

СОСТОЯНИЕ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ В РАННЕМ НЕОНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

С. А. Перепелица^{1,2}, В. А. Сергунова¹, О. Е. Гудкова¹¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва, Россия
107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2² Балтийский Федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия
236016, г. Калининград, ул. А.Невского, д.14

The Red Blood Cell Membrane of Preterm Infants in the Early Neonatal Period

S. A. Perepelitsa^{1,2}, V. A. Sergunova¹, O. E. Gudkova¹¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Moscow, Russia
25, Petrovka St., Build. 2, Moscow 107031² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia
14, A. Nevsky St., Kaliningrad 236041

Цель — исследование наноструктуры эритроцитов и эритроцитарных индексов недоношенных новорожденных. **Материал и методы.** В исследование включено 47 новорожденных, из них 33 недоношенных детей, составивших группу исследования, и 14 доношенных новорожденных группы сравнения. Гестационный возраст недоношенных новорожденных составлял $33,3 \pm 1,9$ недель, масса тела при рождении — $2065,4 \pm 304,8$ грамм. Проводились подсчет количества эритроцитов, определение гемоглобина, расчет эритроцитарных индексов, а также исследование эритроцитов в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). **Результаты.** При рождении для недоношенных новорожденных характерен макроцитоз, внутриутробный пойкилоцитоз, нарушение макроструктуры мембран эритроцитов. Внутриутробная гипоксия влияет на наноструктуры мембраны эритроцита: фосфолипидный бислой и спектриновый матрикс, без повреждения белкового компонента мембраны. Выявленные изменения являются обратимыми и направлены на сохранение функциональной способности эритроцитов в критической ситуации. На показатели эритроцитарного звена при рождении влияют гестационный возраст, масса тела ребенка, количество гемоглобина, содержание холестерина и стандартного бикарбоната в крови. Течение раннего неонатального периода характеризовалось активным процессом на мембранах эритроцитов, сменой морфологических форм, что свидетельствует о продолжающейся постнатальной перестройке эритропоэза, адаптации недоношенного ребенка к новым условиям внешней среды. **Ключевые слова:** мембрана эритроцита, наноструктура, эритроцитарные индексы, недоношенные новорожденные.

Objective: to study the nanostructure of red blood cell membranes and erythrocyte index in preterm neonatal infants. **Subjects and methods.** The trial enrolled 47 neonatal infants, including 33 preterm infants who were included in a study group and 14 full-term infants who formed a comparative group. The gestational age of the preterm infants was 33.3 ± 1.9 weeks and the birth weight was 2065.4 ± 304.8 g. Red blood cell counts, hemoglobin, and erythrocyte indices were estimated and the red blood cells were examined using an atomic-force microscope. **Results.** At birth, the preterm infants showed macrocytosis, intrauterine poikilocytosis, and the impaired nanostructure of red blood cell membranes. Intrauterine hypoxia affects the red blood cell membrane nanostructures: a phospholipid bilayer and a spectrin matrix, without damaging the membrane protein component. The detected changes are reversible and directed to maintaining the functional ability of red blood cells in a critical situation. At birth, gestational age, a baby's weight, hemoglobin, and blood cholesterol and standard bicarbonate levels influence the parameters of a red blood cell component. The early neonatal period was characterized by an active process on the red blood cell membranes and a change of morphological forms, suggesting the continuing postnatal rearrangement of erythropoiesis and a preterm infant's adaptation to new environmental conditions. **Key words:** red blood cell membrane, nanostructure, erythrocyte indices, preterm neonatal infants.

DOI:10.15360/1813-9779-2014-6-46-54

Аntenatalная и интранатальная гипоксия плода остаются предметом пристального изучения, т.к. последствия перенесенной гипоксии непредсказуемы и для доношенных, и для недоношенных новорожденных

Antenatal and intrapartum hypoxia is a subject of extensive research because the consequences of hypoxia are not predictable both in full-term and preterm neonates. The violation of placenta morphological structure leading

Адрес для корреспонденции:

Перепелица Светлана Александровна
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

Correspondence to:

Perepelitsa Svetlana Aleksandrovna
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru

ных. Нарушение морфологической структуры плаценты, приводящее к развитию внутриутробной гипоксии, часто вызывает гематологические нарушения у плода и новорожденного [1]. Гипоксия вызывает различные изменения эритропоэза: при внутриутробной гипоксии в пуповинной крови определяется увеличение нормобластов, при острой гипоксии этот феномен отсутствует, т.е. нормобластоз появляется только при длительной внутриутробной гипоксии [2].

Железодефицитная анемия у беременных оказывает влияние на мембраны эритроцитов плода. В постнатальном возрасте у новорожденных нарушается пространственная конфигурация и топография белков мембраны с их смещением в наружные слои мембраны, снижением кальций — связывающей способности мембран. Дефицит железа у матери способствует дефицитному эритропоэзу у новорожденных, затруднению гемоглобинообразования, появлению хронической гипоксии и дисбалансу в системе эритрона, что проявляется нарушениями физико-химических показателей мембран эритроцитов и метаболизма клеточных структур [3].

Развитие гестоза сопровождается выраженными нарушениями морфологического строения эндотелия артерий и вены пуповины. При этом происходит повреждение эндотелиоцитов и в тех сосудах, где проходят процессы обмена между кровью и тканями. Плотность соприкосновения эндотелиоцитов определяет проницаемость сосудистой стенки, текучесть крови, сохранения гомеостатического равновесия. Морфологические изменения, выявленные в эндотелии сосудов пуповины коррелируют с тяжестью состояния новорожденного при рождении [4].

В норме содержание гемоглобина в крови новорожденных выше, чем у взрослых. Онтогенетической отличительной особенностью гемоглобина является смена его типов, что определяется парциальным давлением кислорода и сменой органов кроветворения. В начале пренатального развития (7–14 недели) в крови эмбрионов обнаруживаются эмбриональные гемоглобины: Говер 1, Говер 2, Портланд 1. Они обладают высоким сродством к кислороду, что важно для развития плода. Фетальный гемоглобин начинает синтезироваться с 14 недели беременности и достигает максимального содержания к моменту рождения. Гемоглобин взрослого типа появляется еще в период внутриутробного развития и становится основным на первом году жизни. Фетальный и взрослый гемоглобины отличаются по строению белковой части молекулы, что определяет их различные свойства, необходимые для транспорта кислорода [5].

Клиническое исследование эритроцитарного звена является необходимым условием при лечении новорожденных, находящихся в критическом состоянии. Исследования показали, что у новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности имеет место реактивация синтеза гемоглобина F, что, вероятно, обеспечивает более эффективный газообмен в условиях гипоперфузии тканей [6].

to the development of intrauterine hypoxia often causes hematological disturbances of fetus and newborn [1]. Hypoxia results indifferent changes of RBC during pregnancy: in cord blood it causes the increase of normoblast content. The latter phenomenon is not observed in acute hypoxia, i.e. normoblasts appear only during prolonged fetal hypoxia [2].

Iron deficiency anemia in mothers affects the RBC membranes of the fetus. The topography of the proteins is altered in these newborns in post-partum period. The proteins are transferred to the outer layers of the membranes resulting in reduction of a calcium — binding capacity of the membrane. The iron deficiency in pregnant women promotes deficient erythropoiesis in their newborns, the violation of hemoglobin formation, chronic hypoxia and imbalance in the erythron system, which all cause violations of physico-chemical properties of RBC membranes and metabolism of cellular structures [3].

Pre-eclampsia development is accompanied by severe disturbances of morphological structure of endothelium of umbilical cord arteries and veins. This causes the damage of endothelial cells in the vessels, where the processes of exchange between blood and tissues occur. The density of the contraction between endothelial cells is determined by the permeability of vascular wall and blood flow contributing to homeostatic balance. Morphological changes detected in the endothelium of blood vessels of the umbilical cord correlate with the severity of the newborn condition at birth [4].

Normal hemoglobin content in blood of newborns is higher than in adults. Ontogenetic distinctive feature of the hemoglobin is changing of its type, which is determined by the partial pressure of oxygen and the changes in blood-forming organs. In early prenatal period (at 7–14 weeks) embryonic hemoglobins (Gover 1, Gover 2, Portland 1) are detected in embryonal blood. Hemoglobin molecules possess high affinity for oxygen that is important for fetal development. Fetal hemoglobin is synthesized starting from week 14 of pregnancy and reaches its maximum content by the time of birth. Hemoglobin of adult type appears in utero and becomes the principal one on the first year of life. Fetal and adult hemoglobins differ by the structure of the protein part of the molecule, which is determined by their various properties required for normal transport of oxygen [5].

Clinical study of the RBC level is important when choosing the treatment of critically ill infants. According to previous studies the reactivation of hemoglobin F synthesis is observed in newborns with multiple organ failure, which probably provides a more efficient gas exchange in cases of hypoperfusion of tissues [6].

The study performed using the atomic force microscopy (AFM) showed the damage of RBC membrane nanostructure in preterm infants from multiple pregnancies with unfavourable conditions of pregnancy. The early period of adaptation is characterized by changing of RBC morphological forms: planocytosis is followed by stomatocytosis. Other RBC forms, which appear due to an active

Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано, что у недоношенных новорожденных при неблагоприятно протекающей многоплодной беременности происходит антенатальное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов. Течение раннего периода адаптации характеризуется сменой морфологических форм эритроцитов: платоцитоз сменяется стоматоцитозом, а также определяются другие формы, появление которых обусловлено активным процессом на мембране эритроцитов. Мембранный flickering наиболее выражен у второго ребенка из двойни, не зависимо от хориальности плаценты, второго и третьего ребенка из тройни, причем величина показателя увеличивается от первого к третьему. Коллизия близнецов сопровождается мембранным flickering высокой интенсивности у обоих детей и высоким стоматоцитозом [7, 8].

Для недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДСН) характерен внутриутробный пойкилоцитоз. Течение заболевания характеризуется нарушением микроструктуры мембран эритроцитов на уровне высот первого и второго порядков. Наиболее чувствительной является величина первого порядка, отражающая явление мембранного flickering, нормализация этого показателя происходит медленно. Структурное состояние белков мембраны эритроцитов не изменяется [7, 8].

Для проведения исследований применяются современные анализаторы, позволяющие определить максимальное количество показателей у новорожденных детей. В настоящее время все чаще используются эритроцитарные индексы, с помощью которых можно более точно оценить морфологические характеристики эритроцитов. К ним относят средний объем эритроцитов (MCV), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCHC), ширину распределения эритроцитов по объему (RDW-SD, RDW-CV). В работах показано, что некоторые эритроцитарные индексы зависят от срока гестации, так, MCV у новорожденных уменьшается с увеличением гестационного возраста, т. е. у глубоко недоношенных детей он составляет 119 ± 7 fl, к концу беременности — 106 ± 4 fl. Снижение MCV у недоношенных детей может быть признаком раннего дефицита железа, который пока не приводит к анемии. Аналогичным образом изменяется MCH. На MCHC не влияет срок гестации. Снижение MCH, отражающее гипохромию эритроцитов, может также использоваться для диагностики железодефицитной анемии [9–11]. Однако, необходимы четкие лабораторные критерии для исследуемых показателей, особенно в неонатологии, т.к. возможна неправильная интерпретация полученных данных [12].

Особым объектом исследования является остаточная пуповинная кровь, т.к. получение физиологических значений для параметров крови новорожденных малодоступны, в связи с тем, что ее исследование у здоровых новорожденных не производится, а полученные результаты от больных детей сложно оценить. Поэтому, усилия многих специалистов направлены на создание банка лабораторных данных [12, 13].

process on RBC membrane, are also observed. Membrane flickering is more often observed in the second infant of twins and the second and the third infant of triplets, regardless placenta chorionality. The value of the index increases from the first to the third infant. Collision of twins is also accompanied by intensive membrane flickering and high stomatocytosis in both infants [7, 8].

Intrauterine poikilocytes are typical for premature infants with respiratory distress syndrome (RDS). The disease is characterized by the violations of RBC membrane microstructure at the level of heights of the first and second orders. The value of the first order is the most sensitive one. It reflects the phenomenon of membrane flickering. The normalization of this index is slow. The structural state of the proteins of the RBC membrane remains stable [7, 8].

Current analyzing tools, which allow determining the maximum number of parameters in newborn infants, were used for the study. Currently, RBC indices, which allow obtaining the data of RBCs morphological characteristics more accurately are increasingly used. The indices include the average volume of RSCs (MCV), mean hemoglobin content in RBCs (MCHC), the width of RBC distribution by volume (RDW-SD, RDW-CV). Several studies showed that some RBC indices depend on the gestational age; thus the MCV values in newborns decrease with the increasing of gestational age (it is less than 119 ± 7 fl in infants with extremely low gestational age and it is 106 ± 4 fl by the end of pregnancy). The decrease in MCV values in premature infants may be a sign of early iron deficiency, which does not cause anemia. MCH is changing in a similar way. MCHC does not depend on the gestational age. The decrease in MCH, reflecting RBC hypochromia, can also be used as a pattern for the diagnosis of iron-deficiency anemia [9–11]. However, a clear-cut laboratory criteria are needed for the studied indicators in neonatology because of incorrect interpretation of the data [12].

Umbilical cord blood is a special object of a research because there are only few studies in healthy newborns, and the results obtained from sick infants are varies. Therefore, the efforts of numerous specialists are focused on developing banks of laboratory samples [12, 13]

Objective: to evaluate RBC nanostructure and RBC indices in preterm infants in the early neonatal period.

Materials and Methods

Forty seven newborns were enrolled in the study. The cohort included 33 pre-term (study group) and 14 full-term (group of comparison). The gestational age of the pre-term neonates was 33.3 ± 1.9 weeks, their birth weight was 2065.4 ± 304.8 grams.

The samples of umbilical blood of 14 in-term infants with favorable course of pregnancy urgent delivery were taken to obtain normal RBCs in the area of AFM microscope.

The mean gestational age of the infants was 39.4 ± 0.5 weeks, their birth weight was 3131.7 ± 588.8 grams, Apgar scale score was 8 ± 0.4 points (first-minute measurement).

The following methods were employed:

1. RBCs of the newborns were studied by atomic force microscopy (AFM). The objects of the study included residual umbilical cord blood (RUCB) of pre-mature infants, central

Цель работы — исследование наноструктуры эритроцитов и эритроцитарных индексов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде.

Материал и методы

В исследование включили 47 новорожденных, из них 33 недоношенных новорожденных, составивших группу исследования, и 14 доношенных новорожденных группы сравнения. Гестационный возраст недоношенных новорожденных составлял $33,3 \pm 1,9$ недель, масса тела при рождении — $2065,4 \pm 304,8$ грамм.

Для получения нормальных эритроцитов в поле АСМ 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.

Использовали следующие методы:

1. Исследование эритроцитов новорожденных в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК) недоношенных новорожденных, центральная венозная кровь через 7 часов после рождения и венозная кровь новорожденных 7-х суток жизни. ОПК забиралась сразу после пересечения пуповины. Изображение эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA prima» (Россия) в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSC01-A. Подробная методика исследования описана нами в других публикациях [7, 8].

2. Определение газового состава, кислотно-основного состояния и лактата крови проводили на анализаторе GemPremier 3000 (USA).

3. Определение эритроцитов, гемоглобина, а также показателей:

- A. Средний объем эритроцитов (MCV) рассчитывали по формуле:

$$MCV (fl) = \text{Hematocrit} (11^{-1}) * 1000 / \text{Erythrocyte count} (*10^{12} l^{-1})$$

- B. Среднее содержание гемоглобина в эритроците: $MCH (pg) = \text{Hemoglobin} (g dl^{-1}) / \text{Erythrocyte count} (*10^{12} l^{-1})$

- C. Средняя концентрация гемоглобина в эритроците:

$$MCHC (g dl^{-1}) = \text{Hemoglobin} (g dl^{-1}) / \text{Hematocrit} (11^{-1})$$

- D. Ширина распределения эритроцитов по объему-RDW, включающая два параметра: процент отклонения объема эритроцитов от среднего значения в популяции — $RSW-CV (\%) = (SD * 100\%) / MCV$, где SD-стандартное средне-квадратичное отклонение объема эритроцита от среднего значения; относительная ширина распределения эритроцитов по объему — RDW-SD.

Исследование проводили на анализаторе «Hemolux» (Китай) в 1-е, 3-и, 7-е сутки постнатального возраста.

4. Статистическую обработку данных АСМ 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 $p < 0,05$. Полученные результаты клинических и лабораторных исследований обрабатывали методами дескриптивной и непараметрической статистики с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Проводили корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции (r) и его достоверности. Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В наших работах ранее показано, что при благоприятно протекавшей беременности и срочных родах в

venous blood 7 hours after the birth and venous blood of newborns 7 days after the birth. The samples of RUCB were taken immediately after crossing the umbilical cord. The image of RBCs was obtained with the aid of the atomic force microscope «NTEGRA prima» (Russia) in tapping mode. Cantilevers NSG01-A were used as probes. Detailed research methodology has been described in our previous publications [7, 8].

2. Gas composition, acid-base status and lactate blood level were determined by analyzer GemPremier 3000 (USA).

3. The quantitative indices such as RBCs, hemoglobin level, and the following indices were evaluated:

- A. the mean RBC volume (MCV) calculated by the formula: $MCV (fl) = \text{Hematocrit} (11^{-1}) * 1000 / \text{Erythrocyte count} (*10^{12} l^{-1})$

- B. The mean level of hemoglobin in RBCs: $MCH (pg), \text{Hemoglobin} (g dl^{-1}) / \text{Erythrocyte count} (*10^{12} l^{-1})$

- C. The mean concentration of hemoglobin in RBCs;

$$MCHC (g dl^{-1}) = \text{Hemoglobin} (g dl^{-1}) / \text{Hematocrit} (11^{-1})$$

- D. The distribution of RBCs by volume-RDW, which includes two indices: the percentage deviation of RBC volume from the mean one in the population- $RSW-CV (\%) = (SD * 100\%) / MCV$ (where SD is the standard deviation of the RBC volume mean) and the relative width of RBC distribution by volume — RDW-SD.

The study was performed using the analyzer Hemolux» (China) on the 1st, 3rd and 7th days after the birth.

4. Statistical processing of data was carried out using a standard program Origin 6.1 (Microsoft Office). The significance of differences was estimated by the factor analysis of variance (One-way ANOVA). The results of clinical and laboratory studies obtained by the methods of descriptive and non-parametric statistics were processed using software package «Statistica 6.0». Correlation analysis with the calculation of the correlation coefficient (r) and its validity was performed. All the differences between groups were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

Our previous works showed, that 85% of flat-shaped RBCs and 15% of transformed RBCs circulate in PCR of newborns in case of favorable pregnancy conditions and in-term birth: 3% of them are represented by echinocytes and stomatocytes, 9% by other cells, intermediate RBC forms caused by intrauterine poikilocytosis [7, 8].

Premature infants were characterized by polymorphism of RBCs. Taking into account the great variability among cells in the study, the statistical data were presented as median (Me , $LQ-UQ$). The results of the study are represented in table 1. The following types of erythrocytes were discovered in the PCR: discocytes, planocytes, stomatocytes, echinocyte, other (transitional) forms. Planocytes are the main RBC form in preterm infants, but the frequency of their occurrence is different.

Discocytes were discovered in 39.4 percent of premature infants. In case of favorable course of pregnancy and developing of acute hypoxia most of the RBCs were represented by discocytes (Fig. 1), and the morphological composition of blood was closer to the one of full-term infants. In premature infants, stomatocytes were found in 80% of pre-term infants, their number varied from 8% to 95% of the total RBC number. The study revealed that the pre-term infants with a gestational age of 31–36 weeks were characterized by specific RBC forms, which varied significantly.

Critical Conditions In Neonatology

Таблица 1. Морфологические формы эритроцитов недоношенных новорожденных на различных этапах исследования (Me, LQ–UQ)

Table 1. Various red blood cells (RBC) forms in preterm infants on different stages of the research (Me, LQ–UQ)

RBC forms	The level of the indices in the stages of investigation		
	UB	7 hours	7 days
Discocytes	13 (10–21)	14.1 (4–14.1)	35.5 (6.5–57.5)
Planocytes	53 (17.7–78)	49.5 (12–81)	20 (10–46)
Stomatocytes	20 (9–37)	22 (10–44)	49 (25–76)*
Echinocytes	8 (3.2–28)	11 (5–20.7)	5 (2–30)
Others	20 (5–33)	14 (6–30.3)	14 (8–42)

Note (примечание). RBC forms – формы эритроцитов; discocytes – дискоциты; planocytes – планоциты; stomatocytes – стоматоциты; echinocytes – эхиноциты; others – другие; the level of the indices in the stages of investigation – значение показателей на этапах исследования; UB (umbilical cord blood) – остаточная пуповинная кровь. * – $P < 0.01$ the significance of the difference compared to UB (достоверность отличий по сравнению с остаточной пуповинной кровью).

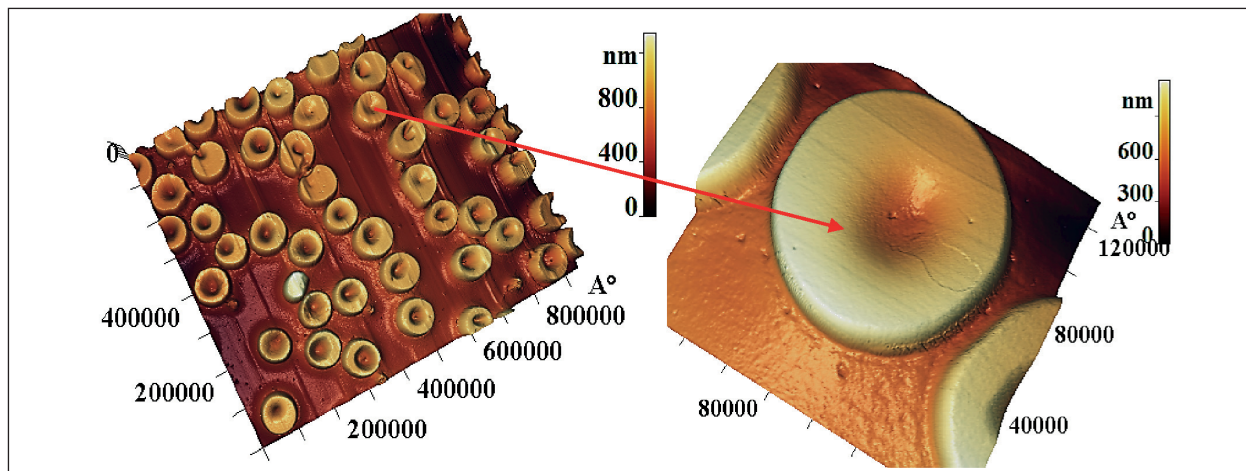


Рис. 1. Изображение эритроцитов недоношенного ребенка в формате 3D в поле 100×100 мкм и 10×10 мкм.

Fig. 1. The image of red blood cells of a preterm infant in 3D format; the area 100×100 micrometers and 10×10 micrometers.

ОПК доношенных новорожденных циркулируют 85% эритроцитов плоской формы – планоциты 15% трансформированных эритроцитов, их них: по 3% клеток представлены эхиноцитами и стоматоцитами, 9% – другими клетками, представляющие промежуточные формы эритроцитов, обусловленные внутриутробным пойкилоцитом [7, 8].

Для недоношенных новорожденных при рождении характерен полиморфизм эритроцитов. Учитывая большую вариабельность клеток при их исследовании, статистические данные представлены в виде медианы (Me, LQ–UQ). Результаты исследования представлены в табл. 1. В ОПК выявлены следующие виды эритроцитов: дискоциты, планоциты, стоматоциты, эхиноциты, другие (переходные) клетки. Планоциты являются основной морфологической формой эритроцитов и у недоношенных новорожденных, но частота их встречаемости различная.

Дискоциты определялись у 39,4% недоношенных детей. При благоприятном течении беременности, и остро развившейся гипоксии плода, большинство эритроцитов представлено дискоцитами (рис. 1), и, в целом, морфологический состав приближался к показателям доношенных детей. Стоматоциты характерны для 80% недоношенных новорожденных, их количество варьирует в значительных пределах: 8–95% от общего коли-

The analysis of RBC membrane nanostructure revealed that the height of the first order (h_1) was significantly higher in pre-term infants than in full-term infants ($P < 0.05$). Individual variability of h_1 pattern was detected. This index was 3.8–10 times and 1.5–3.2 times higher in pre-term infants than in full-term infants in 6 and 4 cases, respectively. Only in 3 children this pattern figures did not differ from the ones of full-term newborns. The height of the 2nd order (h_2) was 1.5–2.5 times higher in pre-term than in full-term infants in 50% of cases. The change of spectrin matrix is affected by multiple pregnancy, a severe form of preeclampsia, placenta previa. In 5 children the change of spectrin matrix was combined with the significant increase of h_1 . The height of the 3rd order (h_3) in two groups did not differ significantly, i.e. protein condition remained stable at birth in all infants ($p > 0.05$).

The data of the main RBC patterns in neonates is presented in table 2. It was established, that there were no signs of anemia at birth in neonates of both groups, the total RBC number corresponded to physiological norm. The average MCV values in premature infants were significantly higher in pre-term than in in-term infants ($p < 0.01$), i.e. macrocytosis was observed. It was discovered in 69.7% of cases in the group of pre-term infants, mainly in case of multiple pregnancies. Planocytosis corresponded to the value of MCV = 96–117 fl.

чества эритроцитов. В исследовании выявлено, что для недоношенных детей с гестационным возрастом 31–36 недель характерны другие формы эритроцитов, которые имеют высокую вариабельность.

При анализе наноструктуры мембран эритроцитов выявили, что у недоношенных новорожденных высота 1-го порядка (h_1) достоверно превышала показатель доношенных детей ($p < 0,05$). Выявили индивидуальную вариабельность h_1 . У 6 недоношенных новорожденных величина этого порядка превышала показатель доношенных детей в 3,8–10 раз, в 4-х случаях величина h_1 была повышена в 1,5–3,2 раза, только у 3-х детей этот показатель не отличался от доношенных новорожденных. Высота 2-го порядка (h_2) у 50% недоношенных детей превышала показатель доношенных новорожденных в 1,5–2,5 раза. На изменение спектринного матрикса влияют многоплодие, тяжелая форма гестоза, предлежание плаценты. У 5 детей изменения спектринного матрикса сочетались со значительным увеличением высоты h_1 мембраны эритроцитов. Высота 3-го порядка (h_3) достоверно не отличались между группами, т.е. при рождении у всех новорожденных структурное состояние белков было стабильным ($p > 0,05$).

Данные исследования основных показателей эритроцитарного звена у новорожденных представлены в табл. 2. Установили, что при рождении у новорожденных обеих групп признаков анемии не было, общее количество эритроцитов и гемоглобин соответствовали физиологическим значениям. Средняя величина MCV у недоношенных детей была достоверно выше, чем у доношенных ($p < 0,01$), т.е. характерен макроцитоз. В группе недоношенных детей он встречался в 69,7% случаев, преимущественно у новорожденных от многоплодной беременности. Planoциты являлись основной формой клеток у новорожденных. Planoцитозу соответствовала величина MCV = 96–117 fl. Показатели MCH, MCHC, RDW-SD также были достоверно выше у недоношенных детей ($p < 0,01$). Выявленные изменения являются физиологическим явлением для недоношенных новорожденных, т.к. существует закономерность, чем меньше гестационный возраст, тем выше

The indicators of MCH, MCHC, RDW-SD were also significantly higher in preterm infants ($p < 0.01$). Specific changes are physiological phenomenon, which is typical for premature infants, in which the smaller the gestational age is, the higher is the MCV index. That means that the smaller the gestational age of the child is, the more extensive is macrocytosis. The latter determines the transport of oxygen to the tissues of the fetus at a certain stage of ontogenesis. The data obtained match the results of the studies of other authors [10].

The early neonatal period was characterized by poikilocytosis; the morphological composition of RBCs was not changed by the 7th hour of postnatal life (table 2). In some cases, changes of nanostructure of RBC membranes were detected: increase of h_1 was observed in 3 newborns, i.e. flickering of RBC membrane remained, the height of h_2 was increased in only one child, the decrease of corresponding indices was observed in other cases. Significantly stomacytosis was observed on the 7th day after the birth ($p < 0.05$), h_1 increased in 4 premature infants, i.e. the RBC membrane flickering increased.

A significant decrease of RBC number and hemoglobin occurred on the 7th day of life ($p < 0.05$), which is a physiological process, reflecting the neonatal period in newborns. The mean RDW-CV was stable within the whole time of the study. The dynamics of other RBC indicators levels are represented in figure 2. The mean MCV, MCHC in premature infants had no tendency to decrease, i.e. macrocytosis remained, there has been a significant decrease in MCH and RDW-SD, which is the pattern, since both indicators depend on the level of hemoglobin ($p < 0.05$).

By the end of the early neonatal period, the clinical condition of 94% of premature infants improved, respiratory failure resolved, ventilation and infusion therapy were terminated. Two lethal cases were due to the severe congenital pneumonia.

Correlation analysis showed multiple correlations between metabolism indicators and RBC indices and the resulting regression equation was obtained:

- A feedback link of medium strength between body weight and MCH at birth ($r = -0,4$, $p = 0,049$); $MCH = 44,382 - 0,0028 * x$

Таблица 2. Показатели эритроцитарного звена у новорожденных при рождении

Table 2. Red blood cells (RBC) indices in newborns at birth

Parameters	Value of parameters in the groups		P
	preterm	full-term	
$E_r * 10^{12} / L$	4.96 ± 0.9	5.38 ± 0.65	0.12
Hb, g/l	192.4 ± 31.9	177.6 ± 26.2	0.14
MCV, fl	98.5 ± 8.9	90.7 ± 1.8*	0.003
MCH, pg	38.6 ± 2.5	32.8 ± 1.9*	0.000000
MCHC, g/l	395.6 ± 39	361.7 ± 13.1*	0.003
RDW-CV, %	15.4 ± 0.5	15.3 ± 0.7	0.66
RDW-SD, fl	53.8 ± 3.3	50.6 ± 2.2*	0.002

Note (примечание): parameters — показатели; value of parameters in the groups — значение показателей в группах; preterm — недоношенные; full-term — доношенные; $E_r * 10^{12} / L$ — red blood cells (количество эритроцитов); Hb, g/l — hemoglobin (гемоглобин); MCV, fl — mean cell volume (средний объем эритроцитов); MCH, pg — mean corpuscular hemoglobin (среднее содержание гемоглобина в эритроците); MCHC, g/l — hemoglobin concentration in a given volume of habed erythrocytes (средняя концентрация гемоглобина в заданном объеме эритроцитов); RDW-CV, % — coefficient variable of red blood cell distribution (процент отклонения объема эритроцитов от среднего значения в популяции); RDW-SD, fl — red blood cell distribution width with standard deviation (относительная ширина распределения эритроцитов по объему); * — $P < 0.01$ — the significance of the difference between the groups (достоверность отличий между группами).

Critical Conditions In Neonatology

показатель MCV. Т.е. чем меньше гестационный возраст ребенка, тем больше выражен макроцитоз, что на определенном этапе онтогенеза определяет транспорт кислорода к тканям плода. Полученные данные соответствуют исследованиям других авторов [10].

Течение раннего неонатального периода характеризовалось сохранением пойкилоцитоза, к 7 часам постнатальной жизни морфологический состав эритроцитов не изменился (табл. 2). В отдельных случаях выявляли изменения наноструктуры мембран: у 3-х новорожденных отмечали рост величины h_1 , т.е. сохранялся flickering мембраны эритроцитов, высота h_2 увеличилась только у одного ребенка, в остальных случаях произошло снижение исследуемого показателя. К 7-м суткам жизни достоверно увеличился стомацитоз ($p < 0,05$), высота h_1 возросла у 4 недоношенных новорожденных, т.е. усилился flickering мембраны эритроцитов.

К 7-м суткам жизни произошло достоверное снижение количества эритроцитов и гемоглобина ($p < 0,05$), что является физиологически процессом, отражающим течение неонатального периода у новорожденных. Средняя величина RDW-CV была стабильной в течение всего времени исследования. Динамика других показателей эритроцитарного звена представлена на рис. 2. Средняя величина MCV, MCHC, у недоношенных детей не имела тенденции к снижению, т.е. сохранялся макроцитоз, при этом произошло достоверное снижение MCH и RDW-SD, что является закономерностью, т.к. оба показателя зависят от уровня гемоглобина ($p < 0,05$).

К концу раннего неонатального периода клиническое состояние 94% недоношенных новорожденных улучшилось, разрешилась дыхательная недостаточность, прекращены ИВЛ, инфузионная терапия. В 2-х случаях наступил летальный исход, обусловленный течением врожденной пневмонии.

Корреляционный анализ показал, что у недоношенных новорожденных существуют множественные корреляционные связи между показателями метаболизма и эритроцитарными индексами, а также получено уравнение регрессии:

- Обратная связь средней силы между массой тела и MCH при рождении ($r = -0,4$, $p = 0,049$); $MCH = 44,382 - 0,0028 * x$

- Обратная связь средней силы между массой тела и RDW-SD при рождении ($r = -0,5$, $p = 0,008$); $RDW-SD = 62,5803 - 0,0044 * x$

- Прямая связь средней силы между холестерином (XC) и MCV при рождении ($r = 0,5$; $p = 0,01$); $XC = -2,3552 + 0,0436 * x$.

- Обратная связь средней силы между гемоглобином и MCV при рождении ($r = -0,5$, $p = 0,01$); $MCV = 129,468 - 0,1538 * H$.

- Прямая связь средней силы между высотой мембраны эритроцитов 1-го порядка и величиной стандартного бикарбоната (SBC) через 7 часов после рождения ($r = 0,5$; $p = 0,04$); $h_1 \text{ 7 часов} = 2,8327 + 0,0983 * x$

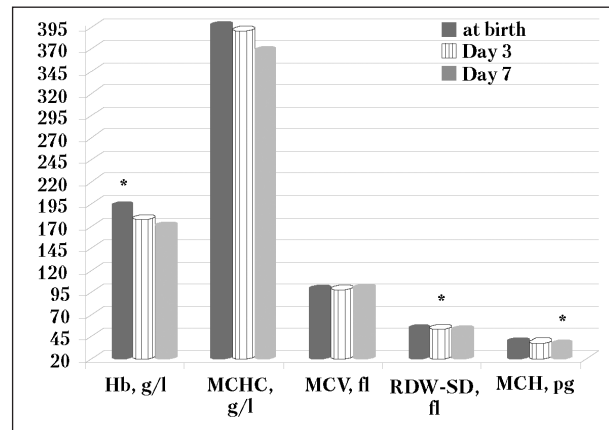


Рис. 2. Основные показатели эритроцитарного звена у недоношенных новорожденных.

Fig. 2. The main red blood cells (RBC) indices in preterm infants.

Note (примечание): at birth – при рождении; days – дни; gemoglobin (Hb) – гемоглобин; MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration (среднее содержание гемоглобина в эритроцитах); MCV – mean cell volume (средний объем эритроцитов); RDW-SD – red blood cell distribution width with standard deviation (ширина распределения эритроцитов по объему); MCH – mean hemoglobin concentration in erythrocyte (среднее содержание гемоглобина в эритроците). * – $P < 0,05$ versus umbilical red blood (достоверность отличий по сравнению с ОПК).

- A feedback link of medium strength between body weight and RDW-SD at birth ($r = -0,5$, and $p = 0,008$); $RDW-SD = 62,5803 - 0,0044 * x$

- A direct link of medium strength between cholesterol (LDL) and MCV at birth ($r = 0,5$; $p = 0,01$); $XC = -2,3552 + 0,0436 * x$.

- A feedback link of medium strength between hemoglobin and MCV at birth ($r = 0,5$, $p = 0,01$); $MCV = 129,468 - 0,1538 * H$.

- A direct link of medium strength between the height of the erythrocyte membrane 1-th order and the value of the standard bicarbonate (SBC) after 7 hours of birth ($r = 0,5$; $p = 0,04$); $h_1 \text{ 7 hours} = 2,8327 + 0,0983 * x$

- A direct link of medium strength between hemoglobin and MCHC on the first day of life ($r = -0,5$, and $p = 0,01$); $MCHC = 262,7947 + 0,6705 * H$.

Thus, macrocytosis, intrauterine poikilocytes, violation of the macro-structure of RBC membranes were typical for the preterm infants. Intrauterine hypoxia affects two nanostructural components of the RBC membrane, phospholipid bilayer and spectrin matrix. The damage of the protein component of the membrane, however, does not occur. The changes are reversible and their aim is to preserve the RBCs functional capacity in the early period of adaptation. Gestational age, infants' birth weight, hemoglobin, cholesterol and standard bicarbonate blood level affect the RBC indices.

The early neonatal period was characterized by an active process within the RBC membranes when their morphological forms are changing that demonstrate the ongoing reorganization of erythropoiesis and adaptation of a premature infant to a new environmental conditions.

• Прямая связь средней силы между гемоглибином и МСНС в первые сутки жизни ($r=-0,5$, $p=0,01$); МСНС = $262,7947+0,6705 \cdot x$.

Таким образом, при рождении для недоношенных новорожденных характерен макроцитоз, внутриутробный пойкилоцитоз, нарушение макроструктуры мембран эритроцитов. Внутриутробная гипоксия влияет на две наноструктуры мембраны эритроцита: фосфолипидный бислой и спектриновый матрикс. Повреждения белкового компонента мембраны не происходит. Выявленные изменения являются обратимыми и направлены на сохранение функциональной способности эритроцитов в раннем периоде адаптации. На показатели эритроцитарного звена при рождении влияют гестационный возраст, масса тела ребенка, количество гемоглобина, содержание холестерина и стандартного бикарбоната в крови. Течение раннего неонатального периода характеризовалось активным процессом на мембранах эритроцитов, сменой морфологических форм, что свидетельствует о продолжающейся постнатальной перестройке эритропоэза, адаптации недоношенного ребенка к новым условиям внешней среды.

Заключение

Неблагоприятное течение беременности, осложненное внутриутробной гипоксией плода, влияет на морфологическую структуру эритроцитов, вызывает функциональные изменения наноструктуры мембран, что проявляется у недоношенных новорожденных выраженным пойкилоцитозом, усиленным flickering мембраны эритроцитов и изменениями спектринового мат-

Литература

1. Black L.V., Maheshwari A. Disorders of the fetomaternal unit: hematologic manifestations in the fetus and neonate. *Semin. Perinatol.* 2009; 33 (1): 12–19. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2008.10.005>. PMID: 19167577
2. Зими́на Н.Н., Румянцев С.А., Майорова О.А., Яковлева М.В., Курцер М.А. Влияние острой и хронической внутриутробной гипоксии плода на формирование клеточного состава пуповинной крови доношенных новорожденных. *Детская больница.* 2010; 2: 48–57.
3. Давая Я.Х., Шубина М.В., Зайцева О.И., Терещенко С.Ю. Структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов новорожденных при анемии беременных. *Якутский мед. журнал* 2010; 2: 9–11.
4. Макаров И.О., Шеманаева Т.В., Гасанова С.Р., Попова О.П. Гестоз как проявление иммунного эндотелиоза. *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.* 2009; 8 (6): 17–22.
5. Данилова Л.А. (ред.). Возрастная биохимия. Учебное пособие. СПб.: СОТИС; 2007: 152.
6. Волосников Д.К., Серебрякова Е.Н. Уровень фетального гемоглобина у новорожденных детей с синдромом полиорганной недостаточности. *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии.* 2010; 55 (1): 21–24.
7. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных при многоплодной беременности. *Общая реаниматология.* 2014; 10 (1): 12–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-24>
8. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. Наноструктура мембран эритроцитов недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом. *Общая реаниматология.* 2013; 9 (6): 11–23. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-11>
9. Льюис С.М., Бэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. 10-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 672.
10. Christensen R.D., Jopling J., Henry E., Wiedmeier S.E. The erythrocyte indices of neonates, defined using data from over 12,000 patients in a

Conclusion

Unfavorable course of pregnancy complicated by intrauterine fetal hypoxia affects the RBC morphological features and causes functional changes of RBC membranes nanostructure leading to extensive poikilocytosis, strong flickering in RBC membranes and changes of spectrin matrix in premature neonate. The revealed changes demonstrate the influence of hypoxia on the nanostructure of RBC membranes. The early neonatal period is characterized by postnatal reorganization of circulation, active process in RBC membranes and poikilocytosis. Macrocytosis and planocytosis reflect the state of compensatory erythropoiesis. It is a physiological condition of RBCs in premature babies. Normalization of RBC morphological composition does not occur till the end of the early neonatal period, and therefore, further clinical observation and laboratory control are needed.

рикса. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на наноструктуру мембран эритроцитов. Течение раннего неонатального периода характеризуется постнатальной перестройкой кровообращения, активным процессом на мембранах эритроцитов, сохранением пойкилоцитоза. Макроцитоз и планоцитоз отражают компенсаторное состояние эритропоэза, являются физиологическим состоянием эритроцитов для недоношенных детей. Нормализации морфологического состава эритроцитов к концу раннего неонатального периода не происходит, в связи с чем, необходимо дальнейшее клиническое наблюдение и лабораторный контроль.

References

1. Black L.V., Maheshwari A. Disorders of the fetomaternal unit: hematologic manifestations in the fetus and neonate. *Semin. Perinatol.* 2009; 33 (1): 12–19. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2008.10.005>. PMID: 19167577
2. Zimina N.N., Rumyantsev S.A., Mayorova O.A., Yakovleva M.V., Kurtser M.A. Vliyaniye ostroi i khronicheskoi vnutritrubnoi gipoksii ploda na formirovaniye kletochnogo sostava pupovinnoi krovi donoshennykh novorozhdennykh. [Impact of acute and chronic intrauterine fetal hypoxia on the formation of the cellular composition of umbilical cord blood in full-term neonatal infants]. *Detskaya Bolnitsa.* 2010; 2: 48–57. [In Russ.]
3. Davaya Ya.Kh., Shubina M.V., Zaitseva O.I., Tereshchenko S.Yu. Strukturno-funktsionalnoe sostoyaniye membran eritrotsitov novorozhdennykh pri anemii beremennykh. [The structural and functional state of red blood cell membranes in neonatal infants with pregnant women with anemia]. *Yakutsky Meditsinsky Zhurnal.* 2010; 2: 9–11. [In Russ.]
4. Makarov I.O., Shemanaeva T.V., Gasanova S.R., Popova O.P. Gestoz kak proyavleniye immunnogo endotelioza. [Gestosis as manifestation of immune endotheliosis]. *Voprosy gynecologii, akusherstva i perinatologii.* 2009; 8 (6): 17–22. [In Russ.]
5. Danilova L.A. (red.). Vozrastnaya biokhimiya. Uchebnoye posobie. [Age biochemistry. A text-book]. Sankt Peterburg: SOTIS; 2007: 152. [In Russ.]
6. Volosnikov D.K., Serebryakova E.N. Uroven' fetalnogo gemoglobina u novorozhdennykh detei s sindromom poliorgannoi nedostatochnosti. [Fetal hemoglobin level in newborn babies with multiple organ dysfunction syndrome]. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Pediatrii.* 2010; 55 (1): 21–24. [In Russ.]
7. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. Osobennosti membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh pri mnogoplodnoi beremennosti. *Obshchaya Reanimatologiya.* [The specific features of red blood cell membranes in premature neonates due to multiple pregnancy. *General Reanimatology.*] 2014; 10 (1): 12–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-24>. [In Russ.]

Critical Conditions In Neonatology

- multihospital health care system. *J. Perinatol.* 2008; 28 (1): 24–28. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jp.7211852>. PMID: 17972890
11. *Subramanian D.N., Kitson S., Bhaniani A.* Microcytosis and possible early iron deficiency in paediatric inpatients: a retrospective audit. *BMC Pediatr.* 2009; 9: 36–40. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-9-36>. PMID: 19480646
 12. *Christensen R.D., Del Vecchio A., Henry E.* Expected erythrocyte, platelet and neutrophil values for term and preterm neonates. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (Suppl 5): 77–79. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.715472>. PMID: 23025775
 13. *Lee H.R., Shin S., Yoon J.H., Kim B.J., Hwang K.R., Kim J.J., Roh E.Y.* Complete blood count reference values of donated cord blood from Korean neonates. *Korean J. Lab. Med.* 2009; 29 (3): 179–184. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.3.179>. PMID: 19571613
- Поступила 23.05.14**
8. *Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V.* Nanostruktura membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh s respiratornym distress-sindromom. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Nanostructure of red blood cell membranes in premature neonates with respiratory distress syndrome. *General Reanimatology*]. 2013; 19 (6): 11–23. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-11>. [In Russ.]
 9. *Lewis S.M., Bain B.J., Bates I.* Prakticheskaya i laboratornaya gematologiya. 10-e izd. [Practical and laboratory hematology. 10th ed.]. Moskva: GEOTAR-Media; 2009: 672.
 10. *Christensen R.D., Jopling J., Henry E., Wiedmeier S.E.* The erythrocyte indices of neonates, defined using data from over 12,000 patients in a multihospital health care system. *J. Perinatol.* 2008; 28 (1): 24–28. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jp.7211852>. PMID: 17972890
 11. *Subramanian D.N., Kitson S., Bhaniani A.* Microcytosis and possible early iron deficiency in paediatric inpatients: a retrospective audit. *BMC Pediatr.* 2009; 9: 36–40. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2431-9-36>. PMID: 19480646
 12. *Christensen R.D., Del Vecchio A., Henry E.* Expected erythrocyte, platelet and neutrophil values for term and preterm neonates. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* 2012; 25 (Suppl 5): 77–79. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.715472>. PMID: 23025775
 13. *Lee H.R., Shin S., Yoon J.H., Kim B.J., Hwang K.R., Kim J.J., Roh E.Y.* Complete blood count reference values of donated cord blood from Korean neonates. *Korean J. Lab. Med.* 2009; 29 (3): 179–184. <http://dx.doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.3.179>. PMID: 19571613

Submitted 23.05.14



Курсы Европейского совета по реанимации

Курсы по навыкам оказания помощи
при внезапной сердечной смерти проводятся
на регулярной основе
в НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского
совместно с Российским Национальным советом по реанимации
и Европейским советом по реанимации

Контактное лицо – директор курса,
к. м. н. Кузовлев Артем Николаевич
Тел.: 8 (926) 188-76-41

E-mail: artemkuzovlev@gmail.com

www.niiorramn.ru/council/courses.php

Адрес: 107031, Москва, ул. Петровка, дом 25, стр. 2

Сайт НИИ общей реаниматологии
им. В. А. Неговского – www.niiorramn.ru