

**Лопатин Алексей Игоревич**

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ МЕХАНИЗМОВ ЦИТОПРОТЕКЦИИ В ХОДЕ  
ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ И РЕАНИМАЦИИ НЕДОНОШЕННЫХ**

1.5.5. – Физиология человека и животных

3.1.12. – Анестезиология и реаниматология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем  
Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

**Научный руководитель:** Лопатина Екатерина Валентиновна, доктор биологических наук,  
профессор

**Андреев Вадим Владимирович**, кандидат медицинских наук

**Официальные оппоненты:** Зефиров Тимур Львович, доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий кафедрой охраны здоровья человека Института  
фундаментальной медицины и биологии, Высшей школы  
медицины «ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный  
университет»

**Наумов Алексей Борисович**, кандидат медицинских наук,  
заведующий отделением реанимации и интенсивной терапии №3  
Санкт-Петербургского учреждения здравоохранения «Городская  
Мариинская больница»

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования "Тюменский государственный медицинский  
университет" Министерства здравоохранения РФ

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г. в \_\_ часов на заседании  
Диссертационного совета по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 24.1.137.01)  
при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова,  
б)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии им. И.П. Павлова  
РАН (Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6) и на сайте <http://www.infran.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025

Ученый секретарь

Диссертационного Совета

доктор биологических наук

Дик Ольга Евгеньевна

## Общая характеристика работы

**Актуальность темы.** Ранний неонатальный период онтогенеза – самый важный период физиологической адаптации ребенка к изменившимся условиям окружающей среды. Появление на свет сопровождается активацией всех систем жизнеобеспечения организма. Большая нагрузка ложится на нервную, вегетативную, дыхательную, сердечно-сосудистую системы.

В 2011 г. Россия приняла нормативы ВОЗ, согласно которым младенцев необходимо выхаживать с 22 недель при массе от 500 г и длине тела более 35 см. По данным Минздрава РФ, частота рождения детей с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) в России фиксируется на уровне 0,2%, с очень низкой массой тела (ОНМТ) — 0,8%. Недоношенные дети умирают в 30–35 раз чаще, чем дети, родившиеся в срок (Симаходский и др., 2020). Осложнения в результате преждевременных родов являются основной причиной смерти детей в возрасте до 5 лет. Детям, родившимся раньше положенного срока, сложнее адаптироваться к новой среде обитания в силу физиологической незрелости их органов и систем.

При этом, совершенствование условий выхаживания детей с экстремально низкой массой тела с целью предотвращения их гибели, увеличивает частоту возникновения заболеваний, которые в дальнейшем могут привести к инвалидизации детей данной группы. Одним из них является ретинопатия недоношенных, тяжелое заболевание, приводящее к неустранимой слепоте с раннего детства (Демьянова и др., 2006; Polin and Yoder, 2007; Hughes et al., 2000; Penn et al., 2008; Пономарева и др., 2021). По статистике ретинопатия недоношенных появляется у каждого пятого младенца, родившегося раньше срока, причём тяжёлыми формами болезни страдают до 8% недоношенных (Симаходский и др., 2020). Опыт отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных № 39а ДГБ №1 Санкт-Петербурга подтверждает данную статистику. Низкий вес при рождении и недоношенность являются основными факторами риска, и они легли в основу клинических рекомендаций по скринингу на РН у всех детей с гестационным возрастом до 35 недель и массой тела менее 2000 г. Однако, многие исследователи указывают и на другие факторы риска, которые можно разделить на материнские, пренатальные и перинатальные (Макогон и др., 2024 Holmes et al., 1999; Berdahl et al., 2005).

Одним из таких факторов и частым осложнением шокового состояния, с которым сталкиваются детские реаниматологи в первые часы и дни жизни новорожденных детей является метаболический ацидоз. 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. Увеличивается риск развития судорожного синдрома, возникает нарушение мозгового кровообращения и развитие внутрижелудочковых кровоизлияний (Афанасьев, 2005). Поражения ЦНС в перинатальном периоде способствуют появлению ранней психоневрологической инвалидизации (ранняя детская инвалидность выявлена в 60-70% случаев) (Ковальчук и др., 2018).

Помимо лечения основного заболевания, которое и провоцирует развитие метаболических нарушений, базовой терапией метаболического ацидоза является применение раствора гидрокарбоната натрия (Беляевский, Монченко, 1997; Чупров, Стемпковский, 2008; Тепаев и др., 2016). Однако, длительное применение раствора гидрокарбоната натрия 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

пара- и гемиплегии являются частыми последствиями гипернатриемии у детей (Büyükkaragöz, Bakkaaloğlu 2023). В связи с этим для уменьшения 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 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, Гадамский 2016). Доказано, что цитофлавин способен оказывать нейро- и церебропротективный эффект при лечении детей с гипоксически-ишемическими и гипоксически-геморрагическими поражениями ЦНС. Также есть 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 и др. 2018).

При проведении интенсивной терапии, которая оказывается новорожденному, основной задачей является не только стабилизация жизненно важных показателей, но и применение подходов и средств, снижающих возникновение и тяжесть инвалидизации пациента в постнатальном онтогенезе.

Учитывая вышеизложенное, а также доклады ВОЗ 2018, 2019 гг., ООН 2019 г. о глобальных действиях в отношении преждевременных родов, где говорится примерно о 15 млн. преждевременно рожденных детей, из которых более 1 млн. умирают вскоре после рождения, исследование, посвященное изучению возможности модуляции физиологических механизмов цитопротекции в ходе интенсивной терапии и реанимации недоношенных с низкой и экстремально низкой массой тела является актуальным.

**Степень разработанность проблемы.** Результаты исследований о возможном провоцирующем влиянии срока гестационного возраста, веса пациента, количества часов, проведенных на ИВЛ, процентного содержания кислорода в газовой смеси на развитие ретинопатии недоношенных с низкой и экстремально низкой массой тела противоречивы. Не установлена связь между применением препаратов группы биогенных аминов в ходе реанимации и интенсивной терапии недоношенных новорожденных и степенью прогрессирования ретинопатии новорожденных. Данных о вкладе катехоламинов и разных типов адренорецепторов в ретиногенез объекта, возраст которого соответствует 24 неделе гестации плода человека нет. Отсутствуют сведения о прямом влиянии цитофлавина на ретино- и кардиогенез в модельных условиях ацидоза *in vitro*. Клинических данных, доказывающих эффективность терапии метаболического ацидоза у новорожденных 1-2 дня жизни, проводимой с помощью цитофлавина и ее сопоставление с таковой при использовании гидрокарбоната натрия нет. Настоящее исследование предлагает учитывать возможность модуляции физиологических механизмов цитопротекции в ходе интенсивной терапии и реанимации недоношенных с низкой и экстремально низкой массой тела.

**Цель исследования:** Клинически и экспериментально исследовать возможность модуляции физиологических механизмов цитопротекции в ходе интенсивной терапии и реанимации недоношенных с низкой и экстремально низкой массой тела.

### **Задачи исследования:**

1. Провести клинико-инструментальное обследование новорожденных с разной степенью зрелости (осмотр, забор венозной крови, лабораторные исследования, выполнение ЭЭГ, ЭКГ). Сформировать экспериментальные и контрольную группы.
2. Провести анализ влияния интенсивной терапии недоношенных разной степени зрелости на развитие ретинопатии новорожденных, выделить факторы риска.
3. В условиях органотипической культуры ткани изучить механизм вклада катехоламинов в регуляцию ретиногенеза эмбриональной сетчатки.
4. Разработать экспериментальную модель ацидоза *in vitro* в условиях органотипического культивирования ткани.
5. На модели ацидоза *in vitro* оценить ретино- и кардиопротекторные свойства цитофлавина и гидрокарбоната натрия.
6. В клинических условиях разработать протокол стабилизации картины метаболического ацидоза при введении в терапию цитофлавина.

**Научная новизна.** В условиях органотипического культивирования впервые показано, что норадреналин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки 12-дневного куриного эмбриона в диапазоне концентраций от  $10^{-4}$  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  $\alpha_1$ -адренорецепторов. Выявлен ретинотоксический эффект адреналина ( $10^{-4}$  -  $10^{-8}$  М) и норадреналина ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$ М), реализующийся при участии  $\beta$ -адренорецепторов. Адреналин ( $10^{-4}$ М), как и норадреналин ( $10^{-4}$ М), угнетал рост эксплантатов ткани сетчатки на 95%.

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 ингибирует рост эксплантатов ткани сердца на 34%.

На авторской модели ацидоза *in vitro* впервые зарегистрирован ретино- и кардиотоксический эффект ацидоза, ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на 53% и 32% соответственно. Исследования показали, что ткань сетчатки 12-дневного куриного эмбриона более чувствительна к ацидозу, чем ткань сердца. Гидрокарбонат натрия нивелировал эти эффекты. На модели ацидоза *in vitro* обнаружены ретино- и кардиопротекторные свойства цитофлавина (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 (ВЕ, лактат) у детей, получивших в комплексной терапии цитофлавин в дозе 2 мл/кг/сут на 2-3 день проводимой терапии.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Исследование, проведенное в клинических условиях, позволило сформулировать дополнительные критерии, наличие которых необходимо учитывать при проведении интенсивной терапии у новорожденных с низкой и экстремально низкой массой тела для исключения инвалидизации пациентов или снижения ее степени в постнатальном периоде. Показано, что количество гемотрансфузий не провоцирует прогрессирование ретинопатии; выявлена тесная связь срока гестации, уровня оксигенации (40% и выше) и количества часов пребывания на аппарате искусственной вентиляции легких со степенью выраженности ретинопатии новорожденных. Сохраняющиеся фетальные коммуникации не влияют на прогрессирование заболевания. Все прооперированные пациенты получали инотропную терапию препаратами группы биогенных аминов (адреналин, добутамин,

норадреналин). Применение катехоламинов в лечении новорожденных детей является дополнительным фактором, который надо учитывать.

В условиях органотипической культуры ткани доказано участие  $\alpha_1$ -адренорецепторов в реализации ретиностимулирующего эффекта норадреналина ( $10^{-12}$ М) и  $\beta$ -адренорецепторов в ретинотоксических эффектах высоких концентраций адреналина ( $10^{-4}$  М) и норадреналина ( $10^{-5}$ М). Полученные результаты позволяют лучше понимать отдаленные эффекты от применения биогенных аминов во время лечения новорожденных.

Разработана модель ацидоза *in vitro*, которая позволяет тестировать препараты, потенциально регулирующие кислотно-щелочное равновесие и клеточный метаболизм. На модели ацидоза *in vitro* получены приоритетные данные, прямо подтверждающие ретино- и кардиопротекторные свойства цитофлавина в условиях дисбаланса кислотно-щелочного равновесия. Доказана эффективность применения цитофлавина 2мл/кг/сут в виде продленной внутривенной инфузии для коррекции метаболических нарушений у новорожденных в первые дни жизни. Отрицательных побочных эффектов, наблюдаемых при длительной терапии гидрокарбонатом натрия, у цитофлавина не обнаружено.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Применение в интенсивной терапии катехоламинов является фактором, провоцирующим прогрессирование ретинопатии у недоношенных новорожденных.
2. Связи между количеством гемотрансфузий и провоцированием развития ретинопатии нет. Существует корреляция между процентным содержанием кислорода в газовой смеси, количеством часов ИВЛ, весом, сроком гестации и степенью прогрессирования ретинопатии.
3. Норадреналин, в отличие от адреналина, дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки 12-дневного куриного эмбриона.
4. Ретиностимулирующий эффект норадреналина ( $10^{-12}$ М) опосредован активацией  $\alpha$ -адренорецепторов. Ретинотоксический эффект высоких доз катехоламинов ( $10^{-5}$ М) реализуется при участии  $\beta$ -адренорецепторов.
5. Цитофлавин и гидрокарбонат натрия устраняют кардио- и ретинотоксический эффект, спровоцированный ацидозом в условиях *in vitro*.
6. Эффективность применения цитофлавина для коррекции кислотно-основного ацидоза у новорожденных сопоставима с эффективностью гидрокарбоната натрия.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов обусловлена строгим соблюдением клинических рекомендаций, стандартизацией условий культивирования ткани сетчатки и сердца, 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); Всероссийской конференции с международным участием «Интегративная физиология», (Санкт-Петербург, 2022); IV Всероссийской (XIX) молодёжной научной школе-конференции «Молодёжь и наука на Севере – 2022; XXIV Съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); Всероссийской конференции «Нейрогуморальные механизмы регуляции физиологических функций, посвященной 125-летию кафедры физиологии ПСПбГМУ им.акад. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023); VII Международном конгрессе, посвященном А.Ф. Самойлову «Фундаментальная и клиническая электрофизиология. Актуальные вопросы современной медицины» (Казань, 2024); Всероссийской научно-практической конференции с

международным участием «Учение академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук», посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И.П. Павлову Нобелевской премии (Санкт-Петербург, 2024).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 работ, включая 5 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК и 1 публикацию в журнале базы данных Scopus.

**Личное участие автора в получении результатов.** Все клинические манипуляции, экспериментальные процедуры, обработка, анализ полученных результатов, подготовка материалов для публикации выполнены автором лично.

**Соответствие паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации и результаты исследования соответствуют паспорту научной специальности: 1.5.5 – Физиология человека и животных, пункты 1, 2, 3, 5, 6; 3.1.12. «Анестезиология и реаниматология» – 8, 13.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 124 машинописных страницах, состоит из списка сокращений, введения и четырех глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов), практических рекомендаций, выводов и списка литературы. Диссертация содержит 14 таблиц и 24 рисунка. Библиографический список включает 99 работ отечественных и 68 зарубежных авторов.

Экспериментальная часть работы выполнена в лаборатории физиологии сердечно-сосудистой и лимфатической систем Института физиологии им. И.П. Павлова РАН. Клиническая часть работы выполнена в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных №39а Детского городского многопрофильного клинического специализированного центра высоких медицинских технологий (Детская городская больница №1, г. Санкт-Петербург). Исследования выполнены в рамках Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019-2030), тема 0134-2019-0001.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Материалы и методы исследования**

#### **1.1. Клиническая часть исследования №1**

Объектами первого этапа исследования были новорожденные с поставленным диагнозом ретинопатия новорожденных или с рисками развития данного заболевания, находящиеся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных №39а СПбГБУЗ «ДГМКСЦВМТ» за период с 2021 по 2023 годы.

Из анализа были исключены доношенные дети, дети с задержкой внутриутробного развития, дети, находившиеся в отделении интенсивной терапии и реанимации новорожденных меньше трех дней, дети с летальным исходом. Всего было исключено 20 пациентов. В исследование вошли 40 недоношенных детей с разным сроком гестационного возраста и установленным диагнозом ретинопатия новорожденных, а также дети с рисками развития данного заболевания. Оперативное вмешательство было проведено 6 пациентам. Во вторую часть исследования были включены 27 новорожденных с максимальным риском развития ретинопатии с экстремально низкой массой тела и гестационным возрастом менее 30 недель.

#### **1.1.2. Методы исследования**

В ходе работы проводили лечение новорожденных по основным заболеваниям, использовали клиничко-лабораторный и инструментальный методы, а также статистический анализ. С помощью Медицинской информационной системы qMS рассчитывали количество кислорода, которое каждый пациент получал в ходе лечения. Статистическую обработку

результатов проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена с привлечением языка программирования R в программе STATISTICA 10.0.

### **1.1.3. Интенсивная терапия у новорожденных**

Все дети, поступившие в отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных, получали лечение согласно порядку оказания медицинской помощи по профилю "Анестезиология и реаниматология" (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. N 919н) и "Неонатология" (утв. приказом Министерства здравоохранения РФ от 15 ноября 2012 г. N 921н), а также согласно клиническим рекомендациям министерства здравоохранения Российской Федерации по анестезиологии-реаниматологии и неонатологии.

При поступлении ребенка на отделение оценивали анамнез матери и течение беременности, анализировали клиническую картину состояния ребенка в родильном доме, а также проводили осмотр новорожденного, рентгенологические и ультразвуковые исследования.

В зависимости от каждого индивидуального случая, согласно внутренним протоколам отделения, проводили терапию шоковых состояний путем использования препаратов для стабилизации центральной гемодинамики (адреналин, норадреналин, дофамин, добутамин). В зависимости от степени дыхательной недостаточности осуществляли респираторную поддержку. При необходимости назначали антибактериальную терапию. По показаниям корректировали систему гемостаза: проводили гемо- и плазмотрансфузии, а также трансфузии тромбоконцентрата. В зависимости от состояния ребенка назначали энтеральное питание. В случае острой хирургической патологии проводили подготовку детей к хирургическим вмешательствам.

По мере стабилизации состояния вектор лечения смещался от экстренной терапии критических состояний на обеспечение нормализации работы всех пострадавших органов и систем ребенка. После восстановления собственной сердечной деятельности ребенка выполняли постепенную отмену инотропной терапии. По мере восстановления регулярного и эффективного самостоятельного дыхания осуществляли изменение респираторной поддержки в сторону менее инвазивной и более физиологичной. Обеспечивали начало и расширение энтерального питания, необходимого для восстановления работы ЖКТ и для обеспечения адекватного калоража и весовых прибавок у недоношенных пациентов. На фоне компенсации ребенка по инфекционному статусу постепенно отменяли рациональную антибактериальную терапию. При необходимости проводили консультации и совместное лечение детей с другими узконаправленными специалистами: неврологами, неонатальными хирургами, нейрохирургами, офтальмологами, ЛОР-врачами, клиническими фармакологами. По истечении длительного лечения на фоне стабилизации всех основных витальных функций детей переводили в отделение патологии новорожденных.

Оценку кислородозависимости пациентов и показатель  $SvO_2$  (венозная сатурация крови) проводили в приложении Медицинская информационная система qMS, рассчитывая количество кислорода, который каждый пациент получал в ходе лечения.

Параметры венозной сатурации у всех пациентов были в пределах нормативных и возрастных показателей. Так как 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, в дальнейшем анализе этот показатель решено было не учитывать.

### **1.1.4. Клинико-лабораторный и инструментальный метод**

Во время нахождения и лечения в отделении реанимации всем новорожденным детям назначали исследование биохимического состава крови, клинического анализа крови, коагулограммы, проводили оценку кислотно-щелочного равновесия крови, ПЦР-диагностики, брали посевы различных сред организма, выполняли инструментальные исследования (эхокардиографическое исследование, нейросонография, УЗИ органов брюшной полости, почек, плевральных полостей, рентгенография органов грудной и брюшной полости).



Офтальмологические исследования проводили строго при достижении ребенком постконцептуального возраста и далее раз в 7 дней после начала осмотров.

### **1.1.5 Анализ факторов риска**

Первые 40 детей были разделены на 3 группы в зависимости от тяжести ретинопатии. Группа А – 6 человек, все из которых были прооперированы и имели диагноз ретинопатия 3 стадии. Группа В – 23 человека с диагнозом ретинопатия 1 и 2 стадии. Группа С – 11 человек с сетчаткой на стадии васкуляризации.

Следующие 27 детей (срок гестации менее 32 недель) аналогично были разделены на 3 группы: дети с тяжелыми формами ретинопатии, которые подверглись оперативному лечению, дети с диагнозом, но на стадии консервативного лечения, и дети без заболевания.

Среди детей первой группы адреналин получали 81%, норадреналин – 27%. Среди второй группы новорожденных 38% получали адреналин, 19% норадреналин. Среди третьей группы пациентов адреналин и норадреналин в терапии не применяли.

В качестве предполагаемых ведущих факторов риска развития ретинопатии новорожденных выделены: степень оксигенации, количество гемотрансфузий, гестационный возраст, наличие инотропной поддержки препаратами группы биогенных аминов в ходе лечения. Дополнительно рассматривались: количество часов искусственной вентиляции легких (ИВЛ), вес, инфекционный статус, наличие внутриутробных фетальных коммуникаций, анализ венозной сатурации, степень перенесенной асфиксии в родах (если она была). Каждому пациенту присваивали индивидуальный код, после чего его данные заносили в таблицы и анализировали. Статистический анализ проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена с привлечением языка программирования R. Результаты представлены как  $M \pm m$ .

## **1.2. Экспериментальная часть исследования**

### **1.2.1. Метод органотипического культивирования ткани**

Исследования проводили на 12-дневных куриных эмбрионах породы белый Леггорн. Объекты исследования; эксплантаты ткани сетчатки и сердца. Модуляторные свойства широкого диапазона концентраций адреналина и норадреналина оценивали морфометрически. Фармакологический анализ осуществляли при помощи блокаторов  $\alpha$ - или  $\beta$ -адренорецепторов. Контрольными были эксплантаты, культивируемые в среде стандартного содержания (Пасатецкая и др., 2019; Лопатин и др., 2023а), рН культуральной среды в стандартных условиях – 7,9 (Лопатин и др., 2023в).

Каждая чашка Петри содержала 20 эксплантатов исследуемых тканей. Изучаемые вещества добавляли в соответствии с протоколом эксперимента. За контрольные принимали эксплантаты, культивируемые в условиях питательной среды стандартного содержания. На каждую изучаемую концентрацию приходилось от 32 до 69 эксплантатов.

Культивирование эксплантатов осуществляли при 37°С и 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Binder», Германия). Спустя трое суток культивирования чашки Петри извлекали из CO<sub>2</sub>-инкубатора и исследовали. Для унификации количественной оценки показателей степени роста исследуемой ткани использовали относительный критерий – индекс площади (ИП), который рассчитывали как отношение площади всего эксплантата к площади центральной зоны.

### **1.2.2. Модель метаболического ацидоза *in vitro***

Стандартная питательная среда, используемая для культивирования органных культур, имеет рН=7,9 (Лопатин и др. 2023в). Для моделирования условий метаболического ацидоза *in vitro* рН среды снижали до значения 7,24, что соответствует значению рН крови, наблюдаемой у новорожденных в случае нарушения баланса кислотно-основного равновесия. Снижение рН среды достигали путем добавления 175 мкл/мл 15% соляной кислоты непосредственно в чашку Петри под контролем рН метра АМТ10 («AMTAST», США). В питательную среду экспериментальных эксплантатов с нормальным или сниженным рН добавляли цитофлавин

(ООО НТФФ ПОЛИСАН, Россия) или 5% раствор гидрокарбоната натрия (ОАО "Биосинтез", Россия), согласно протоколу эксперимента. Контрольными служили эксплантаты, культивируемые в среде стандартного содержания и pH. Влияние измененного pH и тестируемых веществ оценивали, как описано в пункте 2.2.1.

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  $p < 0.05$ .

### **1.3. Клиническая часть исследования №2**

#### **1.3.1. Характеристика участников исследования №2**

В исследование вошло 40 новорожденных детей первых двух дней жизни, которые поступили в отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных 39а «Детского городского многопрофильного клинического специализированного центра высоких медицинских технологий» №1 города Санкт-Петербург. У всех пациентов, включенных в исследование, зарегистрированы нарушения в системе кислотно-щелочного равновесия (КЩР) и, помимо основного диагноза, поставлен диагноз метаболический ацидоз. С целью дифференциальной диагностики метаболического и респираторного ацидоза клинически и лабораторно оценивали газовый состав крови до начала и в ходе проводимого лечения гидрокарбонатом натрия или цитофлавином, уровень лактата и дефицит или избыток оснований в крови, уровень pH крови.

Пациенты случайным образом были разделены на две группы по 20 человек в каждой. В группах были недоношенные и доношенные новорожденные. В первую группу вошли дети, которые получали терапию раствором цитофлавина (ЦИТОФЛАВИН®, раствор для в/в введения, ООО НТФФ ПОЛИСАН, Россия) 2 мл/кг/сут.

Вторую группу составили пациенты, которые получали терапию гидрокарбонатом натрия. Гидрокарбонат натрия вводили микроструйно в постоянном режиме из расчета  $BE \times 0,3 \times M$  (кг). Лабораторные показатели (BE, уровень лактата и pH крови) регистрировали в течение 6 дней. Статистический анализ проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена с привлечением языка программирования R. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **2.1. Результаты клинической части исследования №1**

#### **2.1.1. Анализ ведущих факторов риска развития ретинопатии новорожденных**

Нами выявлены предполагаемые ведущие факторы риска развития ретинопатии новорожденных: 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 зависимости от тяжести ретинопатии пациенты ( $n=40$ ) были разделены на 3 группы. Группа А – 6 прооперированных детей с диагнозом ретинопатия 3 стадии. Пациенты получали  $FiO_2$  40% и выше. Группа В – 23 пациента с диагнозом ретинопатия 1 и 2 стадии. Пациенты этой группы получали  $FiO_2$  40% и выше в 34,7% случаев,  $FiO_2$  30-35% – 52,17% детей и  $FiO_2$  21-30% – 13% пациентов. Группа С – 11 человек с диагнозом сетчатка в стадии васкуляризации. 9% пациентов этой группы получали  $FiO_2$  40% и выше,  $FiO_2$  30-35% получали 45,5% детей и  $FiO_2$  21-30% – 45,5% новорожденных.

В работе статистически обоснованно сравнивали средние величины факторов риска в зависимости от группы принадлежности пациента, а также рассчитывали ранговые коэффициенты корреляции между факторами риска в каждой группе. Для графического

представления данных использовали диаграмму «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.

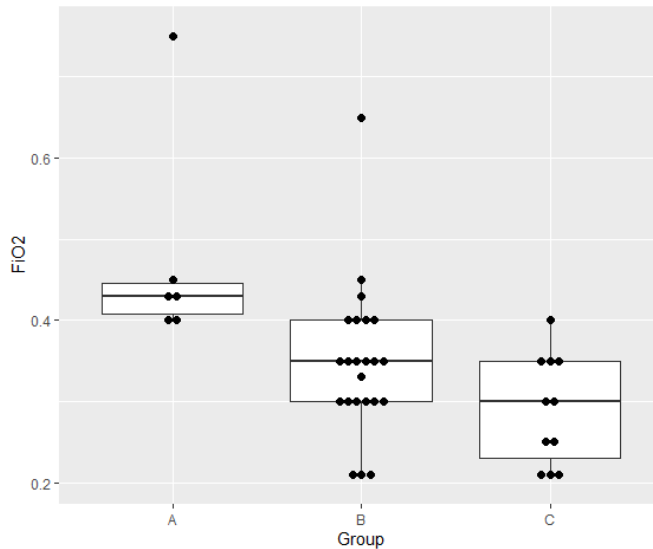


Рисунок 1. Анализ влияния степени оксигенации на степень развития ретинопатии в 3-х группах пациентов

В составленной по всем пяти переменным общей Таблице 1 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 записан в виде  $B = C$ .

Таблица 1. Анализ пяти исследуемых параметров у 40 новорожденных детей

|                  |        |   | Группы |   |   |
|------------------|--------|---|--------|---|---|
| Параметр $FiO_2$ | Группы | A | *      | > | > |
|                  |        | B |        | * | = |
| Параметр Вес     | Группы | A | *      | = | < |
|                  |        | B |        | * | < |
| Параметр ИВЛ     | Группы | A | *      | = | > |
|                  |        | B |        | * | > |
| Параметр ГТС     | Группы | A | *      | = | = |
|                  |        | B |        | * | = |
| Параметр ГВ      | Группы | A | *      | < | < |
|                  |        | B |        | * | < |

При исследовании количества часов, проведенных с применением ИВЛ (искусственной вентиляции легких), пациенты группы А не отличались от пациентов группы В. Параметр ИВЛ достоверно выше в группах А и В по сравнению с группой С.

Дальнейший анализ показал, что различий по параметру ГТС (количество гемотрансфузий) между пациентами групп А, В, С нет (рис. 2). Пациенты группы А по параметру Вес не имели значимых различий с пациентами группы В и достоверно отличались от пациентов группы С. Гестационный возраст (параметр ГВ) у пациентов группы А достоверно ниже возраста пациентов группы В и С, а у пациентов группы С выше В и А соответственно.

Далее проведен расчет коэффициентов ранговой корреляции  $\rho$  Спирмана между факторами в разрезе групп, значимыми при уровне доверительной вероятности 0,95. В группе А обнаружена корреляция между параметрами ИВЛ и ГТС (0,858).

В группе В обнаружена корреляция между  $\text{FiO}_2$  к ИВЛ (0,434) и ГТС (0,438). Выявлена положительная зависимость между весом и гестационным возрастом (0,801). Между количеством гемотрансфузий (параметр ГТС) и гестационным возрастом (ГВ) – корреляция отрицательная (-0,478). Прямой связи между количеством гемотрансфузий и гестационным возрастом пациента нет. У пациентов в группе С обнаружена отрицательная корреляция между параметром  $\text{FiO}_2$  и весом с коэффициентом -0,616, а также между параметром Вес и количеством часов ИВЛ с коэффициентом -0,674. Между параметрами  $\text{FiO}_2$ , Вес, ИВЛ нет корреляции с параметрами количество гемотрансфузий (ГТС) и гестационный возраст (ГВ).

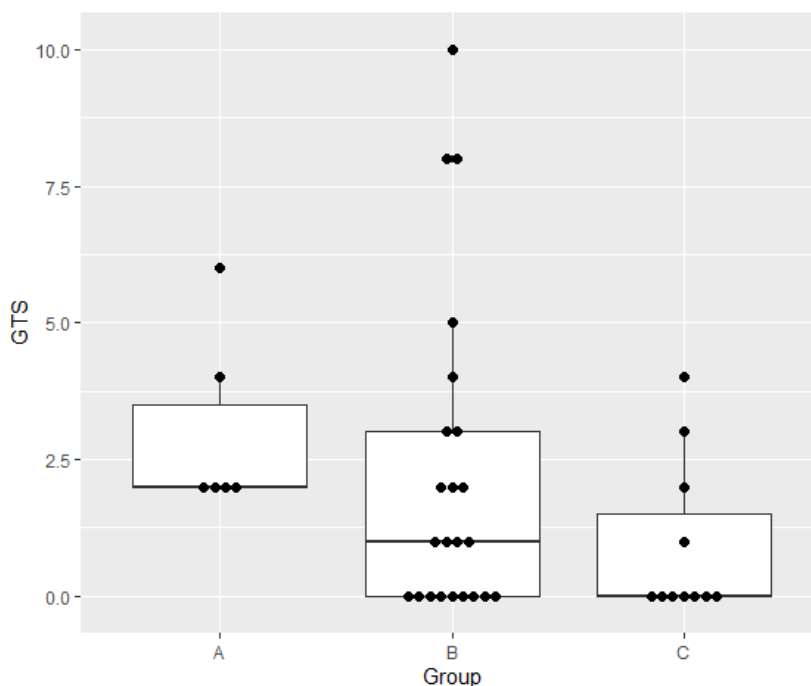


Рисунок 2. Анализ влияния количества гемотрансфузий у пациентов на степень развития ретинопатии в 3-х группах.

Проведенные исследования показали, что наиболее неблагоприятный процент кислорода, подаваемый вместе с газовоздушной смесью, начинается от 40-45%. В ходе исследования выделены предполагаемые дополнительные факторы риска развития ретинопатии новорожденных: наличие внутриутробного инфекционного статуса, состояние фетальных коммуникаций, уровень С-реактивного белка. Результаты анализа демонстрируют наличие 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 ( $R=0,61$ ,  $p<0,001$ ).

### 2.1.2. Анализ риска развития ретинопатии новорожденных группы детей максимального риска

Для уточнения полученных результатов провели клинико-диагностический разбор 27 новорожденных недоношенных детей группы максимального риска. В исследование включили пациентов с экстремально низкой массой тела и гестационным возрастом менее 32 недель. Дети были поделены на 3 группы.

Группа А в количестве 11 человек состояла из прооперированных пациентов, которым был поставлен диагноз ретинопатия 3 стадии. Группа В в количестве 13 человек состояла из пациентов с диагнозом ретинопатия 1 и 2 стадии. Группа С в количестве 3 человек была с диагнозом сетчатка в стадии васкуляризации.

По аналогии со статистическим анализом, представленным в первой части работы, была разработана таблица. В составленной по всем пяти переменным общей Таблице 2 полученный результат средних уровней  $\text{FiO}_2$  записан в виде  $A=B$ . Расчеты, выполненные для средних уровней  $\text{FiO}_2$ , у групп пациентов В и С также не выявили различий генеральных средних. Такой результат отражен в таблице 2 в виде  $B=C$ . Анализ параметра кислородозависимости показал, что разницы между пациентами группы А, В и С нет (таб. 2). Параметр – количество часов, проведенных с применением ИВЛ, – у пациентов группы А был достоверно выше, чем у пациентов группы В и С. Параметр ИВЛ был выше и в группе В по сравнению с группой.

Таблица 2. Анализ пяти исследуемых параметров у 27 новорожденных детей

| Параметр                |        |   | Группы |   |   |
|-------------------------|--------|---|--------|---|---|
|                         |        |   | А      | В | С |
| Параметр $\text{FiO}_2$ | Группы | А | *      | = | = |
|                         |        | В |        | * | = |
| Параметр Вес            | Группы | А | *      | = | = |
|                         |        | В |        | * | = |
| Параметр ИВЛ            | Группы | А | *      | > | > |
|                         |        | В |        | * | > |
| Параметр ГТС            | Группы | А | *      | = | = |
|                         |        | В |        | * | = |
| Параметр ГВ             | Группы | А | *      | = | < |
|                         |        | В |        | * | < |

Параметр – количество часов, проведенных с применением ИВЛ, – у пациентов группы А был достоверно выше, чем у пациентов группы В и С. Параметр ИВЛ был выше и в группе В по сравнению с группой С (таб. 2). Дальнейший анализ показал, что различий по параметру

ГТС (количество гемотрансфузий) между пациентами групп А, В, С нет (таб.2). Пациенты группы А по параметру Вес не имели значимых различий с пациентами группы В и С (таб.2). Гестационный возраст (параметр ГВ) у пациентов группы А не отличается от пациентов группы В. Гестационный возраст пациентов группы С достоверно выше В и А соответственно (таб. 2). Расчет коэффициентов ранговой корреляции  $\rho$  Спирмана между факторами в разрезе групп, значимыми при уровне доверительной вероятности 0,95 показал: в группе А обнаружена отрицательная корреляция между параметрами Вес к ИВЛ (-0,764), а также к ГТС (-0,754), и обнаружена корреляция между Вес и ГВ (0,905). Есть корреляция между ИВЛ и количеством ГТС (0,774), корреляция между ИВЛ и ГВ отрицательная (-0,673). Между ГТС и ГВ корреляция отрицательная (-0,699). Нет прямой связи между количеством гемотрансфузий и гестационным возрастом пациента.

Анализ группы В показал положительную корреляцию параметра ИВЛ и ГТС (0,580), как и в группе А. Анализ группы С показал отрицательную корреляцию параметра  $\text{FiO}_2$  и ГТС (-1), как и в группе А. Большинство пациентов, имеющих диагноз ретинопатия разной степени тяжести, и группа пациентов, вышедших на оперативное лечение, получали инотропную поддержку препаратами группы биогенных аминов.

Далее, в условиях органотипической культуры ткани сетчатки и сердца 12-дневных куриных эмбрионов, исследовали физиологические эффекты адреналина и норадреналина и их механизм.

## 2.2. Результаты экспериментальной части исследования №1

### 2.2.1. Исследование участия адренорецепторов в регуляции ретиногенеза в модельных условиях

Влияние адреналина на рост эксплантатов 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 обнаружил ретинотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $95,0 \pm 2,0\%$  ( $n=40$ ,  $p<0,001$ ) и  $35 \pm 5,0\%$  ( $n=40$ ,  $p=0,01$ ) (рис. 3).  $10^{-12}$  М. ИП был выше контрольного значения на  $40 \pm 6,0\%$  ( $n=40$ ,  $p=0,01$ ). В высоких концентрациях ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$  М) норадреналин, как и адреналин, угнетал рост эксплантатов исследуемой ткани (рис. 4). Для изучения механизма трофотропного и ретинотоксического действия катехоламинов в питательную среду экспериментальных чашек Петри вводили неселективный  $\beta$ -адреноблокатор пропранолол и селективный  $\alpha_1$ -адреноблокатор урапидил. Предварительно оценили влияние блокаторов на рост эксплантатов ткани сетчатки.

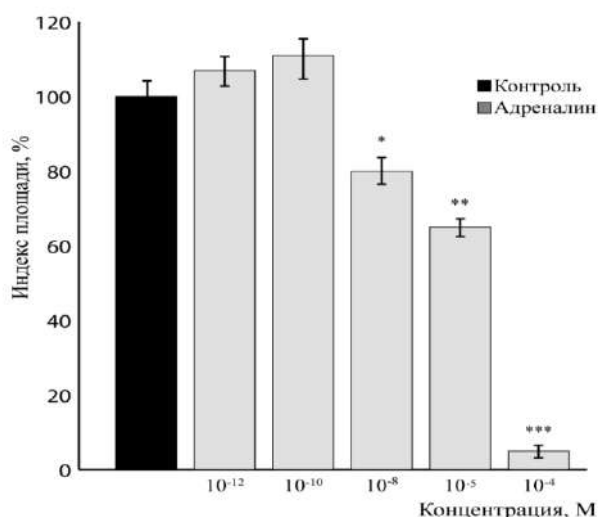


Рисунок 3. Влияние адреналина на рост эксплантатов ткани сетчатки.

\*-  $p<0,05$ , \*\*-  $p<0,01$ , \*\*\*-  $p<0,001$  по сравнению с контрольным значением

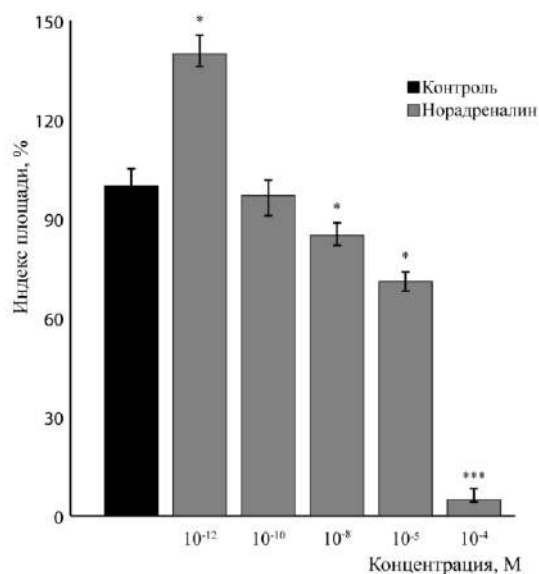


Рисунок 4. Норадреналин дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки. \*-  $p < 0,05$ , \*\*\*-  $p < 0,001$  по сравнению с контрольным значением

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 эксплантатов, ИП был ниже контрольного значения на  $95,0 \pm 1,8\%$  ( $n=40$ ,  $p < 0,001$ ). При введении в питательную среду пропранолола в концентрации  $10^{-6}$  М ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $32,0 \pm 5,9\%$  ( $n=40$ ,  $p = 0,014$ ). В следующей части работы  $\beta$ -адреноблокатор использовали в максимальной концентрации, которая не влияет на рост эксплантатов ткани сетчатки ( $10^{-8}$  М). Урапидил в концентрациях  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  М на рост эксплантатов 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 эксплантаты ткани сетчатки культивировали в питательной среде, содержащей норадреналин ( $10^{-12}$  М) и пропранолол ( $10^{-8}$  М) или урапидил ( $10^{-4}$  М). Стимулирующее рост эксплантатов действие норадреналина сохранялось в присутствии  $\beta$ -адреноблокатора. ИП был на  $37,0 \pm 6,0\%$  ( $n=40$ ,  $p = 0,02$ ) выше контрольного значения и не отличался от ИП эксплантатов, культивируемых только в присутствии норадреналина ( $10^{-12}$  М). При введении в питательную среду совместно урапидила и норадреналина, трофотропное действие последнего отсутствовало. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения (рис. 5).

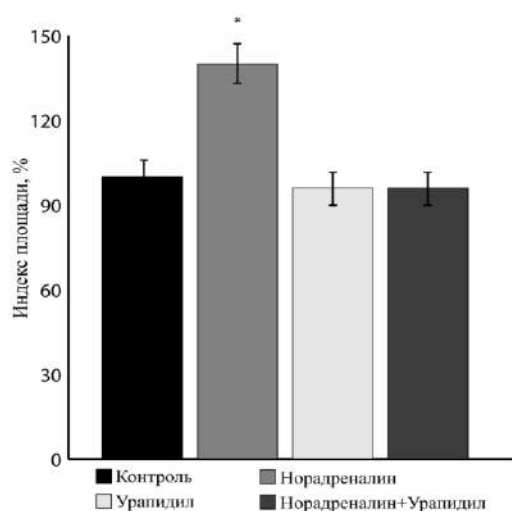


Рисунок 5. Трофотропный эффект норадреналина ( $10^{-12}$  М) опосредован активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов. \*-  $p < 0,05$  по сравнению с контрольным значением

Оценку ретинотоксического эффекта катехоламинов проводили при культивировании эксплантатов в питательной среде, содержащей катехоламины в концентрации  $10^{-5}$ М и пропранолол ( $10^{-8}$ М). Ретинотоксический эффект как адреналина, так и норадреналина, на фоне  $\beta$ -адреноблокатора отсутствовал (рис. 6).

Проведенные исследования показали, что механизм трофотропного действие катехоламинов тканеспецифичен и реализуется как через  $\beta$ -, так и через  $\alpha$ -адренорецепторы. Полученные ранее результаты показали, что  $\beta$ -адренорецепторы не вовлечены в реализацию ретиностимулирующего действия норадреналина. После экспериментального подтверждения участия адренорецепторов в реализации ретинотрофного и ретинотоксического эффектов биогенных аминов встал вопрос о способах минимизации агрессивного применения препаратов данной группы на ранней стадии лечения шока у новорожденных детей.

Было решено обратить внимание на метаболический ацидоз, который является одним из самых частых осложнений, как недоношенности, так и инфекционного процесса, а также одним из факторов риска развития ретинопатии новорожденных. Использование раствора гидрокарбоната натрия с целью быстрой коррекции ацидоза может приводить к развитию тяжелой гипернатриемии у новорожденных детей, а увеличение скорости инфузии у маловесных детей приводить к жидкостной перегрузке и отёкам во время проводимого лечения. Дальнейшие исследования проводили в условиях модели ацидоза *in vitro* (Лопатин и др. 2023в).

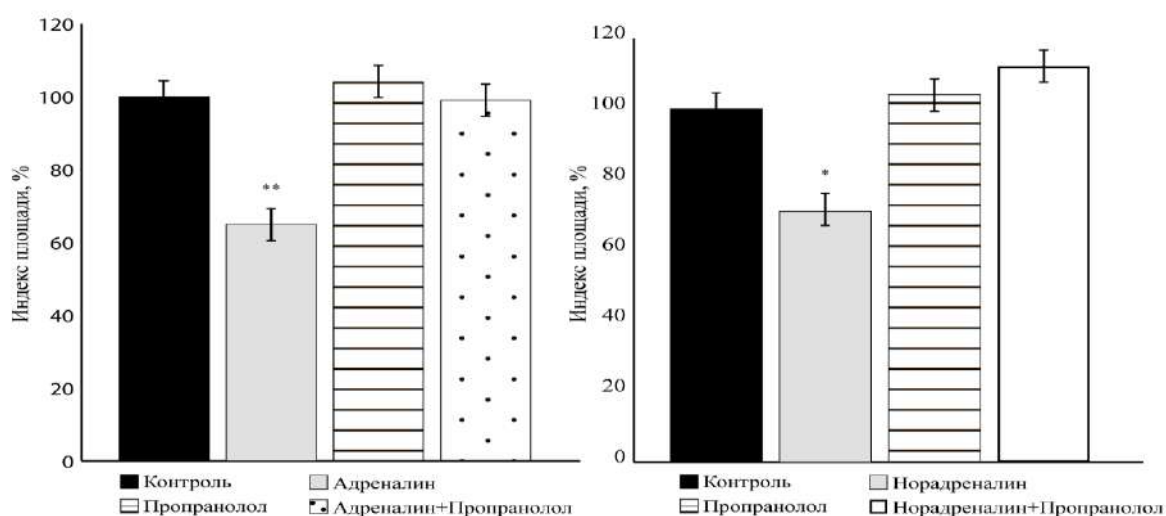


Рисунок 6. Пропранолол нивелирует ретинотоксический эффект катехоламинов. \*-  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$  по сравнению с контрольным значением

### 2.2.2. Исследование влияния цитофлавина и гидрокарбоната натрия на рост эксплантатов ткани сердца и сетчатки 12-дневного куриного эмбриона в норме и в условиях модели ацидоза *in vitro*

Цитофлавин исследовали в диапазоне концентраций 0,2-20 мкл/мл. На рост эксплантатов ткани сетчатки во всех изучаемых концентрациях в условиях стандартного pH препарат не влиял. ИП не отличался от контрольного значения. В концентрации 0,2 мкл/мл и 2 мкл/мл при стандартном pH препарат не оказывал действия на рост эксплантатов ткани сердца. ИП составил 100% и 95% соответственно. В концентрации 20 мкл/мл препарат обнаружил кардиотоксическое действие. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $34,0 \pm 4,0\%$  ( $n=69$ ,  $p < 0,001$ ) (рис. 7).



Культивирование эксплантатов ткани сетчатки в питательной среде в условиях моделированного ацидоза при  $pH=7,24$  оказывало ретинотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $53,0 \pm 7,0\%$  ( $n=56$ ,  $p<0,001$ ). Добавление цитофлавина  $0,2$  мкл/мл этот эффект устраняло. ИП, зарегистрированный через 3-е суток культивирования, не отличался от контрольного значения и отличался от ИП эксплантатов культивируемых при  $pH = 7, 24$  на  $47,0 \pm 6,0\%$  ( $n=42$ ,  $p<0,001$ ) (Рис. 8).

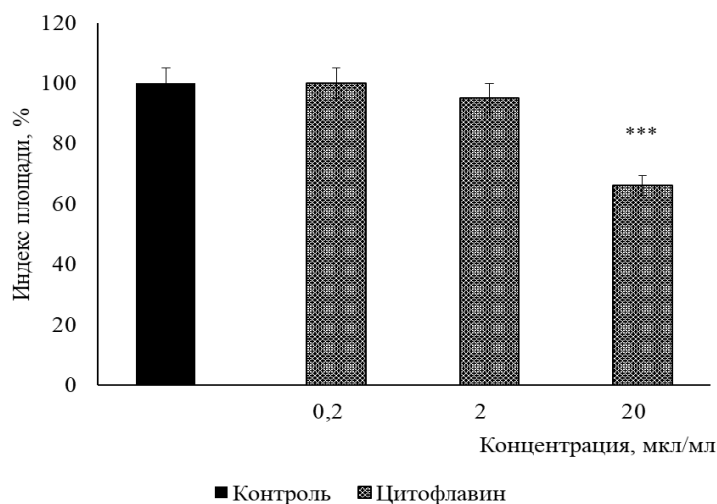


Рисунок 7. Влияние цитофлавина на рост эксплантатов ткани сердца куриных эмбрионов. \*\*\*-  $p<0,001$  по сравнению с контрольным значением

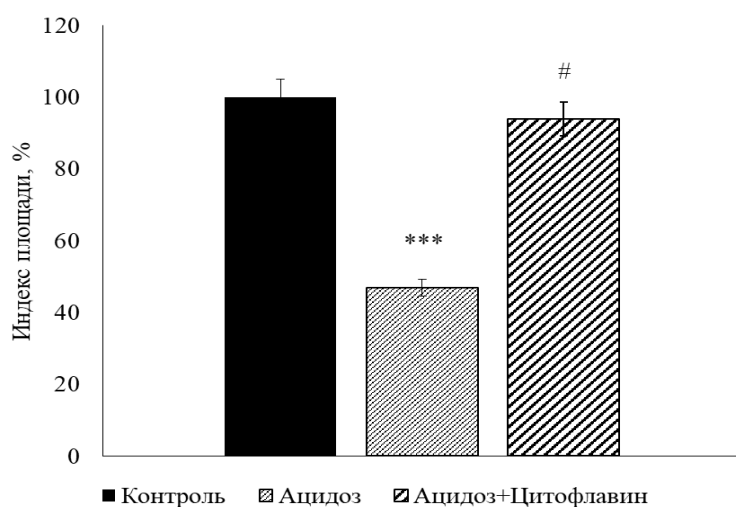


Рисунок 8. Цитофлавин в дозе  $0,2$  мкл/мл нивелирует ретинотоксический эффект ацидоза. \*\*\*-  $p<0,001$  по сравнению с контрольным значением, #-  $p<0,001$  по сравнению с эксплантатами, культивируемыми при  $pH = 7, 24$ .

При культивировании эксплантатов ткани сердца в питательной среде в условиях ацидоза зарегистрирован кардиотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантатов был ниже контрольного значения на  $32,0 \pm 5,0\%$  ( $n=33$ ,  $p<0,001$ ). Цитофлавин ( $0,2$  мкл/мл) устранял этот кардиотоксический эффект. ИП экспериментальных эксплантатов не отличался от контрольного значения и отличался от ИП эксплантатов, культивируемых в условиях ацидоза при  $pH = 7, 24$  на  $34,0 \pm 6,0\%$  ( $n=32$ ,  $p<0,001$ ) (рис. 9).

Добавление гидрокарбоната натрия в питательную среду в условиях изучаемой тест-системы полностью нивелировало токсические эффекты ацидоза, как при культивировании эксплантатов ткани сетчатки, так и при культивировании эксплантатов ткани сердца. Этот факт, по-видимому, обусловлен срабатыванием буферных систем и стабилизацией  $pH$  до стандартной отметки  $7,9$ . Предварительные исследования показали, что гидрокарбонат натрия на рост эксплантатов исследуемых тканей влияния не оказывает.

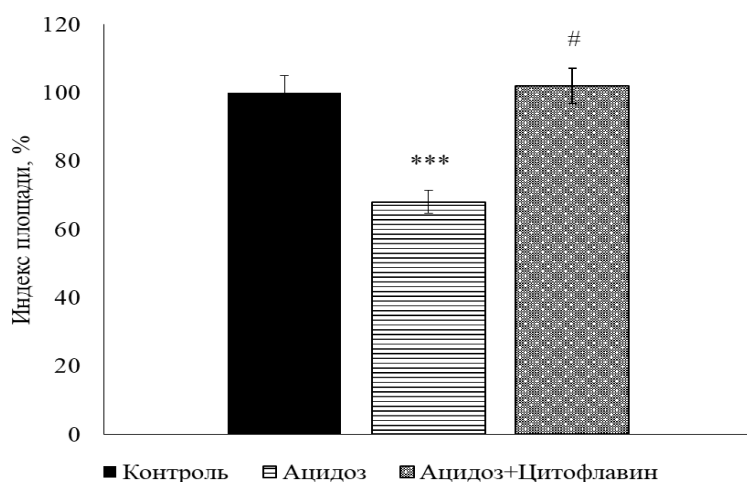


Рисунок 9. Цитофлавин в дозе 0,2 мкл/мл нивелирует кардиотоксический эффект ацидоза. \*\*\*-  $p < 0,001$  по сравнению с контрольным значением,  $p < 0,001$  по сравнению с эксплантатами, культивируемых при pH = 7, 24

### 2.3. Результаты клинической части исследования №2

#### 2.3.1. Исследование эффективности цитофлавина для коррекции метаболического ацидоза в клинических условиях

Исследование осуществляли в 2-х группах пациентов, которые не отличались по возрасту и весу, но различались по сроку гестации. Возраст пациентов обеих групп составил – 1-2 сутки с момента рождения. Средний вес в группе, получающей раствор цитофлавина, –  $1,862 \pm 0,171$  кг, а в группе с терапией раствором гидрокарбоната натрия –  $1,893 \pm 0,228$  кг.

В первый день введения цитофлавина (2 мг/мл/сутки) параметр BE был  $-1,99 \pm 0,645$ , ко второму дню  $-0,515 \pm 0,852$ , на 2-й и 3-й день  $1,195 \pm 0,596$  и  $1,765 \pm 0,793$  соответственно. Далее наблюдалась стабилизация картины и параметр BE практически не изменялся, составив на шестые сутки  $1,896 \pm 0,634$  (рис. 10).

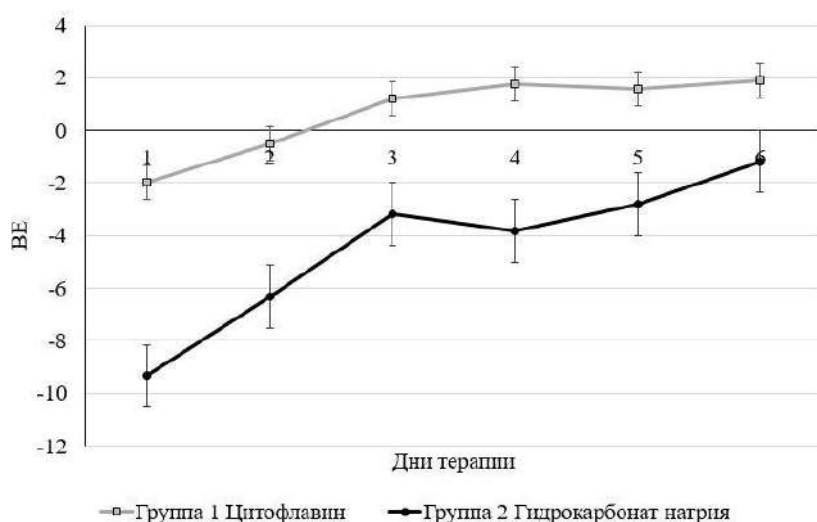


Рисунок 10. Изменение параметра BE при терапии цитофлавином или раствором гидрокарбоната натрия у пациентов исследуемых групп

В группе пациентов, которые получали терапию раствором гидрокарбоната натрия, в первый день введения препарата параметр BE составил  $-9,345 \pm 0,783$ . Во второй день введения наблюдалась положительная динамика, BE был  $-6,335 \pm 1,209$ . На третий день введения положительная тенденция сохранилась, BE составил  $-3,195 \pm 0,542$ . К четвертому дню терапии зарегистрировано изменение параметра до  $-3,845 \pm 0,637$ , по сравнению с третьими сутками, динамика была отрицательной. К пятому дню терапии картина несколько изменилась, и параметр BE составил  $2,795 \pm 0,877$ . К шестому дню терапии BE стабилизирован до нормального

значения –  $1,175 \pm 0,849$  (рис.10). Необходимо отметить, что в группе терапии цитофлавином стабилизация картины наступила на 2-3 день от начала терапии.

Динамика изменения лактата при терапии цитофлавином или раствором гидрокарбоната натрия в течение шести дней представлена на рисунке 11. В группе пациентов, получавших цитофлавин, уровень лактата изменился с  $3,89 \pm 0,751$  в первый день до  $3,315 \pm 0,565$  на второй день введения препарата. На третий день уровень лактата составил  $2,995 \pm 0,384$  и далее практически не изменялся (рис.11).

В группе у детей, получающей терапию раствором гидрокарбоната натрия, уровень лактата изменился с  $5,025 \pm 0,347$  в первый день введения до  $4,395 \pm 0,419$  на второй день проводимой терапии. На третий день уровень лактата был  $3,76 \pm 0,431$  и далее на четвертый день снизился до значения  $2,88 \pm 0,290$ . На пятый и шестой день зарегистрировано дальнейшее снижение уровня лактата до  $2,705 \pm 0,484$  и  $2,495 \pm 0,215$  соответственно (рис. 11). В первый день терапии цитофлавином pH крови пациентов составил  $7,38 \pm 0,018$ . На второй день  $7,40 \pm 0,015$  и далее стабилизировался. Уровень практически не менялся до шестого дня. В группе детей, получающих терапию раствором гидрокарбоната натрия, в первый день pH был  $7,29 \pm 0,020$ . На второй день терапии pH составил  $7,32 \pm 0,018$ , на третий день  $7,38 \pm 0,017$ . К шестым суткам терапии значение было  $7,35 \pm 0,016$  (рис. 12).

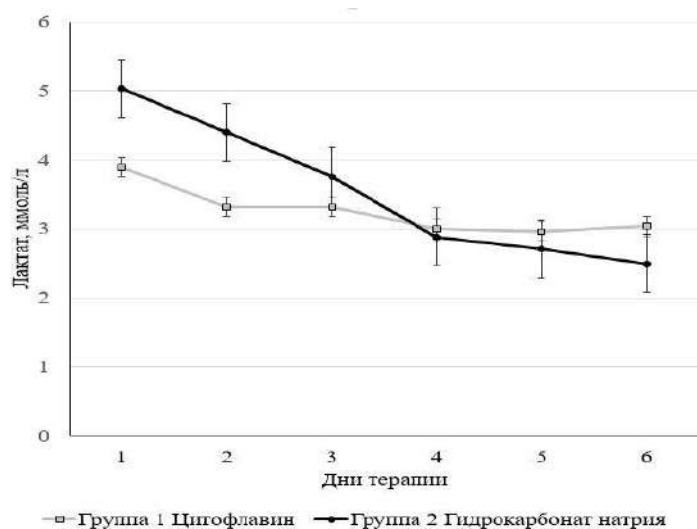


Рисунок 11. Динамика изменения лактата при терапии цитофлавином или раствором гидрокарбоната натрия у пациентов исследуемых групп

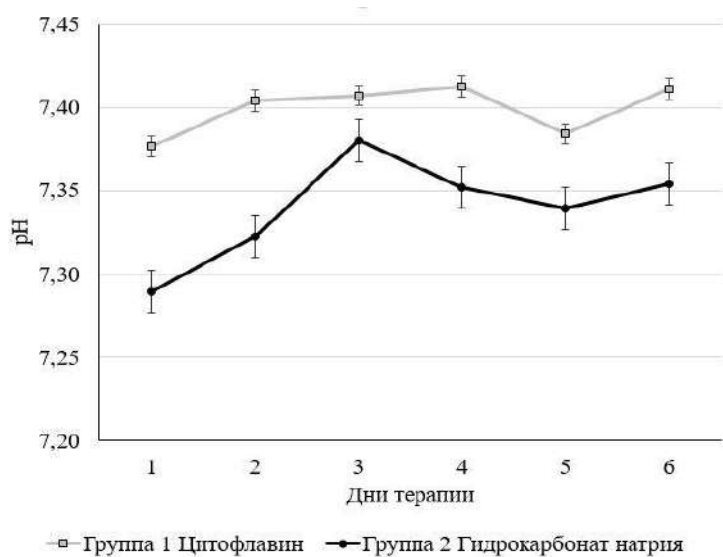


Рисунок 12. Динамика изменения pH крови при терапии цитофлавином или раствором гидрокарбоната натрия в течение 6 дней

Данные анализа, полученные при сравнении эффективности применения цитофлавина или раствора гидрокарбоната натрия для коррекции метаболического ацидоза в двух группах детей, представлены в Таблице 3.

Анализ результатов исследований не выявил значимых отклонений между изучаемыми параметрами. Достоверных различий по эффективности осуществляемой терапии цитофлавином и раствором гидрокарбоната натрия между изучаемыми параметрами ВЕ и уровень лактата не обнаружено. Различия в эффективности описаны только для уровня pH в 1 и 6 день исследования (таб. 3).

Проведенные исследования показали, что основной защелачивающий эффект цитофлавина в дозе 2 мл/кг/сут развивается на 2-3 сутки введения и достигает максимума к 4-5 суткам. В группе детей без цитофлавина, на фоне прекращения защелачивающей терапии, у девяти новорожденных к 4-6 суткам все еще сохранялись лабораторные признаки метаболических нарушений (таб. 4).

Таблица 3. Сравнение эффективности терапии цитофлавином или раствором бикарбоната натрия по параметрам ВЕ, лактат и pH в двух группах пациентов в каждый из дней терапии с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (n1=20; n2= 20)

| День терапии | ВЕ                 | Лактат             | pH                  |
|--------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| 1            | 0,1320 (p=0,5651)  | -0,0369 (p=0,8721) | 0,4717* (p=0,0398)  |
| 2            | -0,1407 (p=0,5397) | -0,2142 (p=0,3504) | -0,1287 (p=0,5748)  |
| 3            | 0,1533 (p=0,5039)  | -0,2618 (p=0,2539) | -0,1573 (p=0,4928)  |
| 4            | 0,0310 (p=0,8926)  | -0,2058 (p=0,3696) | -0,2282 (p=0,3199)  |
| 5            | -0,2313 (p=0,3134) | 0,3099 (p=0,1767)  | 0,0247 (p=0,9144)   |
| 6            | 0,1632 (p=0,4770)  | 0,1892 (p=0,4096)  | -0,6823* (p=0,0029) |

Таблица 4. Сравнительный анализ лабораторных признаков уровня дефицита оснований в группе с применением цитофлавина и группы с использованием раствора гидрокарбоната натрия

| Уровень ВЕ меньше 2,0 | Цитофлавин | Гидрокарбонат натрия |
|-----------------------|------------|----------------------|
| 2 сутки               | 8 детей    | 19 детей             |
| 3 сутки               | 3 ребенка  | 15 детей             |
| 4-5 сутки             | 5 детей    | 16 детей             |
| 6 сутки               | 0 детей    | 9 детей              |

У новорожденных с высоким уровнем лактата в крови, получавших терапию цитофлавином, лактатацидоз в большинстве случаев не развивался, грубых метаболических нарушений не было. Негативные побочные эффекты в отличие от группы детей, которые не получали терапию цитофлавином, отсутствовали.

На фоне стабилизации системы кислотно-щелочного равновесия и всех основных витальных функций детей переводили для дальнейшего лечения и наблюдения в отделение патологии новорожденных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что все дети, которым выполнено хирургическое лечение ретинопатии новорожденных, родились на сроке гестации меньше 29 недель и в ходе реанимационных мероприятий получали терапию моноаминами. В условиях органотипического культивирования ткани сетчатки экспериментально доказано, что ретиностимулирующий эффект норадреналина реализуется через модуляцию  $\alpha_1$ -адренорецепторов в том время, как ретинотоксические эффекты высоких концентраций катехоламинов опосредованы активацией  $\beta$ -адренорецепторов.

Анализ данных полученных в ходе интенсивной терапии новорожденных позволил обнаружить связь между количеством часов, проведенных пациентом при искусственной вентиляции легких и степенью прогрессирования ретинопатии. Выявлено отсутствие связи между количеством гемотрансфузий и прогрессированием ретинопатии. Показано, что содержание кислорода в газовой смеси - 40% является пограничным, увеличение его содержания приводит к прогрессированию заболевания. По данным литературы метаболический ацидоз являясь наиболее распространенным осложнением при терапии новорожденных, также провоцирует прогрессирование ретинопатии. Использование модели ацидоза *in vitro* на модели срок гестационного возраста, которой соответствует 24 неделе гестации новорожденных, позволило обнаружить, что цитофлавин (0,2мкл/мл) или гидрокарбонат натрия (1,6 мг/мл) устраняют ретино- и кардиотоксический эффекты метаболического ацидоза и показать, что его ретинотоксический эффект является более мощным. Эффективность цитофлавина основана на физиологической модуляции механизмов цитопротекции.

Проведенные исследования позволили научно обосновать применение цитофлавина в ходе противошоковой терапии метаболического ацидоза новорожденных, начиная с 24 недели гестации, 1-2 дня жизни.

## ВЫВОДЫ

1. Анализ показал, что все прооперированные дети (17 новорожденных) родились на сроке гестации меньше 29 недель. Связи между количеством гемотрансфузий и прогрессированием ретинопатии не обнаружено. Все прооперированные пациенты на этапе лечения получали газовоздушную смесь с содержанием кислорода выше 40%, по-видимому, данный процент является пограничным. Обнаружена корреляция между количеством часов, проведенных при искусственной вентиляции легких и степенью прогрессирования ретинопатии. Все пациенты группы максимального риска (<29 недель) получали терапию моноаминами.

2. Норадреналин ( $10^{-6}$  М до  $10^{-12}$  М), в отличие от адреналина ( $10^{-4}$  М до  $10^{-12}$  М) дозозависимо регулирует рост эксплантатов ткани сетчатки 12-дневного куриного эмбриона. В концентрации ( $10^{-12}$  М) норадреналин стимулирует рост эксплантатов ткани сетчатки на 40%, эффект опосредован активацией  $\alpha_1$ -адренорецепторов.

3. Норадреналин ( $10^{-4}$  М) и адреналин ( $10^{-4}$  М) угнетают рост эксплантатов ткани сетчатки на 95%. Ретинотоксический эффект высоких концентраций катехоламинов обусловлен активацией  $\beta$ -адренорецепторов.

4. На модели ацидоза *in vitro* при снижении pH питательной среды до 7,24 зарегистрирован кардио- и ретинотоксический эффект. Ретинотоксический эффект ацидоза более выражен, индекс площади эксплантатов ткани сетчатки ниже контрольного значения на 53%, ткани сердца на 32% соответственно. Цитофлавин (0,2мкл/мл) или гидрокарбонат натрия (1,6 мг/мл) устраняли цитотоксический эффект ацидоза.

5. Клинически доказано - основной защелачивающий эффект цитофлавина в дозе 2 мл/кг/сут развивается на 2-3 сутки введения и достигает максимума к 4-5 суткам. В группе детей без цитофлавина, на фоне прекращения защелачивающей терапии гидрокарбонатом натрия к 4-6 суткам все еще сохраняются лабораторные признаки метаболических нарушений. У детей с высоким уровнем лактата в крови, получавших терапию цитофлавином, в 75% лактацидоз не развивался, грубых метаболических нарушений, в отличие от группы детей, которые не получали терапию цитофлавином, не было.

6. Впервые на модели ацидоза *in vitro*, научно обосновано наличие у цитофлавина ретино- и кардиопротекторных свойств на объекте, гестационный возраст которого соответствует 24 неделе развития плода человека. Корреляционный анализ клинических данных не выявил различий между эффективностью терапии метаболического ацидоза у новорожденных 1-2 дня жизни, проводимой с помощью цитофлавина и гидрокарбоната натрия.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанная оригинальная авторская модель метаболического ацидоза *in vitro* может использоваться для тестирования лекарственных препаратов, регулирующих систему кислотно-щелочного равновесия и потенциально влияющих на клеточный метаболизм.

Результаты проведенного клинико-экспериментального исследования могут дополнить существующие клинические рекомендации при оказании реанимации и интенсивной терапии новорожденных с разным сроком гестации.

Поскольку длительность часов ИВЛ у пациентов с ретинопатией достоверно выше, чем у недоношенных без данного заболевания, ранняя экстубация у недоношенных новорожденных является приемлемой в случае проведения респираторной терапии. Однако в первую очередь надо опираться на возможность поддержания адекватного самостоятельного спонтанного дыхания. Поддержание уровня дотации кислорода не должно превышать 40-45%. Необходимо учитывать, что при применении большего процента кислорода в подаваемой газовой смеси риски развития заболевания повышаются.

Проведение гемотрансфузии должно применяться согласно клиническим рекомендациям.

Применение инотропных и вазопрессорных препаратов должно быть рационально, проводиться под контролем ЭХОКГ и при оценке совокупности всех параметров новорожденного ребенка. Бездумное применение больших дозировок в разы повышает риски развития осложнений, которые были описаны выше. Так как ретинотрофотропный эффект норадреналина обусловлен влиянием на  $\alpha_1$ -адренорецепторы, то рекомендуется избегать применения больших доз данного препарата.

Применение цитофлавина в инфузионной терапии у новорожденных детей первых часов жизни является эффективным, безопасным и удобным, не требует установки дополнительного венозного катетера. Цитофлавин рекомендуется добавлять в капельницу из расчета 2мл/кг/сут для проведения постоянной продленной инфузии. В случае грубых и выраженных метаболических расстройств рекомендуется комплексная инфузия как гидрокарбоната натрия, так и цитофлавина. Рекомендуется применение цитофлавина всем новорожденным недоношенным детям с момента их поступления в отделение ОРИТН. Необходимо проводить лабораторный контроль у новорожденных на данной терапии не реже 1 раза в 2 дня с целью избегания развития метаболического алкалоза. При появлении признаков метаболического алкалоза препарат следует отменить.

### Статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК

1. **Лопатин, А.И.** Участие адренорецепторов в регуляции роста эмбриональной сетчатки / А.И. Лопатин, Н.А. Пасатецкая, Е.Г. Удовенко, Е.В. Лопатина // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2023. – Т.20, № 3. – С.31-36.
2. **Лопатин, А.И.** Анализ влияния интенсивной терапии недоношенных на развитие ретинопатии новорожденных / А. И. Лопатин, В. В. Андреев, Н. А. Пасатецкая, М. Г. Соколова, Е. В. Лопатина // Медицинский алфавит. – 2023. – № 26. – С.35-41.
3. **Лопатин, А.И.** Тест-система для оценки эффективности препаратов применяемых для коррекции кислотно-основного состояния новорожденных детей / А.И. Лопатин, Н.А. Пасатецкая, Е.Г. Удовенко, Е.В. Лопатина // Медицинская наука и образование Урала. – 2023. – Т. 24, № 4. – С. 122-127.
4. **Лопатин, А.И.** Применение цитофлавина для коррекции метаболических нарушений у новорожденных в критических состояниях / А.И. Лопатин, Н.А. Пасатецкая, Е.В. Лопатина, В.В. Андреев // Современные проблемы науки и образования. – 2023. – № 5. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32980> (дата обращения: 23.10.2023).
5. **Лопатин, А.И.** Физиологическое обоснование применения цитофлавина в ходе интенсивной терапии и реанимации новорожденных /Лопатин А.И. // Интегративная физиология. – 2024. – Т.5, № 2. – С. 167-176.

### Публикации в журналах и материалах конференций

6. **Лопатин А.И.,** Андреев В.В., Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В. Анализ корреляции степени оксигенации, количества гемотрансфузий с выраженностью прогрессирующей ретинопатии // Материалы Всероссийской конференции с международным участием Интегративная физиология – 2021, Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2021 г. – С. 152-153.
7. Крайнова Ю.С., **Лопатин А.И.,** Пасатецкая Н.А. Участие норадреналина в регуляции роста эмбриональной сетчатки // Материалы Всероссийской конференции с международным участием Интегративная физиология-2021, Санкт-Петербург, 8-10 декабря 2021 г. - С. 93.
8. **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.
9. 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.
10. **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», Сыктывкар, 21 – 25 марта 2022 г. В 2-х томах. Том I. – С.244.
11. **Лопатин А.И.,** Пасатецкая Н.А., Лопатина Е.В. Участие катехоламинов и цитофлавина в регуляции роста эмбриональной сетчатки // Материалы Всероссийской конференции с международным участием Интегративная физиология-2022, Санкт-Петербург, 7-9 декабря 2022 г. – С. 49.
12. **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.

13. **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 // Материалы XXIV Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова Санкт-Петербург, 11-15 сентября 2023 г. – С. 72-73.
14. Лопатина Е.В., Пасатецкая Н.А., Андреев В.В., **Лопатин А.И.** Эффективность гидрокарбоната натрия и цитофлавина при коррекции метаболического ацидоза новорожденных // Российский кардиологический журнал. – 2024. – 29(6S), дополнительный выпуск. - апрель. - С.28-29.
15. Лопатина Е.В., Пасатецкая Н.А., Андреев В.В., **Лопатин А.И.** Сравнительный анализ эффективности гидрокарбоната натрия и цитофлавина при коррекции метаболического ацидоза новорожденных: трансляционное исследование // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Учение академика И.П. Павлова в современной системе нейронаук», посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня вручения академику И.П. Павлову Нобелевской премии. Санкт-Петербург, 18-20 сентября 2024 г. – С.143-144.