

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

Лопатин Алексей Игоревич

**Модуляция физиологических механизмов
нейропротекции в терапии ретинопатий новорожденных**
Специальность 1.5.5 – физиология человека и животных

**Научный руководитель:
д.б.н., доцент Лопатина Е.В.**

**Санкт-Петербург
2023**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Ранний неонатальный период – самый важный период физиологической адаптации ребенка к изменившимся условиям окружающей среды. Детям, родившимся раньше положенного срока, сложнее адаптироваться к изменившимся условиям окружающей среды. По данным Минздрава РФ, в России рождаются 0,2% детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) и 0,8% с очень низкой массой тела (ОНМТ). Недоношенные дети умирают в 30–35 раз чаще, чем дети, родившиеся в срок. Осложнения в результате преждевременных родов являются основной причиной смерти детей в возрасте до 5 лет. Россия в 2011 г. приняла нормативы ВОЗ, согласно которым младенцев необходимо выхаживать с 22 недель при массе от 500 г и длине тела более 35 см. (Симаходский и др., 2020).

Совершенствование условий выхаживания детей с экстремально низкой массой тела провоцирует повышение частоты встречаемости ретинопатии недоношенных. Это одно из наиболее тяжелых заболеваний, приводящих к неустранимой слепоте с раннего детского возраста.

Ретинопатия недоношенных – это нарушение процессов васкуляризации сетчатки у детей, имеющих низкий гестационный возраст. Ретинопатия – одно из наиболее тяжелых заболеваний, приводящих к слепоте с раннего детства (Демьянова и др., 2006; Polin and Yoder, 2007; Hughes et al., 2000; Penn et al., 2008; Пономарева и др., 2021).

Встречаемость ретинопатии недоношенных в неонатологии и детской офтальмологии тесно связано со степенью зрелости организма ребенка: у детей с массой тела менее 1500 г патология сетчатки развивается в 40-50% случаев; менее 1000 г – в 52-73%; а у глубоко недоношенных детей с массой тела менее 750 г – в 81-95% случаев. Парадоксальность ситуации заключается в том, что совершенствование условий выхаживания детей с экстремально низкой массой тела приводит к увеличению случаев

ретинопатии недоношенных, которая в развитых странах становится ведущей причиной слепоты у детей. Частота встречаемости ретинопатии недоношенных в неонатологии тесно связана со степенью зрелости организма ребенка.

Развитие сосудов сетчатки регулируется различными медиаторами и факторами роста, из которых наиболее значимы и изучены фактор роста сосудистого эндотелия, фактор роста фибробластов и инсулиноподобный фактор. Нарушению регуляции нормального ангиогенеза и развитию ретинопатии у недоношенных способствуют условия, вызывающие изменение парциального давления кислорода и углекислого газа в крови (Hughes et al., 2000).

Метаболические процессы в сетчатке осуществляются посредством гликолиза, т. е. расщепления глюкозы без участия кислорода, поэтому длительное пребывание ребенка на искусственной вентиляции легких (ИВЛ), применение кислородотерапии и назначения сурфактанта и т. п., вызывают ретинопатию недоношенных. Дополнительными факторами риска, влияющими на возникновение ретинопатии недоношенных, могут быть гипоксия плода, внутриутробные инфекции, синдром дыхательных расстройств, внутричерепные родовые травмы, сепсис, анемия новорожденных и др. Одной из причин развития ретинопатии является воздействие на незрелую сетчатку недоношенного младенца избыточной освещенности, тогда как в норме ангиогенез сетчатки протекает внутриутробно в отсутствии светового воздействия.

Патогенез ретинопатии недоношенных связан как с нарушением образования новых сосудов сетчатки, так и с изменением уже сформировавшихся сосудистых трактов. При ретинопатии недоношенных образование сосудов в аваскулярных зонах периферии сетчатки прекращается, а новообразованные сосуды начинают прорастать в стекловидное тело, что в дальнейшем приводит к кровоизлияниям,

новообразованию глиальной ткани, натяжению и тракционной отслойке сетчатки (Шабалов 2009).

По данным статистики ретинопатия недоношенных появляется у каждого пятого новорожденного, родившегося раньше срока. Тяжёлыми формами болезни страдают до 8% малышей. Опыт отделения интенсивной терапии и реанимации новорожденных ДГБ №1 Санкт-Петербурга подтверждает данную статистику.

Метаболический ацидоз, с которым сталкиваются детские реаниматологи в первые часы и дни жизни новорожденных детей, является осложнением шокового состояния и причиной развития ретинопатии. Данное состояние приводит к уменьшению ударного и минутного объема крови на фоне снижения сократительной функции миокарда, а также к уменьшению чувствительности сердечно-сосудистой системы к воздействию препаратов с инотропной и вазопрессорной активностью. При метаболическом ацидозе также происходит снижение общего периферического сопротивления сосудов, нарушается перфузия микроциркуляторного русла, появляется компенсаторное тахипноэ, легочная гипертензия. В зоне кровообращения желудочно-кишечного тракта и почек происходит спазм артериол с проявлениями в виде ухудшения моторной функции кишечника и снижением темпа диуреза, возникает гиперкалиемия и повышается содержание натрия внутри клетки. На фоне снижения активности пневмоцитов II порядка спровоцированного ацидозом уменьшается синтез сурфактанта. Увеличивается риск развития судорожного синдрома, кривая диссоциации оксигемоглобина смешается вправо, что приводит к уменьшению сродства гемоглобина эритроцитов к кислороду. Возникает нарушение мозгового кровообращения и развитие внутрижелудочных кровоизлияний (Афанасьев В.В. 2005). Необходимо отметить, что поражения ЦНС в перинатальном периоде способствуют появлению ранней психоневрологической инвалидизации (ранняя детская инвалидность выявлена в 60—70% случаев) (Ковалчук В.В., и др., 2018).

Помимо лечения основного заболевания, которое и провоцирует развитие метаболических нарушений, базовой терапией метаболического ацидоза является применение раствора NaHCO₃ (гидрокарбоната натрия/соды). Данный раствор позволяет компенсировать дефицит оснований и избежать осложнений, связанных с пролонгированной декомпенсацией организма во время метаболических нарушений. Длительное применение соды у новорожденных детей с острым шоковым состоянием может вызвать тяжелую гипернатриемию. В отличие от гипернатриемии у взрослого человека, грубое нарастание содержания натрия в крови у детей приводит к развитию серьезных неврологических расстройств. Умственная отсталость, а также очаговые неврологические дефекты, такие как параличи и гемиплегии, являются частыми последствиями гипернатриемии у детей (Büyükkaragöz B, Bakkaloglu SA. 2023). Для минимизации использования натрий содержащих растворов, остро встает вопрос поиска дополнительных средств коррекции метаболических нарушений у новорожденных. Исследования, описанные в работе Виноградовой И.В. и соавторов, указывают на то, что серьезные перспективы имеют препараты, содержащие сукцинат, в частности, цитофлавин (Виноградова И.В., и др., 2016). Преимущества сукцината над другими субстратами клеточного дыхания проявляются при гипоксии, когда происходит нарастание скорости окисления и продукции эндогенного сукцината. Он может влиять на метаболизм тканей и клеток организма, изменяя белковый синтез, ионный транспорт и клеточное дыхание (Лазарев В.В., Гадомский И.В 2016). Цитофлавин способен оказывать нейро- и церебропротективный эффект при лечении детей с гипоксически-ишемическими и гипоксически-геморрагическими поражениями ЦНС. В литературе описаны исследования, демонстрирующие кардиопротективное действие данного препарата, что дает основание для его применения в терапии новорожденных детей первых дней жизни с расстройствами нейрометаболизма в рамках комплексного лечения перинатальных поражений (Кирьяков К.С., и др. 2018). В ходе реанимационных

мероприятий, оказываемых новорожденному, основной задачей является не только стабилизация жизненно-важных показателей, но и применение средств, снижающих тяжесть инвалидизации пациента в постнатальном онтогенезе.

Из докладов ВОЗ 2018, 2019 гг., ООН 2019 г. о глобальных действиях в отношении преждевременных родов, где говорится примерно о 15 млн недоношенных детей, из которых более 1 млн умирают вскоре после рождения, заключаем, что исследование является актуальным.

Цель исследования

Клинически и экспериментально изучить возможность модуляции физиологических механизмов протекции, препятствующих развитию ацидоза и ретинопатий новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела.

Задачи исследования:

1. Провести клинико-инструментального обследование новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела: осмотр, забор венозной крови, лабораторные исследования, выполнение ЭЭГ, ЭКГ.
2. Проанализировать вклад известных ранее факторов, провоцирующих развитие ретинопатии.
3. Сформулировать критерии включения пациентов в экспериментальную и контрольную группу.
4. Сформировать контрольную и экспериментальную группы.
5. Провести анализ влияния интенсивной терапии недоношенных на развитие ретинопатии новорожденных.
6. Выделить факторы риска, провоцирующие развитие и прогрессирование ретинопатии недоношенных и группы максимального риска по развитию заболевания.
7. В клинических условиях разработать протокол стабилизации картины ацидоза при введении в терапию цитофлавина.

8. Разработать экспериментальную модель ацидоза *in vitro* в условиях органотипического культивирования ткани сетчатки и сердца оценить цитопротекторные свойства цитофлавина в норме и на фоне ацидоза.
9. В условиях органотипического культивирования ткани сетчатки с помощью фармакологического анализа изучить вклад адренорецепторов в направленную регуляцию ретиногенеза в норме и условиях оксидативного стресса.

Научная новизна

В условиях органотипического культивирования впервые показано, что норадреналин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки 10-12-дневного куриного эмбриона в диапазоне концентраций от 10^{-6} М до 10^{-12} М. В дозе 10^{-12} М норадреналин стимулирует рост экспериментальных эксплантатов на 40%, ингибиторный анализ показал, что трофотропный эффект опосредован активацией α_1 -адренорецепторов. Выявлен ретинотоксический эффект адреналина в концентрациях 10^{-4} - 10^{-8} М, реализующийся при участии, бета –адренорецепторов.

При культивировании ткани сетчатки и сердца в стандартных условиях обнаружено, что цитофлавин в диапазоне концентраций 0,2 - 20 мкл/мл, не влияет на рост эксплантатов ткани сетчатки, а в диапазоне 0,2 -2 мкл/мл не оказывает влияния на ткань сердца. В дозе 20 мкл/мл цитофлавин ингибировал рост эксплантатов ткани сердца на 34 %. Разработана модель ацидоза *in vitro*, которая позволяет тестировать препараты, потенциально регулирующие кислотно-щелочное равновесие. В строго контролируемых экспериментальных условиях на модели ацидоза *in vitro* обнаружены ретино и кардио протекторные свойства цитофлавина в дозе 0,2 мкл/мл. Эффект зарегистрирован на 3-е сутки культивирования. Результаты экспериментов совпали с клиническими данными о стабилизации основных параметров системы кислотно-основного равновесия у детей, получивших в комплексной терапии цитофлавин в стандартной рекомендуемой дозе 2 мл/кг/сут.

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 с низкой и экстремально низкой массой тела для исключения инвалидизации пациентов или снижения ее степени в постнатальном периоде. Количество гемотрансфузий не является решающим фактором при направлении недоношенного ребенка на операцию в отличие от детей с экстремально низкой массой тела; выявлена тесная связь срока гестации и уровня оксигенации (45% и выше) со степенью выраженности ретинопатии новорожденных. 100% прооперированных новорожденных - дети со сроком гестации до 28 недель. Сохраняющиеся фетальные коммуникации не влияют на прогрессирование заболевания. 100% прооперированных пациентов получали инотропную терапию препаратами (адреналин, добутамин).

В экспериментальных условиях исследованы инотропные и вазопрессорные препараты, которые получали 100% прооперированных детей и было доказано участие α_1 -адренорецепторов в реализации ретиностимулирующего эффекта норадреналина и бета-адренорецепторов в ретинотоксическом эффекте адреналина (10^{-4} - 10^{-8} М). Полученные результаты позволяют скорректировать дозы биогенных аминов, используемые в интенсивной терапии и реанимации новорожденных.

На модели ацидоза *in vitro*, получены приоритетные данные, прямо подтверждающие ретино и кардиопротекторные свойства цитофлавина в условиях дисбаланса кислотно-щелочного равновесия.

Положения, выносимые на защиту

1. Применение в комплексной терапии катехоламинов на ранних стадиях течения основного заболевания относятся к факторам, провоцирующим

прогрессирование ретинопатий новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела.

2. Повышенное процентное содержание кислорода в газовоздушной смеси влияет на выраженность ретинопатии. При подаче уровня кислорода выше 40-45% исходы ретинопатии ухудшаются. Тяжесть ретинопатий на прямую не связана с количеством гемотрансфузии.
3. Норадреналин, в отличие от адреналина, дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки.
4. Ретиностимулирующий эффект норадриналина (10^{-12} М) опосредован активацией альфа –адренорецепторов. Ретинотоксический эффект высоких доз катехоламинов (10^{-5} М) реализуется при участии бета адренорецепторов.
5. Цитофлавин в дозе 2 мкг/мл устраниет кардио и ретинотоксический эффект, спровоцированный ацидозом в условиях *in vitro*.
6. Цитофлавин в ходе терапии кислотно-основного ацидоза у новорожденных обнаруживает защелачивающий эффект, который проявляется максимум к 4-5 суткам жизни. Применение цитофлавина на ранних стадиях интенсивной терапии новорожденных уменьшает длительность использования раствора гидрокарбоната натрия и нивелирует его побочные эффекты.

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 сетчатки 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 ткани сетчатки. 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, 2021, 2022;2023). IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школе-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022, Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», (Санкт-Петербург, 2021;2022); Съезде физиологов РФ – 2023.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, 3 статьи приняты в печать в рецензируемых журналах из перечня ВАК.

Личное участие автора в получении результатов

Все клинические манипуляции, экспериментальные процедуры, обработка, анализ полученных результатов, подготовка материалов для опубликования выполнены автором лично. Данные по офтальмологической картине ретинопатий получены по результатам консультации офтальмологов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектами клинической части исследования являлись новорожденные дети с диагнозом ретинопатия недоношенных, новорожденные недоношенные дети из группы риска развития заболевания и доношенные дети с другой соматической патологией. Контрольную группу по исследованию свойств цитофлавина составляли новорожденные недоношенные дети без диагноза ретинопатия и дети, которые не получали лечение сукцинат-содержащими препаратами для компенсации метаболических нарушений.

Обследовано 120 новорожденных детей, из которых первые 40 пациентов являлись недоношенными детьми с разным сроком гестационного возраста. Во вторую группу исследования вошли 40 недоношенных детей с экстремально-низкой массой тела и гестационным возрастом менее 30 недель. Третья группа – 40 детей, как доношенных, так и недоношенных, которые нуждались в защелачивающей терапии на фоне метаболического ацидоза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ДГБ №1 № 1/23 .

Объектами экспериментальной части исследования являлись эксплантаты ткани сердца и сетчатки 12-дневных куриных эмбрионов породы белый Леггорн. Препаровку куриных эмбрионов осуществляли в стерильных условиях. Выделяли сердце и сетчатку 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. Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов. Для получения органотипической культуры ткани сетчатки осуществляли энуклеацию глаза, который помещали в чашку Петри с небольшим количеством питательной среды. Инструментами для офтальмологической микрохирургии аккуратно отделяли ткани передней камеры глаза, после чего извлекали стекловидное тело. Ориентируясь на пигментные клетки, осуществляли препаровку ткани сетчатки. Фрагменты ткани сетчатки размером около 1 мм помещали в стерильные чашки Петри диаметром 40 мм на коллагеновую подложку, добавляли питательную среду и культивировали в СО₂ инкубаторе («Binder», Германия) при 37° С и 5% СО₂ в течение 3-х суток. Важно, что по сроку эмбрионального развития 12-дневный куриный эмбрион соответствует 24 неделе гестации плода человека.

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 телячье 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 ходе разработки модели ацидоза *in vitro* pH среды снижали до значения 7,24, что соответствует значению pH крови, наблюдаемой у новорожденных в случае нарушения баланса кислотно-основного равновесия. Снижение pH среды достигали путем добавления 175 мкл/мл 15% соляной кислоты непосредственно в чашку Петри, под контролем pH метра АМТ10 («АМТАСТ», США).

В питательную среду экспериментальных эксплантатов с нормальным или сниженным pH добавляли цитофлавин (ООО НТФФ ПОЛИСАН, Россия) или 5% раствор гидрокарбоната натрия (ОАО "Биосинтез", Россия), согласно протоколу эксперимента. Контрольной группой служили эксплантаты, культивируемые в среде стандартного содержания и pH.

Через трое суток культивирования чашки Петри извлекали из СО₂ инкубатора и исследовали с использованием морфометрического метода.

Влияние измененного рН и 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 $p \leq 0.05$. В клинической части исследования использовали язык программирования R и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты клинической части исследования

В качестве предполагаемых ведущих факторов риска развития ретинопатии новорожденных нами выделены: степень оксигенации, количество гемотрансфузий, гестационный возраст и наличие инотропной поддержки в ходе лечения. Дополнительно рассматривались ИВЛ-часы, вес, инфекционный статус, наличие внутриутробных фетальных коммуникаций, венозная сатурация. В таблице 1 приведены данные по 6 пациентам, которым проведено хирургическое вмешательство. Пациенты ($n=40$) были разделены на 3 группы в зависимости от тяжести ретинопатии.

Таблица 1. Ведущие факторы риска развития ретинопатии новорожденных. Пациенты группы А

Код пациента	ГВ (неде ль)	Вес (грамм)	Инотропная поддержка	ГТС	ИВЛ (часы)	Стадия ретинопати и	FiO2 %
A1	26/2 7	1,020	Адреналин и Добутамин	2	240	3	40- 50
A2	28	1,195	Адреналин и Добутамин	2	240	3	40- 45
A3	24	0,700.	Адреналин, Норадреналин и Добутамин	6	1032	3	100- 80- 40
A4	28	0,940	Адреналин Добутамин	2	168	3	40
A5	24	0,700	Адреналин Добутамин	2	216	3	40
A6	24	0,970	Адреналин Добутамин	4	354	3	40- 45

Группа А – 6 прооперированных детей с диагнозом ретинопатия III стадии. Пациенты получали FiO2 40% и выше. Группа В – 23 пациента с диагнозом ретинопатия I и II стадии. Пациенты этой группы получали FiO2 40% и выше в 34,7% случаев; FiO2 30-35% – 52,17% детей и FiO2 0,21-0,30% – 13% пациентов. Группа С – 11 человек с диагнозом сетчатка в стадии васкуляризации. 9% пациентов этой группы получали FiO2 40% и выше; FiO2 30-35% получали 45,5% детей и FiO2 0,21-0,30% – 45,5% новорожденных.

В работе статистически обоснованно сравниваются средние величины факторов риска в зависимости от группы принадлежности пациента, а также рассчитываются ранговые коэффициенты корреляции между факторами риска в каждой группе. Для графического представления данных используется диаграмма «ящик-с-усами». На рис.1 графически изображена переменная «степень оксигенации FiO_2 ». Выборочные медианы (устойчивые к выбросам статистики среднего) групп А и В равны 0.43 и 0.35 соответственно, их разность равна 0.08, то есть уровень FiO_2 группы А выше соответствующего уровня в группе В.

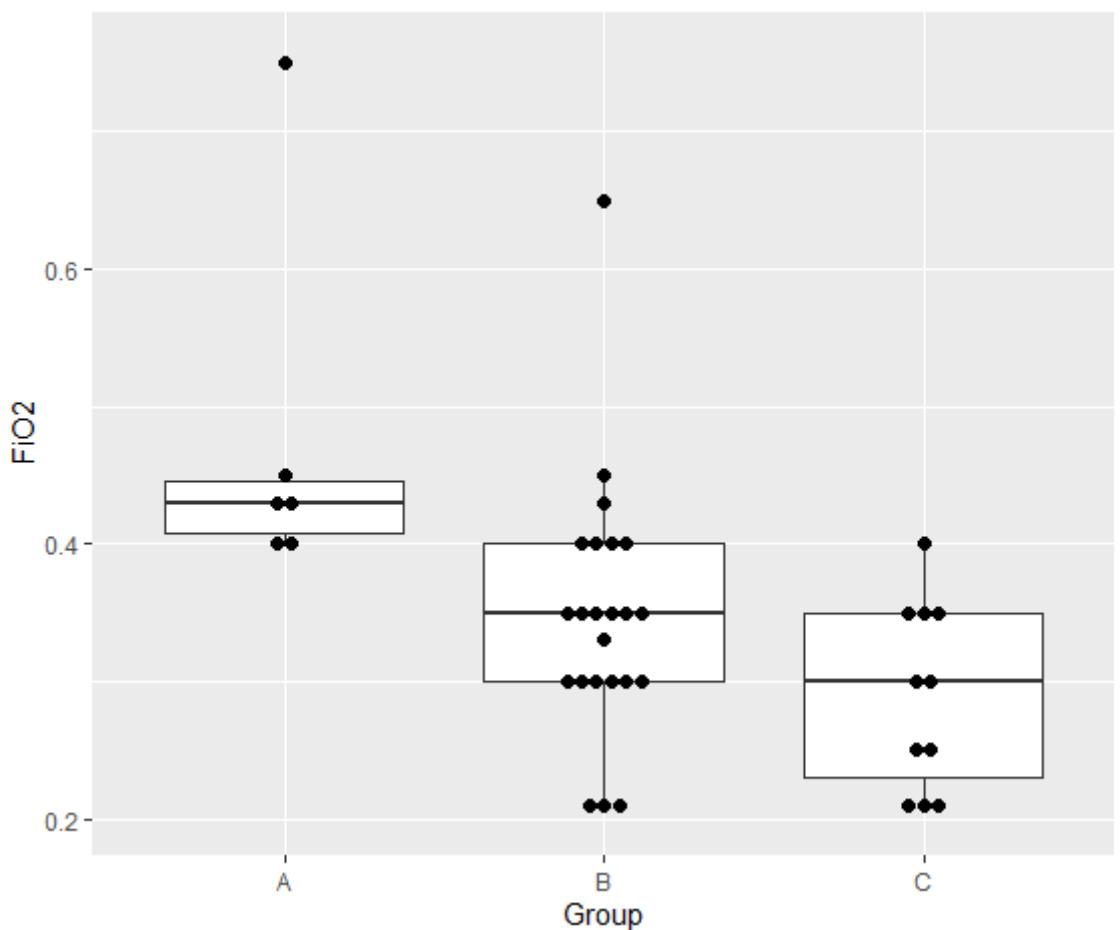


Рисунок 1. Анализ влияния степени оксигенации на степень развития ретинопатий в 3-х группах пациентов

В составленной по всем пяти переменным общей Таблице 2 полученный результат будет записан в виде $A > B$. Аналогичные расчеты, выполненные для средних уровней FiO_2 у групп пациентов В и С, не выявили различий генеральных средних. Такой результат будет записан в виде $B = C$.

<i>FiO2</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>A</i>	*	>	>
<i>B</i>		*	=
<i>Weight</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>A</i>	*	=	<
<i>B</i>		*	<
<i>IVL</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>A</i>	*	=	>
<i>B</i>		*	>
<i>GTS</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>A</i>	*	=	=
<i>B</i>		*	=
<i>GV</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
<i>A</i>	*	<	<
<i>B</i>		*	<

Таблица 2. Анализ пяти исследуемых параметров у 40 новорожденных детей

На рисунках представлены диаграммы «ящик-с-усами» для оставшихся 4 переменных. Результаты обработки данных по предложенному в работе методу сведены в Таблице 2.

По параметру - число часов, проведенных с применением IVL (искусственная вентиляция легких), пациенты группы А достоверно не отличались от пациентов группы В. Параметр IVL достоверно выше в группах А и В по сравнению с группой С (рис.2).

Дальнейший анализ показал, что различий по параметру GTS (количество гемотрансфузий) между пациентами групп А, В, С нет (рис.3.)

Пациенты группы А по параметру weight (вес) не имеют значимых различий с пациентами группы В и достоверно отличаются от пациентов группы С (рис.4.). Гестационный возраст (параметр GV) у пациентов группы А достоверно ниже возраста пациентов групп В и С, а у пациентов группы С выше В и А соответственно (Рис. 5).

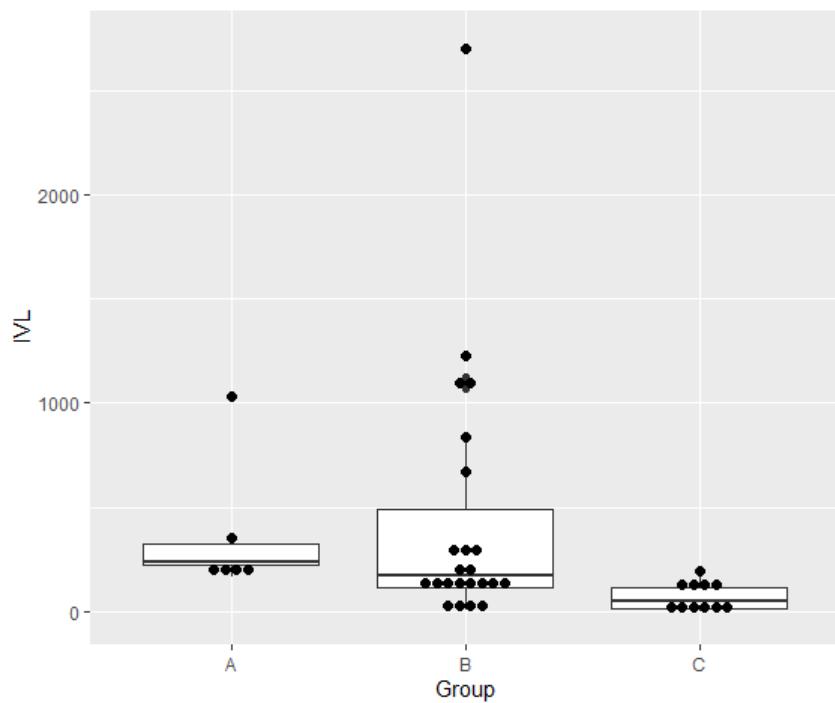


Рисунок 2. Различия по числу часов, проведенных с применением IVL у пациентов групп А и В, в отличие от группы С – отсутствуют.

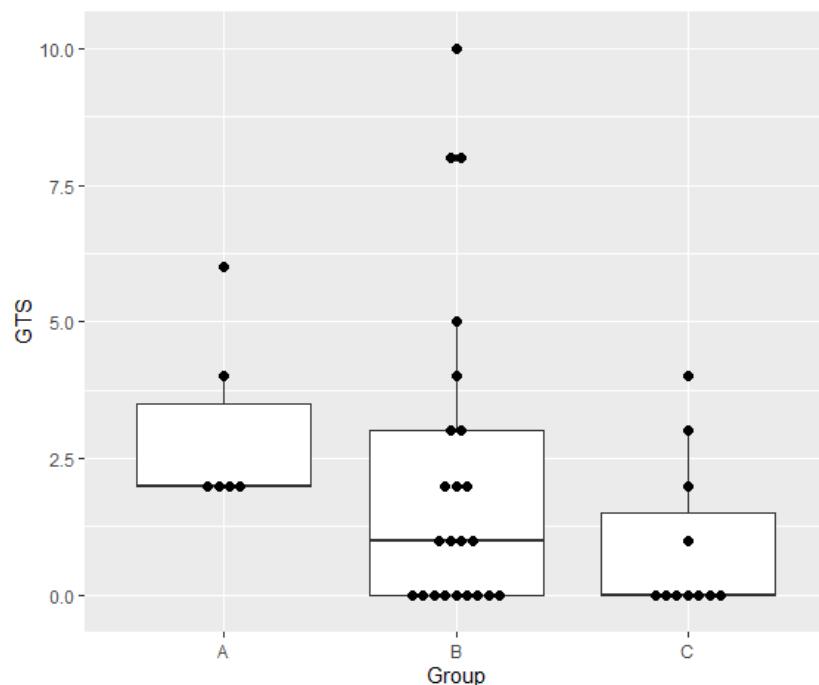


Рисунок 3. Анализ влияния количества гемотрансфузий у пациентов на степень развития ретинопатий в 3-х группах

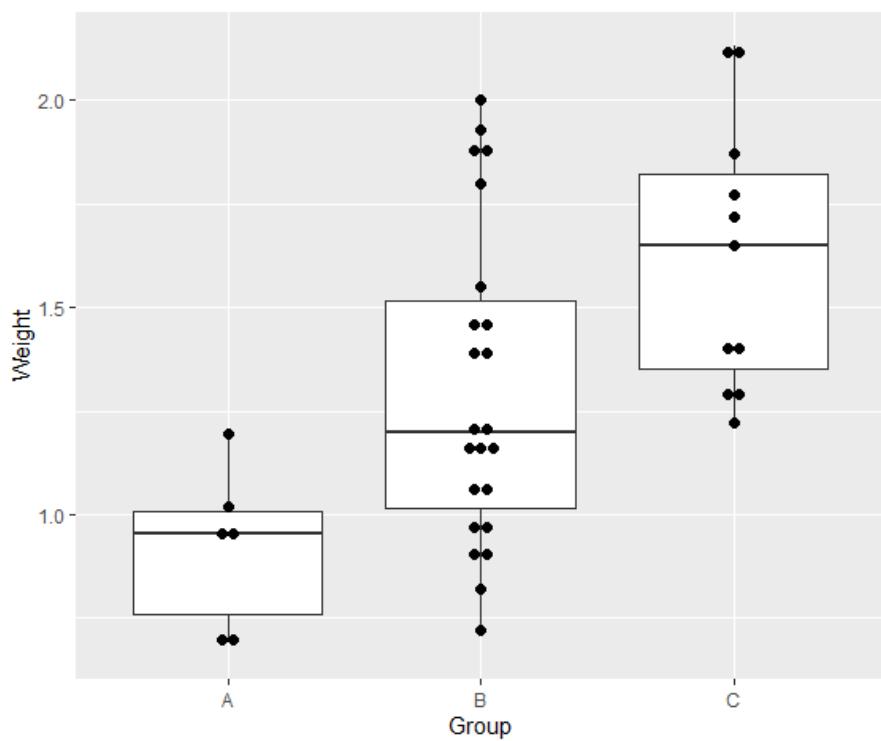


Рисунок 4. Анализ влияния веса пациентов на степень развития ретинопатий в 3-х группах

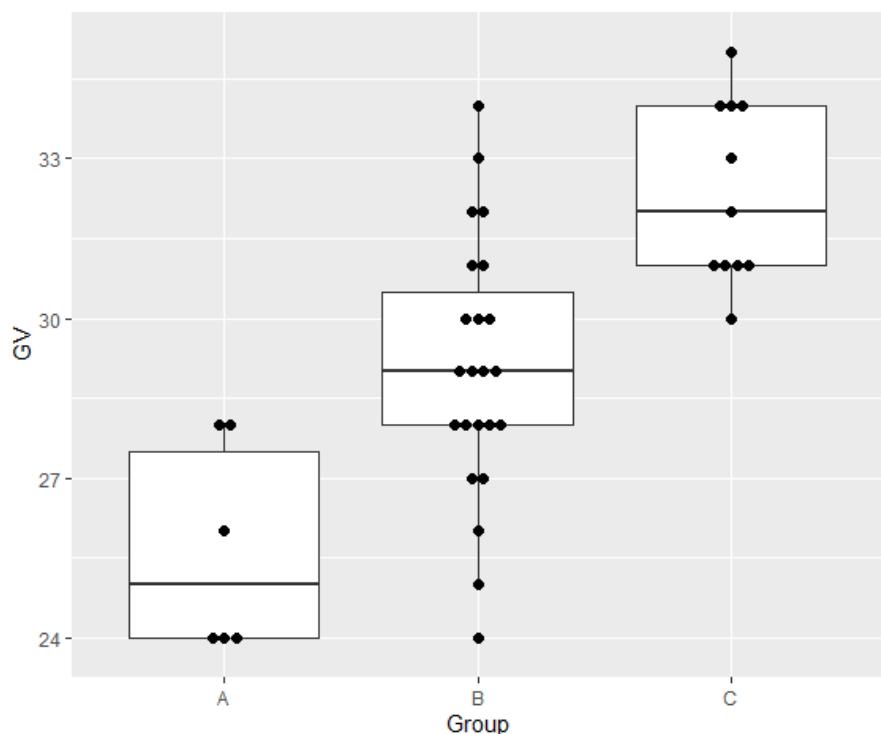


Рисунок 5. Влияние гестационного возраста пациентов на степень развития ретинопатий в 3-х группах

В следующих таблицах представлены выборочные значения коэффициентов ранговой корреляции ρ Спирмана между факторами в разрезе групп, значимые при уровне доверительной вероятности 0,95. В группе А обнаружена корреляция между параметрами IVL и GTS (Таблица 3).

Таблица 3.

Группа А	<i>FiO2</i>	<i>Weight</i>	<i>IVL</i>	<i>GTS</i>	<i>GV</i>
<i>FiO2</i>	*	Нет	Нет	Нет	Нет
<i>Weight</i>		*	Нет	Нет	Нет
<i>IVL</i>			*	0,858	Нет
<i>GTS</i>				*	Нет
<i>GV</i>					*

Таблица 4.

Группа В	<i>FiO2</i>	<i>Weight</i>	<i>IVL</i>	<i>GTS</i>	<i>GV</i>
<i>FiO2</i>	*	Нет	0,434	0,438	Нет
<i>Weight</i>		*	Нет	Нет	0,801
<i>IVL</i>			*	0,705	Нет
<i>GTS</i>				*	-0,478
<i>GV</i>					*

В группе В обнаружена корреляция между FiO2 и IVL (0,434), и GTS (0,438), положительная зависимость между весом (weith) и гестационным возрастом GV. Между количеством гемотрансфузий (параметр GTS) и гестационным возрастом (GV) – корреляция отрицательная. Нет прямой связи между количеством гемотрансфузий и гестационным возрастом пациента.

Таблица 5.

Группа С	<i>FiO2</i>	<i>Weight</i>	<i>IVL</i>	<i>GTS</i>	<i>GV</i>
<i>FiO2</i>	*	-0,616	Нет	Нет	Нет
<i>Weight</i>		*	-0,674	Нет	Нет
<i>IVL</i>			*	Нет	Нет

<i>GTS</i>				*	Нет
<i>GV</i>				*	

У пациентов в группе С обнаружена отрицательная корреляция между параметром FiO₂ и весом (Weight) с коэффициентом -0,616. И между параметром вес (Weight) и количеством часов IVL с коэффициентом -0,674. Между параметрами FiO₂, Weight, IVL нет корреляции с параметрами количество гемотрансфузий (GTS) и гестационный возраст (GV).

Проведенные исследования показали, что наиболее неблагоприятный процент кислорода, подаваемый вместе с газовоздушной смесью, начинается от 40-45%.

Параметры венозной сатурации у всех пациентов были в пределах нормативных и возрастных показателей (рис. 6). Поскольку отклонения венозной сатурации чаще происходят при истощении организма и включения компенсаторных путей потребления кислорода, а оценка артериальной сатурации как более динамичного показателя невозможна ввиду трудности постановки катетера у недоношенных детей, этот показатель решено было не учитывать.

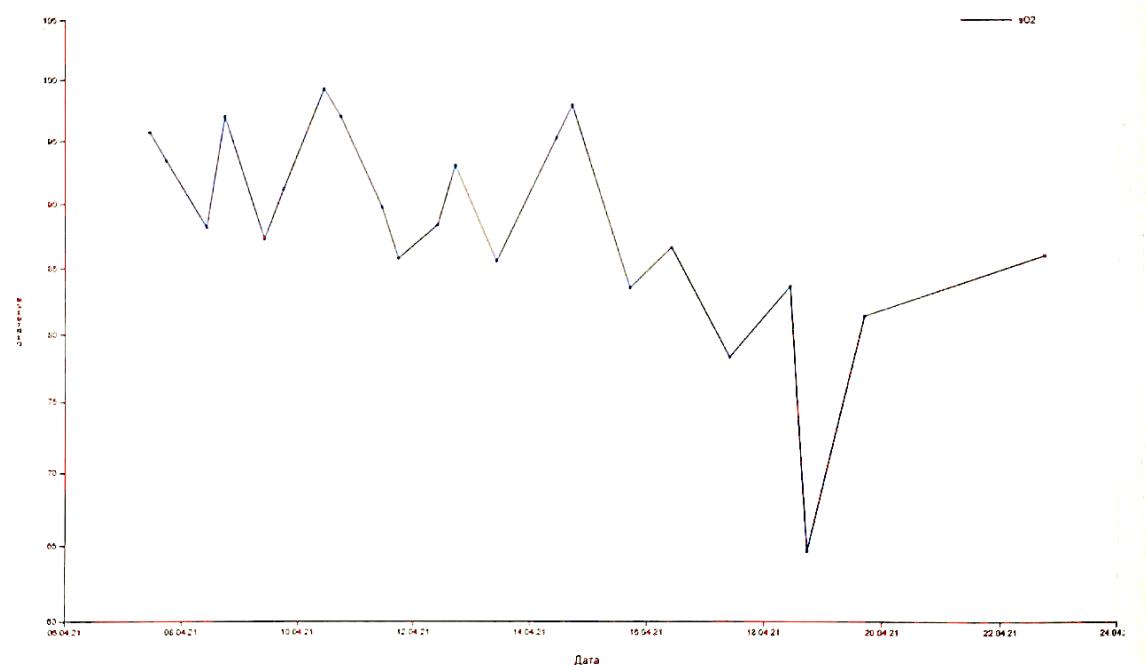


Рисунок 6. График уровня венозной SvO_2 пациента, участвующего в исследовании. Пример записи.

В ходе исследования выделены предполагаемые дополнительные факторы риска развития ретинопатии новорожденных (Таблица 6). В таблице отражены данные по наличию внутриутробного инфекционного статуса, состоянию фетальных коммуникаций, уровню С – реактивного белка.

Таблица 6. Дополнительные предполагаемые факторы риска развития ретинопатии новорожденных. Пример по группе А

Номер истории болезни	ГВ (недель)	Вес (грамм)	Инфекционный статус	Уровень СРБ (мг/л)	ОАП
A1	26/27	1,020	Ранний неонатальный сепсис.	5	Нет
A2	28	1,195	Внутриамниотическая инфекция.	2,9	Да, не значимый
A3	24	0,700	Ранний неонатальный сепсис.	8,5	Да, не значимый
A4	28	0,940	Внутриамниотическая инфекция.	5,2	Да, гемодинамиически значимый
A5	24	0,700	Внутриамниотическая инфекция.	1,8	Нет
A6	24	0,970	Внутриамниотическая инфекция.	152	Нет

Результаты корреляционного анализа демонстрируют наличие сильной отрицательной корреляции между гестационным возрастом и степенью ретинопатии новорожденных ($R = -0,75$, $p < 0,001$). Также выявлена

положительная корреляция между наличием инотропной поддержки и степенью выраженности ретинопатии новорожденных ($R= 0,61$, $p<0,001$).

Всего в исследование по влиянию цитофлавина на метаболические нарушения детей вошло 40 новорожденных детей первых 7 дней жизни, которые поступили на отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных ДГМКСЦВМТ № 1 Санкт- Петербург.

Дети были поделены на две группы по 20 человек, в первой группе новорожденные не получали терапию раствором соды, или получили ее на первые сутки, а в дальнейшем при сохраняющемся дефиците оснований перешли на терапию раствором цитофлавина.

Во второй группе были дети, которые получали только терапию гидрокарбонатом натрия. В табличном виде отражены лабораторные показатели, которые регистрировались у детей за время прохождения лечения в первые 6-7 дней терапии (Таблица 7).

Таблица 7. Пример регистрации основных параметров пациентов

Номер пациента	Основной диагноз	Вес	BE/лактат 1сутки	2-3 сутки	4-5 сутки	Ph	Сода мл
1	САК, средняя и умеренная асфиксия при рождении. Пневмония	3740	-12,3/7,4	-2,5/7,5 -3,4/8,0	-5,2/2,1 -3,4/1,0 1,0/2,2	7,25 7,37 7,42 7,33 7,40 7,38	5% 33мл
2	Ранний неонатальный сепсис	1450	-14,1/6,3 -8,8/6,1	-6,4/3,1 -0,8/4,8	-9,3/1,4 -5/0,8 0,1/1,5	7,2 7,16 7,29 7,19 7,2 7,28	2,5% 48мл 2,5% 36мл

Основной защелачивающий эффект цитофлавина в дозе 2 мл/кг/сут развивается на 3 сутки введения и достигает максимума к 4-5 суткам.

В группе детей без цитофлавина, на фоне прекращения защелачивающей терапии, к 4-6 суткам все еще сохраняются лабораторные признаки метаболических нарушений. У новорожденных с высоким уровнем лактата в крови, получавших терапию цитофлавином, лактат-ацидоз не

развивался, грубых метаболических нарушений не было, в отличии от группы детей, которые не получали терапию цитофлавином.

Результаты экспериментальной части исследования

1. Участие адренорецепторов в регуляции ретиногеза

Влияние адреналина на рост эксплантов ткани сетчатки исследовали в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-12} М. Трофотропного действия препарата не обнаружено. В высоких концентрациях (10^{-4} и 10^{-5} М) адреналин оказывал ретинотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантов был ниже контрольного значения на $95.0\pm2.0\%$ ($n=40$, $p<0.001$) и $35\pm5.0\%$ ($n=40$, $p=0.01$) (Рис.1).

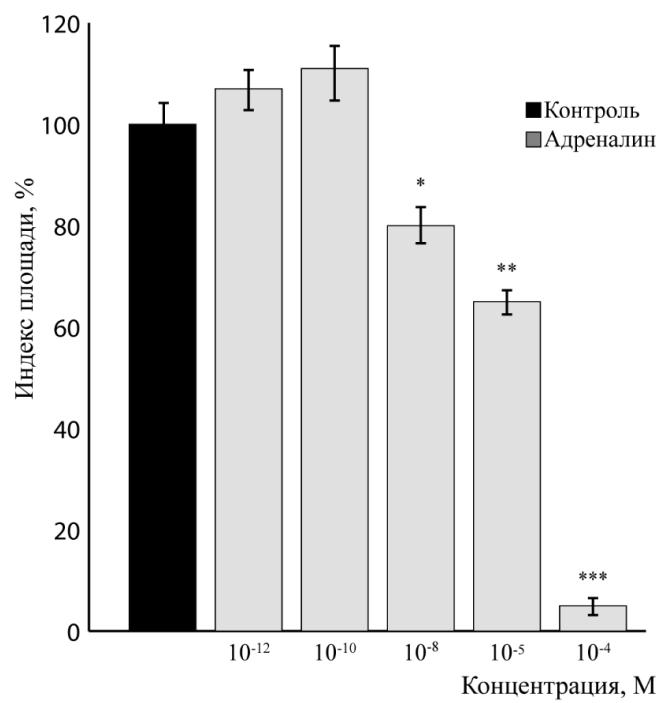


Рисунок 1. Влияние адреналина на рост эксплантов ткани сетчатки. *-
 $p<0.05$, **- $p<0.01$, ***- $p<0.001$ по сравнению с контрольным значением.

При исследовании влияния норадреналина (10^{-4} - 10^{-12} М) на рост эксплантов ткани сетчатки обнаружен трофотропный эффект препарата в дозе 10^{-12} М. ИП был выше контрольного значения на $40\pm6.0\%$ ($n=40$, $p=0.01$). В высоких концентрациях (10^{-4} - 10^{-5} М) норадреналин, также как и адреналин, угнетал рост эксплантов исследуемой ткани (Рис. 2).

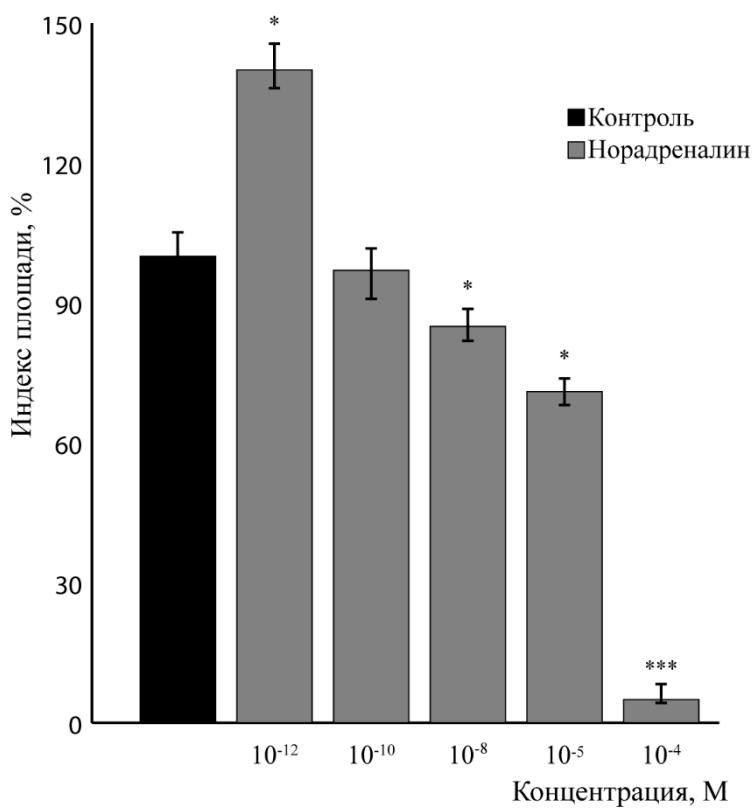


Рисунок 2. Норадреналин дозозависимо регулирует рост эксплантов ткани сетчатки. *- $p<0.05$, ***- $p<0.001$ по сравнению с контрольным значением

Для изучения механизма трофотропного и ретинотоксического действия катехоламинов в питательную среду экспериментальных чашек Петри вводили неселективный β -адреноблокатор пропранолол и селективный α_1 -адреноблокатор урапидил. Предварительно оценили влияние блокаторов на рост эксплантов ткани сетчатки.

Пропранолол в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-10} М проявлял дозозависимое действие. В концентрации 10^{-4} М препарат практически полностью угнетал рост экспериментальных эксплантов, ИП был ниже контрольного значения на $95.0\pm1.8\%$ ($n=40$, $p<.001$). При введении в питательную среду пропранолола в концентрации 10^{-6} М ИП экспериментальных эксплантов был ниже контрольного значения на $32.0\pm5.9\%$ ($n=40$, $p=0.014$). В следующей части работы β -адреноблокатор

использовали в максимальной концентрации, которая не влияет на рост эксплантов ткани сетчатки (10^{-8} М).

Урапидил в концентрациях 10^{-4} – 10^{-8} М на рост эксплантов ткани сетчатки не влиял. ИП не отличался от контрольного значения, поэтому в следующих сериях экспериментов для изучения механизма трофотропного действия катехоламинов блокатор применяли в концентрации 10^{-4} М.

Для оценки механизма трофотропного действия норадреналина экспланты ткани сетчатки культивировали в питательной среде, содержащей норадреналин (10^{-12} М) и пропранолол (10^{-8} М) или урапидил (10^{-4} М). Стимулирующее рост эксплантов действие норадреналина сохранялось в присутствии β -адреноблокатора. ИП был на $37.0 \pm 6.0\%$ ($n=40$, $p=0.02$) выше контрольного значения и не отличался от ИП эксплантов, культивируемых только в присутствии норадреналина (10^{-12} М). При введении в питательную среду совместно урапидила и норадреналина, трофотропное действие последнего отсутствовало. ИП экспериментальных эксплантов не отличался от контрольного значения (Рис. 3).

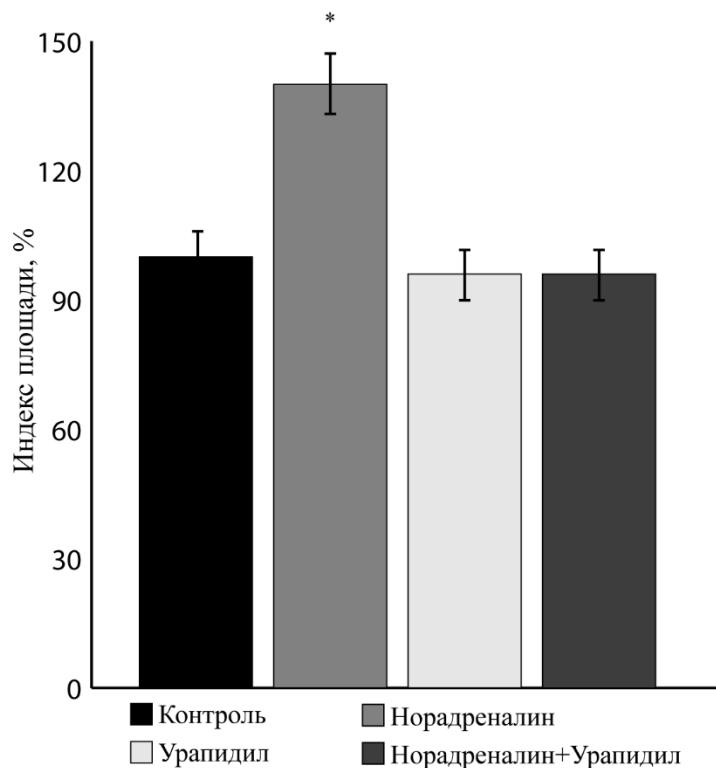


Рисунок 3. Трофотропный эффект норадреналина (10^{-12} М) опосредован активацией α -адренорецепторов. *- $p<0.05$ по сравнению с контрольным значением

Оценку ретинотоксического эффекта катехоламинов проводили при культивировании эксплантов в питательной среде, содержащей катехоламины в концентрации 10^{-5} М и пропранолол (10^{-8} М). Ретинотоксический эффект как адреналина, так и норадреналина на фоне β -адреноблокатора отсутствовал (Рис. 4).

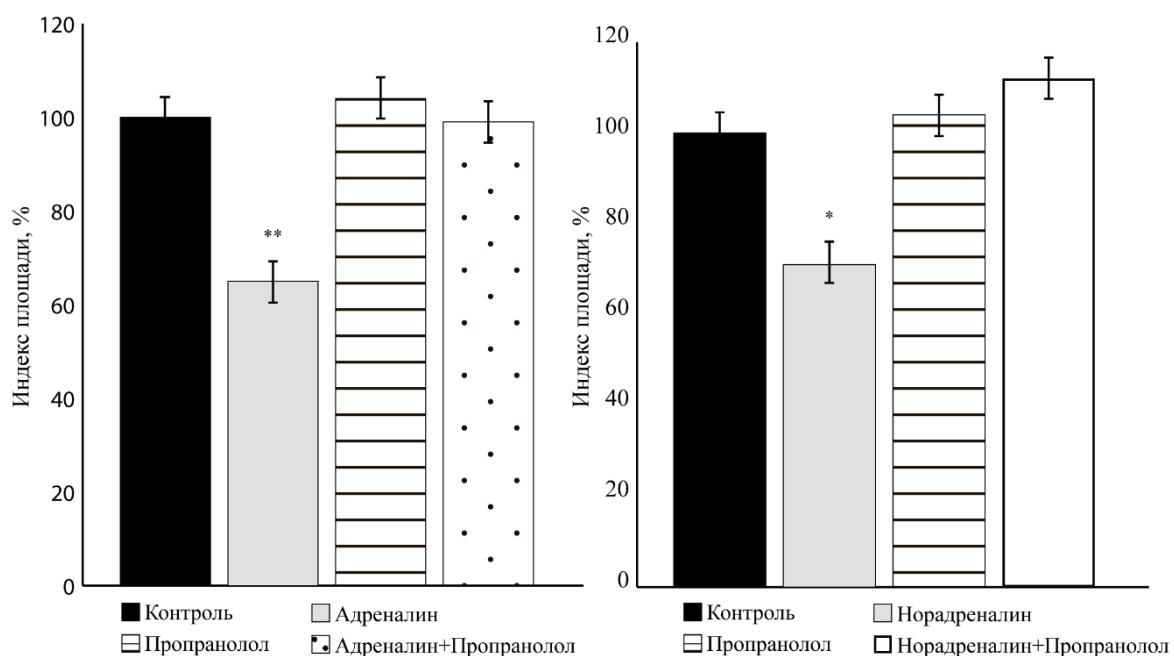


Рисунок 4. Пропранолол нивелирует ретинотоксический эффект катехоламинов. *- $p<0.05$, **- $p<0.01$ по сравнению с контрольным значением

Механизм трофотропного действия катехоламинов тканеспецифичен и реализуется как через β -, так и через α -адренорецепторы. Полученные ранее результаты показали, что β -адренорецепторы не вовлечены в реализацию ретиностимулирующего действия норадреналина.

2. Влияние цитофлавина и NaHCO_3 на рост эксплантов ткани сердца и сетчатки в норме и в условиях ацидоза *in vitro*

Цитофлавин исследовали в диапазоне концентраций 0,2 - 20 мкл/мл. На рост эксплантов ткани сетчатки во всех изучаемых концентрациях в

условиях стандартного рН препарат не влиял. ИП не отличался от контрольного значения (рис. 5). В концентрации 0,2 мкл/мл и 2 мкл/мл при стандартном рН препарат не влиял оказывал действия на рост эксплантатов ткани сердца. ИП составил 100% и 95% соответственно. В концентрации 20 мкл/мл препарат обнаружил кардиотокическое действие. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на $34\pm4\%$ ($n=69$, $p<0.001$) (Рис. 6).

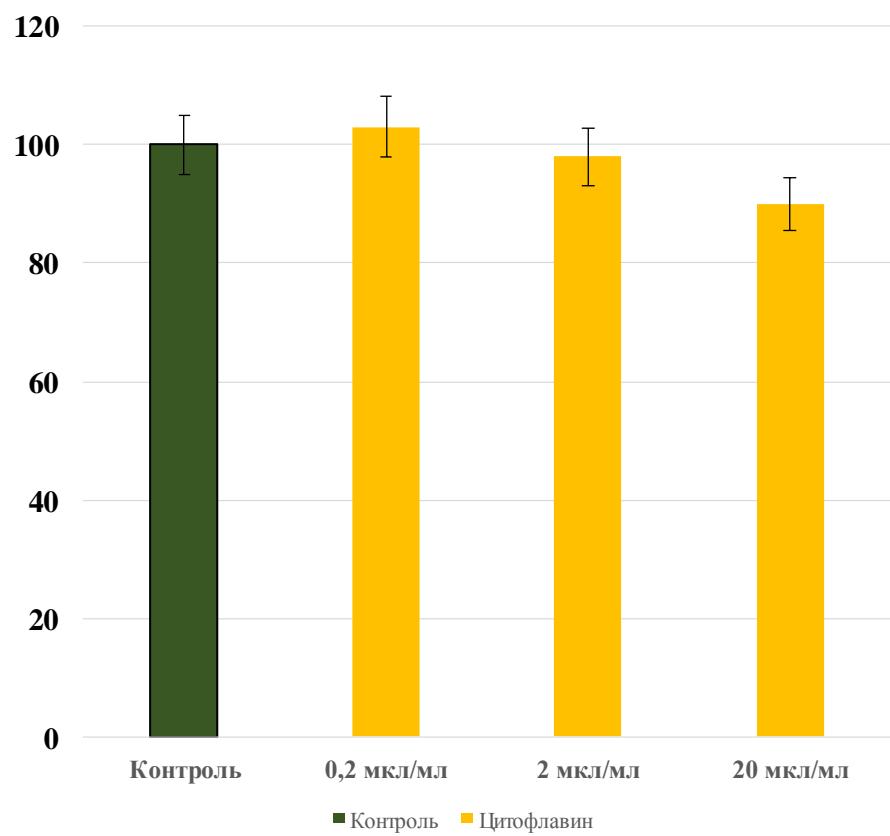


Рисунок 5. Влияние цитофлавина на рост эксплантатов ткани сетчатки куринных эмбрионов

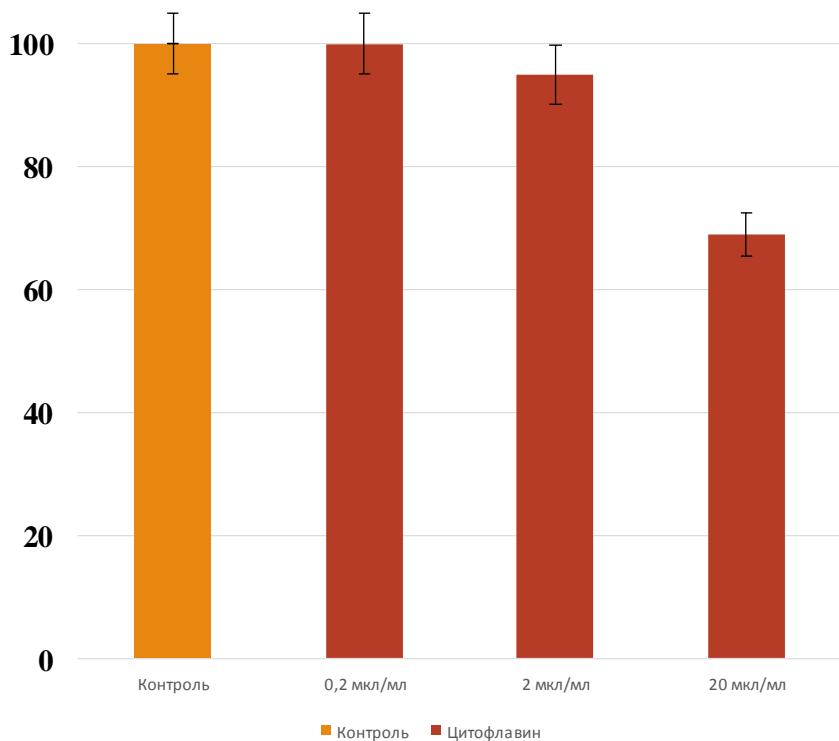


Рисунок 6. Влияние цитофлазина на рост эксплантов ткани сердца куриных эмбрионов

Культивирование эксплантов ткани сетчатки в питательной среде в условиях моделированного ацидоза при $\text{pH} = 7,24$ оказывало ретинотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантов был ниже контрольного значения на $53\pm7\%$ ($n=56$, $p<0.001$). Добавление цитофлавина $0,2$ мкл/мл устранило ретинотоксический эффект. ИП зарегистрированный через 3-е суток культивирования не отличался от контрольного значения и отличался от ИП эксплантов культивируемых при $\text{pH} = 7,24$ на $47\pm6\%$ ($n=42$, $p<0.001$) (Рис. 7).

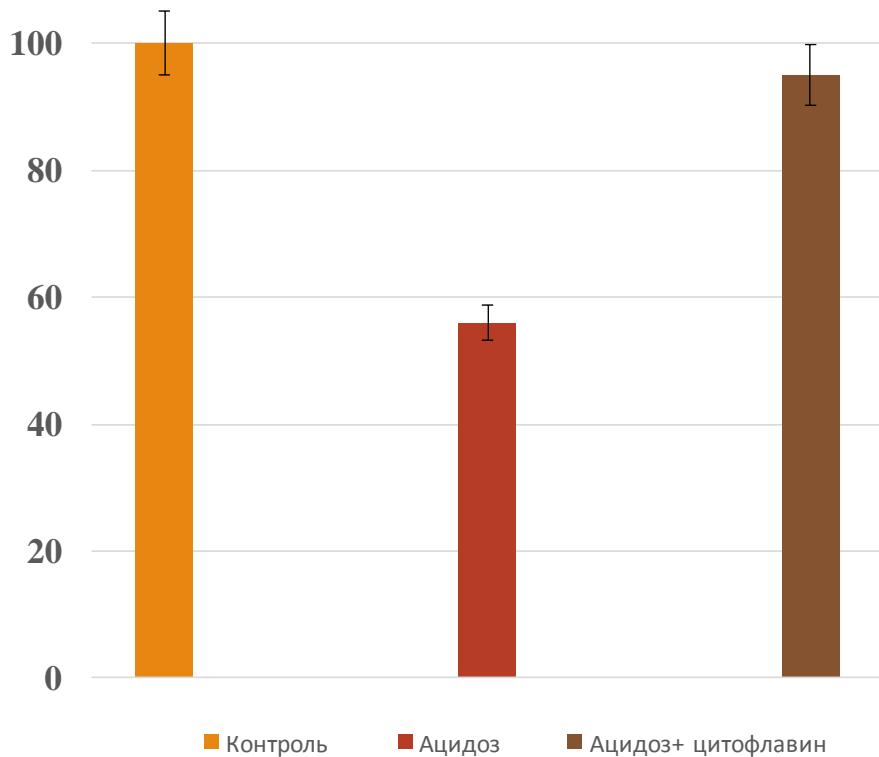


Рисунок 7. Цитофлавин в дозе 0,2 мкл/мл нивелирует
ретинотоксический эффект ацидоза

При культивировании эксплантатов ткани сердца в питательной среде в условиях ацидоза зарегистрирован кардиотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на $32\pm5\%$ ($n=33$, $p<0.001$). Цитофлавин в дозе 0,2 мкл/мл устранил кардиотоксический эффект, наблюдавшийся при культивировании эксплантатов ткани сердца в модельных условиях ацидоза. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения и отличался от ИП эксплантатов культивируемых в условиях ацидоза при $pH = 7,24$ на $34\pm6\%$ ($n=32$, $p<0.001$) (Рис. 8).

Добавление соды в питательную среду в условиях изучаемой тест-системы полностью нивелировало токсические эффекты последнего, как при культивировании эксплантатов ткани сетчатки, так и при культивировании

эксплантатов ткани сердца. Этот факт, по-видимому, обусловлен срабатыванием буферных систем и стабилизацией рН до стандартной отметки 7,9.

120

100

80

60

40

20

0

Рисунок 8. Цитофлавин в дозе 0,2 мкл/мл нивелирует кардиотоксический эффект ацидоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное клинико-экспериментальное исследование с использованием методов интенсивной терапии и реанимации, нейрофизиологических, лабораторных методов, метода органотипической культуры ткани и фармакологического анализа.

Получены приоритетные данные о том, что применение норадреналина и адреналина на первоначальных этапах интенсивной терапии

новорожденных детей влияет на ретиногенез сетчатки. Через α_1 -адренорецепторы реализуется трофотропный эффект, а через β -адренорецепторы ретинотоксический эффект. Результаты клинической части исследования подтвердили, что 100% прооперированных детей получали инотропную и вазопрессорную поддержку адреналином и норадреналином. Было выявлено, что при инсуфляции дополнительным кислородом выше 40-45%, исходы ретинопатии ухудшаются. Данные о том, что гемотрансфузии приводят к ухудшению степени развития ретинопатии, не подтвердились. Применение препаратов данной группы может участвовать в провоцировании прогрессирования ретинопатии недоношенных детей, и как следствие, приводить к инвалидизации и ухудшению качества дальнейшей жизни человека.

Выполнена работа, связанная с улучшением коррекции метаболических нарушений у новорожденных детей и, в первую очередь, метаболического ацидоза, учитывая, что есть данные о том, что метаболический ацидоз сам является провокатором развития ретинопатии, данное исследование, вышло на первый план работы.

В клинических и экспериментальных условиях доказана эффективность применения цитофлавина для коррекции кислотно-щелочного равновесия. Препарат разрешен к применению у новорожденных детей. Положительный эффект от его использования был зафиксирован клинически в группе из 40 новорожденных детей и подтвержден в экспериментальных условиях на оригинальной модели ацидоза *in vitro* в условиях органотипического культивирования ткани.

Применение результатов исследования в клинической практике поможет снизить риски развития тяжелой инвалидизации новорожденных детей после остро перенесенного жизни-угрожающего состояния.

Выводы

1. Анализ показал, что все прооперированные дети родились на сроке гестации меньше 29 недель, что подтверждает уже известные ранее данные. Большая часть детей из группы максимального риска (<29 недель) получала терапиюmonoаминами.
2. Прямой связи между количеством гемотрансфузий и высоким риском развития тяжелой формы ретинопатии с дальнейшим оперативным лечением не обнаружено.
3. Все прооперированные пациенты на этапе лечения получали газовоздушную смесь с содержанием кислорода выше 40%. Данный процент является пограничным.
4. Клинически доказано, что основной защелачивающий эффект цитофлавина в дозе 2 мл/кг/сут развивается на 3 сутки введения и достигает максимума к 4-5 суткам. В группе детей без цитофлавина на фоне прекращения защелачивающей терапии к 4-6 суткам все еще сохраняются лабораторные признаки метаболических нарушений. У детей с высоким уровнем лактата в крови, получавших терапию цитофлавином, лактат-ацидоз не развивался, грубых метаболических нарушений не было, в отличие от группы детей, которые не получали терапию цитофлавином.
5. Норадреналин (10^{-6} М до 10^{-12} М), в отличие от адреналина (10^{-4} до 10^{-12} М), дозозависимо регулирует рост эксплантов ткани сетчатки 10-12-дневного куриного эмбриона. Трофотропный эффект норадреналина (10^{-12} М) опосредован активацией α_1 -адренорецепторов. Ретинотоксический эффект высоких концентраций катехоламинов обусловлен активацией β -адренорецепторов.
6. В экспериментальных условиях на модели ацидоза *in vitro* при снижении pH питательной среды до 7,24 зарегистрирован кардио- и ретинотоксический эффект, который устранил цитофлавин в концентрации 0,2 мкл/мл. Впервые научно обосновано наличие у

цитофлавина кардио- и ретинопротекторных свойств на объекте, гестационный возраст которого соответствует 24 неделе развития плода человека.

Статьи в журналах из списка ВАК

Приняты в печать

1. Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А., Удовенко Е.Г., Лопатина Е.В. Участие адренорецепторов в регуляции роста эмбриональной сетчатки. Волгоградский научно-медицинский журнал - 2023.
2. Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В., Андреев В.В. Применение цитофлавина для коррекции метаболических нарушений у новорожденных в критических состояниях. Проблемы современной биологии. 2023.

Тезисы устных докладов

1. Лопатин А.И., Андреев В.В., Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В. Анализ корреляции степени оксигенации, количества гемотрансфузий с выраженностю прогрессирующей ретинопатии. Всероссийская конференция с международным участием Интегративная физиология 2021. Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2021 год - С. 152-153.
2. Крайнова Ю.С., Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А. Участие норадреналина в регуляции роста эмбриональной сетчатки Всероссийская конференция с международным участием Интегративная физиология-2021. Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2021 год - С. 93.
3. Лопатин А.И., Андреев В.В., Пасатецкая Н.А. Прогрессирующие ретинопатии новорожденных детей: влияние степени оксигенации и количества гемотрансфузий // Материалы XXVIII Всероссийской

- конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 24-26 марта 2022 г. - С.204.
4. Крайнова Ю.С., Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А. Участие разных типов адренорецепторов в ретиностимулирующем действии норадреналина //Материалы XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 24-26 марта 2022 г. - С. 203
 5. Лопатин А.И., Андреев В.В., Пасатецкая Н.А. , Лопатина Е.В. Анализ факторов риска, провоцирующих прогрессирование ретинопатии новорождённых. Материалы IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школы-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022», 21 – 25 марта 2022 г. Сыктывкар. В 2-х томах. Том I с . С.244. DOI 10.19110/89606-042.
 6. Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В. Участие катехоламинов и цитофлавина в регуляции роста эмбриональной сетчатки. Всероссийская конференция с международным участием Интегративная физиология-2022. Санкт-Петербург, Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН. 7-9 декабря 2022 год . С. 49.
 7. Лопатин А.И., Пасатецкая Н.А. Прогрессирующие ретинопатии новорожденных детей: влияние моноаминов и цитофлавина на ретиногенез сетчатки //Материалы XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023 г. - С. 156.
 8. Лопатин А.И. Пасатецкая Н.А., Удовенко Е.Г., Андреев В.В., Лопатина Е.В. Применение сукцината для коррекции метаболических нарушений у новорожденных младенцев в критическом состоянии. XXIV Съезд физиологичемского общества им. И.П. Павлова 11-15 сентября 2023. Санкт- Петербург. С. 72-73.

В 2022 году научная работа «Прогрессирующие ретинопатии новорожденных детей: влияние степени оксигенации и количества гемотрансфузий» **удостоена Диплома второй степени** на XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022». Санкт-Петербург, 24-26 марта 2022.

В 2022 году научная работа «Анализ факторов риска, провоцирующих прогрессирование ретинопатии новорождённых» **удостоена Диплома второй степени** на IV Всероссийской (XIX) молодежной научной школе-конференции «Молодежь и наука на Севере – 2022», Сыктывкар, 23-26 марта. Сыктывкар. Россия В 2-х томах. Том I с . С.244. DOI 10.19110/89606-042.

В 2023 году научная работа «Прогрессирующие ретинопатии новорожденных детей: влияние моноаминов и цитофлавина на ретиногенез сетчатки» **удостоена Диплома третьей степени** на XXIV Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022». Санкт-Петербург, 30-31 марта 2023.