

## ОСОБЕННОСТИ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ МНОГОПЛОДНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

С. А. Перепелица<sup>1,2</sup>, В. А. Сергунова<sup>1</sup>, О. Е. Гудкова<sup>1</sup>, С. В. Алексеева<sup>3</sup>

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

<sup>2</sup> ФГБУ ВПО Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград

<sup>3</sup> ГБУЗ Родильный дом №1, Калининград

**Цель** — выявление особенностей мембран эритроцитов и их наноструктур у недоношенных детей, рожденных от многоплодной беременности. **Материал и методы.** В исследование включили 28 новорожденных, из них — 14 недоношенных детей, рожденных от многоплодной беременности. Средний гестационный возраст составил  $34,1 \pm 1,7$  нед., масса тела при рождении —  $2065,4 \pm 304,8$  г. Группа сравнения — 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и срочными родами. Средний гестационный возраст детей составил  $39,4 \pm 0,5$  недель, масса тела при рождении —  $3131,7 \pm 588,8$  грамм, оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни —  $8 \pm 0,4$  балла. Проводили исследование эритроцитов в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК), центральная венозная кровь через 7 часов после рождения и венозная кровь недоношенных новорожденных 7-х суток жизни. Проводилось исследование плаценты. Данные сопоставляли с гестационным возрастом, состоянием детей при рождении, клиническими симптомами. **Результаты.** У детей основной морфологической формой эритроцитов при рождении являются planoциты, при этом определяются стоматоциты и другие аномальные клетки, являющиеся промежуточными, обратимыми формами. Наименее стабильной и подверженной патологическим изменениям на мембране эритроцитов является поверхность первого порядка, а спектриновый матрикс и белковые кластеры не изменялись. На высоты  $h_1$  и  $h_2$  мембраны эритроцитов в остаточной пуповинной крови влияли парциальное напряжение углекислого газа и насыщение гемоглобина кислородом. Внутренняя, цитоплазматическая поверхность устойчива к длительному воздействию гипоксии, т. к. высоты  $h_2$  и  $h_3$  мембраны эритроцитов при рождении соответствовали аналогичным высотам здоровых новорожденных и в течение всего времени исследования не изменялись. Первые часы постнатальной жизни характеризуются активной трансформацией эритроцитов из одной формы в другую. Отсутствие у недоношенных новорожденных в течение раннего неонатального периода дискоцитов свидетельствует о сниженной устойчивости мембран эритроцитов к действию неблагоприятных внутриутробных факторов. Последствия пренатального воздействия на мембрану эритроцитов сохраняется в течение определенного времени и выходят за рамки раннего неонатального периода. Рождение ребенка прекращает каскад патологических реакций, но нормализация исследуемых показателей к седьмым суткам постнатального возраста не происходит. Сохраняется высокий мембранный flickering, нет стабилизации морфологического состава эритроцитов. **Ключевые слова:** многоплодие, наноструктура мембран, эритроциты, недоношенные новорожденные, плацента.

В механизмах развития критических состояний важная роль принадлежит изменению эритроцитов [1–7]. В настоящее время вопросам перинатологии уделяется большое внимание, это обусловлено тем, что частота рождения недоношенных и больных детей не снижается. Особое внимание уделяется многоплодной беременности, при которой существует высокий риск антенатальной и интранатальной гибели плодов, рождения недоношенных детей, особенно с низкой и экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) [8, 9]. Наряду с комплексным обследованием ребенка важной задачей является исследование эритроцитов и других клеток в остаточной пуповинной крови (ОПК). При многоплодии, преждевременных родах выявляемые различия клеточного состава пуповинной крови и крови новорожденного первых суток жизни позволяет предположить, что повышенное содержание многих клеточных элементов в ОПК может быть адаптацией к процессу родов или причиной заболеваний. В то же время гипоксия — мощный фактор, влияющий на состояние эритроцитов. Установлено, что при острой гипоксии повы-

шается количество эритроцитов, концентрация гемоглобина. Внутриутробная гипоксия приводит к увеличению количества нормобластов в ОПК, что свидетельствует о стимуляции эритропоэза [10].

Активные процессы гемопоэза у глубоконедоношенных детей с ЭНМТ являются необходимым условием адаптации в раннем неонатальном периоде. Недостаточное костно-мозговое кроветворение, снижение гемоглобина, количества эритроцитов, гематокрита, изменение морфометрических характеристик клеток крови — пойкилоцитоз, являются прогностически неблагоприятным признаком. У недоношенных детей с благоприятным процессом адаптации нормализация эритропоэза наблюдается только к концу 1–2-го месяца жизни [11].

Диагностическую значимость имеют не только количественные характеристики исследуемых клеток, но и морфологический состав, структура мембран, выявление обратимых и необратимых изменений. От функционального состояния эритроцитарной мембраны зависит кислородтранспортная функция эритроцитов [12]. Изучение морфологии эритроцитов с использованием световой иммерсионной микроскопии показало, что у новорожденных с полиорганной недостаточностью к 7-м суткам жизни наиболее часто встречающимися формами эритроцитов являются эхиноциты, овалоциты, сфероциты, шистоциты, что

Адрес для корреспонденции:

Перепелица Светлана Александровна  
E-mail: sveta\_perpeliza@mail.ru

Общая характеристика новорожденных

Показатели	Значение показателей ( $M \pm \sigma$ ), %	
	$n=14$	
Гестационный возраст, недель	34,1±1,7	
Масса тела, грамм	2065,4±304,8	
Двойни, из них:	4	
Бихориальная биамниотическая	3	
Монохориальная биамниотическая	1	
Тройни	2	
Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни, балл	6,2±1,0	
Оценка по шкале Апгар на 5-й минуте жизни, балл	7,2±0,7	
Пол ребенка:		
мужской	11 (78,6)	
женский	3 (21,4)	
Количество детей на ИВЛ	4 (28,6)	
Характер околоплодных вод: светлые	12 (85,7)	
Окрашены кровью	2 (14,3)	

может быть обусловлено влиянием различных факторов, в том числе воздействием на эритроцитарную мембрану оксидативного стресса [13, 14]. При изучении ультраструктурных характеристик эритроцитов с помощью световой и просвечивающей электронной микроскопии ультраструктурных характеристик эритроцитов определили, что индивидуальная ультраструктура дискоцитов и planoцитов не всегда равномерно однородная. Для дискоцита характерно утолщение зоны наружного липидного бислоя клеточной оболочки. Ультраструктура стоматоцитов более гетерогенная, по сравнению с дискоцитами и planoцитами. В начале формирования для стоматоцитов характерна меньшая оптическая плотность, увеличивающаяся при дальнейшей трансформации клетки. На поверхности стоматоцитов формируются дубликатуры клеточной оболочки. Трансформация дискоцитов в стоматоциты в ряде случаев ведет к выходу из клеток гемоглобина и части внутреннего содержимого через малые участки деструкции бислоевой клеточной оболочки. Ультраструктура стоматоцитов характеризуется меньшей равномерностью клеточной мембраны, увеличенным по сравнению с дискоцитами числом ее локальных повреждений, менее равномерным внутриклеточным распределением гемоглобина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что обратимая трансформация «дискоцит → стоматоцит» и обратно не может иметь абсолютно идентичного характера, поскольку превращение стоматоцита

в дискоцит будет требовать «залечивания» локальных деструктивных изменений в клетках [15]. Атомно-силовая микроскопия позволяет изучать микроструктуру мембран эритроцитов при различных заболеваниях и критических состояниях [16, 17].

Цель работы — выявление особенностей мембран эритроцитов и их наноструктур у недоношенных детей, рожденных от многоплодной беременности.

## Материал и методы

Провели исследование наноструктуры мембран эритроцитов 28 новорожденных, из них 14 недоношенных детей, рожденных от многоплодной беременности, составили группу исследования. Общая характеристика недоношенных новорожденных представлена в таблице 1. Средний гестационный возраст составил 34,1±1,7 нед., масса тела при рождении — 2065,4±304,8 г. В выборке — 4 спонтанных двойни, из них бихориальных биамниотических — 3, монохориальная биамниотическая — 1, а также 2 трихориальные триамниотические тройни, полученные методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО).

В проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) нуждалось 4 (28,6%) ребенка с респираторным дистресс-синдромом (РДСН). Длительность ИВЛ составила 52±23 часа.

У большинства новорожденных были светлые околоплодные воды, у 2-х детей — окрашены кровью вследствие отслойки плаценты. Преваляровал мужской пол.

Критерий исключения: изоиммунизация новорожденного по АВО-системе и резус-фактору.

Важную роль в оценке состояния новорожденного играют данные о состоянии здоровья матери, течения беременности, характере родов. Анамнестические данные матерей представлены в таблице 2.

Таблица 2

Акушерский анамнез матерей

Показатели	Значение показателей ( $M \pm \sigma$ ), %	
	$n=6$	
Возраст матерей, лет	31,2±5,4	
Первичное и вторичное бесплодие	2 (33,3)	
Первобеременные	2 (33,3)	
Физиологическое течение беременности	1 (16,7)	
Медицинские аборты, самопроизвольные выкидыши, предшествующие преждевременные роды	4 (66,7)	
Беременность методом ЭКО	2 (33,3)	
Угроза прерывания в различные сроки	5 (83,3)	
Тяжелая форма гестоза 2-й половины беременности	1 (16,7)	
Истмико-цервикальная недостаточность	1 (16,7)	
Роды через естественные родовые пути	1 (16,7)	
Оперативное родоразрешение (экстренное)	5 (83,3)	

Акушерский анамнез в 83,3% случаев был отягощен: состоящей беременностью предшествовали медицинские аборт, самопроизвольные выкидыши, что с ранних сроков создавало предпосылки угрозы прерывания беременности, наступление преждевременных родов. Физиологическое течение беременности отметили в одном случае.

Первичное и вторичное бесплодие, многоплодная беременность, полученная с помощью ЭКО, являются факторами высокого риска по патологическому течению. В нашем наблюдении 2 беременности, полученные с помощью высоких репродуктивных технологий, протекали с угрозой прерывания на ранних сроках и осложнились в одном случае истмико-цервикальной недостаточностью, в другом — развитием гестационного сахарного диабета, гестоза второй половины беременности, что явилось причиной досрочного родоразрешения. В одном случае третий ребенок родился без признаков живорождения, подтверждена интранатальная гибель плода.

Причины наступления преждевременных родов: преждевременное излитие околоплодных вод (ПИОВ), отслойка низко расположенной плаценты, стремительные роды, гестоз второй половины беременности, истмико-цервикальная недостаточность. У большинства беременных (5–83,3%) проведено экстренное кесарево сечение по Гусакову, лишь в одном случае роды прошли через естественные пути.

Все беременные, включенные в исследование, получали лечение, направленное на пролонгирование беременности, улучшение маточно-плацентарного кровотока.

Для получения нормальных эритроцитов в поле АМС исследовали остаточную пуповинную кровь 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и срочными родами. Средний гестационный возраст детей составил  $39,4 \pm 0,5$  недель, масса тела при рождении —  $3131,7 \pm 588,8$  грамм, оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни —  $8 \pm 0,4$  балла. 78,5% новорожденных родились через естественные родовые пути, 21,4% — путем экстренного кесарева сечения. При рождении у детей признаков острой гипоксии не было. Морфологическое исследование плаценты не выявило патологических изменений.

В работе использовали следующие методы:

1. Исследование эритроцитов новорожденных в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь недоношенных новорожденных, центральная венозная кровь через 7 часов после рождения и венозная кровь новорожденных 7-х суток жизни. ОПК забирали сразу после пересечения пуповины. Забор осуществляли в специальные пробирки объемом 0,25 мл с добавлением консерванта ЭДТА, кровь перемешивали с консервантом, отстаивали в течение 30 минут, затем готовили монослой эритроцитов для дальнейшей обработки в поле атомно-силового микроскопа: 20 мкл крови наносили на предметное стекло и готовили монослой эритроцитов с помощью центрифуги Diff Spin 2 (США). Изображение эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA prima» (Россия) в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования — 512 и 1024, поля сканирования —  $100 \times 100$  мкм,  $10 \times 10$  мкм. Анализ наноструктуры мембран проводили с помощью пространственного преобразования Фурье с разложением наноповрхности мембран эритроцитов на три порядка: 1-й порядок — спектральное окно 1000–600 нм, коррелирующий с явлением flickering (поверхностные волны на мембране эритроцитов [19–21]) мембраны и отражает его макроструктурные свойства; 2-й порядок — спектральное окно 80–300 нм, связанный с конфигурацией спектрального матрикса; 3-й порядок — спектральное окно 20–60 нм, отражающий состояние протеиновых узлов соединения. Подробная методика анализа наноструктуры изложена в ранее опубликованных работах [18, 19].

2. Гистологическое исследование плаценты. Морфологические данные сопоставляли с гестационным возрастом, со-

стоянием детей при рождении, клиническими симптомами и морфологией эритроцитов.

3. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Origin 6.1., которая входит в состав Microsoft Office (USA). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Изучение остаточной пуповинной крови дает представление об антенатальном и интранатальном состоянии плода. Выявили, что при благоприятно протекавшей беременности и срочных родах в ОПК доношенных новорожденных циркулирует 85% эритроцитов плоской формы — планоциты — и 15% трансформированных эритроцитов, из них: эхиноцитами и стоматоцитами представлены по 3% клеток, другими аномальными клетками — 9%, представляющими промежуточные формы эритроцитов, связанные с выраженностью внутриутробного пойкилоцитоза (рис. 1).

При исследовании морфологии эритроцитов недоношенных детей, рожденных от многоплодной беременности, получили следующие результаты: в ОПК выявили полиморфизм эритроцитов. Дискоциты, как основная физиологическая форма эритроцитов, были не характерны для детей этой группы. Они присутствовали в крови 3-х новорожденных, из них лишь у одного (второй ребенок из бихориальной биамниотической двойни) содержание дискоцитов составило 43% от общего количества клеток, у других детей визуализировали единичные клетки. Планоциты визуализировали у 12 (85,7%) новорожденных, но частота их встречаемости различалась: у 9 детей планоциты составляли от 41 до 89,4% клеток, т. е. представляли основную часть эритроцитов; у 3-х детей частота их встречаемости составила 5–29% и у 2-х — планоциты не определялись.

Стоматоциты выявили у 12 (85,7%) новорожденных, их количество варьировало от 3 до 95%. Высокий стоматоцитоз был выявлен у первого ребенка из бихориальной биамниотической двойни с коллизией близнецов в родах.

Эхиноциты практически не встречались в ОПК. У одного ребенка из бихориальной биамниотической двойни выявили 35% эхиноцитов, еще у четверых детей визуализировали единичные эхиноциты. Их не было у новорожденных из монохориальной биамниотической двойни, тройни.

Морфологическая картина эритроцитов у двоен не зависела от хориальности плаценты. В ОПК присутствовали три вида клеток: планоциты, стоматоциты и другие аномальные клетки, число которых связано с выраженностью внутриутробного пойкилоцитоза. Этот феномен характерен практически для всех новорожденных, включенных в исследование.

У троен половина клеток была представлена планоцитами, вторая половина — стоматоцитами и другими аномальными клетками. При интранатальной гибели

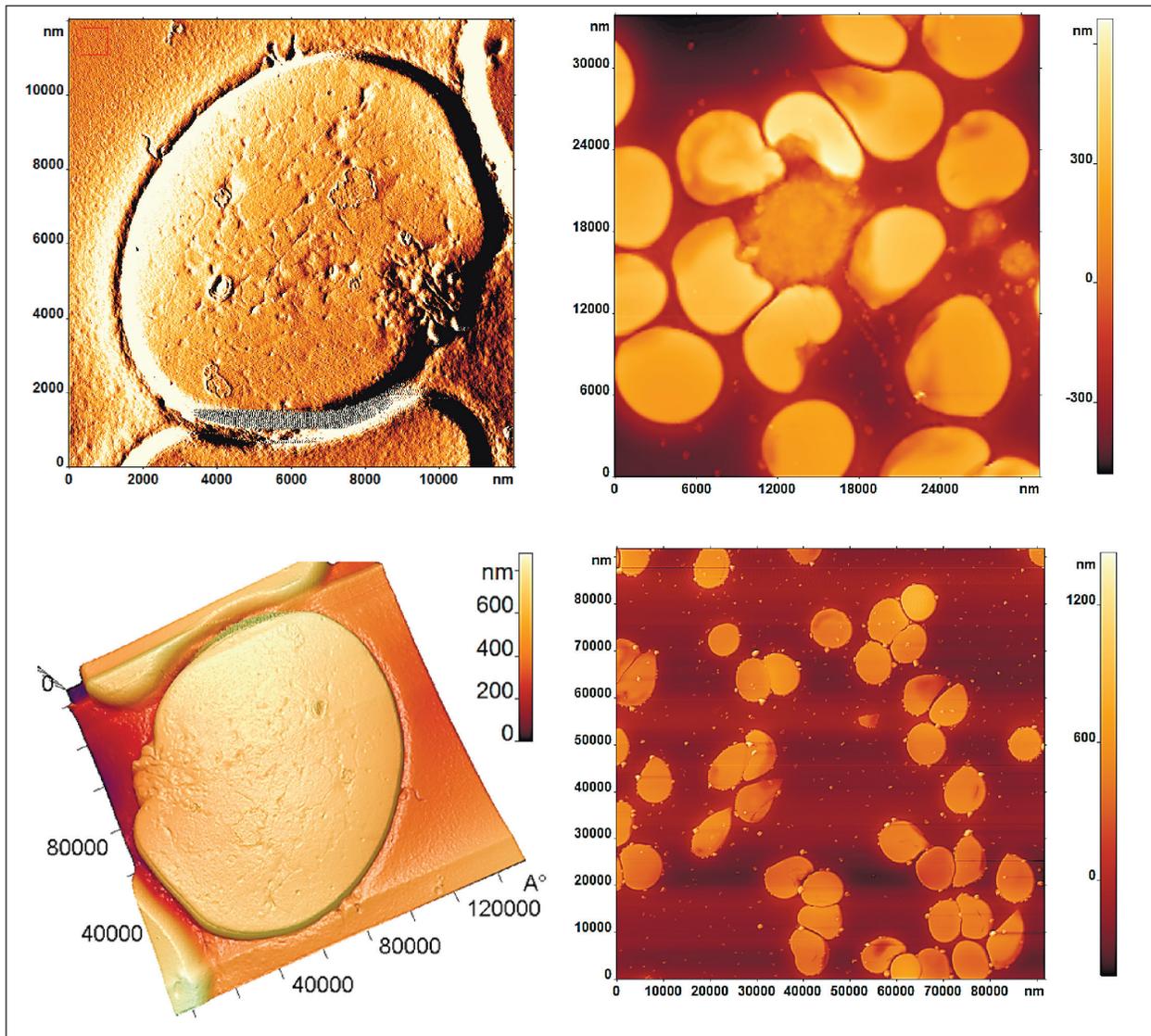


Рис. 1. Аномальные формы эритроцитов, обусловленные внутриутробным пойкилоцитозом (изображение в поле АСМ).

ли третьего плода в ОПК определяли 55% планоцитов и 45% других аномальных клеток, что свидетельствовало о недавней его гибели.

В проведении ИВЛ нуждалось 4 новорожденных, из них 2-е детей из бихориальной биамниотической двойни, а также 2-й и 3-й ребенок из трихориальной триамниотической тройни. Двойня родилась при стремительных родах в сроке гестации 32 недели, что явилось причиной острой интранатальной гипоксии и развития РДСН. Морфологический состав эритроцитов в ОПК 1-го ребенка: 89,4% планоцитов и 10,6% стоматоцитов; 2-го новорожденного — 41,3% планоцитов, 22,6% стоматоцитов и 35,5% других аномальных клеток. Для двоих детей из тройни, которым проводилась ИВЛ, была характерна аналогичная морфологическая картина эритроцитов.

Таким образом, при рождении у недоношенных новорожденных планоциты являются основной морфологической формой эритроцитов. Наличие стоматоцитов и других аномальных клеток свидетельствует о вну-

триутробном пойкилоцитозе. Планоциты являются транзитной физиологической формой эритроцитов у новорожденных независимо от гестационного возраста, количества плодов.

При анализе наноструктуры мембраны эритроцитов выявлено, что при рождении у 8 (57,1%) детей высота первого порядка ( $h_1$ ) достоверно ( $p < 0,05$ ) превышала показатель детей группы сравнения, т. е. имело место внутриутробное нарушение макроструктуры мембран эритроцитов — мембранный flickering. Он был характерен для второго ребенка из двойни, независимо от хориальности плаценты, второго и третьего ребенка из тройни, причем величина показателя достоверно ( $p < 0,05$ ) увеличивалась от первого к третьему. Например,  $h_1$  у первого ребенка составляла 3 нм, у второго — 5 нм, у третьего — 7,5 нм., что, возможно, обусловлено гипоксией, которую испытывают последующие дети при многоплодных родах. Коллизия близнецов сопровождалась мембранным flickering у обоих детей, но у первого ребенка высота наноструктуры  $h_1$  была увеличена в 12 раз



Рис. 2. Группы новорожденных для исследования мембранного flickering в остаточной пуповинной крови.

и сопровождалась практически абсолютным стоматоцитозом (рис. 2).

Высоты  $h_2$  и  $h_3$  достоверно не отличались от показателей детей группы сравнения, т. е. спектринный матрикс и структурное состояние белков эритроцитов в ОПК были стабильными.

Выявлены корреляционные связи (в скобках указаны уравнения регрессии):

- обратная связь средней силы насыщения гемоглобина кислородом ( $\%SO_2c$ ) и высотой  $h_1$  ( $r=-0,7$ ;  $p=0,03$ ); ( $y=7,18181672-0,0527131533*x$ );

- обратная связь средней силы напряжения углекислого газа ( $pCO_2$ ) и высотой  $h_2$  ( $r=-0,6$ ;  $p=0,04$ ); ( $y=3,31985946-0,0370085327*x$ );

- прямая связь средней силы при оценке по шкале Апгар на пятой минуте жизни и высотой  $h_1$  через 7 часов после рождения ( $r=0,6$ ,  $p=0,02$ ); ( $y=-15,0731707+2,97926829*x$ ).

Т. е. на состояние мембраны эритроцитов влияли другие показатели ОПК, в частности,  $pCO_2$ , величина которого была физиологической и составляла  $47,5 \pm 10,4$  мм рт. ст., что благоприятно влияет на спектринный матрикс мембраны эритроцитов. Интранатальное низкое насыщение гемоглобина кислородом влияет на величину мембранного flickering. Низкая оценка по шкале Апгар свидетельствует об острой интранатальной гипоксии, в нашем исследовании у большинства новорожденных ее признаков не было.

При морфологическом исследовании плацент установлено, что у двоен плацента соответствует сроку гестации, регистрировали сочетание хронической субкомпенсированной и острой плацентарной недостаточности, умеренные нарушения водно-солевого обмена: отек децидуальной ткани, стромы ворсин, вартонова студия. Выраженные инволютивно-дистрофические изменения: фибрин, фибриноид, кальцификаты; некоторые ворсины замурованы в фибриноид. Слабая васкуляризация ворсин, в части опорных ворсин выявили облитерацию просвета сосудов. Умеренные дистрофические изменения стенок сосудов. Признаки острой плацентарной недостаточности: парез сосудов, кровоизлияния. При низкой плацентации и преждевременной отслойке низко расположенной плаценты отсутствует васкуляризация ворсин.

Для троен характерны индивидуальные морфологические изменения в плаценте и аномалия пуповины.

В одном случае у 1-го и 2-го плодов плацента соответствовала сроку гестации, нарушения созревания ворсин нет. Выявили умеренные инволютивно-дистрофические изменения: фибрин, кальцификаты, псевдоинфаркты, дистрофия клеток. Очаговые кровоизлияния в межворсинчатом пространстве, расстройства кровообращения. Частичная облитерация сосудов опорных ворсин. Хорошая васкуляризация ворсин, мелкие синцитиальные узлы, синцитиокапиллярные мембраны. В децидуальном слое выявили диффузную лейкоцитарную инфильтрацию. Парацентральное прикрепление пуповины 1-го плода, краевое прикрепление пуповины 2-го плода. Короткая пуповина обоих плодов. У 3-го плода (интранатальная гибель) выявили декомпенсированную плацентарную недостаточность: выраженные инволютивно-дистрофические изменения, обызвествленные синцитиальные узлы, нарушение созревания и ветвления ворсин, склероз стромы ворсин, редукция сосудистого русла с нарушением плацентарного кровообращения. Острая плацентарная недостаточность: парез сосудов, очаговые кровоизлияния. Краевое прикрепление и короткая пуповина.

В другом случае имело место нарушение созревания и ветвления ворсин: преобладание мелких ворсин, их хаотичное расположение. Инволютивно-дистрофические изменения: фибрин, кальцификаты, псевдоинфаркты; дистрофия клеток. Очаговые кровоизлияния в межворсинчатом пространстве, расстройства кровообращения. Частичная облитерация сосудов опорных ворсин. Выявленные изменения в плаценте сопровождаются нарушениями кровообращения, способствуют развитию гипоксии плода, неблагоприятно влияют на пренатальное состояние эритроцитов, вызывают повреждение наноструктуры мембран.

Показатели газообмена в ОПК при рождении отражали интранатальное состояние новорожденных: напряжение кислорода ( $pO_2$ ) —  $39,3 \pm 16$  мм рт. ст., насыщение гемоглобина кислородом ( $SO_2c$ ) —  $58,6 \pm 23,7\%$ . Клиническое состояние 10 (71,4%) детей было стабильным, дыхательной недостаточности не было, кислородная зависимость умеренная, проводили инфузионную терапию, оксигенацию через лицевую маску с фракцией кислорода = 30–40%. Ранний период адаптации в дальнейшем протекал гладко.

Через 7 часов после рождения морфологический состав эритроцитов практически не изменялся. У новорожденных определяли в основном три вида клеток: стоматоциты, planoциты и другие аномальные клетки. Достоверного изменения количества этих клеток по сравнению с ОПК не выявлено ( $p>0,05$ ). У трех детей не выявили зависимости числа дискоцитов и эхиноцитов от порядка рождения, хориальности плаценты и других факторов.

Динамика  $h_1$  и  $h_2$  мембраны эритроцитов в дальнейшие периоды исследования представлена на графике (рис. 3). Через 7 часов после рождения произошло увеличение  $h_1$ , но данные изменения не были достоверными ( $p>0,01$ ). Выявили индивидуальные из-

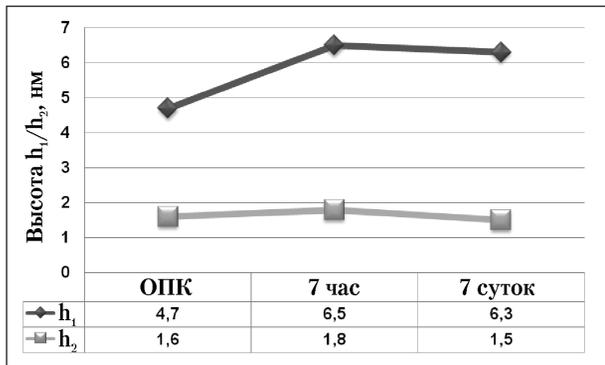


Рис. 3. Динамика высот  $h_1$  и  $h_2$  мембраны эритроцитов в различные периоды исследования.

ОПК — остаточная пуповинная кровь.

менения исследуемого показателя: у 8 (57,1%) новорожденных с низким показателем  $h_1$  эритроцитов в ОПК к 7 часам жизни произошло его увеличение до 4,5–12 нм, т. е. сохранялись нарушения микроструктуры мембран эритроцитов. В остальных случаях  $h_1$  уменьшилась до 1,5–3 нм., т. е. состояние спектринного матрикса и белковых кластеров было стабильным.

Течение раннего неонатального периода характеризовалось достоверным увеличением количества стоматоцитов, уменьшением числа planoцитов ( $p < 0,05$ ), отсутствием дискоцитов и эхиноцитов. Стоматоциты определяли у 13 (92,9%) детей, их количество варьировало от 20% до 100%, а высокий стоматоцитоз выявили у 8 (57,1%) новорожденных.

К 7-м суткам постнатального возраста показатели  $h_1$  и  $h_2$  мембраны эритроцитов достоверно ( $p > 0,01$ ) не изменились. Изменения мембранного flickering были разнонаправленными: у 5 (35,7%) новорожденных появилась тенденция к снижению высоты  $h_1$ . У 2-х (14,3%) детей с высоким показателем  $h_1$  в эритроцитах ОПК отмечали волнообразное изменение  $h_1$ : снижение к 7 часам жизни, затем резкое увеличение к 7 суткам постнатального возраста; в остальных случаях высота  $h_1$  практически не изменилась.

К 7-м суткам жизни: состояние новорожденных стабильное, признаков дыхательной недостаточности и кислородной зависимости нет, инфузионная терапия у большинства детей отменена на 4–5-е сутки жизни.

Течение РДСН у всех 4-х новорожденных было благоприятным, к 5-м суткам постнатального возраста дыхательная недостаточность разрешилась, однако к 7-м суткам жизни произошла трансформация всех эритроцитов в стоматоциты у 2-го ребенка из бихориальной биамниотической двойни, у 1-го ребенка стоматоцитоз составил 74,6%, у 3-го ребенка из тройни — 51%. Выявить взаимосвязь стоматоцитоза с проведением ИВЛ было невозможно из-за малого количества наблюдений.

Течение многоплодной беременности и наступление преждевременных родов обусловлено хронической и острой плацентарной недостаточностью, аномалией пуповины, что подтверждалось морфологическим исследованием и показателями газообмена при рождении. Это

вызывало у недоношенных новорожденных пренатальное изменение формы и мембраны эритроцитов различной степени выраженности. При рождении у детей основной морфологической формой эритроцитов являются planoциты, при этом определяются стоматоциты и другие аномальные клетки, являющиеся промежуточными, обратимыми формами. Изменение формы эритроцитов может происходить вследствие изменения соотношения площадей наружного и внутреннего монослоев плазматической мембраны и является обратимым явлением. Вместе с этим выявляется пренатальное повреждение наружной поверхности мембраны эритроцитов — мембранный flickering, а спектринный матрикс и белковые кластеры не изменяются, т. е. наименее стабильной и подверженной патологическим изменениям на мембране эритроцитов является поверхность первого порядка, отражающая повреждение мембраны на этом уровне. На высоты  $h_1$  и  $h_2$  мембраны эритроцитов влияют другие показатели ОПК, в частности,  $pCO_2$ , %  $SO_2$ . Выявили корреляционную зависимость этих показателей и исследуемых высот мембраны эритроцитов. Внутренняя, цитоплазматическая, поверхность была устойчива к длительному воздействию гипоксии, т. к. высоты  $h_2$  и  $h_3$  мембраны эритроцитов при рождении соответствовали аналогичным высотам здоровых новорожденных и в течение всего времени исследования не изменялись.

Первые часы постнатальной жизни характеризуются активной трансформацией эритроцитов из одной формы в другую. Отсутствие у недоношенных новорожденных в течение раннего неонатального периода дискоцитов свидетельствует о сниженной устойчивости мембран эритроцитов к действию неблагоприятных внутриутробных факторов.

Последствия пренатального воздействия на мембрану эритроцитов сохранялись в течение определенного времени и выходят за рамки раннего неонатального периода. Рождение ребенка прекращало каскад патологических реакций, но нормализации исследуемых показателей к седьмым суткам постнатального возраста не происходило. Сохраняется высокий мембранный flickering, нет стабилизации морфологического состава эритроцитов.

## Выводы

1. Методом атомно-силовой микроскопии установлено, что у недоношенных новорожденных во время неблагоприятно протекающей многоплодной беременности происходит антенатальное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов.

2. Установлено, что течение раннего периода адаптации характеризуется сменой морфологических форм эритроцитов: planoцитоз сменяется стоматоцитозом, а также определяются другие аномальные клетки, появление которых обусловлено происходящими изменениями мембраны эритроцитов.

3. Мембранный flickering наиболее выражен у второго ребенка из двойни, независимо от хориальности

ти плаценты, второго и третьего ребенка из тройни, причем величина показателя увеличивается от первого к третьему.

#### Литература

1. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 52–60.
2. Мороз В.В., Голубев А.М., Козлова Е.К., Афанасьев А.В., Гудкова О.Е., Новодержкина И.С., Марченков Ю.В., Кузовлев А.Н., Заржецкий Ю.В., Костин А.И., Волков Д.П., Яковлев В.Н. Динамика морфологических изменений эритроцитов и биохимических показателей консервированной цельной крови в различные сроки хранения. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (1): 5–13.
3. Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Козлов А.П., Черныш А.М. Измерение локальной жесткости мембран эритроцитов с помощью атомно-силовой спектроскопии. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (1): 14–17.
4. Мороз В.В., Сергунова В.А., Назаров Б.Ф., Козлова Е.К., Черныш А.М., Власов И.Б. Изменения наноструктуры мембран красных клеток крови при кровопотере на этапах хирургического лечения у больных при операциях на спинном мозге. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (2): 5–11.
5. Мороз В.В., Мяжкова Е.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Остапченко Д.А., Черныш А.М., Решетняк В.И. Морфологические особенности эритроцитов у больных с тяжелой сочетанной травмой. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (3): 14–23.
6. Мороз В.В., Новодержкина И.С., Антошина Е.М., Афанасьев А.В. Влияние перфторана на морфологию эритроцита при острой кровопотере. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (5): 5–10.
7. Перепелица С.А., Алексеева С.В., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. Наноструктура мембран эритроцитов недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом. *Общая реаниматология*. 2013; 9 (6): 17–29.
8. Калашиков С.А., Сичинава Л.Г., Савинова А.А. Перинатальные исходы при монохориальной двойне. *Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2008; 7 (6): 41–45.
9. Сичинава Л.Г., Папина О.Б. Современные аспекты ведения многоплодной беременности. *Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2010; 9 (1): 71–76.
10. Румянцев А.Г., Румянцев С.А. Пуповинная кровь, как источник информации о состоянии плода. *Педиатрия*. 2012; 91 (3): 44–52.
11. Стоцкая Г.Е., Литвинова А.М., Пестряева Л.А. Особенности гемопоза в раннем неонатальном периоде у детей с экстремально низ-

4. Коллизия близнецов сопровождается мембранным flickering высокой интенсивности у обоих детей и высоким стоматоцитозом.

- кой массой тела с экстремально низкой массой тела. *Педиатрия*. 2010; 89 (1): 37–40.
12. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты. *Успехи физиол. наук*. 2001; 32 (3): 66–78. PMID: 11565426
  13. Тэмл Х., Диам Х., Хафферлах Т. Атлас по гематологии. М.: МЕДпресс-Информ; 2010: 208.
  14. Серебрякова Е.Н., Волосников Д.К., Симакова Н.В. Морфология эритроцитов и показатели перекисного окисления липидов в плазме у новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности. *Педиатрия*. 2012; 91 (1): 25–31.
  15. Карташова Н.М., Кидалов В.Н., Наумова Э.М., Хадарцев А.А., Цогоев А.С. К вопросу о физиологической значимости изменения формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови при их трансформации в стоматоциты. *Вестн. новых мед. технологий*. 2005; 11 (1): 8–11.
  16. Цицина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различных морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2005; 1: 48–53.
  17. Мороз В.В., Козлова Е.К., Черныш А.М., Гудкова О.Е., Бушуева А.В. Изменения структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (6): 5–10.
  18. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Borshegovskaya P.Y., Bliznjuk U.A., Rysaeva R.M., Gudkova O.Y. Comparison of red blood cell membrane microstructure after different physicochemical influences: atomic force microscope research. *J. Crit. Care*. 2010; 25 (3): 539.e1–539.e12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2010.02.007>. PMID: 20381299
  19. Черныш А.М., Козлова Е.К., Мороз В.В., Борщеговская П.Ю., Близнюк У.А., Рысаева Р.М. Поверхность мембран эритроцитов при калиброванной электропорации: исследование методом атомной силовой микроскопии. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2009; 148 (9): 347–352. PMID: 20396711
  20. Кононенко В.Л. Фликкер эритроцитов. 2. Результаты экспериментальных исследований. *Биол. мембраны*. 2009; 26 (5): 451–467.
  21. Park Y., Best C.A., Auth T., Gov N.S., Safran S.A., Popescu G., Suresh S., Feld M.S. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107 (4): 1289–1294. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910785107>. PMID: 20080583

Поступила 24.08.2013

## The Specific Features of Red Blood Cell Membranes in Premature Neonates Due to Multiple Pregnancy

S. A. Perepelitsa<sup>1,2</sup>, V. A. Sergunova<sup>1</sup>, O. E. Gudkova<sup>1</sup>, S. V. Alekseeva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

<sup>2</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

<sup>3</sup> Maternity Hospital One, Kaliningrad

**Objective:** to reveal the specific features of red blood cell membranes and their nanostructures in premature babies born from multiple pregnancy. **Subjects and methods.** The investigation enrolled 28 newborn infants, including 14 premature babies born from multiple pregnancy. The mean gestational age was 34.1±1.7 weeks; their birth weight was 2065±304.8 g.

#### Correspondence to:

Perepelitsa Svetlana Aleksandrovna  
E-mail: sveta\_perepeliza@mail.ru

A comparison group consisted of 14 term neonates born from favorable pregnancy and term labor. The mean gestational age of the babies was 39.4±0.5 weeks; their birth weight was 3131.7±588.8 g; the infants had a one minute Apgar score of 8±0.4. Their red blood cells were exam-