

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук

Ноздрин Федор Владимирович

Функциональная роль ацетилхолина в реабилитации младенцев с тяжелой асфиксиией в родах.

Специальность 1.5.5 – физиология человека и животных

Научный руководитель:
д.б.н., профессор Лопатина Е.В.

Санкт-Петербург
2024

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Асфиксия при рождении продолжает оставаться одной из основных причин неврологической заболеваемости и смертности у новорожденных и стоит на 5-м месте среди самых распространенных причин смерти детей в возрасте до 5 лет - на нее ежегодно приходится около 814 тыс. случаев (Морал Ю. и др. 2019; Лоун Дж. и др. 2014; Огунленси Т. и др. 2013). Дефицит кислорода в родах может привести к тяжелому гипоксически-ишемическому повреждению мозга у новорожденных с последующим летальным исходом или тяжелыми отдаленными неврологическими исходами, такими как нейродегенеративные заболевания, умственная отсталость, эпилепсия и т.д. (Голубнитшая и др. 2011).

В развитых странах частота асфиксий при рождении составляет 5-10 случаев на 1000 живорождений, однако в развивающихся странах этот показатель в 10 раз выше. Данный факт объясняется ограниченным доступом к медицинской помощи для матерей и новорожденных. Из всех детей, родившихся в асфиксии, 15-20% умирают в неонатальном периоде, а у выживших детей до 25% случаев формируется постоянный неврологический дефицит (Лоун Д. и др. 2009; Одд Д. и др. 2017). По оценкам некоторых авторов, асфиксия при рождении приводит к летальному исходу в 23% случаев и стоит на 3-м месте после инфекций (35%) и преждевременных родов (28%) (Арифф С. и др. 2010).

Термин "асфиксия при рождении" был предложен Всемирной организацией здравоохранения как клиническое описание новорожденного, который "не может инициировать или поддерживать регулярное дыхание при рождении". Этот термин не подразумевает под собой причинности данного состояния, поскольку у новорожденного могут быть и другие причины

нарушения ритма или отсутствия дыхания, например обусловленные недоношенностью.

Согласно МКБ-10, в рубрике "Р21 Асфиксия при родах" основным критерием диагноза "асфиксия" является оценка по шкале Апгар на 1-й минуте после рождения. Тяжелая асфиксия (Р21.0) выставляется при сумме баллов 0-3 через 1 мин после рождения. Средняя и умеренная асфиксия при рождении (Р21.1) - при сумме баллов 4-7. Однако, несмотря на то что по МКБ-10 сумма 7 баллов через 1 мин после рождения соответствует асфиксии средней и умеренной тяжести, нецелесообразно выставлять этот диагноз, поскольку оценка 7 баллов по шкале Апгар к концу 1-й минуты не является клинически и/или прогностически значимой. Кроме того, многочисленные исследования указывают на то, что первая оценка по шкале Апгар слабо коррелирует с дальнейшим исходом у детей. Так, для постановки диагноза "тяжелая асфиксия при рождении" предлагается использовать совокупность признаков: признаки внутриутробной или интранатальной гипоксии плода, низкая оценка по шкале Апгар (<5 баллов на 5-й минуте), $pH < 7,0$ или дефицит оснований (BE) - > 16 ммоль/л в пуповинной крови, полиорганная недостаточность в раннем неонатальном периоде, неврологические нарушения с момента рождения (Лоун Дж. И др. 2009; Одд. Д и др. 2009; Глисон К. и др. 2012). В случае рождения ребенка в асфиксии ему требуется проведение реанимационных мероприятий. По данным Европейского совета по реанимации, приблизительно 85% детей, рожденных в срок, начинают спонтанно дышать в течение 10-30 секунд после рождения без дополнительной помощи. Еще 10% детей положительно отвечают на обсушивание и тактильную стимуляцию, около 3% инициируют самостоятельное дыхание после вентиляции с положительным давлением через маску, 2% нуждаются в интубации трахеи для поддержки дыхательной функции и 0,1% требуют непрямого массажа сердца и/или адреналина для стабилизации состояния (Вилли Дж. и др. 2015; Хиткот А. и др. 2018).

Необходимость в проведении реанимационных мероприятий при рождении тем выше, чем ниже масса тела новорожденных и гестационный возраст.

Гипоксически-ишемическое поражение (ГИП) возникает до, во время или после родов. Причины могут быть связаны с состоянием матери и ребенка, способом родоразрешения, течением беременности. Наиболее эффективным методом лечения ГИП является гипотермия в сочетании с фармакологической терапией. (Ритовска С. и др. 2022).

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных (ГИЭ) является важным клиническим состоянием, поскольку она может привести к смерти и инвалидности. В течение последних 40 лет осуществляются интенсивные поиски методов лечения, которые могли бы улучшить прогноз для новорожденных с ГИЭ. Применение гипотермии для лечения новорожденных стало результатом лабораторных исследований, в том числе на мелких и крупных животных, за которыми последовали пилотные исследования на людях и, наконец, рандомизированные контролируемые испытания для подтверждения эффективности и безопасности. Клинические испытания показали, что применение терапевтической гипотермии снижает смертность и улучшает состояние выживших детей в раннем возрасте. В нескольких рандомизированных контролируемых исследованиях с участием младенцев с явными признаками гипоксически-ишемической энцефалопатии было показано, что умеренная гипотермия (от 33 до 34 °C) в течение 72 часов, начатая в течение 6 часов после родов, снижает риск смерти или инвалидности в возрасте от 18 до 24 месяцев и повышает вероятность выживания без инвалидности. (Джейкобс, С.Е., и др. 2013).

Гипоксически-ишемическая энцефалопатия — это мультисистемное заболевание, которое требует интенсивной медицинской поддержки для мониторинга состояния головного мозга и органов, не относящихся к центральной нервной системе. Лечение должно проводиться в отделении интенсивной терапии для новорожденных высшего уровня с

инфраструктурой для комплексного подхода к лечению критически больных новорожденных. Лечение гипотермией — это первый и в настоящее время единственный метод терапии, улучшающий состояние новорождённых с ГИЭ и указывающий на то, что прогноз для детей, перенесших асфиксию, можно улучшить. Применение данного подхода ускорило изучение других методов терапии в сочетании с гипотермией, а так же подход к мониторингу состояния мозга, что позволяет раньше выявлять осложнения. (Витлоу Э. 2023).

Современные и перспективные исследования в области ГИЭ направлены на изучение новых маркеров для раннего выявления, лечения и надлежащей нейропротекции и цитопротекции доношенных и недоношенных детей из группы риска. (Ритовска С. и др. 2022). В частности, исследование физиологических механизмов протекции, запускаемых гипотермией, поиск новых комбинированных методов лечения.

По данным ВОЗ, асфиксия при рождении является причиной примерно 900 000 смертей в год и одной из основных причин ранней неонатальной смертности, на основании этого можно сделать вывод, что исследование, посвященное изучению функциональной роли ацетилхолина в реабилитации детей с тяжелой асфиксиею в родах является актуальным.

Цель исследования

Клинически и экспериментально изучить возможность модуляции физиологических механизмов протекции, препятствующих развитию повреждения головного мозга и миокарда.

Задачи исследования:

1. Провести анализ клинико-лабораторных данных, детей перенесших тяжелую асфиксию в родах.
2. Сформулировать критерии включения пациентов в исследование.

3. Выявить физиологические маркеры, характеризующие степень стабилизации жизненно важных функций пациентов при проведении гипотермии.
4. В условиях органотипического культивирования ткани сердца 12-ти дневного куриного эмбриона, оценить трофотропные свойства ацетилхолина в широком диапазоне концентраций.
5. С помощью фармакологического анализа изучить вклад М-холинорецепторов и Na/K -АТФазы в реализацию трофотропного эффекта ацетилхолина при органотипическом культивировании ткани сердца.

Научная новизна

В ходе клинической части исследования обнаружено, что основными маркерами стабилизации состояния пациентов, перенесших тяжелую асфиксию, является стабилизация концентраций ионов натрия, калия, кальция. Отношение ионов натрия и калия по окончании гипотермии составило 39,4, в то время как до начала гипотермии было 60,2. При проведении гипотермии зарегистрировано снижение уровня лактата от 6,75 ммоль/л до начала гипотермии, до 1,9 ммоль/л по ее окончании. Уровень лактата снижался параллельно со стабилизацией концентрационных градиентов ионов натрия, калия и концентрации ионизированного кальция. Сформулирована гипотеза об участии ацетилхолина и Na^+/K^+ АТФазы в регуляции ионного гомеостаза и функций основных органов и систем организма при проведении гипотермии. Зарегистрировано достоверное снижение уровня гемоглобина с 151 г/л до начала гипотермии до 131 г/л по ее окончании. Гематокрит (Hct) при проведении гипотермии снижался, в первые сутки - 46,3% на вторые сутки 44,6% и 39,8% по окончании гипотермии.

В условиях органотипического культивирования ткани сердца 12-дневного куриного эмбриона обнаружено дозозависимое действие ацетилхолина в

диапазоне концентраций от 10^{-4} М до 10^{-10} М. Трофотропный эффект ацетилхолина оказывал в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом. Индекс площади экспериментальных эксплантатов был выше контрольного значения в среднем на 27%. Трофотропное действие ацетилхолина реализуется прямо – через взаимодействие с М-холинорецепторами, либо через модуляцию сигнала в ансамбле М-холинорецептор - Na^+/K^+ АТФаза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование, проведенное нами в клинических условиях, позволило сформулировать дополнительные критерии, наличие которых необходимо учитывать при проведении мероприятий по интенсивной терапии и реанимации новорожденных, перенесших тяжелую асфиксию в родах, для исключения инвалидизации пациентов или снижения ее степени в постнатальном периоде. Получены приоритетные данные о динамике соотношения ионов натрия и калия при проведении гипотермии. Обнаруженный эффект сопровождает стабилизацию показателей системы кислотно-щелочного равновесия при действии гипотермии. В клинических условиях обнаружены достоверные различия в содержании ионов калия, кальция и лактата до, во время и после проведения гипотермии. Сформулирована гипотеза о том, что в основе стабилизации картины системы кислотно-щелочного равновесия лежит восстановление работы Na^+/K^+ - АТФазы и Na^+/Ca^+ - АТФазы. Обнаружено, что гипотермия оказывает большее влияние на стабилизацию концентрации ионов калия.

В условиях органотипического культивирования ткани сердца обнаружен трофотропный эффект ацетилхолина, в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом. Фармакологический анализ показал, что этот эффект реализуется при участии М-холинорецепторов и Na^+/K^+ - АТФазы.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение терапевтической гипотермии приводит к стабилизации основных показателей гомеостаза к окончанию проведения процедуры.
2. Соотношение концентрационных градиентов ионов натрия, калия, при стабилизации концентрации ионизированного кальция и снижении уровня лактата — определяются, как основные маркеры стабилизации состояния пациентов при проведении гипотермии.
3. Ацетилхолин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сердца в широком диапазоне концентраций.
4. Оубаин и атропин ингибируют трофотропный эффект ацетилхолина ($10^{-8}M$) за счет воздействия на M-холинорецепторы и Na^+/K^+ -АТФазу.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач проведено комплексное клинико-экспериментальное исследование. Все дети, поступившие в отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных, получали лечение согласно порядку оказания медицинской помощи по профилю "Неонатология" (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. N 921н), а также согласно клиническим рекомендациям министерства здравоохранения Российской Федерации по неонатологии.

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием метода органотипического культивирования ткани головного мозга и сердца. Метод является адекватной моделью для изучения трофотропных свойств физиологически активных веществ и лекарственных препаратов. Применение органотипического культивирования позволяет стандартизировать условия эксперимента, исключить системные влияния организма на изучаемые процессы, сохранить клеточное сообщество тканей головного мозга и миокарда. Морфометрический метод оценки данных с расчетом индекса

площади позволяет оценить изменение процессов клеточного роста и пролиферации в плоскости.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена четким следованием приказу Министерства здравоохранения №921н, стандартизацией условий культивирования изучаемых тканей, анализом значительного фактического клинического и экспериментального материала, адекватным выбором методов статистической обработки.

Материалы работы были представлены в виде устных докладов на Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины» (Санкт-Петербург, 2023;2024). IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школе-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2023, Национальной конференции "Физиология экстремальных состояний" - 2023 (Курган, 2023). Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», (Санкт-Петербург, 2023).

Публикации

Тезисы устных докладов

1. Пасатецкая Н.А., Ноздрин Ф.В., Лопатина Е.В. Участие ацетилхолина в кардиоремоделировании в эмбриональный период онтогенеза. Материалы IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школы-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022», 21 – 25 марта 2022 г. Сыктывкар.
2. Ноздрин Ф.В., Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В. Применение гипотермии при выхаживании младенцев с тяжелой асфиксиею в родах. Материалы национальной конференции имени заслуженного деятеля науки Российской Федерации, доктора биологических наук,

профессора А. П. Кузнецова «Физиология экстремальных состояний»
10 февраля 2022 г. Курган.

3. Ноздрин Ф.В. Кардиопротективное действие мелатонина и ацетилхолина при оксидативном стресс в эмбриональном периоде развития. Всероссийская конференция с международным участием Интегративная физиология 2023. Санкт-Петербург, 6-8 декабря 2023 год - С. 26.
4. Ноздрин Ф.В., Пасатецкая Н.А. Физиологическая роль гипотермии в нейропротекции у детей с тяжелой асфиксиией в родах. Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023 Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023 год. С. 196-197.
5. Удовенко Е.Г., Лопатин А.И., Ноздрин Ф.В., Пасатецкая Н.А. В книге: АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ БИОМЕДИЦИНЫ - 2024. Материалы XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. Санкт-Петербург 2024 год. На тему: «Исследование цитопротекторных свойств препарата фенибут на модели ацидоза in vitro». С. 135-136.

Личное участие автора в получении результатов

Все клинические манипуляции, экспериментальные процедуры, обработка, анализ полученных результатов, подготовка материалов для опубликования выполнены автором лично.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами клинической части исследования являлись новорожденные дети с диагнозом «Тяжелая асфиксия при рождении».

Обследовано 40 новорожденных детей. Из исследования исключены дети, которым не проводилась процедура терапевтической гипотермии, пациенты с летальным исходом, с врожденными пороками развития,

перенесшие среднюю и умеренную асфиксию. По данным историй болезни, оценивались лабораторные данные кислотно-щелочного равновесия в момент начала процедуры терапевтической гипотермии, на второй день применения процедуры и после процедуры. Избраны показатели электролитного состава (ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), уровни венозного PO_2 и PCO_2 , лактат, гемоглобин и гематокрит, трансаминазы (АЛТ и АСТ).

Объектами экспериментальной части исследования являлись эксплантаты ткани сердца 12-дневных куриных эмбрионов породы белый Леггорн. Препаровку куриных эмбрионов осуществляли в стерильных условиях. Выделяли сердце куриного эмбриона и переносили в чашку Петри с небольшим количеством питательной среды. Далее отделяли предсердия, а фрагменты ткани желудочков размером 0.5-1 мм переносили в чашки Петри на коллагеновую подложку и добавляли питательную среду. После чего культивировали в CO_2 инкубаторе («Binder», Германия) при $37^{\circ}C$ и 5% CO_2 в течение 3-х суток. Важно, что по сроку эмбрионального развития 12-дневный куриный эмбрион соответствует 24 неделе гестации плода человека. Каждая чашка Петри содержала 15 эксплантатов.

Стандартная питательная среда, используемая для культивирования органных культур, имеет $pH=7,9$. В ее состав входят раствор Хенкса (50% об.) (Биолот, Россия), среда Игла (40% об.) (Биолот, Россия), эмбриональная телячья сыворотка (9,5% об.) (Thermo Fisher Scientific, Южная Америка), глюкоза 40% (0,5% об.) (АО "ПФК Обновление", Россия) ципрофлоксацин (2 мг/мл) (Красфарма ПАО, Россия).

В питательную среду экспериментальных эксплантатов добавляли ацетилхолин, атропин, оуабаин согласно протоколу эксперимента. Контрольной группой служили эксплантаты, культивируемые в среде стандартного содержания.

Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO_2 инкубатора и исследовали с использованием морфометрического метода.

Влияние тестируемых веществ на рост эксплантатов исследуемых тканей оценивали при помощи морфометрического критерия – индекс площади, который рассчитывали, как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны. Значение индекса площади контрольных эксплантатов принимали за 100%. Контрольными являлись эксплантаты, развивающиеся в условиях питательной среды стандартного состава.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. При сравнении контрольной и экспериментальной групп использовали *t*-критерий Стьюдента для двух независимых выборок. Множественные сравнения проводили с применением дисперсионного анализа ANOVA. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего, выраженные в процентах. Различия считали достоверными при $p < 0.05$. В клинической части исследования использовали язык программирования R и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты клинической части исследования

Сформированы 3 группы данных, характеризующие состояние системы кислотно-щелочного равновесия у 40-ка пациентов: группа А - данные до гипотермии, группа В - данные на вторые сутки гипотермии, группа С – данные после гипотермии.

Статистический анализ проводили с помощью программы STATISTICA 10.0. Для оценки изменения признака при проведении гипотермии и после процедуры применяли критерий Фридмана. Для проведения апостериорных сравнений использовали парный критерий Вилкоксона. Корреляционный анализ проводили с расчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для графического представления данных используется диаграмма «ящик-с-усами».

На рис.1 графически изображена переменная «Калий». Выборочные медианы (устойчивые к выбросам статистики среднего) групп данных А и В равны 2,25 и 3,25 соответственно, их разность равна 1, то есть уровень концентрации калия в группе В выше соответствующего уровня концентрации в группе А.

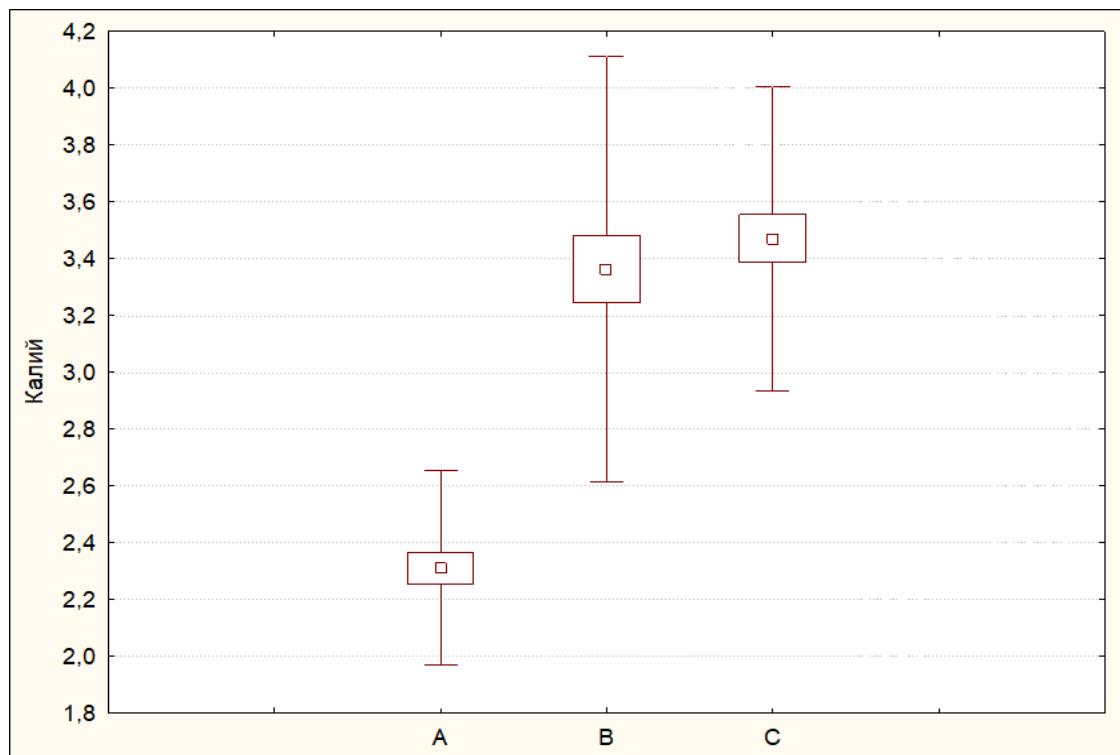


Рисунок 1. Изменение концентрации калия в плазме крови новорожденных при проведении гипотермии

В составленной по всем пяти переменным общей Таблице 1 полученный результат будет записан в виде $A < B$. Аналогичные расчеты, выполненные для средних уровней концентрации калия у групп данных В и С, не выявили различий генеральных средних. Такой результат записан в виде $B = C$. Результаты обработки данных по предложенному в работе методу представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Анализ восьми исследуемых параметров у 40 новорожденных детей

Параметр Hct	Группы	A	X	>	>
		B		X	>

По параметру «Натрий» группы данных в точках А, В и С не отличались друг от друга (рис. 2).

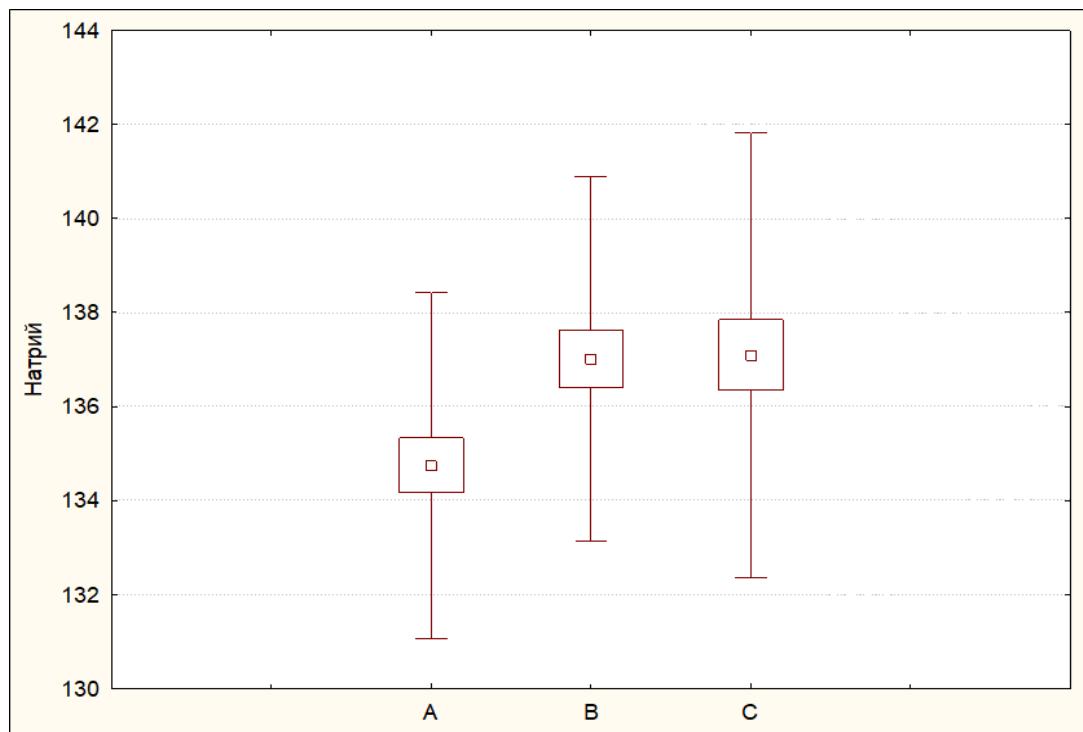


Рисунок 2. Изменение концентрации натрия у новорожденных при проведении гипотермии.

Уровень концентрации кальция в крови пациентов до гипотермии не отличался от концентрации кальция в крови пациентов на 2 сутки гипотермии, однако увеличился после проведения процедуры гипотермии (рис.3). Различий между уровнем концентрации кальция в группах данных В и С не зарегистрировано.

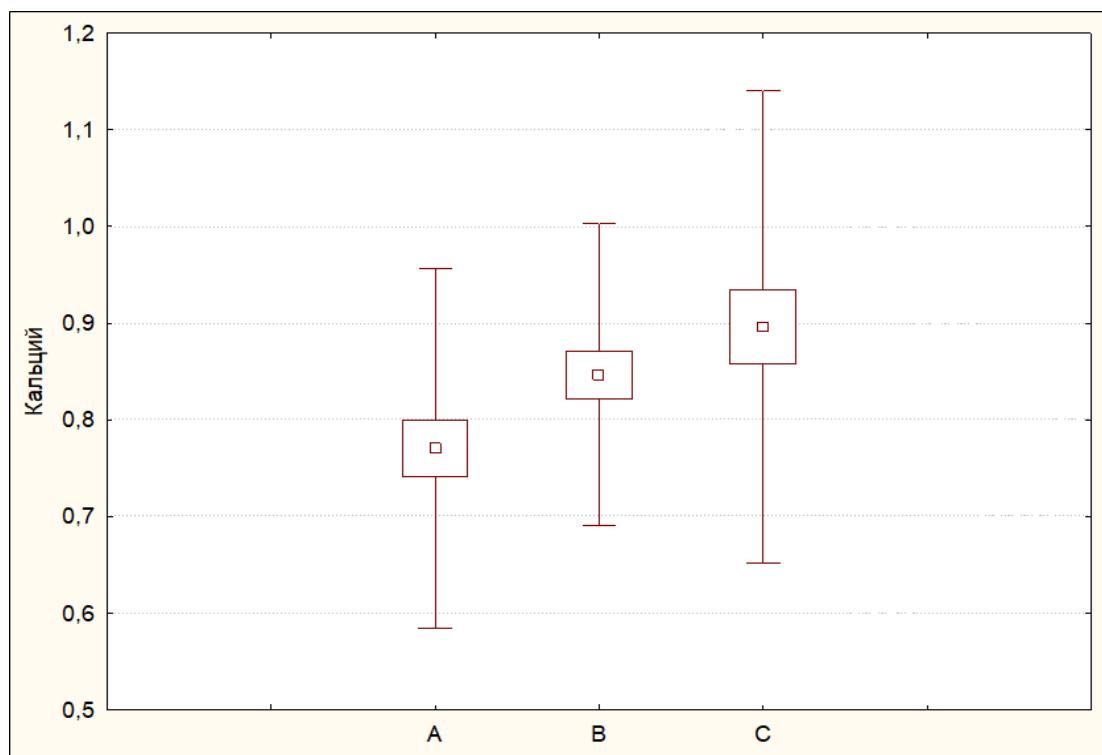


Рисунок 3. Изменение концентрации кальция у новорожденных при проведении гипотермии

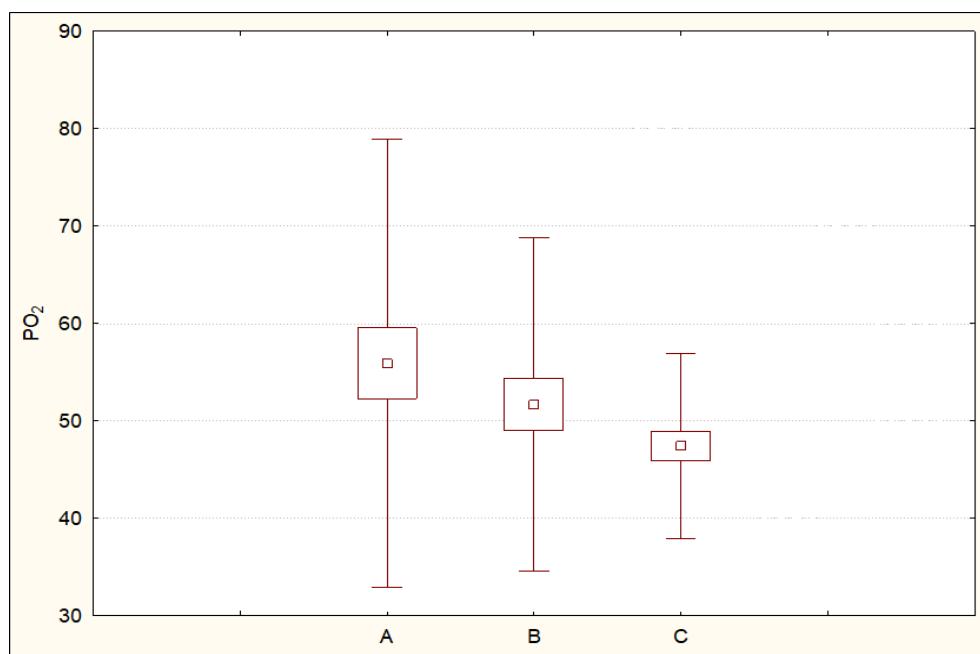


Рисунок 4. Изменение концентрации кислорода у новорожденных при проведении гипотермии.

Значимых изменений концентрации PO₂ в крови пациентов групп данных А, В, и С не зарегистрировано (рис.4).

Параметр « PCO_2 » увеличился у пациентов на 2 сутки гипотермии и после гипотермии по сравнению с исходным уровнем. Различий между параметром в точках В и С нет (рис. 5).

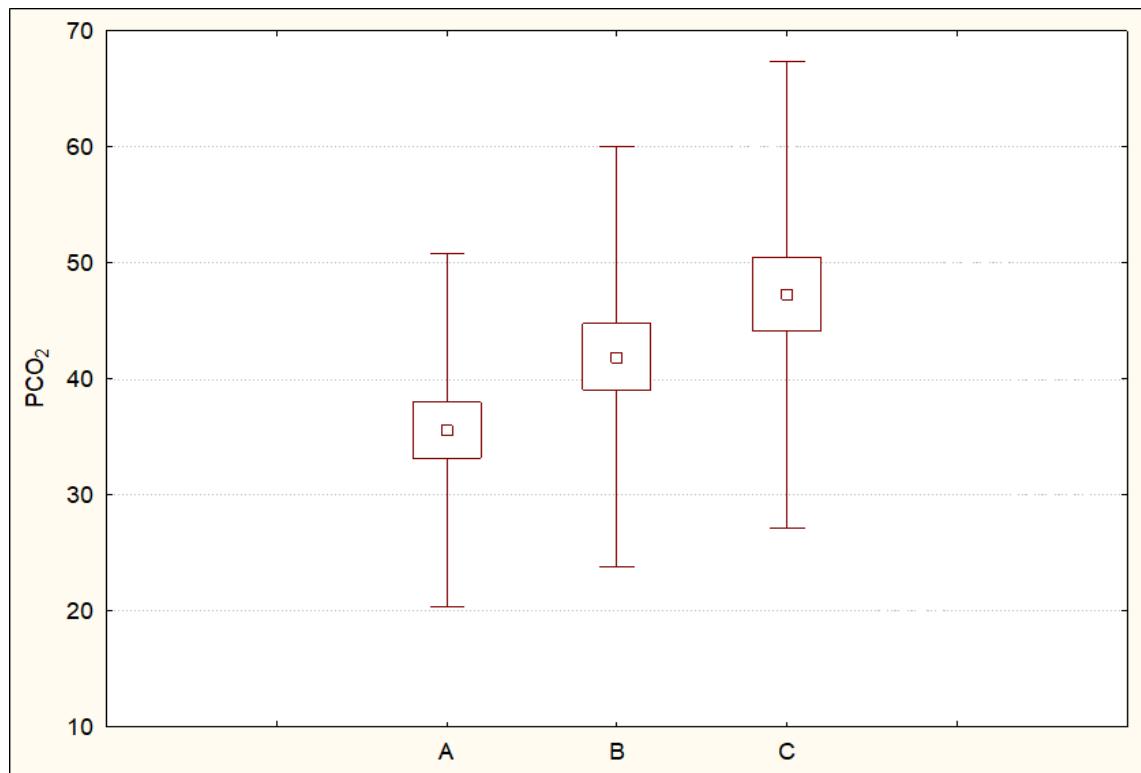


Рисунок 5. Изменение концентрации CO_2 у новорожденных при проведении гипотермии

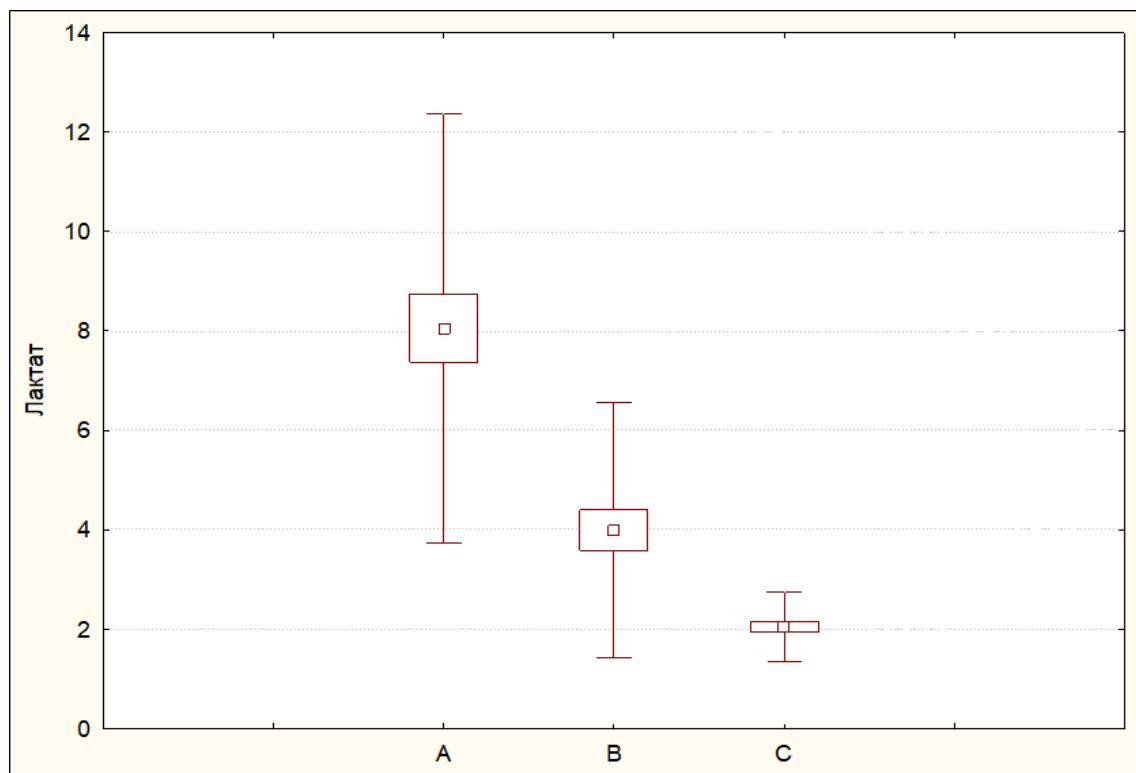


Рисунок 6. Изменение концентрации лактата у новорожденных при проведении гипотермии

Концентрация лактата в крови снижалась при проведении гипотермии и после нее. У пациентов группы данных в точке С содержание лактата достоверно ниже чем в группе данных точки В (рис. 6).

Группы данных А и В не отличались по параметру гемоглобин (Hb). Уровень гемоглобина достоверно снижен у пациентов в группе данных точки С по сравнению с исходным уровнем (группа данных в точке А) и по сравнению с точкой В – вторые сутки гипотермии(рис. 7).

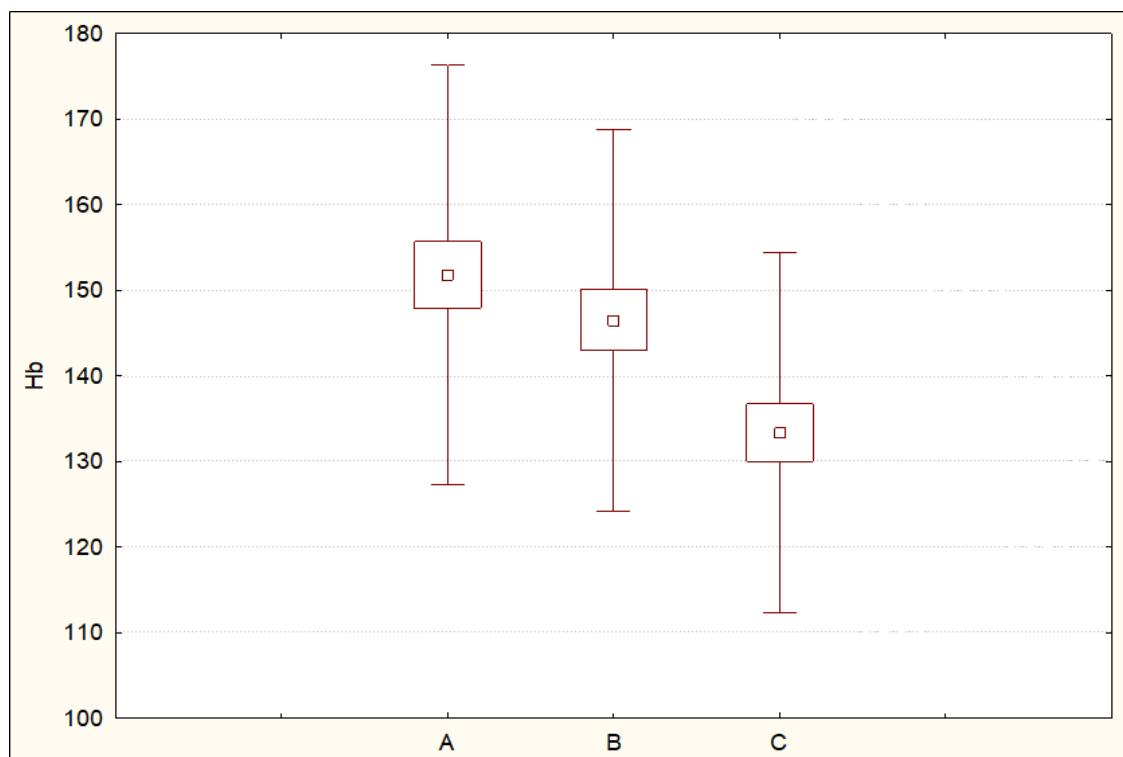


Рисунок 7. Изменение концентрации гемоглобина у новорожденных при проведении гипотермии

Гематокрит (Hct) так же снижен в группе В и С по сравнению с группой А. У пациентов в точке С – после проведения гипотермии параметр достоверно ниже чем в группе В (рис. 8).

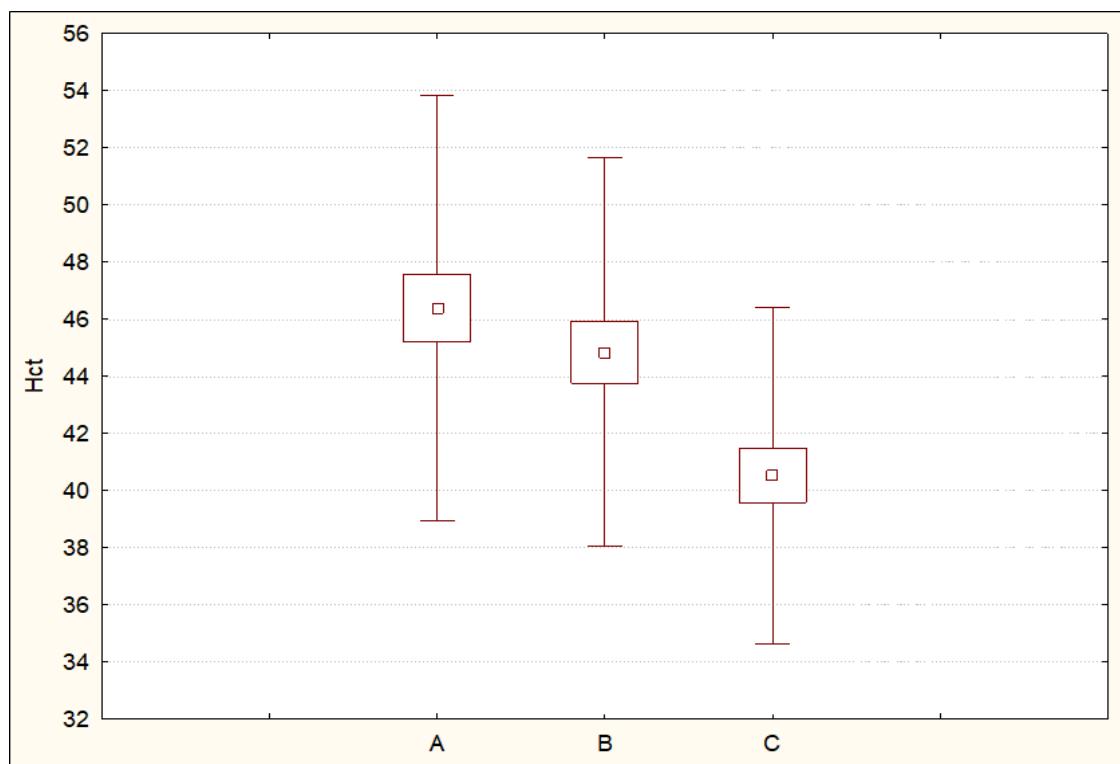


Рисунок 8. Изменение гематокрита у новорожденных при проведении гипотермии

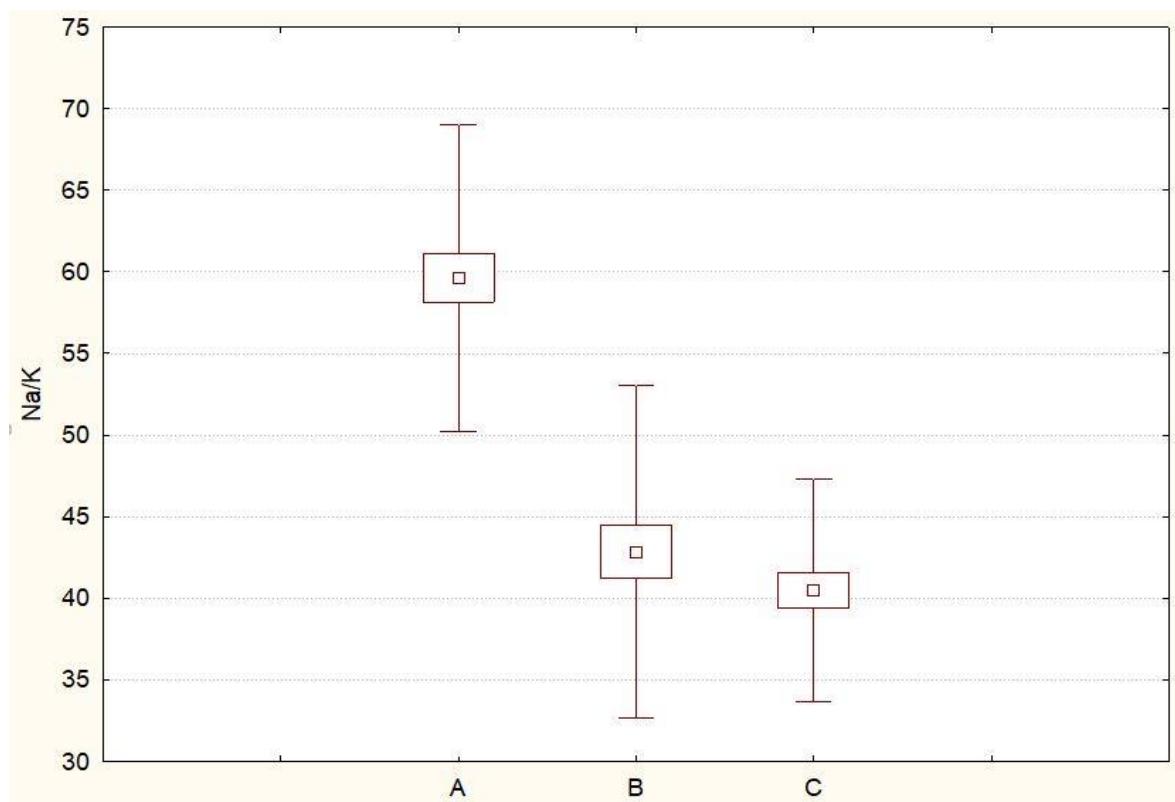


Рисунок 9. Отношение концентраций натрий / калий.

Обнаружены достоверные различия в концентрационных градиентах отношения натрий / калий между точками А и В, точками А и С. Между точками В и С достоверных различий не обнаружено. Необходимо отметить, что проведение гипотермии приводит к стабилизации концентрационных градиентов и по-видимому, нормализации работы Na^+/K^+ - АТФазы и, учитывая стабилизацию концентрации Ca^{2+} (рис. 3) Na^+/Ca - АТФазы.

В следующих таблицах представлены выборочные значения коэффициентов ранговой корреляции ρ Спирмана между факторами в разрезе групп, значимые при уровне доверительной вероятности 0,95.

Таблица 2. Анализ корреляций между выбранными параметрами до начала гипотермии - группа данных - точка А

Группа данных точка А	Калий	Натрий	Кальций	PO_2	PCO_2	Лактат	Hb	Hct
Калий	x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	-0,522	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Натрий		x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Кальций			x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
PO_2				x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	-0,533	<i>Hem</i>
PCO_2					x	<i>Hem</i>	0,500	<i>Hem</i>
Лактат						x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Hb							x	0,631
Hct								x

Таблица 3. Анализ корреляций между выбранными параметрами на вторые сутки гипотермии - группа данных – точка В

Группа данных точка В	Калий	Натрий	Кальций	PO_2	PCO_2	Лактат	Hb	Hct
Калий	x	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	-0,340	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>

Натрий		<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Кальций			<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
PO ₂				<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
PCO ₂					<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Лактат						<i>x</i>	<i>Hem</i>	0,531
Hb							<i>x</i>	0,700
Hct								<i>x</i>

Таблица 4. Анализ корреляций между выбранными параметрами по окончании гипотермии - группа данных – точка С

Группа данных точка С	Калий	Натрий	Кальций	PO ₂	PCO ₂	Лактат	Hb	Hct
Калий	<i>x</i>	<i>Hem</i>	0,426	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	0,391	0,361
Натрий		<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Кальций			<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
PO ₂				<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
PCO ₂					<i>x</i>	<i>Hem</i>	0,324	<i>Hem</i>
Лактат						<i>x</i>	<i>Hem</i>	<i>Hem</i>
Hb							<i>x</i>	0,622
Hct								<i>x</i>

Результаты экспериментальной части исследований

В следующей части работы исследовали влияние ацетилхолина в диапазоне концентраций от 10⁻⁴ М до 10⁻¹⁰ М на рост эксплантатов ткани сердца 12-дневного куриного эмбриона. В концентрации 10⁻⁸ М ацетилхолин стимулировал рост эксплантатов ткани сердца на 27±9% (n=39, p<0.05) по сравнению с контрольным значением (рис.10). В остальных концентрациях препарат на рост экспериментальных эксплантатов не влиял. Атропин в дозе

10^{-8} М ингибировал рост эксплантов ткани сердца на $27\pm5\%$ ($n=40$, $p<0.05$). В концентрации 10^{-10} М препарат не влиял на рост экспериментальных эксплантов.

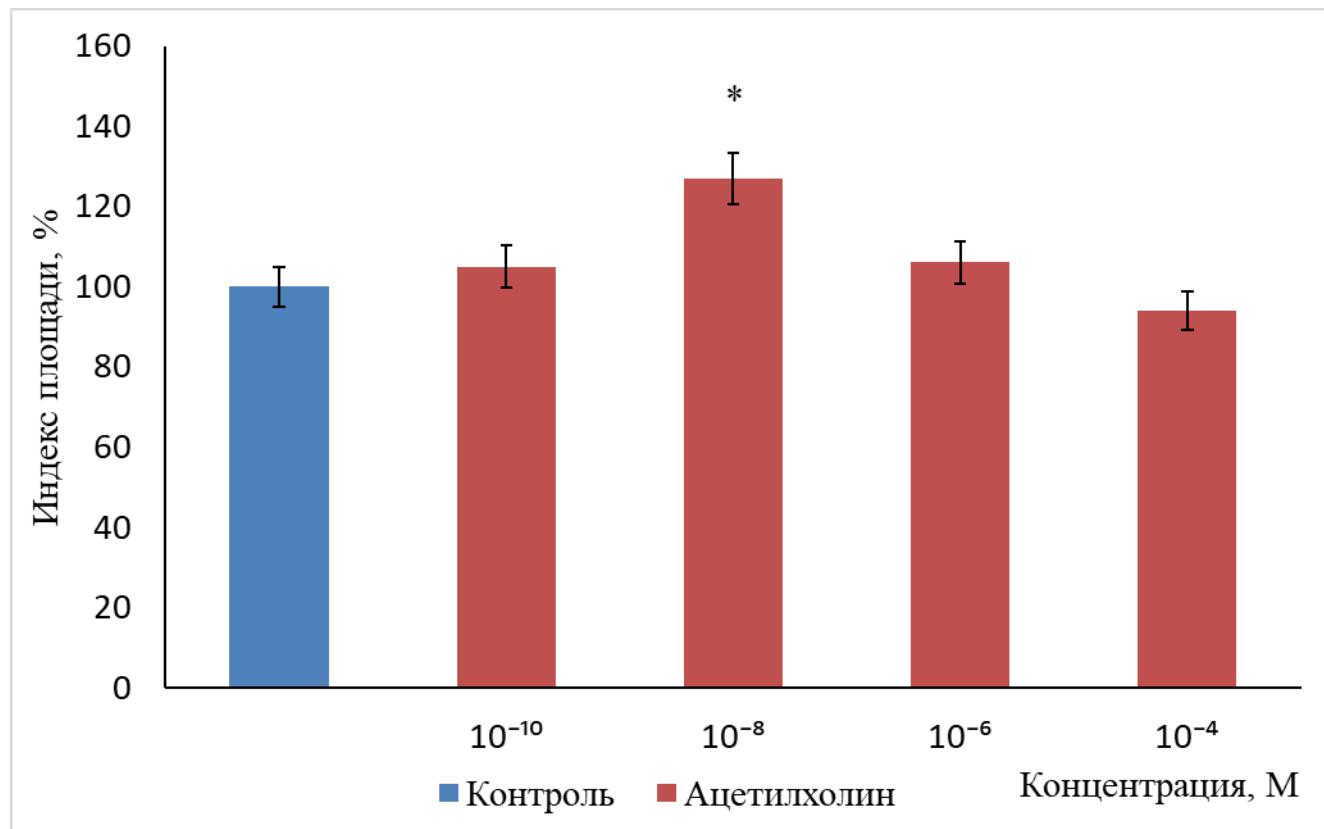


Рисунок 10. Влияние ацетилхолина на рост эксплантов ткани сердца 12-дневных куриных эмбрионов. * – $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

Для уточнения механизма трофотропного действия ацетилхолина, эксплантаты ткани сердца культивировали в питательной среде, содержащей ацетилхолин 10^{-8} М и атропин 10^{-10} М (рис.11.) Введение в питательную среду М-холиноблокатора атропина нивелировало трофотропное действие ацетилхолина. Следовательно, трофотропный эффект препарата опосредован активацией М-холинорецепторов.

Для уточнения роли сигнальной функции Na^+/K^+ -АТФазы в реализации трофотропного эффекта ацетилхолина в концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом провели дополнительные серии

экспериментов. Обнаружено, что ацетилхолин (10^{-8} М) устраняет, ингибирующее рост эксплантатов ткани сердца, действие оуабаина (10^{-8} М) (рис. 12).

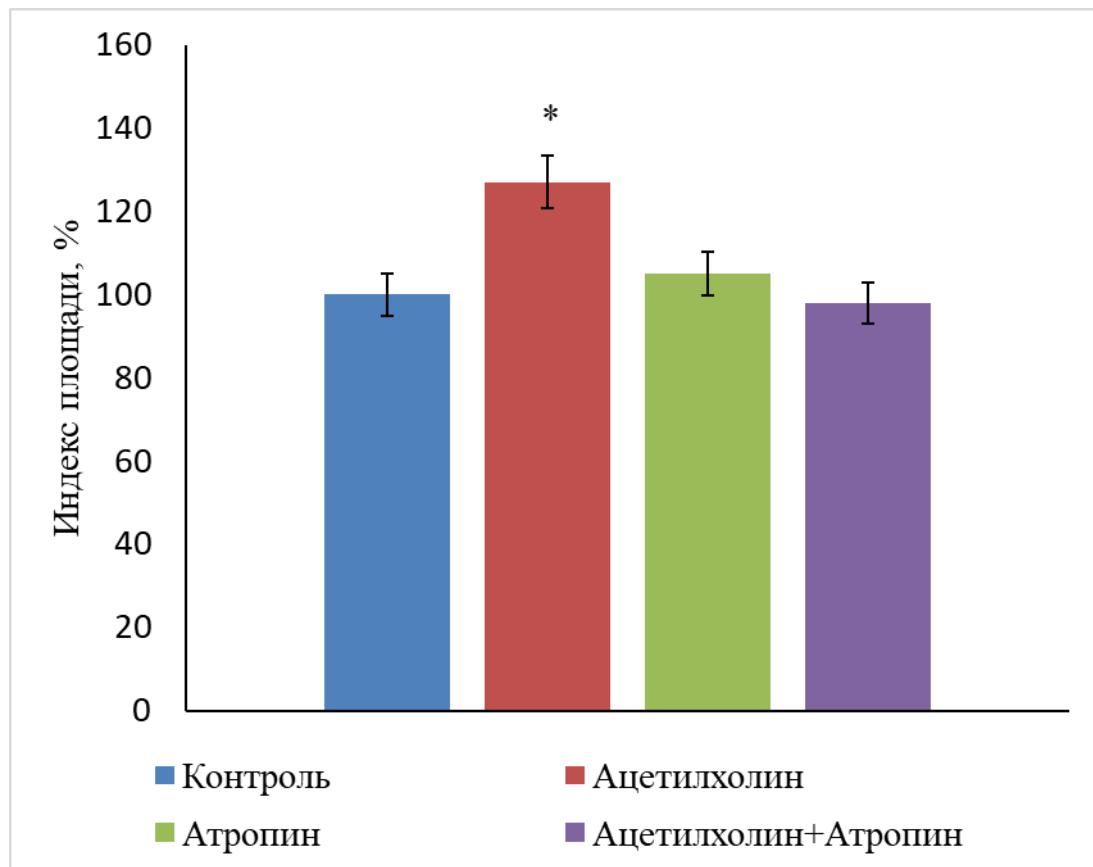


Рисунок 11. Атропин (10^{-10} М) нивелирует трофотропное действие ацетилхолина (10^{-8} М). * – $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

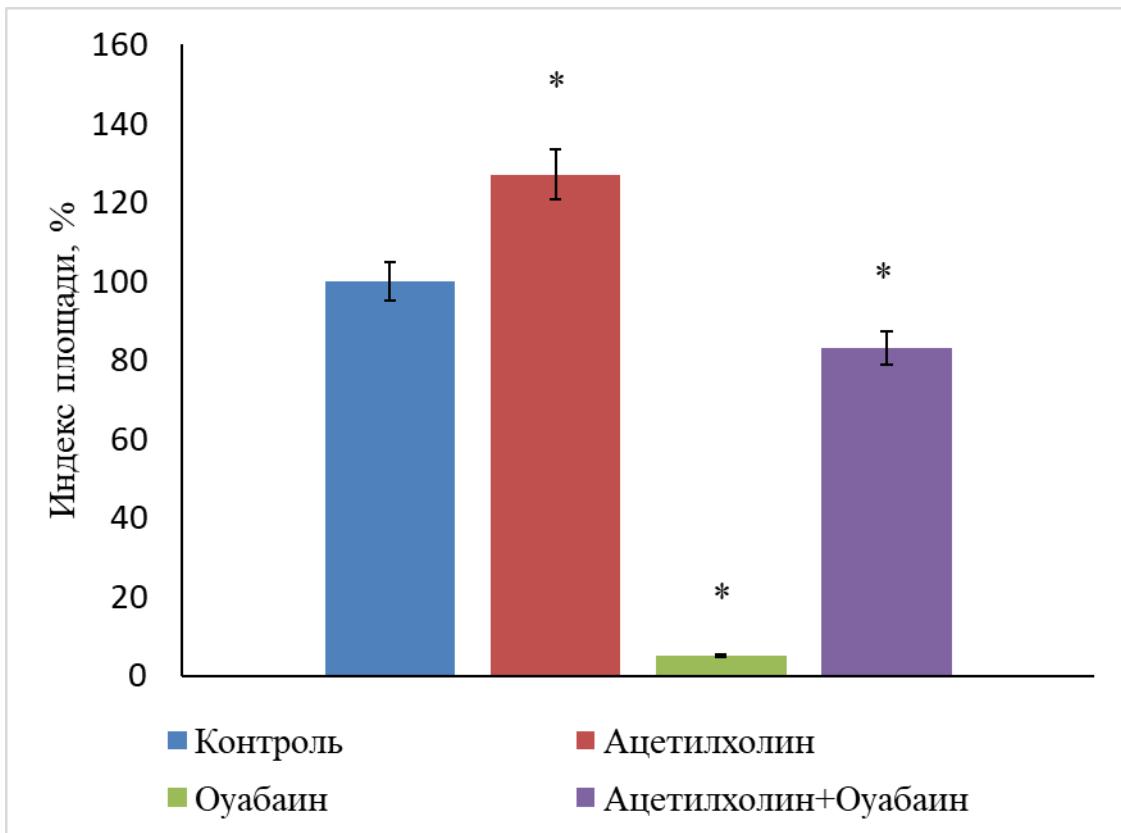


Рисунок 12. Ацетилхолин (10^{-8} М) устраняет ингибирующее рост эксплантов ткани сердца действие оуабаина (10^{-8} М). * – $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля.

Для уточнения возможности модуляции ацетилхолином ансамбля М-холинорецептор- Na^+/K^+ -АТФазы провели серию экспериментов в которых в питательную среду экспериментальных чашек Петри наряду с ацетилхолином (10^{-8} М) добавляли блокатор М-холинорецепторов атропин (10^{-10} М) и блокатор Na^+/K^+ -АТФазы оуабаин (10^{-8} М). Проведенные исследования показали, что трофотропный эффект ацетилхолина реализуется прямо при участии М-холинорецепторов и Na^+/K^+ -АТФазы и рецептор-опосредованно при участии ансамбля М-холинорецептор- Na^+/K^+ -АТФаза (рис13).

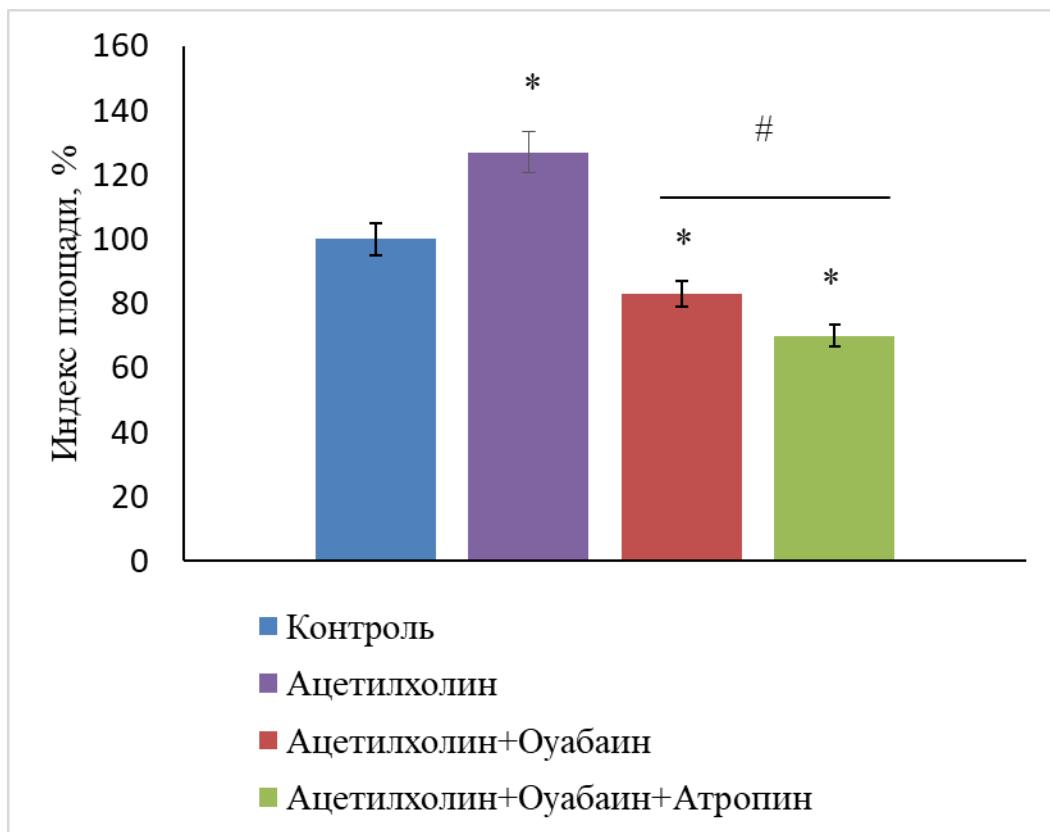


Рисунок 13. Культивирование экспланшатов ткани сердца в присутствии ацетилхолина (10^{-8} М), ouабаина (10^{-8} М) на фоне блокады М-холинорецепторов атропином в дозе 10^{-10} М уменьшает эффект ацетилхолина. * – $p<0.05$, достоверные различия относительно контроля. # – $p<0.05$, достоверные различия относительно экспланшатов, культивируемых в присутствии только ацетилхолина (10^{-8} М) и ouабаина (10^{-8} М).

Выводы

1. Основными маркерами стабилизации состояния пациентов, перенесших тяжелую асфиксию, является стабилизация концентраций ионов натрия, калия, кальция. Отношение ионов натрия и калия по окончании гипотермии составило 39,4, в то время как до начала гипотермии было 60,2. Концентрация лактата в крови снижалась при проведении гипотермии от 6,75 ммоль/л до начала гипотермии, до 1,9 ммоль/л по ее окончании.

2. Различий по параметру гемоглобин (Hb) до проведения гипотермии и на вторые сутки от ее начала не обнаружено. Зарегистрировано достоверное снижение уровня гемоглобина с 151 г/л до начала гипотермии до 131 г/л по ее окончании. Гематокрит (Hct) при проведении гипотермии снижался и составил в первые сутки - 46,3% на вторые сутки 44,6% и 39,8% по окончании гипотермии.
3. В условиях органотипической культуры ткани сердца ацетилхолин в концентрациях 10^{-4} М, 10^{-6} М, 10^{-10} М на рост эксплантатов исследуемой ткани практически не влиял. В концентрации, сопоставимой с неквантовым выбросом (10^{-8} М) - ацетилхолин стимулировал рост эксплантатов ткани сердца 12 дневного куриного эмбриона на $27\pm9\%$ по сравнению с контрольным значением.
4. Трофотропный эффект ацетилхолина (10^{-8} М) обусловлен действием через М-холинорецепторы, либо опосредованно через Na^+/K^+ -АТФазу, при модуляции ансамбля М-холинорецептор Na^+/K^+ -АТФаза.

Экспертная оценка научных работ

Устный доклад на тему: «Участие ацетилхолина в кардиоремоделировании в эмбриональный период онтогенеза». Материалы IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школы-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022», 21 – 25 марта 2022 г. Сыктывкар **удостоен Диплома второй степени**.

В 2023 году научная работа ««Физиологическая роль гипотермии в нейропротекции у детей с тяжелой асфиксиею в родах» **удостоена Диплома второй степени** на XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2023». Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023.

В 2024 году научная работа ««Исследование цитопротекторных свойств препарата фенибут на модели ацилоза *in vitro*»» **удостоена Диплома второй степени** на XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с

международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2024».
Санкт-Петербург, 21 марта 2024.

Экзамены:

Экзамен по английскому языку сдан на оценку отлично.

Экзамен по философии сдан на оценку хорошо.