

АНТЕНАТАЛЬНЫЕ ГЕМОГЛОБИНЫ КАК МАРКЕРЫ ВНУТРИУТРОБНОЙ ГИПОКСИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ

Кривенцев М.Ю.¹, Кривенцев Ю.А.¹, **Бахмутова Л.А.¹**

¹ФГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет, Министерство здравоохранения РФ», Астрахань, e-mail: agma@astranet.ru

Целью исследования было провести иммунохимическую индикацию примитивного и плодового типов гемоглобина в пуповинной крови новорожденных с тяжелой степенью внутриутробной гипоксии при сопутствующих заболеваниях, для анализа роли этих белков как маркеров гипоксии. В ходе работы проведено обследование 497 образцов гепаринизированной пуповинной крови новорожденных детей. Количественный иммунохимический анализ содержания фетального гемоглобина в клиническом материале выявил статистически значимое повышение средних значений этого протеина у новорожденных детей с тяжелой степенью гипоксии ($1433,6 \pm 71,5$ мг/л против $1093,8 \pm 62,8$ мг/л у здоровых детей). Исследование уровня фетального гемоглобина по гендерному признаку выявило статистически значимо более высокие его значения у девочек ($2306,9 \pm 92,3$ мг/л), чем у мальчиков ($1422,6 \pm 51,3$ мг/л). Выявлена высокая положительная корреляция между средней концентрацией фетального гемоглобина в крови и степенью тяжести гипоксии новорожденных ($r = 0,88$). Отмечено выраженное повышение уровня фетального гемоглобина при задержке внутриутробного развития ($1852,1 \pm 97,3$ мг/л). Качественный иммунохимический анализ эмбрионального гемоглобина в клиническом материале показал наличие этого протеина в крови у 29,4% новорожденных детей с тяжелой внутриутробной гипоксией. При этом у детей женского пола он регистрировался в 1,9 раза чаще, чем у пациентов мужского пола. Средняя концентрация эмбрионального гемоглобина в клинической выборке с положительной регистрацией этого протеина составила $3,80 \pm 0,22$ мг/л. Полученные результаты свидетельствуют о диагностической ценности эмбрионального и фетального гемоглобинов как маркеров внутриутробной гипоксии новорожденных.

Ключевые слова: фетальный гемоглобин, эмбриональный гемоглобин, гипоксия новорожденных, недоношенность, иммунохимия, диагностика.

ANTENATAL HEMOGLOBINS AS MARKERS OF INTRAUTERINE HYPOXIA IN NEWBORN CHILDREN

Kriventsev Y.A.¹, Kriventsev M.Y.¹, **Bachmutiva L.A.**

¹Astrachan State Medical University, Astrachan, e-mail: agma@astranet.ru

The aim of the study was to conduct an immunochemical indication of primitive and fetal types of hemoglobin in the umbilical cord blood of newborns with severe intrauterine hypoxia and concomitant diseases, to analyze the role of these proteins as markers of hypoxia. In the course of the work, 497 samples of heparinized umbilical cord blood of newborn children were examined. Quantitative immunochemical analysis of fetal hemoglobin content in clinical material revealed a statistically significant increase in the average values of this protein in newborns with severe hypoxia (1433.6 ± 71.5 mg/l versus 1093.8 ± 62.8 mg/l in healthy children). A study of the level of fetal hemoglobin by gender revealed statistically significantly higher values in girls (2306.9 ± 92.3 mg/l) than in boys (1422.6 ± 51.3 mg/l). A high positive correlation was found between the average concentration of fetal hemoglobin in the blood and the severity of hypoxia in newborns ($r = 0.88$). There was a marked increase in the level of fetal hemoglobin with intrauterine development delay (1852.1 ± 97.3 mg/l). Qualitative immunochemical analysis of embryonic hemoglobin in clinical material showed the presence of this protein in the blood of 29.4% of newborns with severe intrauterine hypoxia. At the same time, it was registered in female children 1.9 times more often than in male patients. The average concentration of embryonic hemoglobin in the clinical sample with positive registration of this protein was 3.80 ± 0.22 mg/l. The results obtained indicate the diagnostic value of embryonic and fetal hemoglobins as markers of intrauterine hypoxia of newborns.

Keywords: fetal hemoglobin, fetal hemoglobin, neonatal hypoxia, prematurity, immunochemistry, diagnostics.

Как известно, неблагоприятная демографическая ситуация в современной России приобретает масштабы острейшей проблемы не только медико-социального, но и

общегосударственного характера, что неоднократно озвучивалось высшими лицами руководства нашего государства. Тот факт, что уже в течение трех десятилетий население РФ не может достигнуть уровня 1993 года, говорит о критическом состоянии здоровья страны на популяционно-национальном уровне [1].

Одним из ключевых условий решения вышеназванной проблемы, безусловно, являются медико-профилактические мероприятия, направленные на охрану здоровья женщин репродуктивного возраста и детей. В частности, мониторинг совокупного соматического статуса полиорганизменного репродуктивного комплекса: беременная-плод, а также в дальнейшем - новорожденного ребенка (как и матери), является одной из фундаментальных медико-социальных задач, направленных на оптимизацию демографического профиля России XXI века. Внутриутробная гипоксия плода и гипоксия новорожденных является одной из основных причин тяжелых осложнений состояния ребенка и ранней его инвалидизации в родовом, послеродовом и раннем грудном периодах. Успешное предотвращение подобных состояний предполагает поиск новых адекватных биохимических маркеров гипоксемии для своевременной адекватной диагностики гипоксических состояний [2-4].

Особый интерес в этом плане представляют стадиоспецифические антенатальные изоформы гемоглобиновой системы, а именно: плодовой (фетальный, HbF) и примитивный (эмбриональный, HbE) гемоглобины. При хроническом устойчивом снижении парциального давления кислорода, приводящем к гипоксии на тканевом уровне, в крови плода отмечается рост концентрации HbF, что, по мнению ряда авторов, объясняется непосредственным воздействием выраженной длительной гипоксемии на индукцию генов названного антенатального типа гемоглобина и, соответственно, активации его синтеза [5-7]. Данный феномен, очевидно, носит компенсаторно-адаптивный характер, поскольку важнейшим свойством HbF является более выраженная тропность к O₂, нежели у гемоглобина взрослого (HbA₁). Это важнейшее качество позволяет тетрамерам HbF энергично отнимать кислород от молекул HbA₁ материнской крови и обеспечивать тем самым адекватную оксигенацию тканей эмбриона или плода [6-8].

Замечательным является тот факт, что у HbE, как и у HbF, сродство к кислороду значительно выше, чем у гемоглобинов взрослого человека.

Основываясь на приведенных выше фактах, можно сделать логичное предположение о вовлечении в процесс компенсации тяжелой внутриутробной гипоксии не только HbF, но и HbE. Поэтому исследование примитивного гемоглобина, безусловно, представляет интерес как в теоретическом, так и в практическом отношении, поскольку в перспективе позволит понять механизмы, регулирующие пролиферацию и дифференцировку кроветворных клеток,

выявить компенсаторные возможности организма, что дает основу для разработки клинико-диагностических алгоритмов при гипоксических состояниях.

В свете вышесказанного экспериментальное подтверждение диагностической значимости HbE и HbF, как маркеров гипоксии, и создание новых надежных, точных и специфичных диагностических тестов на эти белки является актуальной задачей.

Следует отметить, что исследования по разработке оригинальных точных и селективных способов определения HbF, а также (в меньшей степени) HbE ведутся уже не одно десятилетие [7; 9; 10].

Цель исследования: иммунохимическая индикация примитивного и плодового типов гемоглобина в пуповинной крови новорожденных с тяжелой степенью внутриутробной гипоксии при сопутствующих заболеваниях, для анализа роли этих белков как маркеров гипоксии.

Материал и методы исследования

Сбор клинического материала проводился в ГБУЗ «Клинический родильный дом имени Ю.А. Пасхаловой» г. Астрахани.

Клинический анализ изучаемых нозологических форм проводился при участии квалифицированных врачей-акушеров.

Объектом исследования служила пуповинная гепаринизированная кровь новорожденных детей. Всего было обследовано 497 образцов пуповинной крови, полученной от новорожденных детей с письменного согласия их матерей (табл. 1).

Таблица 1

Перечень материала по группам

Исследуемый материал (пуповинная кровь) по нозологии	Число обследованных новорожденных		
	Всего	Мужского пола	Женского пола
Здоровые дети	84	43	41
Внутриутробная гипоксия легкой степени	66	34	32
Внутриутробная гипоксия средней степени	79	40	39
Внутриутробная гипоксия тяжелой степени (ВГТС)	207	106	101
ВГТС в сочетании с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР)	61	31	30
ВСЕГО	497	254	243

Степень тяжести гипоксического состояния оценивалась квалифицированными неонатологами с использованием методик шкал Silverman и Downes, рентгенологических данных, специальных лабораторных исследований, а также общей оценки объективного состояния новорожденного.

Анализ изучаемых протеинов проводили на базе научной лаборатории кафедры биологической химии и КЛД ФГБОУ ВРО «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Концентрацию HbF в исследуемых пробах определяли по авторской методике путем разгона в агаровом геле ракетным электрофорезом биоматериала, обработанного раствором додецилсульфата натрия (ДСН) (патент № 2310204. от 10.11.2007) [9; 10]; порог чувствительности метода $1,71 \pm 0,29$ мг/л. Индикацию HbE проводили полуколичественной методикой иммунопреципитации по Оухтерлони; порог чувствительности тест-системы – $3,75 \pm 0,05$ мг/л. Количественное определение HbE осуществляли путем радиальной иммунодиффузии по Манчини; порог чувствительности – $2,28 \pm 0,04$ мг/л. Для количественного и качественного анализа применяли моноспецифические антисыворотки на HbE и HbF, полученные самостоятельно. Иммунохимические тесты и соответствующие калибровочные кривые по вышеописанным методикам смоделированы самостоятельно [7; 9; 10].

Статистический анализ результатов работы проводили при помощи лицензионной программы Excel-2016 с использованием общепринятых показателей: средней (M), среднего отклонения (m), значимости соизмеримых различий (p), критерия Стьюдента (t), показателя дисперсии F и корреляционного анализа Пирсона (коэффициент корреляции - r).

Результаты исследования и их обсуждение

Данное исследование проводилось с 2019 по 2024 г., но следует указать, что приводимые данные являются совокупным итогом анализа проводимых ранее работ [7; 10], расширенных и дополненных современными результатами.

А. Определение HbF

Развернутое количественное иммунохимическое определение HbF в клиническом материале показало значительное статистически значимое отклонение средних значений концентраций HbF в крови новорожденных в исследуемых группах по отношению к группе сравнения, а именно: ВГТС - повышение на 30,23%, ВГТС в сочетании с ЗВУР - повышение на 70,46%, и менее выраженное, но значимое повышение уровня HbF при внутриутробной гипоксии средней тяжести (табл. 2). Статистическая значимость изменения среднего уровня HbF при внутриутробной гипоксии легкой степени является сомнительной.

Таблица 2

Результаты количественного определения HbF у новорожденных

Исследуемые группы	n	Концентрация HbF (мг/л)	Коэффициент дисперсии (F)	Критерий Стьюдента (t)
Здоровые дети	84	1093,8±62,8	3,91	
Внутриутробная гипоксия легкой степени	66	1134±48,4	4,03	1,76 p>0,05
Внутриутробная гипоксия средней степени	79	1223±70,8	4,15	3,68 p<0,05
Внутриутробная гипоксия тяжелой степени	207	1433,6±71,5	5,19	4,51 p<0,05
ВГТС в сочетании с задержкой внутриутробного развития (ЗВУР)	61	1852,1±97,3	5,64	6,23 p<0,05

Межгрупповая степень свободы = 2.

Стандартное отклонение (σ) по генеральной совокупности 49,3.

На основе полученных данных впервые выявлена высокая положительная корреляция между средней концентрацией HbF в крови и степенью тяжести гипоксии новорожденных ($r = 0,88$).

Проведен гендерный анализ средних показателей HbF в исследуемой клинической выборке у новорожденных девочек и мальчиков (табл. 3).

Таблица 3

Средние показатели уровня HbF у новорожденных девочек и мальчиков

Исследуемые группы	Концентрация HbF (мг/л)		F	
	Пол		Пол	
	Мужской	Женский	Мужской	Женский
Здоровые новорожденные	1077,1±49,2 p<0,05	1211,4±75,0 p<0,05	4,68	3,84
Новорожденные с ВГТС	1422,6±51,3 p<0,05	2306,9±92,3 p<0,01	4,77	4,86

Межгрупповая степень свободы = 3.

Стандартное отклонение (σ) по генеральной совокупности 68,9.

Приведенные данные свидетельствуют о явной зависимости продукции HbF от пола ребенка, наиболее выраженной при внутриутробной гипоксии тяжелой степени. И если средние величины уровня HbF в крови у здоровых новорожденных женского пола превышают таковые у новорожденных мужского пола на 12,44%, то удельное преимущество

средних концентраций HbF у новорожденных женского пола в группе с гипоксией тяжелой степени составляет 64,44%.

Б. Определение HbE

Данные качественного иммунохимического тестирования 497 образцов клинического материала на HbE позволили показать, что этот самый ранний онтогенетический тип гемоглобина человека, как и следовало ожидать, не определяется в крови здоровых детей и пациентов с различными формами гипоксии новорожденных легкой и средней степени тяжести.

В крови детей с ВГТС положительные реакции на примитивный гемоглобин регистрировали в 29,4% случаев.

Проведен сравнительный иммунохимический анализ частоты определения HbE в крови новорожденных девочек и мальчиков. Следует отметить, что полученные результаты во многом сходны с таковыми по плодovому гемоглобину, а именно: в ходе данного исследования показана математически значимая разница частоты индикации HbE в крови новорожденных с ВГТС по гендеру: у детей женского пола этот показатель в 1,9 раза превышал таковой у детей мужского пола (табл. 4).

Таблица 4

Частота выявления HbE у новорожденных с ТВГ

Пол	Число обследованных	Число положительных тестов на HbE	Частота выявления (в %)
Мальчики	105	20	19,0
Девочки	99	40	40,4
Всего	204	60	29,4

Межгрупповая степень свободы = 2.

Коэффициент дисперсии (F) по генеральной совокупности 7,6.

Величина значимости различий в сопоставляемых выборках мальчиков и девочек была удовлетворительной ($p < 0,05$).

Определение *концентрации* HbE методом радиальной иммунодиффузии по Манчини проводилось только в исследуемых пробах с положительным тестом на этот протеин. Средняя концентрация примитивного гемоглобина в крови новорожденных с ВГТС с позитивным выявлением равнялась $3,80 \pm 0,22$ мг/л; среди них у новорожденных женского пола - $3,97 \pm 0,25$ мг/л; мужского - $3,64 \pm 0,17$ мг/л.

По мнению авторов, существенное повышение количества исследуемых гемопротеинов в пуповинной крови при ВГТС можно объяснить отмеченным ранее фактом: HbE и HbF, будучи стадиоспецифическими белками, работающими в антенатальном периоде развития человека, в условиях физиологической гипоксии плода (или эмбриона) имеют

большую тропность к O₂, чем гемоглобин взрослого. Именно это качество позволяет данным белкам извлекать кислород от материнского гемоглобина в тканях плаценты и успешно транспортировать его в ткани плода/эмбриона, обеспечивая адекватную оксигенацию. Как оказалось, описанное свойство HbE и HbF играет существенную биологическую роль оптимизации тканевого дыхания не только в условиях физиологической, но и при патологической внутриутробной гипоксемии и тканевой гипоксии. Вероятно, гипоксия тяжелой степени является триггером, активирующим процессы индукции соответствующих генов (гены γ -цепи (HbF) и ϵ -цепи (HbE) гемоглобина), что опосредованно приводит к повышению концентрации HbF и появлению HbE в крови плода и, соответственно, способствует более эффективному отбору кислорода из материнской крови, обеспечивая, таким образом, адекватный перенос O₂ и достаточную оксигенацию тканей плода [5; 7; 8].

Очевидно, увеличение уровня изучаемых белков в крови плода при внутриутробной гипоксии тяжелой степени является мощным адаптивным механизмом, оптимизирующим газообмен в тканях плода в условиях выраженного дефицита кислорода [9; 10].

Выраженный дисбаланс частоты индикации HbE и средних значений уровня HbF в крови новорожденных женского и мужского пола с ВГТС, по мнению авторов, объясняется более высокими компенсаторными возможностями женского организма как в общем, так и в системе «эритроцит – кровь – тканевое дыхание» [7].

Заключение

Показана диагностическая ценность фетального и эмбрионального гемоглобинов человека как маркеров тяжелой внутриутробной гипоксии новорожденных. Моделирование эффективных иммунохимических тестов на плодовой и примитивный гемоглобины и внедрение их в клиническую практику, безусловно, дополнит общепринятые диагностические панели по внутриутробной гипоксии новорожденных тяжелой степени и оптимизирует диагностику, прогноз и оценку качества лечения.

Список литературы

1. Губанова О.А. Демография в России // Психолого-педагогические проблемы безопасности человека и общества. 2020. Т. 48. № 3. С. 53-56.
2. Шуралёва Е.В., Лытнев Н.С., Сертакова А.Д., Чичкова П.А., Неизвестных П.В. Острая внутриутробная гипоксия, динамика в липецкой области и проблемы её решения // Научный альманах. 2023. № 2-2 (100). С. 72-75.
3. Панченко А.С., Панова М.С. Биохимические маркеры гипоксического поражения головного мозга у доношенных новорожденных // Доктор.Ру. 2020. Т. 19. № 3. С. 12-16.

4. Ибрагимова Д.Т. Состояние здоровья детей, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию // Academy. 2020. № 5 (56). С. 89-91.
5. Левитан Б.Н., Касьянова Т.Р., Титаренко Ю.Б. Значение фетального гемоглобина для диагностики тканевой гипоксии при хронических гепатитах и циррозах печени // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. Т. 11. № 3. С. 466-467.
6. Шининова С.В., Саташева З.М., Сайдулаев В.А., Коханов А.В., Кчибеков Э.А., Гудинская Н.И., Жмыхов Д.В., Мусалаев Х.А. Сравнение уровней лактоферрина и фетального гемоглобина в крови пожилых жителей юга астраханской области и горных районов Дагестана // Современные проблемы науки и образования. 2023. № 4. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=32739> (дата обращения: 25.02.2024). DOI: 10.17513/spno.32739.
7. Бахмутова Л.А., Никулина Д.М., Кривенцев Ю.А. Клиническое значение изучения антенатальных типов гемоглобина для прогноза ранней адаптации у недоношенных новорожденных детей // Вопросы современной педиатрии. 2009. Т. 8. № 2. С. 120-122.
8. Данилова Л.А. Фетальный гемоглобин - репортер метаболизма // Детская медицина Северо-Запада. 2020. Т. 8. № 1. С. 141.
9. Касьянова Т.Р., Левитан Б.Н., Кривенцев Ю.А., Никулина Д.М. Диагностическое значение определения фетального гемоглобина у больных хроническим гепатитом и циррозом печени // Фундаментальные исследования. 2011. № 10-3. С. 505-508.
10. Бисалиева Р.А., Кривенцев Ю.А., Бисалиев Р.В., Кальной В.С. Иммунохимический анализ фетального гемоглобина в крови наркологических больных // Наркология. 2009. Т. 8. № 1. С. 95-97.