспрессия нейротрофических факторов BDNF, GDNF обеспечивает защиту новорожденного даже при наличии и реализации факторов гипоксии. Низкое содержание нейротрофических факторов BDNF, GDNF наблюдалось в группе младенцев с высоким риском развития неблагоприятных последствий гипоксического повреждения.

Таким образом, экспериментально и клинически установлена защитная роль нейротрофических факторов BDNF, GDNF в регуляции гомеостаза у плода в условиях хронической гипоксии.

Финансирование исследования. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-10149). Дополнительные измерения HIF были проведены в рамках гранта Президента РФ (МК-1485.2019.4).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

1. Федорова М.В. *Диагностика и лечение внутриутробной гипоксии плода*. М: Медицина; 1982; 207 с.

Fedorova M.V. *Diagnostika i lechenie vnutriutrobnoy gipoksii ploda* [Diagnosis and treatment of fetal hypoxia]. Moscow: Meditsina; 1982; 207 p.

2. Hennigan A., O'Callaghan R.M., Kelly A.M. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(2): 424–427, <https://doi.org/10.1042/bst0350424>.

3. Фоминова У.Н., Гурина О.И., Шепелева И.И., Попова Т.Н., Кекелидзе З.И., Чехонин В.П. Нейротрофический фактор головного мозга: структура и взаимодействие с рецепторами. *Российский психиатрический журнал* 2018; 4: 64–72.

Fominova U.N., Gurina O.I., Shepeleva I.I., Popova T.N., Kekelidze Z.I., Chekhonin V.P. Brain-derived neurotrophic factor: structure and interaction with receptors. *Rossiyskiy psikhiatricheskiy zhurnal* 2018; 4: 64–72.

4. Urazov M.D., Astrakhanova T.A., Usenko A.V., Mishchenko T.A., Schelchkova N.A., Kravchenko G.A., Vedunova M.V., Mitroshina E.V. New aspects of central nervous system adaptation to prenatal hypoxia. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2018; 10(4): 60–68, <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.4.07>.

5. Giannopoulou I., Pagida M.A., Briana D.D., Panayotacopoulou M.T. Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. *Hormones* 2018; 17(1): 25–32, <https://doi.org/10.1007/s42000-018-0007-7>.

6. Benarroch E.E. Brain-derived neurotrophic factor: regulation, effects, and potential clinical relevance. *Neurology* 2015; 84(16): 1693–1694, <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000001507>.

7. Kowiański P., Lietzau G., Czuba E., Waśkow M., Steliga A., Moryś J. BDNF: a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cell Mol Neurobiol* 2018; 38(3): 579–593, <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4>.

8. Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Usenko A.V., Voronova N.V., Astrakhanova T.A., Shirokova O.M., Kastalskiy I.A., Vedunova M.V. Features of neural network formation and their functions in primary hippocampal cultures on the background of chronic TrkB receptor system influence. *Front Physiol* 2019; 9: 1925, <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01925>.

9. Duarte E.P., Curcio M., Canzoniero L.M., Duarte C.B. Neuroprotection by GDNF in the ischemic brain. *Growth Factors* 2012; 30(4): 242–257, <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.691478>.

10. Mitroshina E.V., Mishchenko T.A., Shirokova O.M., Astrakhanova T.A., Loginova M.M., Epifanova E.A., Babaev A.A., Tarabykin V.S., Vedunova M.V. Intracellular neuroprotective mechanisms in neuron-glia networks mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 1036907, <https://doi.org/10.1155/2019/1036907>.

11. Celtik C., Acunaş B., Oner N., Pala O. Neuron-specific enolase as a marker of the severity and outcome of hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev* 2004; 26(6): 398–402, <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2003.12.007>.

12. Морозова А.Ю., Милютин Ю.П., Арутюнян А.В., Евсюкова И.И. Содержание нейрон специфической эноллазы и нейротрофического фактора роста в пуповинной крови здоровых доношенных детей после операции планового кесарева сечения и спонтанных родов. *Журнал акушерства и женских болезней* 2015; 64(6): 38–42.

Morozova A.Y., Milyutina Yu.P., Arutyunyan A.V., Evsyukova I.I. The contents of neurospecific enolase and neurotrophic growth factor in the cord blood of healthy full-term newborns elective planned caesarean section surgery and spontaneous delivery. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney* 2015; 64(6): 38–42.

13. Chen R., Lai U.H., Zhu L., Singh A., Ahmed M., Forsyth N.R. Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: the role of hypoxia inducible factors. *Front Cell Dev Biol* 2018; 6: 132, <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00132>.

14. Adachi N., Numakawa T., Richards M., Nakajima S., Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: implications in brain-related diseases. *World J Biol Chem* 2014; 5(4): 409–428, <https://doi.org/10.4331/wjbc.v5.i4.409>.

15. Shishkina T.V., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Pimashkin A.S., Kastalskiy I.A., Mukhina I.V., Kazantsev V.B., Vedunova M.V., Shirokova O.M. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) counteracts hypoxic damage to hippocampal neural network function in vitro. *Brain Res* 2018; 1678: 310–321, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.10.023>.

16. Vedunova M.V., Sakharnova T.A., Mitroshina E.V., Shishkina T.V., Astrakhanova T.A., Mukhina I.V. Antihypoxic and neuroprotective properties of BDNF and GDNF in vitro and in vivo under hypoxic conditions. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 38–47.
17. Maragakis N.J., Rothstein J.D. Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2006; 2(12): 679–689, <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0355>.
18. Capani F., Quarracino C., Caccuri R., Sica R.E. Astrocytes as the main players in primary degenerative disorders of the human central nervous system. *Front Aging Neurosci* 2016; 8: 45, <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00045>.
19. Douglas-Escobar M., Weiss M.D. Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Front Neurol* 2012; 3: 144, <https://doi.org/10.3389/fneur.2012.00144>.
20. Pan W., Banks W.A., Fasold M.B., Bluth J., Kastin A.J. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 1998; 37(12): 1553–1561, [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00141-5](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00141-5).
21. Karege F., Schwald M., Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 2002; 328(3): 261–264, [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00529-3](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00529-3).
22. Fujita K., Tatsumi K., Kondoh E., Chigusa Y., Mogami H., Fujii T., Yura S., Kakui K., Konishi I. Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors. *Placenta* 2011; 32(10): 737–744, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.001>.
23. Sahay A.S., Sundrani D.P., Joshi S.R. Neurotrophins: role in placental growth and development. *Vitam Horm* 2017; 104: 243–261, <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.11.002>.
24. Mayeur S., Lukaszewski M.A., Breton C., Storme L., Vieau D., Lesage J. Do neurotrophins regulate the fetoplacental development? *J Med Hypotheses* 2011; 76(5): 726–728, <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.02.008>.
25. Rajkumar R., Bhaya B., Mamilla D., Czech T., Kisseih E., Saini A., Chouthai N. A preliminary evaluation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) levels in cerebrospinal fluid across various gestational ages and clinical conditions of the neonate. *Int J Dev Neurosci* 2018; 65: 61–65, <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.001>.
26. Kinjo T., Ohga S., Ochiai M., Honjo S., Tanaka T., Takahata Y., Ihara K., Hara T. Serum chemokine levels and developmental outcome in preterm infants. *Early Human Development* 2011; 87(6): 439–443, <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.03.006>.