

На правах рукописи

Денисенко Оксана Дмитриевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ
КРОВИ У НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ
ГИПОКСИЮ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Томск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования "Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Литвинова Лариса Сергеевна

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор
РАН

Андриевская Ирина Анатольевна

заведующий лаборатории механизмов
этиопатогенеза и восстановительных
процессов дыхательной системы при
неспецифических заболеваниях легких
ФГБНУ «Дальневосточный научный
центр физиологии и патологии дыхания»

Доктор медицинских наук, доцент,
заведующий кафедрой биофизики и
функциональной диагностики медико-
биологического ФГБОУ ВО "Сибирский
государственный медицинский
университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Гусакова Светлана Валерьевна

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное научное учреждение Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)

Защита состоится ___ _____ в ___ ч на заседании диссертационного совета 21.2.068.03 при Сибирском государственном медицинском университете (634050, г. Томск, Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Дистресс плода и асфиксия новорожденного широко распространены, представляя важнейшую медицинскую и социальную проблему во всем мире [Герасимова Н. С. и др., 2015; Pasquo di E. et al., 2022; Zhen-Zhen J. et al., 2022]. Усилия специалистов многих специальностей направлены на профилактику, раннюю диагностику и лечение этого состояния: в 2021 году показатель перинатальной смертности в России снизился почти в 2 раза, достигая 4,4‰ [Щербакова Ю. Г., Малышева Е. В., 2021] против 10,2‰ в 2005 году [Суханова Л. П., 2006]. Асфиксия является главной причиной перинатальной смертности, в структуре ее интранатальных причин первое место занимает гипоксия плода [Радзинский Е. В., 2017; Приходько А.М., 2022; Locatelli A. et al., 2022; Pasquo E. et al., 2022; Pereira S. et al., 2022; Amsalu S. et al., 2023]. Гипоксия, приводящая к тяжёлым неврологическим нарушениям у детей, возникает в антенатальном периоде в 63% случаев, интранатально в 21,2% случаев и в периоде новорожденности - до 5,7% случаев [Еремина О. В., 2014; Chen X. et al., 2023]. Перинатальная гипоксия, связанная с нарушениями плацентарного кровообращения, приводит к активации оксидативных процессов в организме плода, являясь пусковым механизмом гипоксических повреждений у новорожденных в неонатальном периоде [Радзинский Е. В., 2017]. Оксидативный стресс и ацидоз негативно влияют на все клетки организма, в том числе на эритроциты, которые весьма чувствительны к нарушениям гомеостаза [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007; Shankaran S., 2015; Chen X. et al., 2023].

Степень разработанности темы. Важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции функций организма в норме и при развитии патологии, в том числе у новорожденных, является симпатoadреналовая система, реализующая свои эффекты через действие гормонов – катехоламинов, связывающихся с адренорецепторами, расположенными на мембранах клеток, вызывая в них функциональные изменения [Стрюк Р. И., 2003, Тихомирова И. А., 2006; Kvetnansky R. et al., 2013; Nedoboy P. E. et al., 2021; Gaskill P.J., Khoshbouei H., 2022]. Длительная или сильная стимуляция организма катехоламинами меняет количество адренорецепторов и их функциональные свойства, способствуя десенситизации мембран клеток к стрессорным медиаторам и гормонам [Шукуров Ф.А. и др., 2020]. Функциональное состояние детекторного звена симпатoadреналовой системы находится под контролем обратной связи с количеством адренореактивных веществ, которые действуют на клетку [Hamilton L. D. et al., 2008; Халимова Ф. Т., 2017; Шукуров Ф. А. и др., 2020]. Системные реакции организма, в ответ на изменения активности

симпатоадреналовой системы, отражены в понятии адренореактивности [Гарганеева А.А. и др., 2020]. Эритроциты представляют самую значительную популяцию (около 84%) от общего клеточного состава организма [Sender R. et al., 2016]; их цитозольный протеом на 90% состоит из гемоглобина [Amon S. et al., 2019], посредством которого они выполняют буферную функцию; активно участвуют в метаболизме катехоламинов, ацетилхолина, иммунных комплексов и ряда лекарственных веществ [Masuda M. et al., 2002]. Эритроциты являются перспективным объектом для изучения адренореактивности организма [Namdar A., 2017, Rebrova T. Y. et al., 2021; Zyubanova I. V. et al., 2021]; на мембране эритроцита локализованы $\alpha 1$ -АР, $\alpha 2$ -АР, $\beta 1$ -АР, $\beta 2$ -АР и $\beta 3$ -АР, число их на одном эритроците составляет от 90 до 300 [Lamsadze G. et al., 2011]. Установлено, что по уровню адренореактивности эритроцитов можно оценивать развитие стрессовой ситуации, которая возникает в процессе адаптации организма к новым экстремальным условиям среды, в том числе, при родах, осложненных перинатальной гипоксией [Гарганеева А. А. и др., 2020, Olofsson P., 2023]. В эритроцитах, при действии гипоксии происходит истощение продукции АТФ, запускается активация протеинкиназы С и фосфорилирование неселективных катионных каналов, что способствует входу в клетку ионов Ca^{+2} [Белевич Е. И. и др., 2015; Чумакова С. П. и др., 2018; Ващенко В. И., Вильянинов В. Н., 2019]; деформируемость и проницаемость мембран эритроцитов при этом возрастают, а транспорт кислорода - снижается [Мороз В. В. и др., 2012]. Процесс деформации сопровождается нарушениями цитоскелета и плазматической мембраны эритроцита [Сергунова В. А. и др., 2015; Шерстюкова Е.А., 2020]. Количественные или качественные дефекты в мембранных белках, приводят к уменьшению стабильности мембраны и последующему разрушению клеток и их программированной смерти – эритрозу [Мороз В. В. и др., 2012; Перепелица С.А., 2017; Шерстюкова Е.А., 2020; Хадарцев А. А. и др., 2022; Dreischer P. et al., 2022; D'Alessandro A. et al., 2023]. Согласно многочисленным данным, существует тесная двусторонняя связь между состоянием организма и морфофункциональными изменениями эритроцитов [Hines P. S., 2003; Judkins A. J. et al., 2019; Gwozdinski K. et al., 2021; Strijkova-Kenderova V. et al., 2021]. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященным изучению различных характеристик эритроцитов в норме и при патологии, на сегодняшний день нет четкого понятия о влиянии перенесенной перинатальной гипоксии на показатели адренореактивности эритроцитов и изменение их морфологических характеристик у новорожденных. Вышесказанное, в целом, обуславливает своевременность и актуальность данной тематики: знания закономерностей возникновения

морфофункциональных и структурных нарушений эритроцитов крови могут значительно расширить представления о влиянии гипоксии на развитие критических состояний у плода и новорожденных. **В связи с вышесказанным,** целью исследования явилось изучение морфофункциональных изменений эритроцитов у новорожденных с признаками гипоксии в раннем неонатальном периоде.

Задачи исследования:

1. Оценить взаимосвязь уровня β -адренореактивности эритроцитов, определяемого в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, с параметрами кислотно-основного состояния и содержанием молодых форм эритроцитов, в зависимости от степени компенсации ацидоза (рН).
2. Выявить динамику морфологических характеристик эритроцитов крови (изменение формы, размера эритроцитов, наноструктуры мембраны) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию в раннем неонатальном периоде (от момента рождения до 7 суток жизни) во взаимосвязи с показателями их кислотно-основного состояния.
3. Выявить общие закономерности и особенности морфофункциональных изменений эритроцитов при перинатальной гипоксии.

Научная новизна. Научную ценность представляют полученные данные, свидетельствующие, что β -адренореактивность эритроцитов, определяемая в пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, в целом, зависит от степени компенсации ацидоза, выявленной при рождении. Впервые установлено, что содержание ретикулоцитов в артериальной крови, полученной из сосудов (вена) пуповины у новорожденных с ацидозом, позитивно коррелирует с величиной рН и показателем β -адренореактивности эритроцитов. Оригинальными являются данные об изменении формы эритроцитов (пойкилоцитоз) и их размеров (анизоцитоз), определяемых в остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Выявлено, что морфологический состав эритроцитов детей с гипоксией представлен сниженным (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии) количеством нормальных форм эритроцитов (платоцитов), и, напротив, повышенным – стоматоцитов, на фоне снижения содержания нормоцитов. Приоритетными являются данные о том, что на фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови, выявленные изменения форм эритроцитов и их размеров у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, сохраняются в

течение всего раннего неонатального периода (7 суток после рождения). Впервые, с применением метода атомно-силовой микроскопии, у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию доказано, что эритроциты остаточной пуповиной крови, а также венозной крови, полученной через 7 часов и 7 суток после рождения, характеризуются более выраженной (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот h1 (мембранный фликеринг) и h2 (цитоскелет, спектринный матрикс), что является компенсаторно-приспособительной реакцией эритроцита в ответ на гипоксию и сниженное содержание кислорода в плазме. Выявленные нами изменения морфофункциональных характеристик эритроцитов направлены на обеспечение их жизнедеятельности и выполнение газотранспортной функции в условиях гипоксии.

Теоретическая и практическая значимость. Получены знания фундаментального характера об общих закономерностях и особенностях изменений морфофункциональных характеристик эритроцитов при перинатальной гипоксии.

Практическая значимость работы обусловлена доказательством, что динамика изменений параметров поверхности эритроцитов (мембранный фликеринг и спектринный матрикс) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, может быть использована для оценки процессов восстановления эритроцитов в раннем неонатальном периоде. Внедрение в клиническую практику экспресс-метода определения адренореактивности организма, по наиболее удобному, в методическом плане, эритроцитам (для изучения действия агонистов или антагонистов катехоламинов), важно для раннего выявления нарушений симпатoadреналовой системы, профилактики и лечения заболеваний, связь которых с активностью симпатoadреналовой системы несомненна и уже доказана. Метод атомно-силовой микроскопии может применяться в клинической практике, наряду с оптической микроскопией, для оценки морфологической формы и размеров эритроцитов, а также для изучения структуры мембран красных клеток крови у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград.

Методология и методы диссертационного исследования. В соответствии с поставленными задачами, были выбраны высокоинформативные методы исследования, выполненные на базе современного высокотехнологического Центра иммунологии и клеточных

биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). Материалом для исследования служила артериальная и венозная кровь, полученная из сосудов пуповины; остаточная пуповинная кровь; венозная кровь, взятая через 7 ч и 7 суток после рождения.

Основные методы исследования:

1. Определение кислотно-основного состояния крови новорожденных;
2. Определение β -адренореактивности эритроцитов крови новорожденных;
3. Определение молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов, нормобластов) в крови новорожденных
4. Анализ морфологических характеристик эритроцитов крови новорожденных:
 - анализ морфологических форм эритроцитов и их размерных характеристик методом световой микроскопии;
 - анализ морфологических форм и структурных характеристик (высоты h_1 и h_2 , характеризующие мембранный фликеринг и цитоскелет, спектринный матрикс) эритроцитов с применением метода атомно-силовой микроскопии;
5. Статистический анализ данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных с признаками гипоксии в раннем неонатальном периоде, регистрируется повышение значений *β -адренореактивности эритроцитов*, увеличение молодых форм эритроцитов (нормобластов и ретикулоцитов), определяется прямая зависимость этих показателей от степени компенсации ацидоза (величины рН).

2. В остаточной пуповиной крови новорожденных с признаками перинатальной гипоксии регистрируется более выраженный (по сравнению с новорожденными без гипоксии) анизоцитоз (уменьшение числа нормоцитов) и пойкилоцитоз (снижение количества платоцитов, увеличение содержания стоматоцитов и переходных форм (кодоциты)) эритроцитов; эритроциты детей с гипоксией характеризуются высокой нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот h_1 (мембранный фликеринг) и h_2 (цитоскелет, спектринный матрикс). Выявленные изменения морфологических характеристик эритроцитов сохраняются у данной категории детей через 7 суток после рождения, на

фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови.

Степень достоверности и апробация результатов. Высокая степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным объёмом экспериментального материала с использованием современных высокотехнологичных методов исследования и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки полученных результатов. Основные результаты исследования рассмотрены на Всероссийской молодежной научно-практической конференции (Архангельск, 2012 г.); на XVII Всероссийской молодежной научной конференции с элементами научной школы (Сыктывкар, 2013г.); на Международной научно-практической конференции (Уфа, 2013г.); на II Международной заочной электронной конференции «Кислотно-основная и температурный гомеостазис» (Красноярск, 2014г.); на VIII Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Киев, 2014г.); на III-ей Международной научно-практической конференции (Тюмень, 2014г.); на V Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2014г., 2018г.); на XII Балтийском медицинском конгрессе «Янтарная осень» (Калининград, 2022г.); на XXIV Всероссийской конференции "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 2022г.); на V Всероссийском Конгрессе "Актуальные вопросы медицины критических состояний" (Санкт-Петербург, 2023г). Работа осуществлена при финансовой поддержке Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 4 полнотекстовых статьи в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 1 глава в монографии, 11 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 23 рисунками и 5 таблицами. Библиографический указатель включает 245 источников (113 отечественных и 132 иностранных).

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, а также проведении всех преаналитических и аналитических этапов исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в положениях и выводах лично автором.

Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н. С.А. Перепелице, заведующему кафедрой хирургических дисциплин образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, за консультативно-методические консультации и рекомендации при анализе клинических данных; В.А. Сергуновой, к.б.н., руководителю лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, за помощь в организации исследований на атомно-силовом микроскопе и интерпретации полученных данных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Выполнено проспективное исследование на базе ГБУЗ «Родильный дом Калининградской области №1». Обследованы **135 новорожденных**, родившихся через естественные родовые пути. В соответствии с задачами исследования, нами было выполнено **2 блока исследований**.

БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 1 - был направлен на оценку функциональных особенностей эритроцитов новорожденных (**108 детей**), перенесших перинатальную гипоксию. Материалом для исследования служила артериальная и венозная кровь, взятая из сосудов пуповины новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее. Далее проводили серию измерений показателей кислотно-основного состояния, β -адренореактивности эритроцитов, содержания молодых форм эритроцитов. В зависимости от параметров КОС, были выделены три группы (**таблица 1**).

Таблица 1 - Основные клинические характеристики новорожденных, включенных в 1 блок работ, ($M \pm \sigma$), Me (Q_1 ; Q_3)

Показатели	Группа 1 n=28	Группа 2 n=32	Группа 3 n=48
Срок гестации, недель	38,8 \pm 0,3	39,3 \pm 0,3	39,2 \pm 0,3
Масса тела, гр	3316 \pm 78,7	3317 \pm 83,6	3428 \pm 61,4
Шкала Апгар на 1-й мин., балл	9(8;9)	8,5(8;9)	8(8;9)
Шкала Апгар на 5-й мин., балл	9(9;9)	9(9;9)	9(8;9)
Мальчики/девочки	16/12	13/19	23/25

БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 2 - был ориентирован на оценку морфологических особенностей эритроцитов новорожденных (**27 детей**), перенесших перинатальную гипоксию и без нее. Материалом для исследования в этом блоке работ служила остаточная пуповинная кровь (ОПК), полученная сразу после пересечения пуповины, а также венозная кровь, взятая в ранний неонатальный период - через 7 ч и 7 суток после рождения. В этом блоке были оценены показатели кислотно-основного состояния новорожденных в динамике, морфологические характеристики (изменение формы и размера эритроцитов, изменения цитоскелета и жесткость мембран эритроцитов) эритроцитов (**таблица 2**).

Таблица 2 - Основные клинические характеристики новорожденных, включенных во 2 блок работ ($M \pm \sigma$), Me (Q_1 ; Q_3)

Показатели	1Н группа n=7	2НГ группа n=20
Срок гестации, недель	33,1±0,8	34±0,5
Масса тела, гр	2001,4±158,9	2224,2±151,8
Шкала Апгар на 1-й мин., балл	6[5:8]	6[6:8]
Шкала Апгар на 5-й мин., балл	7[6:8]	7[6:9]
Мальчики/девочки	3/4	11/9

Работа проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с одобрением комиссии по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта: №1 от 28.02.2020 г.

Критерии включения в исследование: новорожденные в сроке гестации 32 - 42 недели с признаками перинатальной гипоксии при рождении и в ранний неонатальный период; нормальные значения параметров кислотно-основного состояния, определяемые в пуповинной крови новорожденных (в частности, рН - 7,35 - без гипоксии); рН<7,35 (для новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию).

Критерии исключения: врождённые пороки развития у новорождённого; онкологические, аутоиммунные, инфекционные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости у матери. Новорожденные, включенные в исследование, не получали препараты, которые могли бы повлиять на количественные и качественные характеристики эритроцитов.

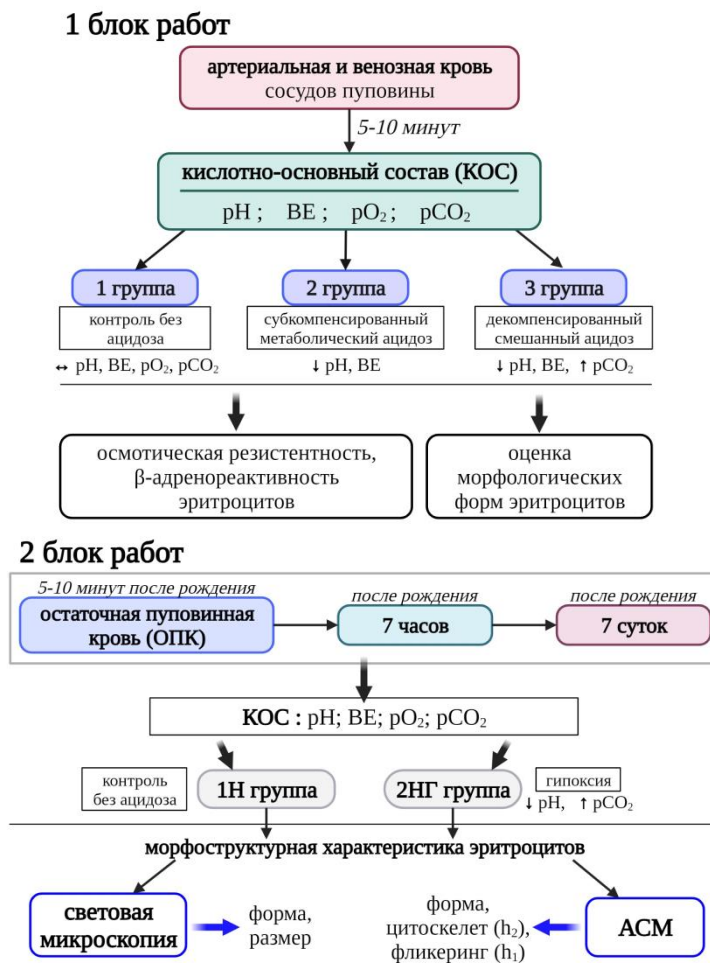


Рисунок 1 - Дизайн исследования 1 и 2 БЛОКОВ РАБОТ

Определение кислотно-основного состояния крови новорожденных (рН, VE, pCO₂, содержание HCO₃⁻) осуществляли с помощью биохимического анализатора EasyStat, (Medica, США). Исследование адренореактивных свойств эритроцитов определяли по методу Р. И. Стрюк и И. Г. Длусской с использованием наборов «Бета-АРМ-Агат» [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003]. Подсчет ретикулоцитов проводили в мазках. Для выявления зернисто-сетчатой субстанции эритроцитов в крови сосудов пуповины использовали метод окраски в пробирке [Кост Е.А., 1975]. Результаты выражали в %. Подсчет нормобластов проводили в мазках, с одновременным подсчетом лейкоцитарной формулы, результаты выражали в %. Анализ морфологических характеристик эритроцитов осуществляли в ОПК, через 7 ч и 7 суток после рождения. Подготовленные образцы анализировали с помощью светового (ZEISS Primo Star iLED; Carl Zeiss, Германия) и атомно-силового (АСМ NTEGRA Prima; NT-MDT SpectrumInstruments, Россия) микроскопов. Параметры пространственных масштабов, оцениваемые

атомно-силовой микроскопией, были выбраны в соответствии с естественными структурами мембран эритроцитов. Статистический анализ полученных данных проводили с применением программы GraphPad Prism 9.3.1. Результаты АСМ анализировали с использованием стандартной программы OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA (США)).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важную роль в оценке состояния новорожденного играют газовый состав и кислотно-основное состояние крови [Lindroos L. et al., 2018]. Согласно полученным нами данным, у детей 2 группы определялся субкомпенсированный метаболический ацидоз, тогда как у новорожденных группы 3 был диагностирован смешанный декомпенсированный ацидоз (рисунок 2).

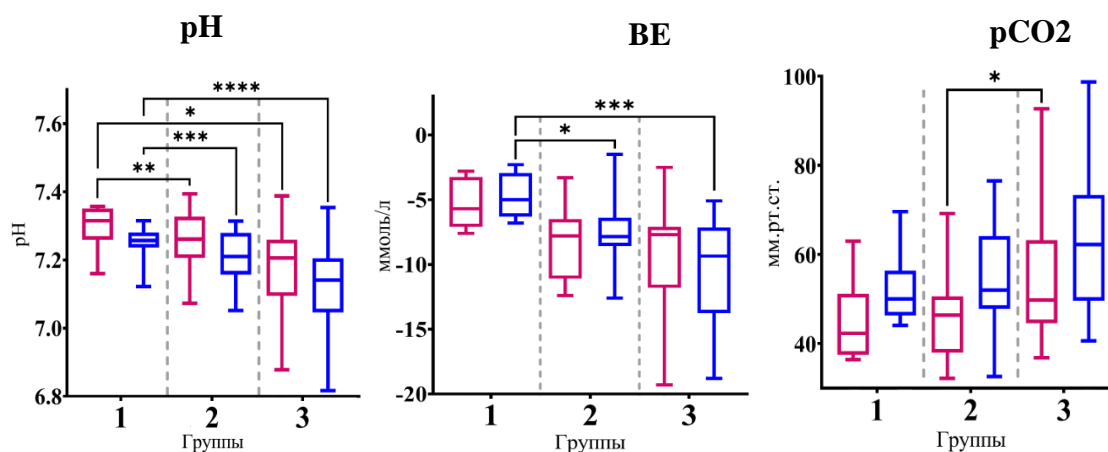


Рисунок 2 - Уровень pH, VE и pCO₂ в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

*Примечание: здесь и на рисунках 3 и 4: * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; **** - p<0,0001 - уровни значимости при сравнении групп*

Важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции функций организма в норме, а также при развитии гипоксии, нарушениях гомеостаза и др., в том числе у новорожденных, является симпатoadреналовая система. Согласно данным литературы, по уровню адренореактивности эритроцитов можно судить о развитии стрессовой ситуации в организме, которая возникает в процессе его адаптации к новым экстремальным условиям среды [Гарганеева А. А. и др., 2020]. Нами была выявлена высокая вариабельность уровня адренореактивности эритроцитов у новорожденных с различной степенью компенсации ацидоза (рисунок 3). Самые низкие показатели β-

адренореактивности эритроцитов, определяемые в венозной и артериальной крови сосудов пуповины, регистрировались в 1 группе новорожденных без гипоксии (**рисунок 3**). У них регистрировалась повышенная осмоустойчивость эритроцитов (низкая степень гемолиза) и функциональная активность мембраны. Т.е., иными словами, для детей 1 группы была характерна высокая адренореактивность организма, которая характеризовалась повышенной чувствительностью адренорецепторов клеточных мембран к увеличению уровня катехоламинов, при этом целостность клеточных мембран эритроцитов сохранялась [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003].

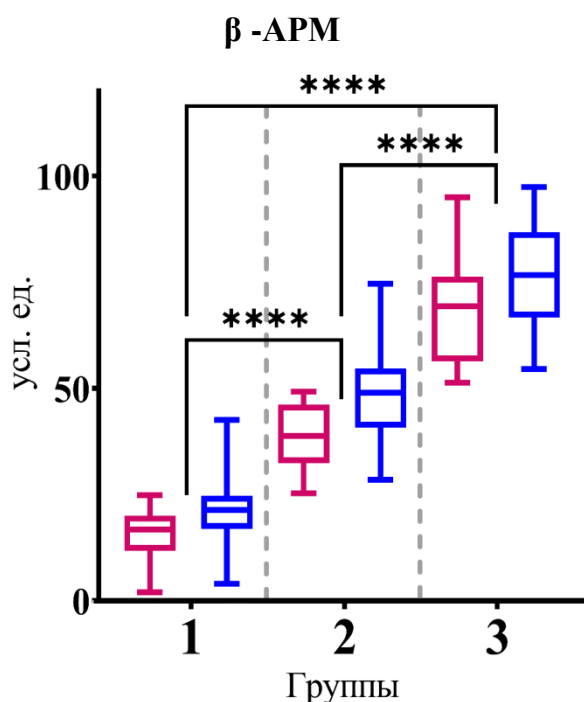


Рисунок 3 - Значения β -адренореактивности (усл. ед.) эритроцитов (β -АРМ), определяемой в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

Во 2-ой группе отмечалось увеличение показателя β -адренореактивности эритроцитов (**рисунок 3**), который, по принципу биологической обратной связи, характеризовал снижение системного показателя адренореактивности организма - при умеренном увеличении содержания катехоламинов. В 3 группе детей с глубокими нарушениями кислотно-основного состояния, обусловленных более выраженным дефицитом буферных оснований, повышением парциального давления углекислого газа, его накоплением и низкими показателями pH [Кирияков К. С. и др., 2018; Приходько А. М., Баев О. Р., 2019], регистрировались более

высокие цифры β -адренореактивности эритроцитов (рисунок 3), что характеризовало низкую адренореактивность организма. Резюмируя вышесказанное, нарушения метаболических процессов (изменение показателей КОС), выявленные нами у новорожденных, сопровождались активацией симпатoadреналовой системы разной степени выраженности. Выявленные нами корреляции свидетельствуют о четкой взаимосвязи показателей кислотно-основного состояния новорожденных со значениями β -адренореактивности эритроцитов и их взаимном влиянии друг на друга, т.е. чем ниже степень компенсации ацидоза (т.е. величина рН), тем выше β -адренореактивность эритроцитов, и, соответственно, ниже адренореактивность организма (рисунок 4).

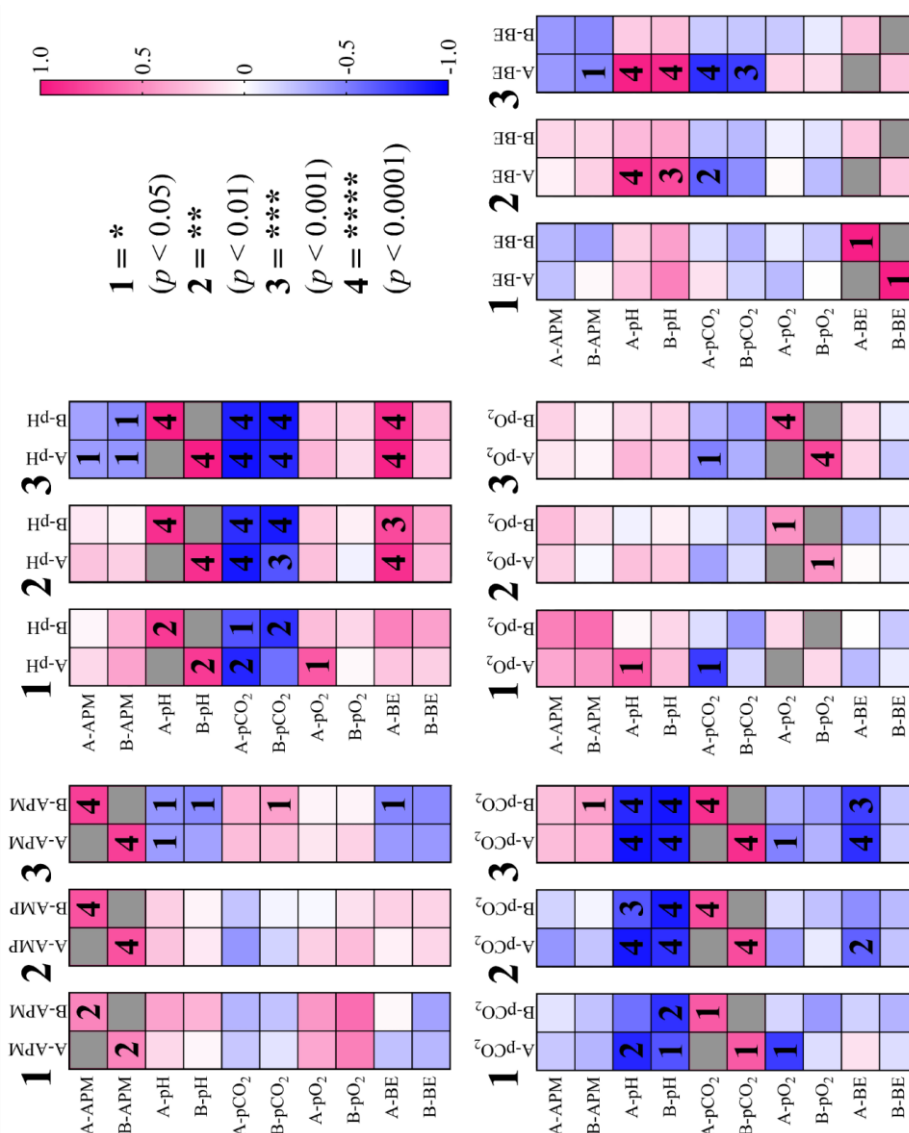


Рисунок 4 - Корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию

Результаты оценки молодых форм эритроцитов в артериальной и венозной крови сосудов пуповины представлены на **рисунке 5**. В группах 2 и 3 изучаемые показатели значительно превышали значения, полученные в группе 1; и не отличались достоверно между собой (**рисунк 5**). Предполагаемым механизмом повышения числа ретикулоцитов и нормобластов в крови сосудов пуповины у детей с гипоксией (с разной степенью компенсации ацидоза) может быть спазм сосудов костного мозга, опосредованный активацией симпатoadреналовой системы и выбросом катехоламинов, в том числе, во время родов. Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость содержания ретикулоцитов в артериальной крови пуповины у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию с рН (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,831$; $p < 0,05$) и уровнем значений β -адренореактивности эритроцитов (коэффициент регрессии: $r^2 = 0,792$; $p < 0,05$).

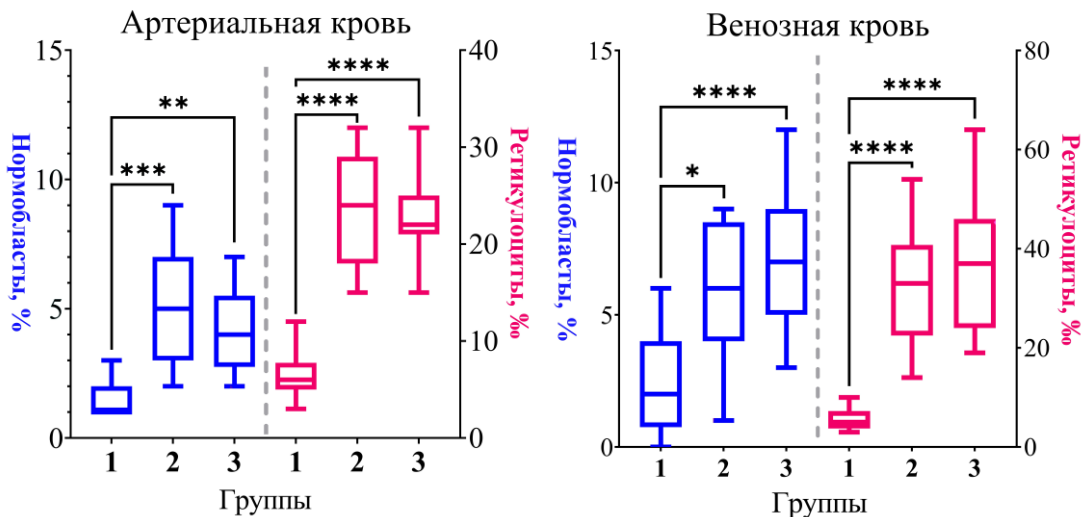


Рисунок 5 - Содержание нормобластов (%) и ретикулоцитов (%) в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

Второй блок нашего исследования был посвящен оценке морфологических изменений эритроцитов, опосредованных перинатальной гипоксией. Изменения функциональных свойств эритроцитов под влиянием гипоксии приводят к повышенной деформируемости и проницаемости их мембран, что проявляется снижением газотранспортной функции красных клеток [Мороз В. В. и др., 2012]. Учитывая выявленные нами изменения параметров кислотно-основного состояния (**рисунк 6**), у детей 2НГ группы (гипоксанты) был диагностирован субкомпенсированный смешанный ацидоз, свидетельствующий о перенесенной ими перинатальной гипоксии.

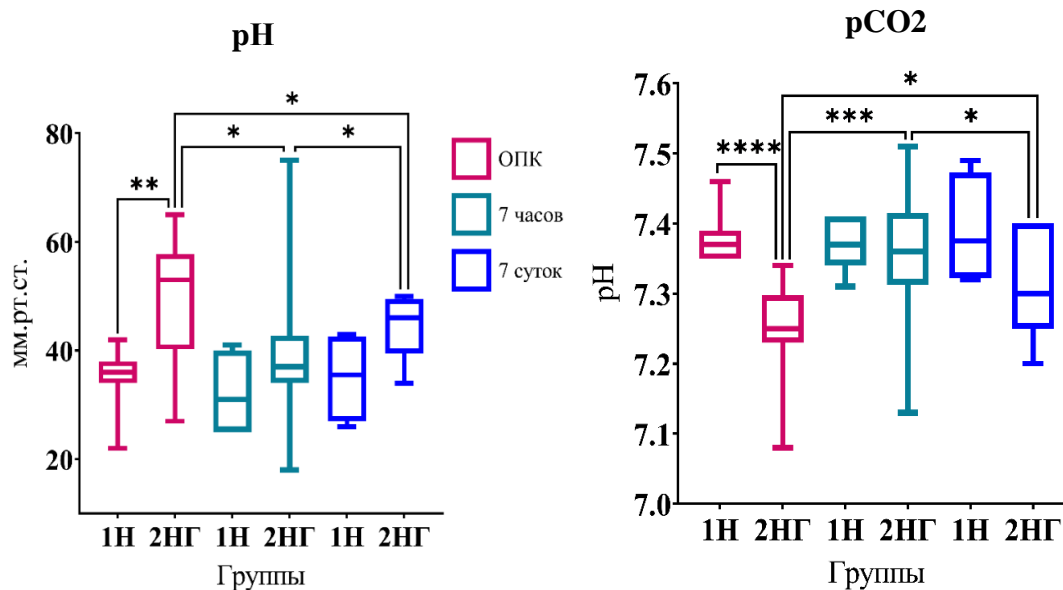


Рисунок 6 - Показатели pH и pCO₂ у новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования
Примечание: здесь и на рисунках 6,7,8 - * - p<0,05; ** - p<0,01; *** - p<0,001; **** - p<0,0001 - уровни значимости при сравнении групп

Немаловажной частью анализа крови является информация о размере эритроцитов. Нами было выявлено достоверное снижение количества нормоцитов в ОПК детей гипоксантов, в сравнении с показателями 1Н группы (**рисунок 7**). Через 7 суток содержание нормоцитов в венозной крови детей 2НГ группы возрастало по сравнению с цифрами в ОПК, однако по-прежнему было значимо ниже (p<0,05) значений детей 1Н группы (**рисунок 7**). Вероятно, что под влиянием гипоксии, эритроциты стремятся компенсаторно изменить форму и размер, и, тем самым, увеличить свою поверхность для более эффективного захвата кислорода из плазмы с низким его содержанием [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007].

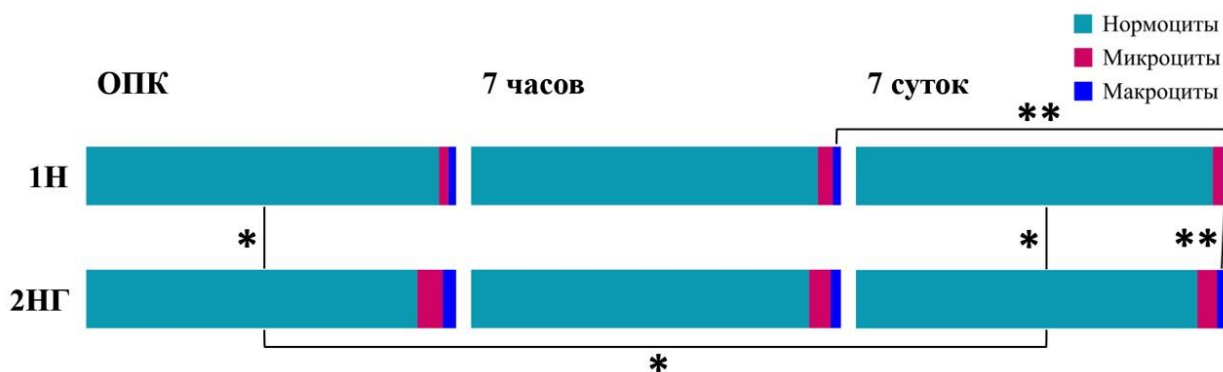


Рисунок 7 - Распределение эритроцитов по размеру (анизоцитоз) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, в разные сроки исследования

Методом атомно-силовой микроскопии было выявлено, что основной морфологической формой эритроцитов в ОПК новорожденных являются planoциты (**рисунок 8**). У детей 2НГ группы относительное количество planoцитов, определяемое в ОПК, было достоверно ниже аналогичных значений детей 1Н группы ($p < 0,05$). Напротив, содержание стоматоцитов и кодоцитов у гипоксантов было выше ($p < 0,05$) (**рисунок 8**). Через 7 ч после рождения у детей гипоксантов сохранялся статистически значимый стоматоцитоз ($p < 0,05$) (**рисунок 8**).

На 7-е сутки жизни, в момент окончания раннего неонатального периода, у гипоксантов (по сравнению с ОПК и сроком 7 ч после рождения) значимо уменьшалось число planoцитов, на фоне увеличения содержания стоматоцитов и дискоцитов. Аналогичные изменения происходили и в морфологическом составе эритроцитов венозной крови детей 1Н группы: снижение числа planoцитов, и, напротив, рост содержания стоматоцитов ($p < 0,05$). Таким образом, у детей обеих групп к концу 7-х суток - planoциты и стоматоциты становятся основными формами эритроцитов ($p < 0,05$) (**рисунок 8**). Однако стоит отметить, что стоматоцитоз был более выражен в венозной крови детей гипоксантов, тогда как число planoцитов было ниже аналогичных значений, полученных у детей 1Н группы (**рисунок 8**).

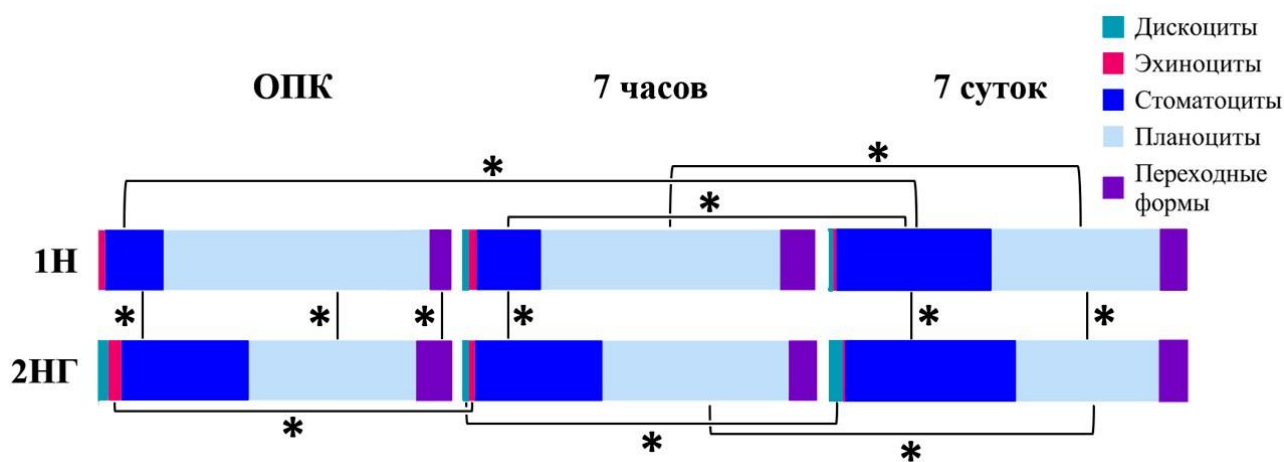


Рисунок 8 - Морфологические формы эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее на разных сроках исследования

Далее, с применением метода атомно-силовой микроскопии нами были получены количественные характеристики (высоты h_1 и h_2) поверхности мембраны эритроцитов (**рисунок 9**). Установлено, что у детей гипоксантов - показатель h_1 (мембранный фликеринг) эритроцитов из ОПК был значимо

выше значений 1Н группы ($p < 0,05$). Через 7 ч после рождения в венозной крови обеих групп детей происходил рост значений h_1 ($p < 0,05$), в среднем, в 1,4 раза ($p < 0,05$). На 7-е сутки у новорожденных обеих групп значения высоты h_1 не изменялись по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина в 2НГ группе была статистически значимо выше, чем в 1Н группе ($p < 0,05$).

При анализе показателя h_2 (рисунок 9), отражающего изменение цитоскелета эритроцитов, нами было установлено, что у детей гипоксантов его величина (эритроциты из ОПК) была выше, чем в 1Н группе ($p < 0,05$). На 7-е сутки у пациентов обеих групп показатель h_2 не изменялся по сравнению с предыдущим периодом исследования, но его уровень в группе гипоксантов был значимо выше ($p < 0,05$) (рисунок 9). Мы предполагаем, что выявленные изменения обусловлены влиянием ацидоза на мембрану эритроцитов. Следует отметить, что к окончанию раннего неонатального периода снижения величин h_1 и h_2 не происходило. Подтверждением вышесказанному явились обнаруженные нами корреляционные взаимосвязи величин h_1 и h_2 со значениями рН в обеих группах на разных сроках исследования (с h_2 - $r = 0,55$, $p < 0,05$ - для 2НГ группы в ОПК; с h_2 - $r = -0,45$, $p < 0,05$ и $r = -0,53$, $p < 0,05$ - для 1Н группы и 2НГ группы, соответственно).

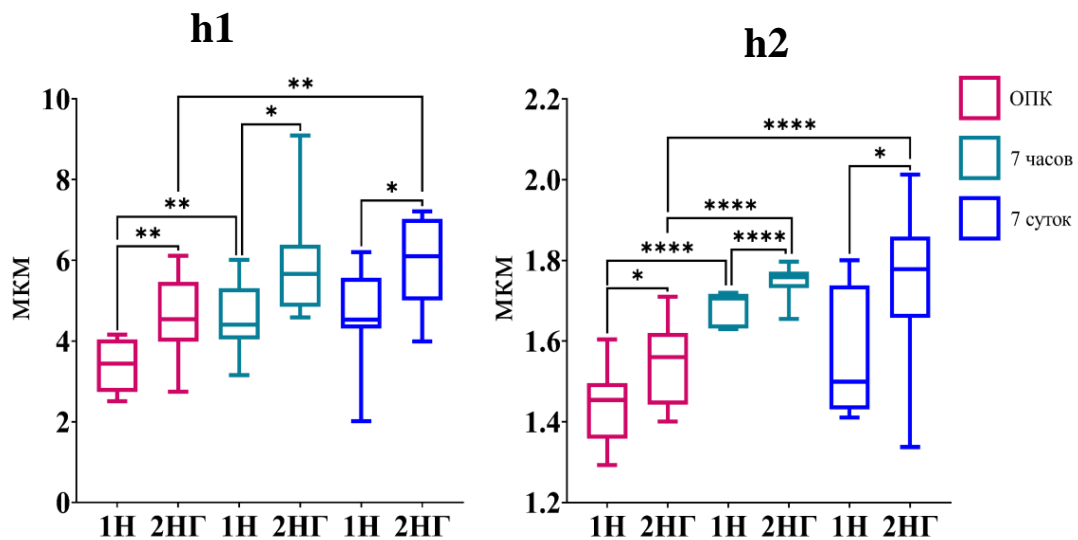


Рисунок 9 - Гистограммы высот h_1 , и h_2 поверхности мембраны эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования

Резюмируя вышесказанное, течение раннего неонатального периода у новорожденных обеих групп характеризовалось выраженным пойкилоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов, которые

проявлялись изменениями высот h_1 и h_2 , отражающих мембранный фликеринг и изгибы цитоскелета, выраженными, в большей степени у детей, перенесших перинатальную гипоксию. Такая приспособительная реакция, вероятно, обеспечивает сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при воздействии внутриутробной перинатальной гипоксии изменение функционального состояния эритроцитов происходит уже внутриутробно (**рисунок 10**). При гипоксии происходит активация симпатoadреналовой системы, увеличение синтеза катехоламинов, что влечет за собой нарушение функциональной активности эритроцитов, а также структуры их мембраны и изменение морфологии, появление молодых форм эритроцитов. Выявленные нами изменения адренореактивности эритроцитов свидетельствуют о влиянии степени перинатальной гипоксии на гомеостаз, концентрацию вырабатываемых катехоламинов, чувствительность эритроцитов и нормальное функциональное состояние адренорецепторов (**рисунок 10**).

Нестабильность адренореактивности организма и большая вариабельность показателей β -адренореактивности эритроцитов отмечена на протяжении всего интранатального периода. Ацидоз, как проявление перинатальной гипоксии, также оказывает воздействие на мембрану эритроцитов новорожденных. Обнаружение адаптационных изменений в виде изменения высот и пространственных периодов поверхностей мембран эритроцитов, на наш взгляд, является ответной реакцией на возникшие изменения кислотно-основного состояния крови (**рисунок 10**).

Вероятно, стремление клеток сохранить свои функциональные способности является приспособительной реакцией. Течение раннего периода адаптации у детей, перенесших гипоксию, характеризуется большой вариабельностью морфологических форм, уменьшением количества платоцитов и появлением большого количества измененных и переходных форм эритроцитов. Выявленные изменения свидетельствуют об активности процессов на мембране эритроцитов.

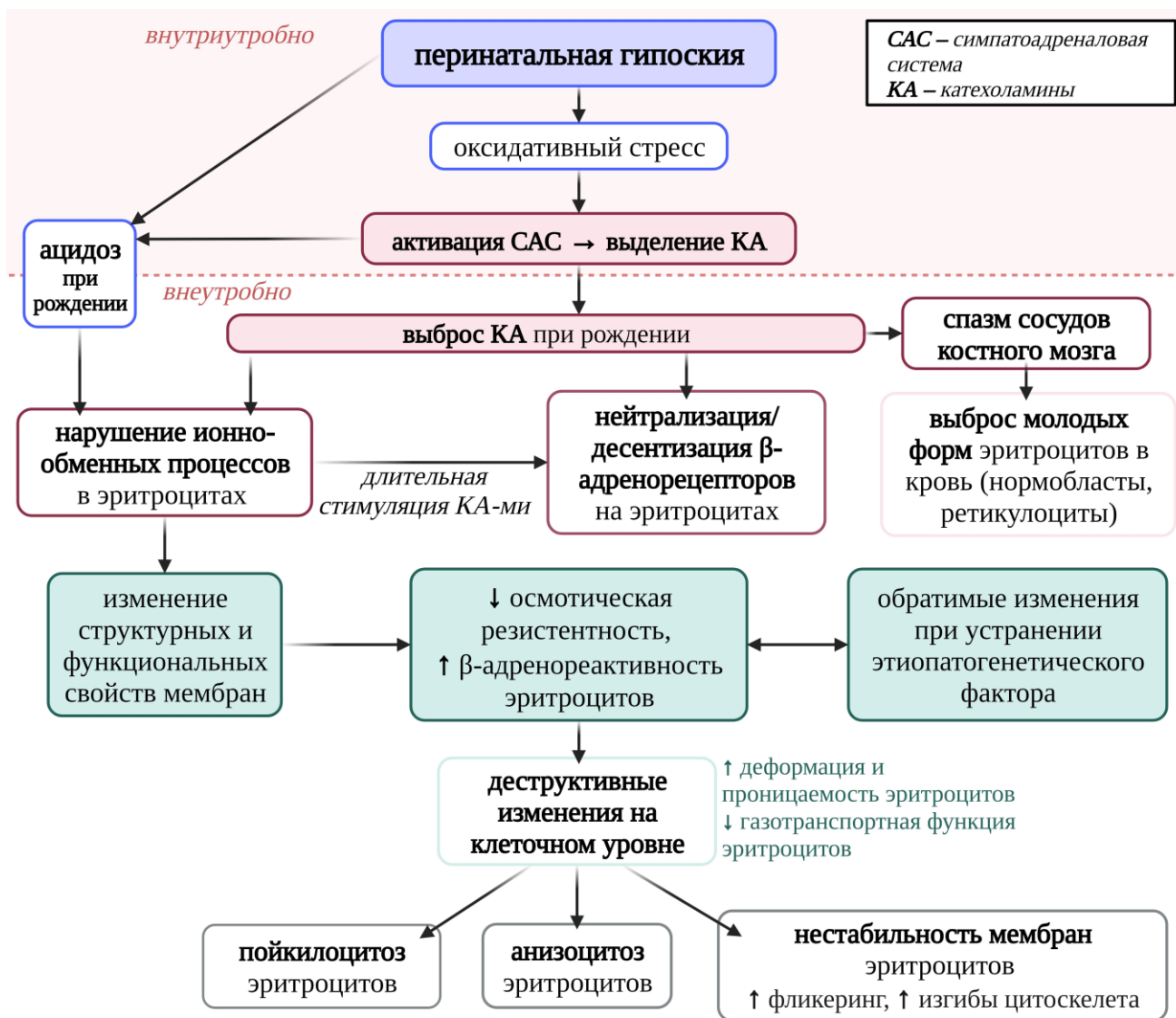


Рисунок 10 - Схема, отражающая изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов крови новорождённых под действием перинатальной гипоксии

ВЫВОДЫ

1. В артериальной и венозной крови сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, высокая (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии) β-адренореактивность эритроцитов, косвенно характеризующая активацию симпатоадреналовой системы организма, в целом, зависит от степени компенсации ацидоза, выявленного при рождении.

2. Содержание молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов) в артериальной крови, полученной из сосудов (вена) пуповины у новорожденных, напрямую зависит от величины рН и позитивно коррелирует с уровнем β -адренореактивности эритроцитов.

3. В остаточной пуповиной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, регистрируется снижение (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии) количества нормальных форм эритроцитов (платоцитов), и, напротив, повышение – стоматоцитов и переходных форм, отсутствующих в классификации (кодоциты). На фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови, выявленный пойкилоцитоз эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, сохраняется в течение всего раннего неонатального периода (7 суток после рождения).

4. В остаточной пуповиной крови новорожденных с признаками перинатальной гипоксии, регистрируется более выраженный (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) анизоцитоз эритроцитов (уменьшение числа нормоцитов). Выявленные изменения у данной категории детей сохраняются через 7 суток после рождения, на фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови.

5. У новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, эритроциты остаточной пуповиной крови, а также венозной крови, полученной через 7 часов и 7 суток после рождения, характеризуются более выраженной (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот h_1 (мембранный фликеринг) и h_2 (цитоскелет, спектринный матрикс).

6. Течение раннего неонатального периода (до 7 суток после рождения) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, в целом, характеризуется пойкилоцитозом, анизоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов (изменения высот h_1 и h_2 , отражающих мембранный фликеринг и изгибы цитоскелета), выраженными, в большей степени у детей с гипоксией.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Петрова Н.Б., Пашнина Е.Н., Денисенко О.Д. Адренореактивность эритроцитов человека в разные сезоны года // **В мире научных открытий**. - 2012. - Т. 26, №2. - С. 95-97 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ -0,227).
2. Денисенко О.Д. Показатели адренореактивности эритроцитов артериальной и венозной крови новорожденных детей в условиях Крайнего

Севера // «Адаптация человека на Севере: медико-биологические аспекты»: материалы Всероссийской молодежной научно-практической конференции. - 2012. - С.58-60.

3. **Денисенко О.Д.** Оценка общего состояния и адренореактивности эритроцитов новорожденных детей в условиях Крайнего Севера // «Молодежь и наука на Севере»: материалы XVII Всероссийской молодежной научной конференции. - 2013. - С. 174-175.
4. **Денисенко О.Д.,** Петрова Н.Б. Адренореактивность эритроцитов из артериальной и венозной крови детей при рождении в условиях Крайнего Севера // «Современная наука: теоретический и практический взгляд»: материалы Международной научно-практической конференции. - 2013. - С. 179-181.
5. **Денисенко О.Д.,** Иржак Л.И., Петрова Н.Б. Адренореактивность эритроцитов и кислотно - основные свойства артериальной и венозной крови новорожденных детей в условиях Крайнего Севера // **В мире научных открытий.** - 2014. - Т. 50, № 2. С.85-91. (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ -0,257).
6. **Денисенко О.Д.,** Иржак Л.И. Осмотическая резистентность эритроцитов из артериальной и венозной крови новорожденных детей // «Актуальные проблемы биофизической медицины»: тезисы VIII Международного симпозиума. - 2014. - С. 21.
7. **Денисенко О. Д.,** Петрова Н.Б. Показатели гемоглобина и кислотно-основное состояние крови новорожденных детей в условиях Крайнего Севера // «Биологические и медицинские аспекты экологии человека»: сборник статей Всероссийской научной конференции. - 2014. - С 14-17.
8. Петрова Н.Б., **Денисенко О.Д.** Адренореактивность организма человека на Севере // 4.1. глава: Разнообразие, структура и функционирование биологических систем на Севере: монография / под ред. Загировой С.В. и др. – Сыктывкар: Изд-во СыктГУ им. Питирима Сорокина, 2015. - Глава 4. 1. - С. 172-185.
9. **Денисенко О.Д.,** Петрова Н.Б. Адренореактивность эритроцитов крови новорожденных детей в условиях Крайнего севера // «Физиологические механизмы адаптации и экологии человека»: материалы III Международной научно-практической конференции. - 2014. - С. 106-109.
10. **Денисенко О.Д.,** Иржак Л.И. Адренореактивность эритроцитов новорожденных детей в условиях Крайнего Севера // материалы V-ой Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека». - 2014. - С. 63-64.
11. **Денисенко О.Д.** Содержание нормобластов и ретикулоцитов из крови детей, рожденных в Заполярье // «Медико-физиологические проблемы

экологии человека»: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием. - 2018. - С. 96-97.

12. **Денисенко О.Д.** Осмотическая резистентность эритроцитов из крови новорожденных детей в Заполярье // Проблемы гипоксии: сборник трудов ГОУ ВПО "Сыктывкарский гос. ун-т", лаб. проблем гипоксии. - 2018. - С. 56-58.

13. **Денисенко О.Д.,** Перепелица С.А., Литвинова Л.С. Показатели адренореактивности и рН крови у доношенных новорожденных // «Жизнеобеспечение при критических состояниях»: материалы XXIV Всероссийской конференции с международным участием. - 2022. - С. 95.

14. **Денисенко О.Д.,** Перепелица С.А., Литвинова Л.С. Влияние метаболического ацидоза на адренореактивность эритроцитов у новорожденных // **Цитокины и воспаление.** - 2022. - Т. 19, № 1-4. - С. 28-33 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,341).

15. **Денисенко О.Д.,** Перепелица С.А., Литвинова Л.С. Влияние перинатальной гипоксии на морфологический состав эритроцитов у новорожденных // "Актуальные вопросы медицины критических состояний»: сборник тезисов V всероссийского конгресса с международным участием. - 2023. - С. 22.

16. **Денисенко О.Д.,** Перепелица С.А., Сергунова В.А., Ляпунова С.С., Литвинова Л.С. Морфологические изменения эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию // **Цитология.** - 2023. - Т. 65, № 4. - С. 384-394 (журнал ВАК, импакт-фактор РИНЦ - 0,521).

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АРМ- адренореактивность

АСМ - атомно-силовая микроскопия

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

ОПК - остаточная пуповинная кровь

ОРЭ - осмотическая резистентность эритроцитов

КОС - кислотно-основное состояние

САС- симпатoadреналовая система

BE - буферные основания

НСО₃⁻ - концентрация бикарбоната

pCO₂ - парциальное давление углекислого газ

pO₂ - парциальное давление кислорода

Денисенко Оксана Дмитриевна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ
КРОВИ У НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ
ГИПОКСИЮ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

1.5.22. Клеточная биология

Подписано в печать __. __.2023
Формат 60x90 1/16. Усл. печ. листов 1,5
Тираж 100 экз. Заказ № _____

Отпечатано в Полиграфическом центре
Балтийского федерального университета им. И. Канта
236001, г. Калининград, ул. Гайдара, 6