

УДК 576.08:612.11

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

© 2023 г. О. Д. Денисенко^{1, *}, С. А. Перепелица^{1, 2}, В. А. Сергунова², С. С. Ляпунова², Л. С. Литвинова¹

¹Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, 236016 Россия

²Научно-исследовательский институт общей реаниматологии и реабилитологии им. В.А. Неговского
Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии, Москва, 107031 Россия

*E-mail: ksushadenisenko@mail.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 06.03.2023 г.

Принята к публикации 27.03.2023 г.

Несмотря на активное исследование функциональных свойств эритроцитов при патологических состояниях, данная проблема достаточно актуальна. Одной из причин дистресса плода и новорожденного является гипоксия. Последствия негативного влияния дефицита кислорода для эмбриона и плода могут проявляться как внутриутробно, так и после рождения, приводя к заболеваниям различного рода. Цель настоящей работы – изучение влияния ацидоза, как маркера перинатальной гипоксии, на мембрану эритроцитов у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Применение атомно-силового микроскопа позволило получить изображения и профили клеток для оценки морфологических и структурных особенностей эритроцитов при гипоксии у детей в раннем неонатальном периоде. Установлено, что перинатальная гипоксия вызывает изменение морфологии и структур мембран эритроцитов. Ранний неонатальный период характеризуется изменением морфологических форм и нестабильностью мембран эритроцита.

Ключевые слова: новорожденные, перинатальная гипоксия, мембрана эритроцитов, морфология эритроцитов

DOI: 10.31857/S0041377123040053, **EDN:** ZFPEUY

Пусковым механизмом гипоксических повреждений у новорожденных в неонатальном периоде является типовой патологический процесс – перинатальная гипоксия, связанная с нарушениями плацентарного кровообращения, приводящая к активации оксидативных процессов в организме плода (Чайка и др., 2019). Возникающие гипоксия и ацидоз негативно влияют на все клетки, в том числе и эритроциты, которые очень чувствительны к нарушениям гомеостаза (Steiner, Gallagher, 2007; Shankaran, 2015). Изменение функциональных свойств эритроцитов приводит к повышению деформируемости, проницаемости мембран и снижению транспорта кислорода (Мороз и др., 2012). Под влиянием гипоксии в эритроцитах происходит истощение продукции АТФ, запускается активация протеинкиназы С и фосфорилирование неселективных катионных каналов, что способствует входу в клетку ионов Ca^{2+} (Белевич и др., 2015; Чумакова и др., 2018; Ващенко, Вильянинов, 2019). Прогрессирующий процесс деформации сопровождается нарушениями цитоске-

лета и плазматической мембраны эритроцита (Сергунова и др., 2015). Образовавшиеся количественные или качественные дефекты в мембранных белках приводят к уменьшению стабильности мембраны и последующему разрушению клеток и их программированной смерти – эритрозу (Мороз и др., 2012; Хадарцев и др., 2022).

Мембрана эритроцита имеет сложную структуру (Рязанцева, Новицкий, 2004). В ее состав входят три основных компонента: тонкий липидный бислои (4–5 нм), белки (периферические и интегральные) и цитоскелет (Трошкина и др., 2007; Kim et al., 2017). Большинство белков периферической мембраны образуют мембранный цитоскелет толщиной от 40 до 90 нм, который составляет основу внутренней поверхности мембраны и выполняет роль каркаса клетки (Мушкхамбаров, Кузнецов, 2007). Цитоскелет представляет собой белковую сеть, состоящую в основном из тетрамеров спектрина, которые связаны с белковыми комплексами актина, белка 4.1R, анкирина, тропомиозина, тропоподулина, аддуцина и дематина. Связывание цитоскелета с липидным бислоем осуществляется с помощью анкирина и белка 4.1R через белок полосы 3 (Kim et al., 2017). Размер ячеек сети цитоскелета составляет 80–100 нм

Принятые сокращения: АСМ – атомно-силовой микроскоп; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; BE (Base Excess) – сдвиг буферных оснований; HCO_3^- – ион бикарбоната; $p\text{CO}_2$ – парциальное напряжение углекислого газа в крови.

(Мушкамбаров, Кузнецов, 2007; Kodippili et al., 2009).

Для мембраны эритроцитов характерно колебательное движение – “фликкеринг” (мерцание) (Конonenko, 2009; Jafarzadeh et al., 2019). Возникшие под влиянием неблагоприятных факторов патологические колебания мембраны приводят к изменению формы эритроцитов.

Эритроциты новорожденных детей и взрослых имеют отличия по таким параметрам, как размер, морфология, состояние клеточных мембран, состав, глубина и другие. У здоровых людей большая часть эритроцитов представлена дискоцитами. Их мембрана состоит из липидов и белков, которые взаимодействуя друг с другом, сохраняют эритроциту физиологическую деформируемость и гибкость, обеспечивая газотранспортную функцию крови (Steiner, Gallagher, 2007). Для новорожденных характерен внутриутробный физиологический эритроцитоз и повышенный уровень гемоглобина, включающий фетальный гемоглобин. Основной морфологической формой эритроцитов являются планоциты, которые имеют внешние отличия от дискоцитов, но считаются физиологической транзитной формой, обеспечивающей полноценную газотранспортную функцию (Перепелица и др., 2014а, 2014б). Показано, что в перинатальном периоде повреждение красных клеток у новорожденных индуцируется тяжелой гипоксией и ацидозом (Pegione et al., 2012), что приводит к неоднородности морфологического состава эритроцитов и выраженному пойкилоцитозу (Перепелица и др., 2017).

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) относится к классу сканирующей зондовой микроскопии. Этот метод позволяет визуализировать структуры клеток, размер которых колеблется в диапазоне от 0.5 до 100 нм. Поверхность мембраны эритроцитов представляет собой сложную неоднородную структуру, а с помощью пространственного преобразования Фурье сложное изображение поверхности мембран эритроцитов, полученное на АСМ, раскладывается на поверхности двух порядков (1 и 2) (Kozlova et al., 2018, 2019).

Преимущества АСМ перед другими методами микроскопии включают высокое разрешение и простоту приготовления образца для исследования (Sergunova et al., 2022). С момента своего изобретения в 1986 г. (Binnig et al., 1986) атомно-силовой микроскоп стал одним из важнейших инструментов для визуализации биологических объектов как на макро-, так и на микроуровне. По сравнению со световой микроскопией, которая позволяет исследовать только морфологию и размер клетки, АСМ позволяет детально изучить структуры клеточной мембраны при гипоксии (Revin et al., 2019) и различных заболеваниях (Kamruzzahan et al., 2004; Zhang et al., 2012; Мельченко, 2015; Стародубцева и др., 2015), оценить влияние лекарственных препаратов (Niese et al.,

2015; Starodubtseva et al., 2022) и солей кадмия на структуру мембраны эритроцитов (Demchenkov et al., 2020).

Учитывая особенности адаптации новорожденного в перинатальном периоде, анализ влияния гипоксии на мембрану эритроцитов с помощью АСМ представляет научный интерес.

Цель настоящей работы – изучить влияния ацидоза, как маркера перинатальной гипоксии, на мембрану эритроцитов у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Задачи работы включали сравнительное исследование морфологических форм эритроцитов и изменения структуры мембран эритроцитов (у новорожденных без признаков гипоксии и перенесших перинатальную гипоксию).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект. Работа включала 27 новорожденных детей, родившихся в ГБУЗ “Родильный дом Калининградской области № 1”. В зависимости от показателей кислотно-основного состояния крови при рождении выделяли две группы для исследования – А и Б.

Группа А – 20 новорожденных с признаками гипоксии, у которых в остаточной пуповиной крови определялся метаболический ацидоз, величина рН была < 7.35 . Средний срок гестации составлял 34 ± 0.5 нед., масса тела при рождении – 2224.2 ± 151.8 г. Группа Б – 7 новорожденных без признаков гипоксии, у которых в остаточной пуповиной крови признаков ацидоза не было, величина рН > 7.35 . Средний срок гестации составлял 33.1 ± 0.8 нед., масса тела при рождении – 2001.4 ± 158.9 г.

Достоверных различий между группами по гестационному возрасту, массе тела при рождении не выявлено ($p > 0.05$). Всем новорожденным была оказана квалифицированная помощь в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю “неонатология” (Володин, 2019). Новорожденные обеих групп с рождения получали комплексное лечение, направленное на обеспечение жизненно важных функций: инфузионную, кардиотоническую и симптоматическую терапию. В проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) нуждалось 13 детей (65%) группы А и 2 ребенка (28.6%) группы Б ($p = 0.0003$). Новорожденным, включенным в исследование, не проводили трансфузия препаратов крови, и они не получали препараты, которые могли бы влиять на количественный и качественный состав эритроцитов.

Анализ кислотно-основного состояния крови. Сразу после рождения исследовали величины следующих параметров крови: рН, ВЕ, pCO_2 содержание HCO_3^- на анализаторе Gem Premier 3000 (США).

Подготовка препарата монослоя эритроцитов. Исследовали остаточную пуповинную (венозную) кровь через 7 ч и 7 сут после рождения. Забор крови осуществляли в пробирки объемом 0.2 мл с добавле-

нием консерванта ЭДТА, кровь перемешивали и отстаивали в течение 30 мин. Затем готовили монослой эритроцитов для дальнейшего сканирования на АСМ: 20 мкл крови наносили на предметное стекло и приготавливали монослой эритроцитов с помощью центрифуги Diff Spin 2 (США).

Анализ морфологии эритроцитов с помощью АСМ. Для каждого образца было приготовлено по 3 мазка с монослоем эритроцитов. На каждом мазке сканировали по 5 изображений размером 100×100 мкм и 10×10 мкм. Среднее число клеток на участке 100×100 мкм составляло 108 ± 20 . Всего было просканировано 810 изображений. Для получения данных о структуре мембран эритроцитов анализировали области размером 1.5×1.5 мкм на 30 клетках для каждого образца. Всего было проанализировано 2430 участков изображений. Использовали атомно-силовой микроскоп АСМ NTEGRA Prima (NT-MDT Spectrum Instruments, РФ) в методике осцилляционной резонансной АСМ (Zhong et al., 1993).

Изображения поверхности эритроцитов получали на воздухе в полуконтактном режиме с помощью кремниевых кантилеверов серии NSG01 с золотым отражающим покрытием (NT-MDT Spectrum Instruments, РФ). Высота иглы кантилевера 14–16 нм, а радиус закругления – 10 нм. Типичное значение резонансной частоты составило 148 кГц, коэффициент жесткости $k = 5$ Н/м. Поля сканирования выбирали от 100×100 мкм до 10×10 мкм. Число точек в скане составляло 512 или 1024, частота сканирования строк варьировала от 0.3 до 0.9 Гц. Полученные изображения и их профили были проанализированы в двумерном (2D) и трехмерном (3D) форматах. Для выявления небольших структурных изменений, количественной оценки в разных масштабах и статистического сравнения их размеров использовали математическое программное обеспечение FemtoScan Online (Фемтоскан, Россия). Использовали пространственное преобразование Фурье, сложное АСМ-изображение поверхности раскладывали на два более простых с разным пространственным разрешением (рис. 1). Спектральное окно с низкими пространственными частотами содержит изображения мембранных структур с большим пространственным периодом (600–1200 нм) с высотой h_1 , а спектральное окно с высокими пространственными частотами – изображения мембранных структур с малым пространственным периодом (80–200 нм) с высотой h_2 . Параметры пространственных масштабов были выбраны в соответствии с естественными структурами мембран эритроцитов. Первый порядок соответствует фликерингу мембраны и отражает его макроструктурные свойства. Второй порядок связан с конфигурацией цитоскелета эритроцита. Более подробное описание метода пространственного преобразования Фурье приведено в наших предыдущих исследованиях (Шерстюкова и др., 2021; Sergunova et al., 2022).

Полученные изображения эритроцитов классифицировали согласно общепринятой классификации (Новицкий и др., 2003, Льюис и др., 2009).

Статистическая обработка данных. Результаты АСМ анализировали с помощью стандартной программы OriginPro 2019 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0.05$.

Статистический анализ клинических и лабораторных исследований проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Для данных, распределение которых в вариационном ряду носило нормальный характер, использовали среднее арифметическое и его стандартное отклонение. Нормальность выборок проверяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова с поправкой Лилефорса. Для количественных признаков, отличных от нормального распределения, определяли медиану (Me) и междуквартильный размах ($Q1$; $Q3$). Различия между двумя числовыми выборками, имеющие признаки негауссовского распределения, определяли при помощи критерия Манна–Уитни, а для сравнения связанных выборок использовали критерий Вилкоксона. Качественные данные анализировали путем вычисления доли (в %) каждого значения. Сравнение групп по качественному признаку проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При рождении в остаточной пуповинной крови определяли значения pH, BE, $p\text{CO}_2$, HCO_3^- как диагностические критерии ацидоза (табл. 1). Нами показано, что при рождении у новорожденных группы А, по сравнению с группой Б, величина pH крови статистически значимо ниже ($p < 0.05$), а $p\text{CO}_2$ выше ($p < 0.05$). Между группами не установлено статистически значимых различий по уровням BE и HCO_3^- ($p > 0.05$). Учитывая выявленные изменения, у новорожденных группы А диагностирован субкомпенсированный смешанный ацидоз, свидетельствующий о перенесенной перинатальной гипоксии.

Клеточный состав эритроцитов новорожденных в раннем неонатальном периоде представлен на рис. 2. В остаточной пуповинной крови новорожденных основной морфологической формой эритроцитов являются планоциты. На рис. 3 представлено 3D-изображение планоцита (а) и его боковое сечение (профиль, б). Клетка представляет собой диск с ровной поверхностью; впадина и патологическая деформация, а также выросты мембраны отсутствуют, диаметр клетки составляет 10413 ± 301 нм, высота – 310 ± 43 нм. У детей группы А на долю планоцитов при-

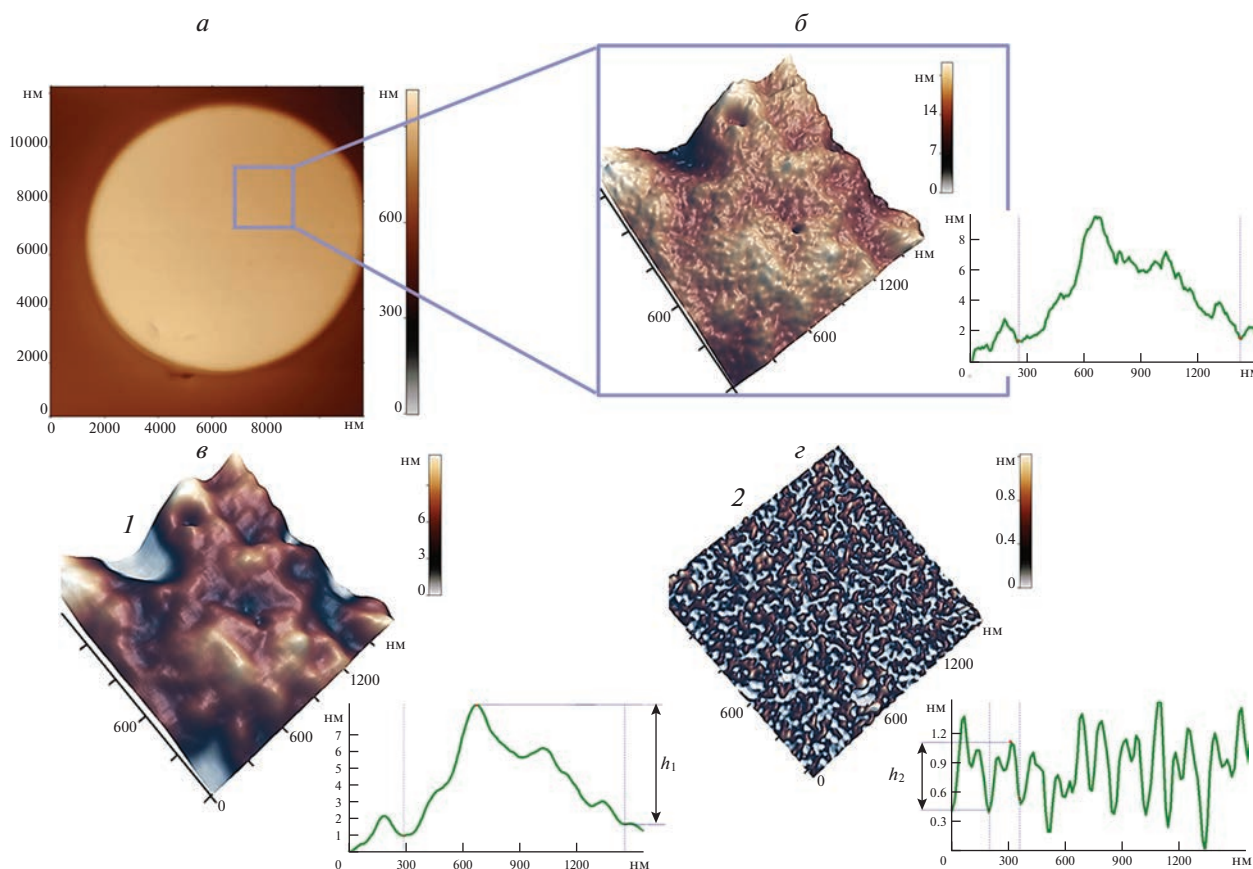


Рис. 1. Иллюстрация анализа АСМ-изображения эритроцита и ее участка размером 1.5×1.5 мкм с профилем мембраны эритроцита на основе пространственного преобразования Фурье. *a* – эритроцит, *б* – исследуемый участок поверхности с его профилем. *в*, *г* – Пространственные компоненты (*в*: 1 и *г*: 2), суммирующиеся в исходном изображении и профиле *б*: профиль поверхности первого порядка (1) высотой h_1 (*в*); профиль поверхности второго порядка (2) высотой h_2 (*г*).

ходится 46% от общего количества эритроцитов, а в группе В их количество достигает 68%, и различия статистически значимы ($p < 0.05$)

Единичные дискоциты встречаются лишь у детей группы А, но в этой группе, по сравнению с группой Б, определяется статистически значимый стоматоцитоз ($p < 0.05$), определяются и другие измененные эритроциты, не входящие в определенную классификацию; вероятно, они находятся в стадии промежуточной трансформации.

Таблица 1. Показатели кислотно-основного состояния крови новорожденных

Параметры	Группа А ($n = 20$)	Группа Б ($n = 7$)
рН	7.3 ± 0.01	7.4 ± 0.01^a
pCO_2 , мм рт. ст.	49.5 ± 2.2	35 ± 2.4^a
HCO_3^- , ммоль/л	21.6 ± 0.9	20.6 ± 0.9
ВЕ, ммоль/л	-4.8 ± 1.8	-3.9 ± 0.5

Примечание. ВЕ (Base Excess) – сдвиг буферных оснований; ^aразличия между группами статистически значимы при $p < 0.05$.

Стоматоцит представляет собой диск диаметром 9226 ± 170 нм и высотой 495 ± 31 нм с ровной поверхностью, имеющий глубокую инвагинацию чашеобразной формы (рис. 4а) (Lim et al., 2009). На профиле клетки (рис. 4б) видно, что инвагинация смещается от центра, ее глубина достигает 467 ± 42 нм.

Первые 6 ч постнатальной жизни являются периодом острой адаптации новорожденных к новым условиям внешней среды. Через 7 ч после рождения у детей группы А, по сравнению с группой Б, сохраняется статистически значимый стоматоцитоз ($p < 0.05$), а в группе Б – планоцитоз ($p < 0.05$) и появляется небольшое количество дискоцитов.

В это время обнаруживаются эритроциты, имеющие на своей поверхности незначительные изменения (рис. 5а), которые, вероятно, обусловлены процессом активной трансформации из планоцита в кодоцит. Поверхность клетки становится более рыхлой, появляются перепады высот в диапазоне от 40 до 150 нм, что наблюдается на профиле клетки (рис. 5б). По сравнению с планоцитом, у нее уменьшается диаметр до 9267 ± 260 нм, а высота увеличивается до 630 ± 78 нм.

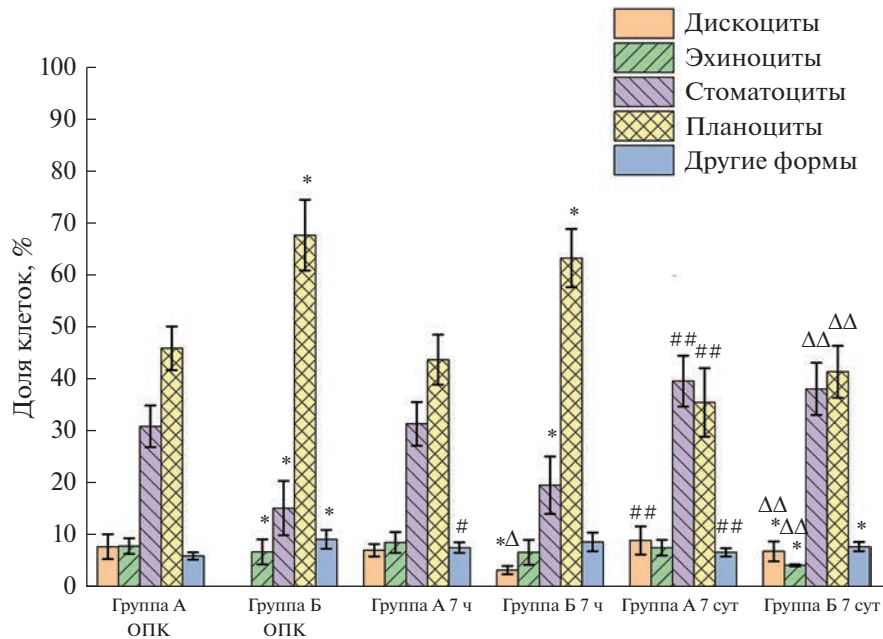


Рис. 2. Статистическое распределение форм эритроцитов в остаточной пуповинной крови (ОПК) новорожденных групп А и Б сразу после рождения и через 7 ч и 7 сут после рождения. Различия достоверны при $p < 0.05$: (*) – между группами А и Б; (#) – в группе А между ОПК и через 7 ч после рождения; (##) – в группе А между сроками 7 сут и 7 ч после рождения; (Δ) – в группе Б между ОПК и сроком 7 ч; (ΔΔ) – в группе Б между сроком 7 сут и 7 ч после рождения.

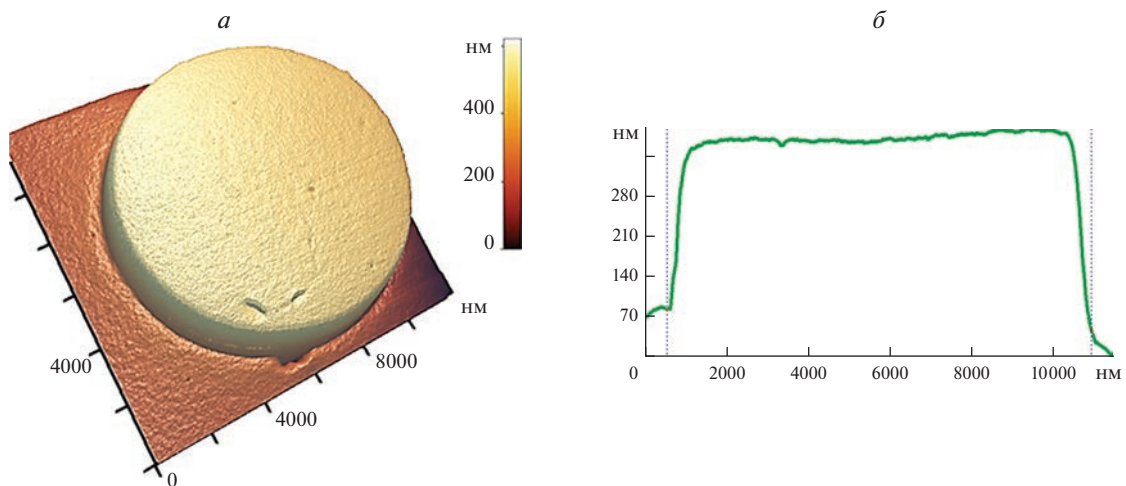


Рис. 3. АСМ-изображение планоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б). Здесь и на рис. 4–6: изображение получено на воздухе в полуконтактном режиме сканирования; размер участка 10×10 мкм.

На 7-е сут жизни, когда заканчивается ранний неонатальный период, у детей группы А происходят статистически значимые изменения количественного распределения морфологических форм эритроцитов ($p < 0.05$) (по сравнению с ОПК и сроком 7 ч после рождения): уменьшается число планоцитов, увеличивается число дискоцитов и нарастает стоматоцитоз, количество эхиноцитов и других клеток не изменяется. В группе Б тоже изменяется состав форм эритроцитов ($p < 0.05$): увеличивается число дискоцитов

и уменьшается число эхиноцитов, но происходит снижение числа планоцитов и нарастание стоматоцитоза ($p < 0.05$). Таким образом, к концу неонатального периода планоциты и стоматоциты становятся основными формами эритроцитов в обеих группах, но в группе А стоматоцитоз выше, чем в группе Б ($p < 0.05$).

На рис. 6а представлен эритроцит 7-суточного новорожденного, не входящий в общепринятую классификацию эритроцитов. Диаметр эритроцита

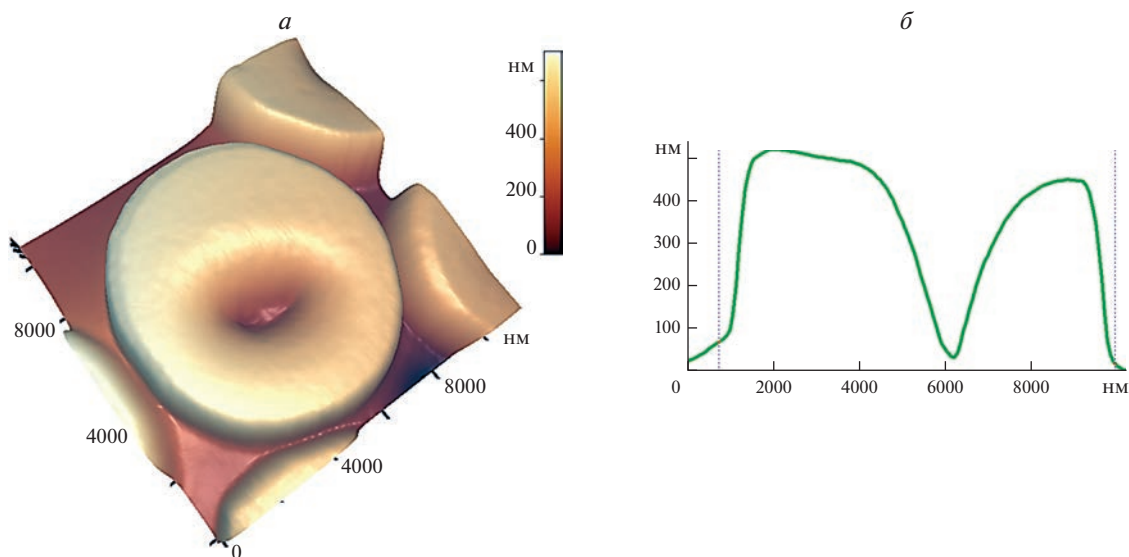


Рис. 4. АСМ-изображение стоматоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б).

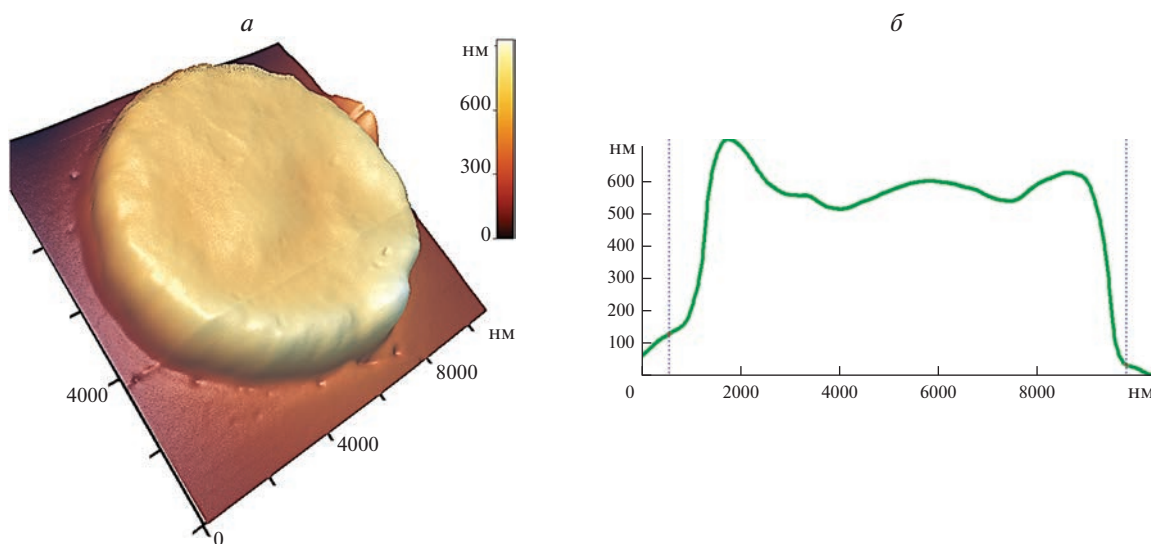


Рис. 5. АСМ-изображение кодоцита в формате 3D в остаточной пуповинной крови (а) и его боковое сечение (профиль, б).

составляет 8496 ± 280 нм, а высота — 513 ± 35 нм. На профиле (рис. 6б) видно, что клетка имеет смещенную к периферии впадину, занимающую примерно 1/3 поверхности, глубиной до 180 ± 37 нм.

Получены количественные характеристики h_i (высоты h_1 и h_2) поверхности мембраны эритроцитов (рис. 7) с помощью пространственного преобразования Фурье. Установлено, что при рождении у новорожденных группы А, по сравнению с новорожденными группы Б, высота h_1 , отражающая изменение колебания поверхности мембран, то есть мембранный фликкеринг, статистически значимо выше ($p < 0.05$). Через 7 ч после рождения в обеих группах происхо-

дил рост высоты h_1 ($p < 0.05$). В группе А ее величина увеличилась в 1.3 раза, в группе Б — в 1.4 раза ($p < 0.05$). На 7-е сут у пациентов обеих групп высота h_1 не изменилась, по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина в группе А была статистически значимо выше, чем в группе Б ($p < 0.05$).

При изучении показателя h_2 (рис. 7), отражающего изменение цитоскелета эритроцитов (Kozlova et al., 2013), установлено, что в остаточной пуповинной крови детей группы А его величина выше, чем в группе Б ($p < 0.05$). На 7-е сут у пациентов обеих групп высота h_2 не изменилась по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина

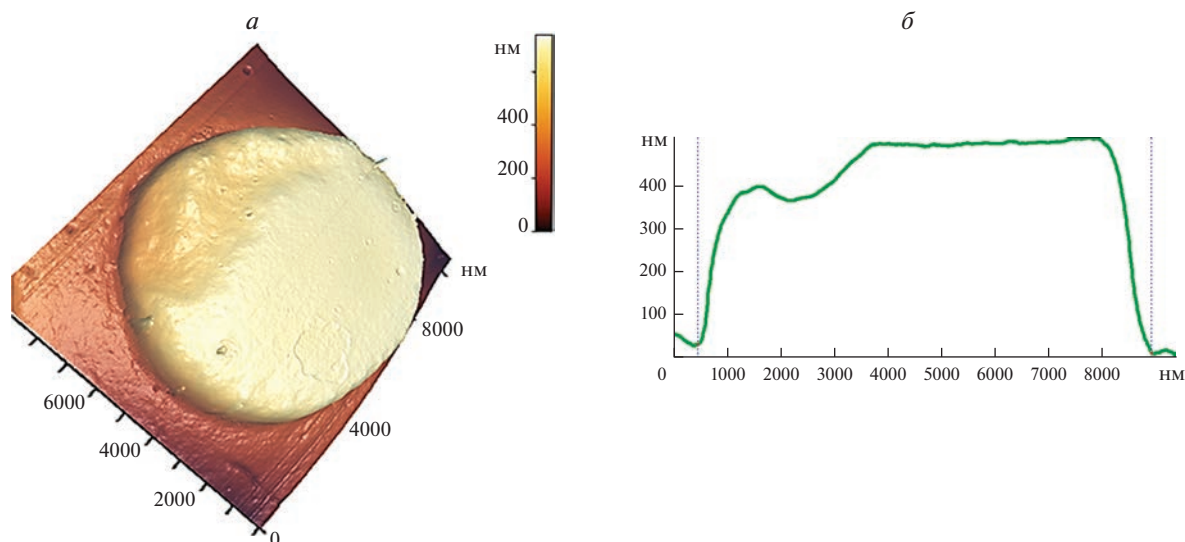


Рис. 6. АСМ-изображение эритроцита, относящегося к категории “другие формы” в формате 3D в венозной крови на 7 сут жизни ребенка (а) и его боковое сечение (профиль, б).

на в группе А, по сравнению с группой Б, была статистически значимо выше ($p < 0.05$).

В первые часы после рождения на мембране эритроцитов происходят активные процессы, обусловленные постнатальной перестройкой организма ребенка, что проявляется статистически значимым увеличением высот h_1 и h_2 . В процесс постнатальной клеточной адаптации вовлечены два параметра структуры мембраны эритроцитов – это фликкеринг мембраны и цитоскелет. В группе А этот процесс наиболее выражен, т.к. уже при рождении обнаруживаются статистически значимые различия по исследуемым показателям; выявленные изменения обусловлены влиянием ацидоза на мембрану эритроцитов (табл. 1). К окончанию раннего неонатального периода снижения h_1 и h_2 не происходит.

В нормальном физиологическом состоянии организма соотношение морфологических форм эритроцитов постоянно, но многие экзогенные и эндогенные факторы, при воздействии которых изменяется гомеостаз, приводят к активации процессов на мембране и появлению других морфологических форм эритроцитов. Нарушение электролитного состава крови, в частности гипонатриемия, гипохлоремия, ацидоз и гипохолестеринемия вызывают дисбаланс между липидными, белковыми компонентами мембраны и белками цитоскелета, что приводит к трансформации дискоцитов и появлению стоматоцитов; гипернатриемия, гиперхлоремия, алкалоз, гиперхолестеринемия, снижение содержания аденозинтрифосфата – к появлению эхиноцитоза (Tachev et al., 2004; Rudenko, 2010; Geekiyanage et al., 2019). В большинстве случаев, когда гомеостаз крови быстро нор-

мализуется, эта трансформация носит обратимый характер (Geekiyanage et al., 2019). В работе Руденко (Rudenko, 2010) показано, что морфологические изменения эритроцитов представляют собой трехфазную последовательность, включающую превращение дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты, или двухфазную модель: дискоцит → эхиноцит, дискоцит → стоматоцит, т.е. изменения варьируют между

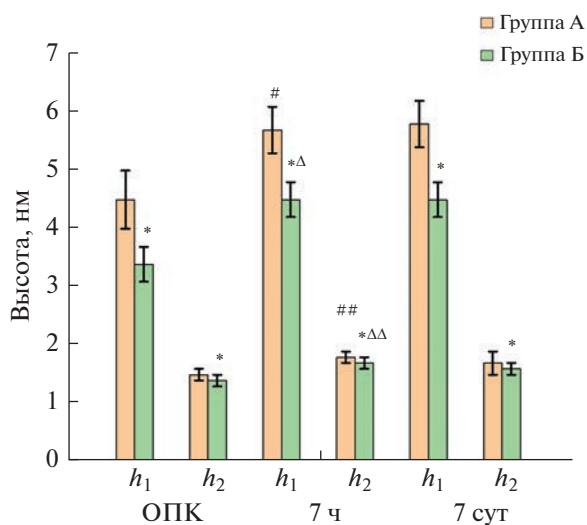


Рис. 7. Гистограммы высот h_1 и h_2 поверхности мембраны эритроцитов в остаточной пуповинной крови (ОПК) новорожденных групп А и Б сразу после рождения и через 7 ч и 7 сут после рождения. Различия достоверны при $p < 0.05$: (*) – между группами А и Б; (# и ##) – в группе А между ОПК и через 7 ч после рождения для h_1 и h_2 соответственно; (Δ и ΔΔ) – в группе Б между ОПК и сроком 7 ч после рождения для h_1 и h_2 соответственно.

тремя основными формами. Этот процесс, в первую очередь, зависит от изменений рН крови (Rudenko, 2010).

Нарушения маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровообращения приводят к антенатальному изменению гомеостаза и кислородного баланса, появлению ацидоза у плодов (Dodd et al., 2017; O'Sullivan et al., 2019), который является маркером степени тяжести перинатальной гипоксии у новорожденных в раннем неонатальном периоде (Perrone et al., 2012). Пусковым моментом выявленных изменений морфологии и структуры мембран эритроцитов являлась гипоксия, при которой уже антенатально происходят нарушения структуры мембран эритроцитов.

При рождении в остаточной пуповинной крови определяются изменения, характеризующие степень выраженности ацидоза (по величине рН) и полиморфизм эритроцитов. У детей, имеющих низкое значение рН крови, основные морфологические формы эритроцитов – это планоциты и стоматоциты, но количество последних позволяет нам говорить о значимом стоматоцитозе. Течение раннего неонатального периода у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, характеризовалось выраженным пойкилоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов, которые проявлялись изменениями высот h_1 и h_2 , отражающие мембранный фликкеринг и изгибы цитоскелета. Такая приспособительная реакция, вероятно, обеспечивает сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии.

Период ранней адаптации новорожденных характеризовался нестабильностью высот h_1 и h_2 мембраны эритроцитов, вариабельностью морфологических форм на протяжении всего неонатального периода. К окончанию раннего неонатального периода у новорожденных обеих групп состав морфологических форм эритроцитов мало отличается. Количество планоцитов уменьшается, появляются дискоциты, но сохраняется стоматоцитоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ацидоз, как проявление перинатальной гипоксии, оказывает воздействие на мембрану эритроцитов новорожденных. Проявление адаптационных изменений в виде изменения высот и пространственных периодов поверхностей мембран эритроцитов служит ответной реакцией на возникшие изменения кислотно-основного состояния крови. Вероятно, стремление клеток сохранить свои функциональные способности является приспособительной реакцией.

Течение раннего периода адаптации у детей, перенесших гипоксию, характеризуется большой ва-

риабельностью морфологических форм, уменьшением количества планоцитов и появлением большого количества измененных и переходных форм эритроцитов. Выявленные изменения свидетельствуют об активности процессов на мембране эритроцитов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного задания № FZWM-2020-0010 Балтийского федерального университета им. И. Канта и Государственного задания № FGWS-2021-0003 Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии им. В.А. Неговского (Москва).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено Этическим комитетом Федерального научно-клинического центра реаниматологии и реабилитологии (протокол № 2/20 от 10.06.2020) и Независимым этическим комитетом Центра клинических исследований ФГАОУ ВО “БФУ им. И. Канта” (выписка из Протокола заседания НЭК № 14 от 27.10.2020 г.) и выполнено в ГБУЗ “Родильный дом Калининградской области № 1”. Забор крови осуществляли сотрудники отделения реанимации новорожденных в рамках запланированного клинического обследования. Дополнительного забора крови не производили. Информированное согласие законных представителей ребенка на проведение медицинских манипуляций и исследования находится в истории развития новорожденного. Все стадии исследования соответствуют законодательству Российской Федерации, международным этическим нормам и нормативным документам исследовательских организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белевич Е.И., Костин Д.Г., Слобожанина Е.И. 2015. Активность каспазы-3 в эритроцитах человека при окислительном стрессе. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук. № 2. С. 34. (Bialevich E.I., Kostin D.G., Slobozhanina E.I. 2015. Caspase-3 activity in human erythrocytes under oxidative stress. Izvestiya Nacional'noy Akademii Nauk Belarusi. Seriya boil. Nauk. № 2. P. 34.)
- Ващенко В.И., Вильянинов В.Н. 2019. Эриптоз (квазиаптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. Т. 17. № 3. С. 5. (Vaschenko V.I., Vil'yaninov V.N. 2019. Eryptosis (quasi-apoptosis) of the human red blood cells. Its role in medicinal therapy. Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy. V. 17.

- P. 5.)
<https://doi.org/10.17816/RCF1735-38>
- Володин Н.Н. 2019. Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа. (Volodin N.N. 2019. Neonatology: National guidelines. Short edition. M.: GEOTAR-Media.)
- Кононенко В.Л. 2009. Фликкер эритроцитов. 1. Теоретические модели и методы регистрации. Биологические мембраны. Т. 26. № 5. С. 352. (Kononenko V.L. 2009. Red blood cell flicker. 1. Theoretical models and methods of registration. Biol. membranes. V. 26. № 5. P. 352)
- Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. 2009. Практическая и лабораторная гематология. М.: ГЭОТАР-МЕД. (L'juis S.M., Bjejn B., Bjejts I. 2006. Practical gematology. Churchill Livingstone.)
- Мельченко Е.А. 2015. Применение атомно-силовой микроскопии при исследовании биофизических свойств мембран эритроцитов. Наука. Инновации. Технологии. № 3. С. 131. (Melchenko E.A. 2015. Application of atomic-power microscopy at research of biophysical properties of red blood cells membranes. Science. Innovations. Technologies. № 3. P. 131)
- Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. 2012. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. Общая реаниматология. Т. 8. № 1. С. 52. (Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. 2012. Stroenie i funktsiya eritrotsita v norme i pri kriticheskikh sostoyaniyah. Obshchaya Reanimatologiya. V. 8. P. 52.)
- Мушкambarов Н.Н., Кузнецов С.Л. 2007. Молекулярная биология. Учебное пособие для студентов мед. вузов. М.: ООО Медицинское информационное агентство. (Mushkambarov N.N., Kuznetsov S.L. 2007. Molecular biology. Study guide for medical students. Moscow: Med. Inform. Agency.)
- Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А., Быстрицкий Л.Д., Ткаченко С.Б. 2003. Клинический патоморфоз эритроцита: Атлас. Томск. (Novitskiy V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya E.A., Bystritskiy L.D., Tkachenko S.B. 2003. Clinical erythrocyte pathomorphosis. Atlas. Tomsk.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. 2014а. Состояние мембраны эритроцитов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде. Общая реаниматология. Т. 10. № 6. С. 46. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. 2014a. The red blood cell membrane of preterm infants in the early neonatal period. Obshchaya Reanimatologiya. V. 10. P. 46.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. 2017. Влияние перинатальной гипоксии на морфологию эритроцитов у новорожденных. Общая реаниматология. Т. 13. № 2. С. 14. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. 2017. The effect of perinatal hypoxia on red blood cell morphology in newborns. Obshchaya Reanimatologiya. V. 13. P. 14.)
- Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. 2014б. Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных при многоплодной беременности. Общая реаниматология. Т. 10. № 1. С. 12. (Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. 2014b. Osobennosti membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh pri mnogoplodnoy beremennosti. Obshchaya Reanimatologiya. V. 10. P. 12.)
- Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. 2004. Типовые нарушения молекулярной организации мембраны эритроцита при соматической и психической патологии. Успехи физиол. наук. Т. 35. № 1. С. 53. (Ryazantseva N.V., Novitskiy V.V. 2004. Typical disorders in molecular organization of erythrocyte membrane in patient with somatic and mental pathology. Uspekhi Physiol. Nauk. V. 35. № 1. P. 53.)
- Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М. 2015. Измерение упругоэластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. Общая реаниматология. Т. 11. № 3. С. 39. (Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M. 2015. In Vitro measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. Obshchaya Reanimatologiya V. 11. P. 39.)
- Стародубцева М.Н., Воронаев Е.В., Петренёв Д.Р., Мишурова В.М., Егоренков Н.И. 2015. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности. Проблемы здоровья и экологии. Т. 44. № 2. С. 99. (Starodubtseva M.N., Voronayev E.V., Petrenyov D.R., Mitsura V.M., Yegorenkov N.I. 2015. AFM diagnostics of red blood cell pathology based on the physical and mechanical image of the cell membrane. Problemy zdorov'â i èkologii V. 44. № 2. P. 99.)
- Трошкина Н.А., Циркин В.И., Дворянский С.А. 2007. Эритроцит: строение и функции его мембраны. Вятский медицинский вестник. Т. 3. № 2. С. 32. (Troshkina N.A., Tirkir V.I., Dvoryanskiy S.A. 2007. Erythrocyte: membrane structure and function. Vyatka Medical Bulletin. V. 3. № 2. P. 32.)
- Хадарцев А.А., Наумова Э.М., Валентинов Б.Г., Рогачев Р.В. 2022. Эритроциты и окислительный стресс. Вестник новых медицинских технологий. Т. 29. № 1. С. 93. (Khadartsev A.A., Naumova E.M., Valentinov B.G., Grachev R.V. 2022. Erythrocytes and oxidative stress (literature review). J. New Medical Technol. V. 29. P. 93.)
- Шерстюкова Е.А., Иноземцев В.А., Козлов А.П., Гудкова О.Е., Сергунова В.А. 2021. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов. Альманах клинической медицины. Т. 49. № 6. С. 427. (Sherstyukova E.A., Inozemtsev V.A., Kozlov A.P., Gudkova O.E., Sergunova V.A. 2021. Atomic force microscopy in the assessment of erythrocyte membrane mechanical properties with exposure to various physicochemical agents. Almanac Clinical Med. V. 49. P. 427.)
- Чайка Н.А., Данилова Л.А., Литвиненко Л.А. 2019. Преэклампсия и здоровье новорожденных. Медицина: теория и практика. № 4. С. 593. (Chajka N.A., Danilova L.A., Litvinenko L.A. 2019. Prejeklampsija i zdorov'e novoro-zhdennyh. Medicina: teorija i praktika. 2019. № 4. P. 593.)
- Чумакова С.П., Уразова О.И., Зима А.П., Новицкий В.В. 2018. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз. Гематология и трансфузиология. Т. 63. № 4. С. 343. (Chumakova S.P., Urazova O.I., Zima A.P., Novitskiy V.V. 2018. Features of the physiology of erythrocytes.

- Hemolysis and eryptosis. *Hematology and Transfusiology*. V. 63. P. 343.)
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C. 1986. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* V. 56. P. 93.
- Demchenkov E.L., Nagdalian A.A., Budkevich R.O., Oboturova N.P., Okolelova A.I. 2020. Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl₂ on red blood cells membrane. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 208. P. 111683.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111683>
- Dodd J.M., Grivell R.M., O'Brien C.M., Dowsell T., Deussen A.R. 2017. Prenatal administration of progestogens for preventing spontaneous preterm birth in women with a multiple pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* V. 2017. № 10. P. D012024.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD012024.pub2>
- Geekiyange N.M., Balanant M.A., Sauret E., Saha S., Flower R., Lim C.T., Gu Y.T. 2019. A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies. *PLoS One*. V. 14. P. e0215447.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215447>
- Jaferzadeh K., Sim M., Kim N., Moon I. 2019. Quantitative analysis of three-dimensional morphology and membrane dynamics of red blood cells during temperature elevation. *Scientific Reports*. V. 9. P. 1.
- Kamruzzahan A.S.M., Kienberger F., Stroh C.M., Berg J., Huss R., Ebner A., Zhu R., Rankl C., Gruber H.J., Hinterdorfer P. 2004. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cells using tapping-mode AFM. *Biol. Chem.* V. 385. P. 955.
- Kim Y., Park J., Kim M. 2017. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era. *Blood Res.* V. 52. P. 84.
- Kodippili G.C., Spector J., Sullivan C. 2009. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes. *Blood*. V. 113. P. 6237.
- Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. 2013. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron*. V. 44. P. 218.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Gudkova O., Manchenko E., Kozlov A. 2018. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes. *Journal of Molecular Recognition*. V. 31. № 10. P. 2724.
<https://doi.org/10.1002/jmr.2724>
- Kozlova E., Chernysh A., Sergunova V., Manchenko E., Moroz V., Kozlov A. 2019. Conformational distortions of the red blood cell spectrin matrix nanostructure in response to temperature changes *in vitro*. *Scanning*. V. 2019. P. 8218912.
<https://doi.org/10.1155/2019/8218912>
- Lim H.W.G., Wortis M., Mukhopadhyay R. 2009. Red blood cell shapes and shape transformations. Newtonian mechanics of a composite membrane. Sections 2.5–2.8. In: *Soft Matter*. Hoboken: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. P. 83.
<https://doi.org/10.1002/9783527623372.ch2a>
- Niece K.L., Boyd N.K., Akers K.S. 2015. *In vitro* study of the variable effects of proton pump inhibitors on voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 59. P. 5548.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00884-15>
- Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Del Vecchio A., Buonocore G. 2012. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* V. 25 P. 104.
- O'Sullivan M.P., Looney A.M., Moloney G.M., FINDER M., Hallberg B., Clarke G., Boylan G.B., Murray D.M. 2019. Validation of altered umbilical cord blood microRNA Expression in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *JAMA Neurol.* V. 76. P. 333.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.4182>
- Revin V.V., Gromova N.V., Revina E.S., Prosnikova K.V., Revina N.V., Bochkareva S.S., Stepushkina O.G., Grunysushkin I.P., Tairova M.R., Incina V. 2019. I. Effects of polyphenol compounds and nitrogen oxide donors on lipid oxidation, membrane-skeletal proteins, and erythrocyte structure under hypoxia. *BioMed. Res. Int.* 2019. Article ID 6758017.
<https://doi.org/10.1155/2019/6758017>
- Rudenko S.V. 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochim. Biophys. Acta—Biomembranes*. V. 1798. P. 1767.
- Sergunova V., Leesment S., Kozlov A., Inozemtsev V., Platitsina P., Lyapunova S., Onufrievich A., Polyakov V., Sherstyukova E. 2022. Investigation of red blood cells by atomic force microscopy. *Sensors (Basel)*. V. 22. P. 2055.
<https://doi.org/10.3390/s22052055>
- Shankaran S. 2015. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy. *Curr. Opin. Pediatr.* V. 2. P. 152.
- Starodubtseva M.N., Karachrysafti S., Shklyarava N.M., Chelnokova I.A., Kavvadas D., Papadopoulou K., Samara P., Pappaliagkas, Sioga A., Komnenou A., Karampatakis V., Papatitsou T. 2022. The Effects of intravitreal administration of antifungal drugs on the structure and mechanical properties peripheral blood erythrocyte surface in rabbits. *Int. J. Mol. Sci.* V. 23. P. 10464.
<https://doi.org/10.3390/ijms231810464>
- Steiner L.A., Gallagher P.G. 2007. Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin. Perinatol.* V. 31 P. 254.
- Tachev K.D., Danov K.D., Kralchevsky P.A. 2004. On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*. V. 34. P. 123.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.12.011>
- Zhang Y., Zhang W., Wang S., Wang C., Xie J., Chen X., Xu Y., Mao P. 2012. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy. *Scanning*. V. 34. P. 295.
- Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. 1993. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters*. V. 290. P. 688.

Morphological Changes of Erythrocytes in Neonates with Perinatal Hypoxia

O. D. Denisenko^{a, *}, S. A. Perepelitsa^{a, b}, V. A. Sergunova^b, S. S. Lyapunova^b, and L. S. Litvinova^a

^a*Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, 236016 Russia*

^b*Negovsky Research Institute of General Resuscitation Federal Scientific, Clinical Center for Resuscitation and Rehabilitology, Moscow, 107031 Russia*

**e-mail: ksushadenisenko@mail.ru*

Despite active research on the functional properties of erythrocytes under pathological conditions, this problem is of great importance. One of the causes of fetal and neonatal distress is hypoxia. The consequences of the negative effects of oxygen deficiency on the embryo and fetus can manifest both in utero and after birth, leading to various diseases. The aim of this work is to investigate the effects of acidosis as a marker of perinatal hypoxia on the erythrocyte membrane of newborns in the early neonatal period. The use of an atomic force microscope made it possible to obtain images and cell profiles to assess the morphological and structural characteristics of erythrocytes during hypoxia in children in the early neonatal period. Perinatal hypoxia has been shown to alter erythrocyte morphology and damage membrane structure. The early neonatal period is characterized by changes in the morphological forms and instability of erythrocyte membranes.

Keywords: neonates, perinatal hypoxia, erythrocyte membrane, erythrocyte morphology