

МОРФОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ИЗОИММУНИЗАЦИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ПО РЕЗУС-ФАКТОРУ И АВО-СИСТЕМЕ

С. А. Перепелица^{1,2}, В. А. Сергунова¹, С. В. Алексеева³, О. Е. Гудкова¹

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, Москва, Россия
107031, Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

² Балтийский Федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Россия
236041, Калининград, ул. А. Невского, д. 14

³ ГБУЗ «Родильный дом Калининградской области №1», Калининград, Россия
236016, Калининград, ул. Клиническая, д. 81

Erythrocyte Morphology in Neonatal Rhesus Factor and ABO Isoimmunization

S. A. Perepelitsa^{1,2}, V. A. Sergunova¹, S. V. Alekseeva³, O. E. Gudkova¹

¹ V.A. Negovsky Research Institute of General Reanimation, Moscow, Russia
25, Petrovka, Build. 2, Moscow 107031

² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia
14, A. Nevsky St., Kaliningrad 236041

³ Maternity Hospital One of the Kaliningrad Region, Kaliningrad, Russia
81, Klinicheskaya St., Kaliningrad 236016

Цель: исследование методом атомно-силовой микроскопии наноструктуры эритроцитов у новорожденных с изоиммунизацией по АВО-системе и резус-фактору. **Материал и методы.** В исследование включено 27 новорожденных, из них 13 детей с резус-сенситизацией и 14 — изоиммунизацией по АВО-системе. Течение беременности, осложнившейся резус-сенситизацией, характеризовалось появлением в крови титра RhD-антител и иммуноглобулинов (Ig) подкласса G: IgG1, IgG2, IgG3. Увеличение продукции IgG происходило к 34 неделям беременности, когда определились все подклассы в различных титрах. У новорожденных имело место несовпадение с матерью или по резус-фактору или по АВО-системе. В паре O(I)Rh-отрицательная мать — A(II) Rh-положительный ребенок проводилась дифференциальная диагностика изоиммунизации. Исследовались общий анализ, биохимические показатели крови, проводилось определение титра RhD-антител и иммуноглобулинов класса G, а у 11 новорожденных проводилось исследование эритроцитов в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК), центральная венозная кровь во время лечения новорожденных. **Результаты.** Комплексная терапия изоиммунизации новорожденного по резус-фактору или АВО-системе прекращает каскад иммунологических реакций, приводит к прекращению гемолиза эритроцитов, снижению билирубина, влияет на морфологический состав и макроструктуру мембран эритроцитов. Последствия перинатального воздействия на мембрану эритроцитов сохраняются в течение определенного времени и выходят за рамки раннего неонатального периода. **Ключевые слова:** наноструктура мембран, эритроциты, резус-конфликт, АВО-конфликт, новорожденные

Objective: to conduct an atomic force microscopy (AFM) study of the red blood cell nanostructure in neonatal infants with ABO and rhesus (Rh) isoimmunization. **Subjects and methods.** The investigation included 27 neonates, including 13 infants with Rh sensitization and 14 with ABO isoimmunization. The course of pregnancy complicated by Rh sensitization was characterized by the emergence of the blood titers of Rh D antibodies and immunoglobulin G (IgG) subclasses: IgG1, IgG2, and IgG3. IgG production increased at 34 weeks' gestation when all the subclasses were detectable in different titers. There was either Rh or ABO incompatibility between the newborns and their mothers. Differential diagnosis of isoimmunization was made in the pair of an O (I) Rh-negative mother and an A (II) Rh-positive baby. Complete blood count and blood biochemical indicators were estimated; Rh D and IgG antibody titers were determined; red blood cells from 11 neonatal infants were examined using an AFM. The investigation was performed with residual umbilical cord blood and central venous blood during neonatal treatment. **Results.** Combination therapy for neonatal Rh or ABO isoimmunization terminates a cascade of immunological responses and erythrocyte hemolysis, lowers bilirubin levels, but fails to influence the morphological composition and macrostructure of red blood cell membranes. The consequences of the perinatal effects on the red blood cell membrane persist for a certain time and are outside the early neonatal period. **Key words:** red blood cell membrane nanostructure, erythrocytes, rhesus incompatibility, ABO incompatibility, neonatal infants.

DOI:10.15360/1813-9779-2015-2-25-34

Адрес для корреспонденции:

Перепелица Светлана Александровна
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru; SPerepelitsa@kantiana.ru

Correspondence to:

Perepelitsa Svetlana Aleksandrovna
E-mail: sveta_perepeliza@mail.ru; SPerepelitsa@kantiana.ru

Несмотря на успехи, достигнутые в изучении патогенеза и клиники гемолитической болезни плода (ГБП) и новорожденного (ГБН), в настоящее время проблема иммунологических отношений плода и материнского организма продолжает оставаться актуальной и требует поиска новых методов профилактики, диагностики и лечения [1, 2]. Одним из эффективных методов профилактики является введение антирезусного иммуноглобулина несенсибилизированным резус-отрицательным женщинам. В случае резус (Rh)-сенсибилизации введение антител анти — RhD Rh-отрицательным матерям препятствует их первичной сенсибилизации Rh — положительными эритроцитами плода вследствие элиминации антигена из крови матери. В развитых странах мира благодаря внедрению в клиническую практику введения антирезусного иммуноглобулина несенсибилизированным резус-отрицательным женщинам, удалось снизить количество женщин с резус — сенсибилизацией (Rh-сенсибилизацией) до 0,2–0,1%. В России количество Rh-сенсибилизированных женщин остается на уровне 1,2%, заболеваемость гемолитической болезнью по резус-фактору регистрируется у 0,6% новорожденных [1–3].

Наиболее иммуногенным среди всех эритроцитарных антигенов системы резус является антиген D, который в 80% случаев является причиной тяжелого течения ГБП и ГБН. Антигены ассоциированы с мембранными белками, экспрессированными на поверхности эритроцитов, они кодируются двумя сцепленными локусами — RhD и RhCcEe, которые на 92% являются гомологичными. Вследствие высокой иммуногенности в развитии заболевания играет роль антиген RhD. У лиц RhD-отрицательных локус RhD полностью отсутствует, а локус RhCcEe кодирует молекулу, экспрессирующую эпитопы RhC/c и RhE/e. Резус-конфликт развивается в тех случаях, когда мать сенсибилирована антигенами эритроцитов плода, у нее вырабатываются IgG -антитела к этим антигенам. Антитела способны проникать через плаценту и реагировать с эритроцитами плода, вызывая их повреждение. Вероятность появления антител у матери зависит от различных факторов: фенотипа плода, иммуногенности эритроцитарного антигена, объема трансплацентарного кровотока, а также от иммунологической способности матери к выработке антител.

Основное значение в развитии ГБП и ГБН имеют антитела, относящиеся к иммуноглобулинам класса G (IgG), которые связываются с антигеном эритроцитов, образуя комплекс, распознающийся Fc-рецепторами эффекторных клеток ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). Клетки РЭС посредством фагоцитоза лизируют эритроциты плода. Этот гемолитический процесс зависит от типа субклассов IgG. Все четыре субкласса IgG активно переносятся к плоду и увеличивают уровень материнских антител в кровотоке плода. Однако IgG1 и IgG3 намного легче взаимодействуют с Fc-рецепторами клеток, чем IgG2 и IgG4. Поэтому диагностическое значение имеют только IgG1 и IgG3 [2–7].

Introduction

Despite the successes in the study of pathogenesis and clinic of hemolytic disease of a fetus and newborn the studies of immunological interaction of the fetus and the mother remains actual that challenge prevention, diagnostics and treatment strategies [1, 2].

One effective method to prevent the isoimmunisation is to inject Rh immunoglobulin to unsensitized Rh-negative women. In case of rhesus (Rh)-sensitization the administration of anti — RhD by Rh-negative mothers prevents their primary sensitization by the Rh — positive RBCs of the fetus due to the elimination of the antigen from mother's blood. In developed countries they succeeded to reduce the number of women with Rh sensitization to 0,2-0,1% due to the introduction of Rh immunoglobulin into clinical practice

In Russia the number of women with Rh-sensitisation remains as high as 1.2%, the hemolytic disease occurs in 0.6% of newborns [1–3].

The Rh-antigen D is the most immunogenic of all the RBC antigens. It is responsible for 80% cases of hemolytic disease of fetus and newborn. The antigens are associated with membrane proteins that are expressed on RBC surface. They are encoded by two linked loci — RhD and RhCcEe, 92% of which are homologous. Due to the high immunogenicity the RhD antigen is of most important for the development of the disease.

In RhD negative individuals the product of RhD locus is completely absent, and the RhCcEe locus encodes a molecule expressing RhC/s and RhE/E epitopes. Rhesus- incompatibility occurs, when the mother is sensitized to the RBC antigens of fetus RBC and the production of anti-RBC IgG antibodies is becoming possible. The antibodies are capable of crossing through the placenta and interact with RBCs of the fetus that causes the damage of the latter. The probability of appearance of antibodies in mother's body depends on various factors: the phenotype of the fetus, immunogenicity of RBC antigen, volume of transplacental blood flow, immunological ability of the mother to produce antibodies.

The IgG, which binds to RBC antigen forming a complex recognized by the Fc-receptors on effector cells of the reticulo-endothelial system (RES), is of primary importance. The RES cells destroy RBCs of fetus by phagocytosis. This process depends on the type of IgG subclasses. All four IgG subclass are actively transferred to the fetus and increase the level of maternal antibodies in the fetus blood. However, IgG1 and IgG3 are much easier interact with Fc-cell receptors than IgG2 and IgG4. Therefore, only the level of IgG1 and IgG3 have the diagnostic value [2–7].

The isoimmunization of newborn occurs due to other blood group antigens, for example Kell, but it results in low frequency (9%) and decreased antigenicity [5, 6, 8].

The ABO system antigens are strong immunogens and the production of anti-ABO antibodies is probable. The epitopes of ABO antigens are not only localized on

Изоиммунизация новорожденного может быть обусловлена и другими антигенами группы крови. Вторым по частоте антигеном является антиген Kell, но он имеет низкую частоту встречаемости в популяции (9%) и менее выраженную антигенность [5, 6, 8].

Антигены ABO — системы представляют собой сильные иммуногены, и продукция антител к ним наиболее вероятна. Эпитопы антигенов ABO — системы находятся не только на эритроцитах, но и на других клетках и локализованы в углеводных компонентах гликопротеинов. У большинства людей антитела к аллогенным антигенам вырабатываются без предварительной сенсибилизации чужеродными эритроцитами. Эта сенсибилизация возможна при контакте с идентичными эпитопами. Антитела к антигенам ABO-системы принадлежат к IgM, которые не проникают через плацентарный барьер, поэтому не происходит внутриутробной сенсибилизации [6, 9].

В настоящее время существуют неинвазивные методы лечения беременных с изоиммунизацией — десенсибилизирующая терапия другими антигенами, лимфоцитоиммуно-терапия и другие методы, направленные на лечение гипоксии, уменьшение проницаемости плаценты, но они не являются патогенетически обоснованными и достаточно эффективными [10, 11].

Гемолитическая болезнь новорожденного характеризуется гипербилирубинемией, которая обусловлена изменением структуры эритроцитов и их гемолизом. Высокая гипербилирубинемия способствует развитию ядерной желтухи и токсической энцефалопатии, вызывает необратимое повреждение центральной нервной системы, приводящие к инвалидности [2, 3, 12, 13]. Исследование мембран эритроцитов позволяет оценить их морфофункциональное состояние [14].

Цель работы — исследование методом атомной силовой микроскопии наноструктуры мембран эритроцитов у новорожденных с изоиммунизацией по ABO-системе и резус-фактору.

Материал и методы

В исследование включено 26 матерей и 27 новорожденных (одна бихориальная биамниотическая двойня), из них 13 детей с резус-сенсибилизацией и 14 — изоиммунизацией по ABO-системе.

Средний возраст матерей составил $30,3 \pm 5,7$ г. Течение беременности, осложнившейся резус-сенсибилизацией, характеризовалось появлением в крови титра RhD-антител и IgG: IgG1, IgG2, IgG3 (табл. 1). Как правило, сначала появлялся титр RhD — антител, а затем IgG. Титр RhD-антител определялся в крови 10 (38,4%) матерей, из них в 5-и (19,2%) случаях выявлено появление антител с 16 недель беременности. Наиболее раннее появление IgG отмечено в 25 недель беременности, определялись IgG1 в титре 1:100 и IgG3 в титре 1:10. В 3-х (11,5%) случаях имело место сочетание титра антител и всех Ig классов G1, G2 и G3 в различных титрах. Увеличение продукции IgG происходило к 34 неделям беременности, когда определились подклассы IgG в различных титрах.

Общая характеристика новорожденных представлена в табл. 2. Большинство новорожденных родилось доношенными, 18% детей родились в сроке гестации 35–36 недель. Оценка по шкале Апгар на 1-й и 5-й минутах составляла $7,8 \pm 0,5$ и $8,2 \pm 0,7$

RBCs. They can be found on other cells and in carbohydrate components of glycoproteins. Most people have antibodies to allogeneic antigens without prior sensitization by foreign RBCs. This kind of sensitization is possible in case of contact with identical epitopes. Antibodies to the antigens of ABO system belong to IgM, which do not cross the placental barrier, therefore no intrauterine sensitization occurs [6, 9].

Currently, there are non-invasive methods to treat pregnant women with isoimmunization. They include desensitizing therapy by other antigens, therapy by lymphocytes and other methods to treat hypoxia and reduce permeability of placenta. However, they are not pathogenetically justified and clinically effective [10, 11].

Hemolytic disease of the newborns is characterized by hyperbilirubinemia, which occurs due to alterations of RBC structure and hemolysis. High bilirubin level causes bilirubin-induced brain dysfunction — kernicterus and toxic encephalopathy, which cause irreversible damage of CNS and disability [2, 3, 12, 13]. The investigation of erythrocyte membranes allows to evaluate morpho-functional patterns of the cells [14].

The objective of the study: to reveal the RBC membrane nanostructure of neonates following ABO/Rh isoimmunization.

Materials and Methods

The study included 26 mothers and 27 infants (one case of bichorionic biamniotic twins), including 13 children with Rh-sensitization and 14 with ABO isoimmunization. The mean age of the mothers was 30.3 ± 5.7 G. The pregnancy complicated by rhesus sensitization was characterized by the appearance RhD antibodies and IgG: IgG1, IgG2, IgG3 in blood (table.1). As a rule, RhD antibodies appeared first and then appeared IgG. The titer of RhD antibodies was determined in blood of 10 (38.4%) mothers. In 5 (19.2%) cases the antibodies appeared first on week 16 of the pregnancy. The earliest appearance of IgG was observed on the 25 week of gestation. IgG1 was determined in a titre of 1:100 and IgG3 in a titer of 1:10. In 3 (11.5%) cases there was a combination of antibody titers and all Ig classes G1, G2 and G3 in various titers. The increase of IgG production occurred by the 34th week of gestation, when IgG was determined in different titers.

The general parameters of the newborns are presented in table 2. Most of the newborns were in-term, 18% of newborns were born at gestational age of 35–36 weeks. The first and the fifth minute Apgar scale score were 7.8 ± 0.5 and 8.2 ± 0.7 , respectively; there were no signs of acute intrapartum hypoxia. All the newborns had either Rh or ABO incompatibility with their mothers. In a pair of O(I)Rh-negative mother and A(II) Rh-positive newborn isoimmunization was diagnosed. The study of RBCs of 11 newborns was performed by the atomic force microscopy (AFM).

Paying attention to the clinical history of mothers, Rh and ABO incompatibility of the mothers and the infants, the results of clinical and laboratory analysis, all the newborns were transferred to the intensive care unit for treatment.

The residual umbilical cord blood (RUCB) of 14 full-term newborns with favorable course of pregnancy and urgent delivery was used to obtain normal RBCs for the AFM-aided observation. The mean gestational age of the newborns was 39.4 ± 0.5 weeks, their mean body weight at birth was 3131.7 ± 588.8 g, the first minute Apgar score was 8 ± 0.4 points.

All study parameters were compared in two groups at birth. Later, the comparison was performed in the study group with the same parameters before the treatment.

Critical Illness in Newborns

Таблица 1. Титр резус-антител и иммуноглобулинов классов G1, G2 и G3 во время беременности, Me [range].
Table 1. Titer of rhesus-specific IgG1, IgG2 and IgG3 during pregnancy.

Gestational age	The titers of Rh antibodies	Median titer				
		Ig G1	Ig G1	Ig G2	Ig G3	Ig G3
16 weeks	1:8 [1:4–1:32]					
20–22 weeks	1:16 [1:2–1:128]					
25 weeks		1:100			1:10	
26 weeks	1:16 [1:8–1:64]					
27 weeks			1:10			
28 weeks	1:16 [1:2–1:64]					
30 weeks	1:48 [1:2–1:256]		1:10			
32 weeks						1:100
34 weeks	1:16 [1:2–1:64]	1:100	1:10		1:10	1:100
35 weeks		1:100		1:100		1:100
36 weeks	1:16 [1:2–1:128]			1:100		

Note (примечание): Gestational age — срок гестации; Median titer — медиана титра; the titers of Rh antibodies (Me and range) — титр Rh-антител (медиана и разброс); weeks — недели.

Таблица 2. Общая характеристика новорожденных ($n=27$; $M \pm \sigma$).
Table 2. The main parameters of the newborns ($n=27$; $M \pm \sigma$).

Parameters	Values of parameters
Gestational age, weeks	38,2±1,6
Body weight, grams	3190±440
The 1 st minute Apgar scale score, points	7,8±0,5
The 5 th minute Apgar scale score, points	8,2±0,7
The pairs of groups mother-newborn	
O(I)Rh-positive-A(II)	8 (29,6%)
O(I)Rh-positive-B(III)	5 (18,5%)
O(I)Rh-negative-A(II) Rh-positiva	2 (7,4%)
Rh-negative-Rh-positive	12 (44,4%)

Note (примечание): Parameters — показатели; Values of parameters — значение показателей; Gestational age, weeks — срок гестации, недели; Body weight, grams — масса тела, гр; the 1st minute Apgar scale score, points — оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни, балл; the 5th minute Apgar scale score, points — оценка по шкале Апгар на 5-й минуте жизни, балл; the pairs of groups mother-newborn — пары групповой принадлежности мать-ребенок: O(I)Rh-positive-A(II) — O(I)Rh-положительный-A(II); O(I)Rh-positive-B(III) — O(I)Rh-положительный-B(III); O(I)Rh-negative-A(II) Rh-positiva — O(I)Rh-отрицательный-A(II) Rh-положительный; Rh-negative-Rh-positive — Rh-отрицательный — Rh-положительный.

балла, т. е. признаков острой интранатальной гипоксии не было. У новорожденных имело место несовпадение с матерью или по резус-фактору, или по ABO-системе. В паре O(I)Rh-отрицательная мать — A(II) Rh-положительный ребенок проводилась дифференциальная диагностика изоиммунизации. Исследование морфологии эритроцитов в поле атомного силового микроскопа (АСМ) проведено у 11 новорожденных.

Учитывая анамнез матерей, несовпадающие резус-факторы и группу крови матери и ребенка, клинико-лабораторную картину, новорожденные переводились в отделение реанимации и интенсивной терапии для проведения лечения.

Для получения нормальных эритроцитов в поле АСМ исследована остаточная пуповинная кровь 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и срочными родами. Средний гестационный возраст детей составил 39,4±0,5 недель, масса тела при рождении — 3131,7±588,8 грамм, оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни — 8±0,4 балла.

При рождении сравнивали исследуемые показатели между группами, в дальнейшем в группе исследования сравнение проводилось с аналогичными показателями до начала лечения.

В работе использовались следующие методы:

1. Исследование эритроцитов новорожденных в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК) новорожденных, центральная венозная кровь. Изображение эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGR Aprima» (NT-MDT, Россия)) в полуконтактном режиме. В

The following methods were used:

1. The study of newborns RBCs was performed in the field of AFM. The objects of the study were residual umbilical blood and central venous blood of newborns. The picture of erythrocytes was received using the atomic force microscope «NTEGRA prima» (NT-MDT, Russia) in semi-contact mode. Cantilevers NSG01-A were used as probes. The numbers of scan dots were 512 and 1024, the area of the scan was 100 sq. microns (10x10 microns). Detailed methodology for the analysis of nanostructures described in previously published studies [14,15].

2. The determination of RBCs, hemoglobin, and parameters:

A. The mean RBC volume was calculated according to the formula:

MCV (fl) = Hematocrit (11⁻¹)*1000/Erythrocyte count(*10¹²l⁻¹)

B. The mean hemoglobin amount in RBCs:

MCH (pg) = Hemoglobin (g dl⁻¹)/ Erythrocyte count(*10¹²l⁻¹)

C. The mean hemoglobin concentration in RBCs:

MCHC (g dl⁻¹) = Hemoglobin (g dl⁻¹)/ Hematocrit (11⁻¹)

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

The study was conducted using the analyzer «Hemolux 19™» (China) on 1, 3, and 7 days after the birth.

3. Photometric blood test for bilirubin was performed with 2,4-dichloraniline (DHA) using the analyzer «Sapphire 400», Japan.

Таблица 3. Лабораторные показатели у новорожденных ($n=27$; $M \pm \sigma$)Table 3. Laboratory parameters of the newborns ($n=27$; $M \pm \sigma$)

Parameters	Values of parameters on the stages of the study			P
	At birth	2–3 days after birth	5–7 days after birth	
RBCs, $10^{12}/l$	3,46 $\pm$ 0,8	4,6 $\pm$ 0,8	4,4 $\pm$ 0,8	
Hemoglobin, g/l	175 $\pm$ 30,6	165,4 $\pm$ 34,7	157,6 $\pm$ 31,9*	0,04
Reticulocytes, %	7,3 $\pm$ 2,3	6,5 $\pm$ 4,3	2,8 $\pm$ 2,8*	0,000001
MCV	98,6 $\pm$ 21	97,1 $\pm$ 13	95,4 $\pm$ 11,5	
MCH	38,2 $\pm$ 2,6	39,3 $\pm$ 14,5	36,1 $\pm$ 3,2*	0,01
MCHC	377,5 $\pm$ 46,2	370,6 $\pm$ 50,1	366 $\pm$ 88,1	
RDW-CV	15,8 $\pm$ 1	15,5 $\pm$ 0,8	15,4 $\pm$ 1	
RDW-SD	55 $\pm$ 4,9	51,6 $\pm$ 3,4	50,3 $\pm$ 4,4*	0,006

Note (примечание): Parameters — показатели; Values of parameters on the stages of the study — значения показателей на этапах исследования; RBCs (red blood cells), $10^{12}/l$ — эритроциты, $10^{12}/l$; hemoglobin, g/l — гемоглобин, г/л; reticulocytes, % — ретикулоциты, %; MCV (mean cell volume) — средний объем эритроцитов; MCH (mean corpuscular hemoglobin) — среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC (hemoglobin concentration in a given volume of packed erythrocytes — средняя концентрация гемоглобина в данном объеме осадка эритроцитов; RDW-CV (coefficient of variability of red blood cell distribution) — процент отклонения объема эритроцитов от среднего значения в популяции; RDW-SD (red blood cell distribution with standard deviation) — относительная ширина распределения эритроцитов по объему; * $P < 0,01$ — if compared with the parameters at birth — при сравнении с параметрами при рождении.

качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования 512 и 1024, поля сканирования 100×100 мкм, 10×10 мкм. Подробная методика анализа наноструктуры изложена в ранее опубликованных работах [16–18].

2. Определение эритроцитов, гемоглобина, а также показателей:

А. Средний объем эритроцитов (MCV) рассчитывался по формуле:

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

В. Среднее содержание гемоглобина в эритроците:

$$\text{MCH (pg)} = \text{Hemoglobin (g dl}^{-1}\text{)} / \text{Erythrocyte count} (\cdot 10^{12} \text{ l}^{-1})$$

С. Средняя концентрация гемоглобина в эритроците:

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

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

Исследование проводилось на анализаторе «Hemolux 19™» (Китай) в 1-е, 3-и, 7-е сутки постнатального возраста.

3. Исследование крови на билирубин с помощью фотометрического теста с 2,4-дихлоранилином (ДХА) на анализаторе «Sapphire 400», Япония.

4. Для определения группы крови по системе ABO использовались эритрогест™-моноклональные антитела анти-A, анти-B, анти-AB.

5. Для определения резус-принадлежности использовался цоликлон анти-D IgM моноклональный реагент.

6. Определение количественного содержания антител, или титра RhD-антител, в крови матери во время беременности осуществлялось с помощью тест-эритроцитов ID-Diacell, иммуноглобулинов класса G с помощью набора DAT IgG1/G3.

7. 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 (Oneway ANOVA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изоиммунизация новорожденных по резус-фактору или ABO-системе имеет общие клинические и лабораторные симптомы: иктеричность кожных покровов, обусловленная гипербилирубинемией с неконъюгированным билирубином, гемолитическая анемия и рети-

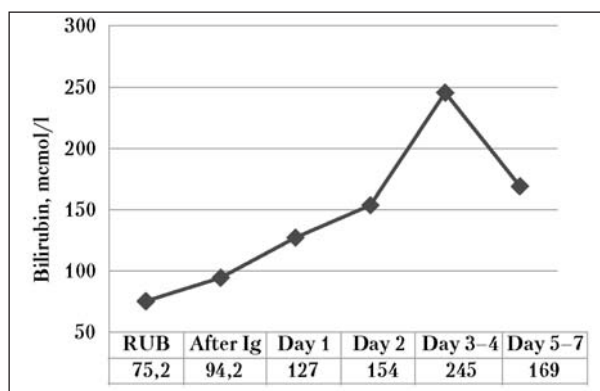


Рис. 1. Динамика билирубина и его почасового прироста в процессе лечения новорожденных.

Fig. 1. The dynamics of bilirubin level and its increase per hour within the period of treatment of the newborns.

Note (примечание): RUB (residual umbilical cord blood) — остаточная пуповинная кровь; after Ig — после введения Ig; day — день.

4. In order to determine the blood group by ABO system erythrotest — monoclonal antibodies anti-a and anti-b, anti-AB was used.

5. To determine the Rh — factor zolicon anti-D IgM monoclonal reagent was used.

6. The determination of RhD antibodies titer in the mother's blood during pregnancy was performed using the test RBCs ID-Diacell of immunoglobulin G and a set of DAT IgG1/G3.

7. The statistical processing of the data was carried out using the standard program of Origin 6.1 (Microsoft Office, USA). The significance of differences was estimated by the factor analysis of variance (One-way ANOVA). The difference was considered to be significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion

The ABO and rhesus isoimmunization of neonates has overall clinical and laboratory symptoms: icteric skin caused by hyperbilirubinemia with unconjugated bilirubin, hemolytic anemia and reticulocytosis of varying severity.

The skin of all the newborns was subicteric, the level of total bilirubin was elevated in residual umbilical cord blood ($75.1 \pm 15 \mu\text{mol/l}$), the peripheral blood was charac-

Critical Illness in Newborns

Таблица 4. Методы лечения новорожденных с изоиммунизацией ($n=27$).Table 4. The methods of isoimmunisation treatment of the newborns ($n=27$).

Parameters	Values of parameters
Phototherapy, n (%) patients	27 (100%)
Intravenous immunoglobulines, n (%) patients	17 (63%)
Repeated administration of intravenous immunoglobulines, n (%) patients	6 (22.2%)
The operation of ex-change blood transfusion, n (%) patients	2 (7.4%)
Hemotransfusion	1 (3.7%)
Intravenous administration of immunoglobulines №1, hours	3.9 ± 2.3
Intravenous administration of immunoglobulines №2, hours	16.5 ± 3
The dosage of intravenous immunoglobulines, mg/kg	1000 ± 72.9

Note (примечание): Parameters — показатели; values of parameters — значения показателей; phototherapy — фототерапия; Intravenous immunoglobulines — внутривенное введение иммуноглобулинов; repeated introduction of intravenous immunoglobulines — повторное внутривенное введение иммуноглобулинов; the operation of ex-change blood transfusion — операция заменного переливания крови; hemotransfusion — гемотрансфузия; intravenous administration of immunoglobulines №1, hours — введение внутривенных иммуноглобулинов №1, часы; if intravenous administration of immunoglobulines №2, hours — внутривенное введение иммуноглобулинов №2, часы; the dosage of immunoglobulines, mg/kg — доза иммуноглобулинов, мг/кг.

кулоцитоз различной степени выраженности. При рождении у детей отмечалась субиктеричность кожных покровов, в остаточной пуповинной крови (ОПК) был повышен общий билирубин до 75.1 ± 15 мкмоль/л, в периферической крови характерны анемия, ретикулоцитоз, отражающие функциональное состояние костного мозга в перинатальный период (табл. 3). Также у новорожденных определялись ядерные формы эритроцитов-нормобласты, медиана нормобластоза составила 15:100 клеток [1:100—156:100], что свидетельствует о перенесенной внутриутробной гипоксии плода.

В первые сутки лечения определились два показателя: общий билирубин в крови и его почасовой прирост (ППБ). В дальнейшем, при оценке эффективности лечения оценивалась только величина общего билирубина, т.к. показатель ППБ становится неинформативным. Динамика билирубина представлена на рис. 1. На графике видно, что в результате проводимой терапии ППБ был минимальным. Дальнейшее изменение билирубина соответствовало физиологическим значениям.

Основная цель терапии — прекращение гемолиза эритроцитов и снижение билирубина в крови. В зависимости от уровня билирубина при рождении новорожденным назначалось лечение: фототерапия, инфузия внутривенных иммуноглобулинов или операция заменного переливания крови (ОЗПК) (табл. 4). В нашем исследовании исходно все дети получали непрерывную фототерапию. В 17-ти случаях (63%) фототерапия сочеталась с введением внутривенных иммуноглобулинов для блокады Fc-рецепторов клеток ретикуло-эндотелиальной системы и прекращения гемолиза эритроцитов [2, 3]. Доза внутривенных иммуноглобулинов составляла 1000 мг/кг, первая инфузия проводилась через 3.9 ± 2.3 часа после рождения. Через 16.5 ± 3 часов после рождения у 22,2% новорожденных, лечившихся внутривенными иммуноглобулинами, в связи с высоким риском тяжелого течения заболевания (высокие исходные показатели гипербилирубинемии, неблагоприятное течение беременности, обусловленное резус-сенсibilизацией) проводилось повторное их введение.

Для 2-х (7,4%) новорожденных при рождении была характерна иктеричность кожных покровов, лаборатор-

теризована анемия, ретикулоцитоз, which reflects the functional state of the bone marrow in the perinatal period (PL.3). Normoblasts were also observed in the blood of neonates. The median of normoblasts was 15:100 cells [1:100—156:100], which evidenced of a previous fetal hypoxia.

On the first day of treatment the levels of total bilirubin in blood and their rate increases per hour were determined. Later, when assessing the effectiveness of treatment, only the assessment of a total bilirubin was performed because the assessment of its increase per hour was not informative. The dynamics of bilirubin is presented in Fig. 1. The graph shows that the increase of bilirubin level per hour was minimal as a result of the therapy. Later, the changes of bilirubin corresponded to physiological values.

The main goal of the therapy was the cessation of RBC hemolysis and decrease of bilirubin level in blood. The methods of treatment were performed in accordance with the level of bilirubin at birth: phototherapy, intravenous infusion of immunoglobulins or operation of blood transfusion (Fig. 4). All the neonates included in our study received a continuous phototherapy. In 17 cases (63%) phototherapy was combined with the intravenous administration of immunoglobulin in order to block Fc-receptors of the reticulo-endothelial system cells and to stop the RBC hemolysis [2, 3]. The dose of intravenous immunoglobulins was 1000 mg/kg, the first infusion was performed 3.9 ± 2.3 hours after birth. The immunoglobulins were injected repeatedly 16.5 ± 3 hours after birth in 22.2% of cases due to the high risk of severe illness (high baseline rates of bilirubin level, complicated pregnancy due to Rh-sensitization).

2 (7.4%) infants were characterized by icteric skin and laboratory signs of jaundice — anemic form of rhesus incompatibility; bilirubin level in their blood was 110 $\mu\text{mol/l}$, RBCs — $2.48 \cdot 10^{12}/\text{l}$. It was an absolute indication for blood transfusion. The operation was carried out in standard mode.

Excessive RBC hemolysis is the main cause of the disease, that is why it is important to assess the morphological composition and the nanostructure of RBC mem-

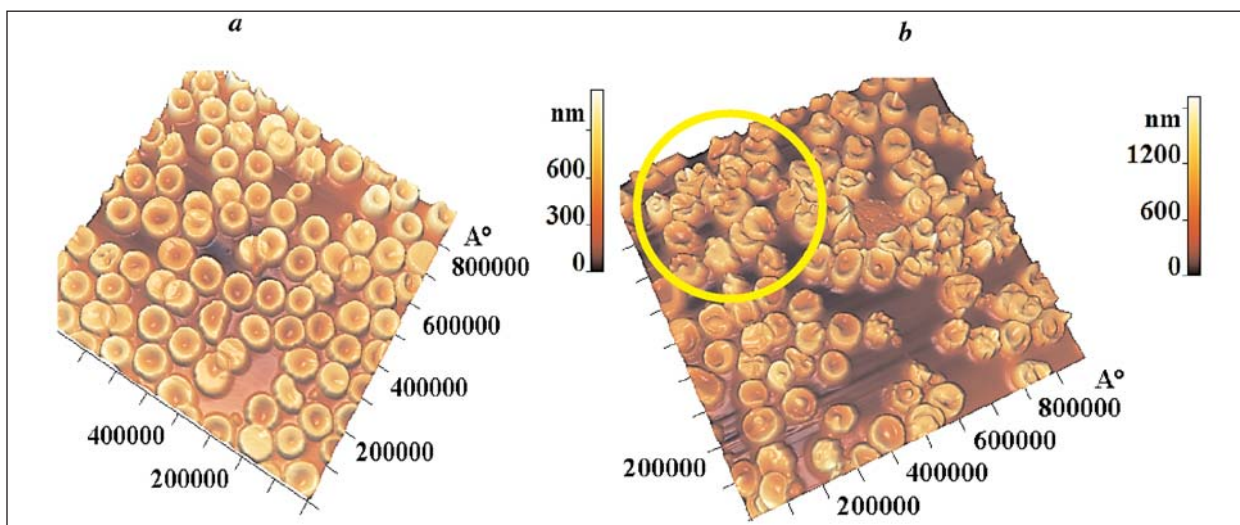


Рис. 2. Полиформизм эритроцитов в остаточной пуповинной крови у новорожденного с резус-конфликтом (а). Участок деструкции эритроцитов при резус-конфликте (b). Изображение в поле атомно-силового микроскопа, формат 3D, поле 100×100 мкм.
Fig. 2. Polymorphism of red blood cells (RBCs) in residual umbilical cord blood of a newborn with a rhesus-incompatibility (a). The plot of RBCs destruction in case of Rh-incompatibility (b). A 3-D picture in the atomic force microscopy field of 100×100 μm.

ные признаки желтушно — анемической формы резус-конфликта: билирубин ОПК 110 мкмоль/л, эритроциты — $2,48 \cdot 10^{12}/л$, что явилось абсолютным показанием для проведения операции заменного переливания крови (ОЗПК). Операция проводилась в стандартном режиме.

Избыточный гемолиз эритроцитов является основной причиной заболевания, поэтому важно оценить морфологический состав и наноструктуру мембран эритроцитов. В норме перинатальный эритропоэз имеет индивидуальные особенности, проявляющиеся планцитозом, наличием клеток неправильной формы, неонатальные эритроциты имеют больший средний объем эритроцитов, содержание гемоглобина в них повышено [18]. В наших работах ранее показано, что в ОПК здоровых доношенных новорожденных циркулируют 85% планоцитов и 15% трансформированных эритроцитов. При анализе наноструктуры мембраны эритроцитов получены индивидуальные количественные данные высот и периодов порядков. Высота 1-го порядка (h_1) составляла $1,24 \pm 0,3$ нм., 2-го порядка (h_2) — $0,8 \pm 0,3$ нм., 3-го порядка (h_3) — $0,17 \pm 0,04$ нм, что принято в исследовании за исходную величину [15].

При резус-иммунизации, сопровождающейся ранним появлением титра антител и IgG во время беременности, в ОПК новорожденных выявлены полиморфизм эритроцитов (рис. 2, а) и участки их деструкции (рис. 2, b). При исследовании морфологии эритроцитов выявлено, что, независимо от этиологического фактора изоиммунизации определяется полиморфизм клеток. В ранние сроки развития заболевания основными формами являются планоциты, стоматоциты и эхиноциты, а также переходные формы клеток. Планоциты визуализировались у 72,7% детей, средняя величина планцитоза составила $54,6 \pm 28\%$ клеток. Стоматоциты выявлялись у всех новорожденных, но количество их варьировало от 18% до 100%. Абсолютный стоматоцитоз выявлен у недоношенного

branes. Normal perinatal erythropoiesis has individual features which include pleocytosis, the presence of cells of irregular shape. RBCs of neonates have a higher mean volume and hemoglobin contents [16]. Our previous works show that there are 85% of planocytes and 15% of transformed cells in the blood of healthy in-term newborns.

Analysing the RBC nanostructure, the individual quantitative data (heights and the periods of the orders) were obtained. The height of the first order (h_1) was 1.24 ± 0.3 nm, the height of the second order (h_2) was 0.8 ± 0.3 nm, the height of the third order (h_3) was 0.17 ± 0.04 nm, which were considered to be the initial parameters in the study [14].

RBC polymorphism (Fig. 2, a) and plots RBC membrane destruction (Fig. 2, b) were observed in case of rhesus immunization accompanied by early appearance of antibody titers and IgG. The RBCs were found to be polymorphous regardless of the etiological factor of isoimmunization.

Planocytes, stomatocytes, echinocytes and cell of transitional shape were the major forms of RBCs in the early period of the disease. Planocytes were visualized in 72.7% of the newborns. The mean planocytosis reached $54.6 \pm 28\%$ of cells. Stomatocytes were observed in all the newborns, but their number varied from 18% to 100%. Absolute stomatocytes was revealed in a premature infant, born from a mother with early titre of RhD antibodies and IgG3 in the titer of 1:100, IgG1 in titer of 1:10 in the 34th week of gestation. Echinocytes were typical for 45.5% of all the newborns with isoimmunization. The RBC morphology in neonates with isoimmunization at birth was variable and depended on many factors. Isoimmunization was associated with the appearance of defects on the surface of RBC membrane (Fig. 3).

Analyzing the nanostructure of RBC membranes, we found that the height of the first order (h_1) underwent the greatest changes. Its value was significantly higher than in healthy newborns ($P < 0.05$).

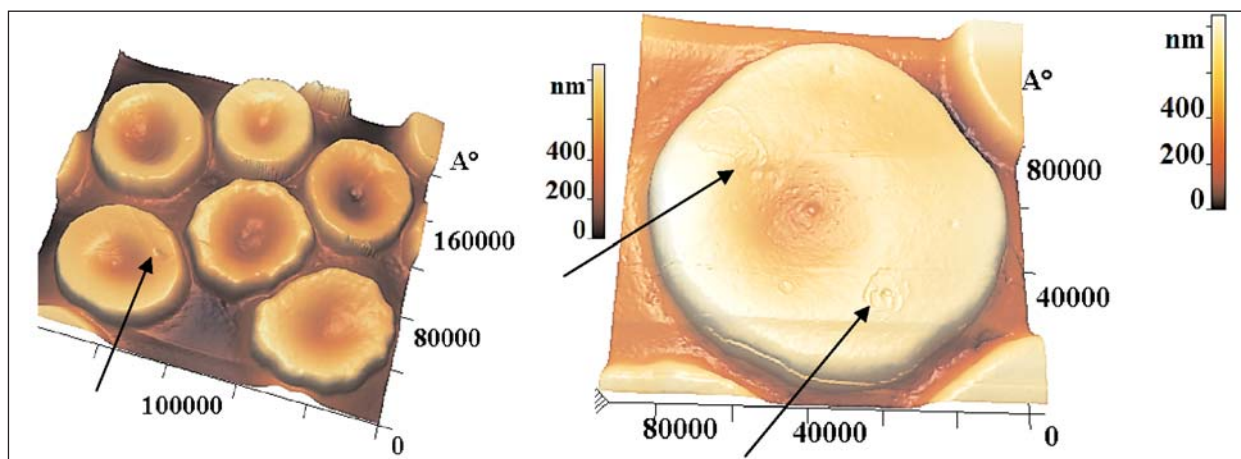


Рис. 3. На поверхности мембраны эритроцитов наблюдаются локальные топологические дефекты. Остаточная пуповинная кровь новорожденного с резус-конфликтом. Изображение в поле атомно-силового микроскопа, формат 3D, поле 100×100 мкм и 10×10 мкм.

Fig. 3. There local defects topological defects on the surface of red blood cells membranes. Residua residual umbilical cord blood. 3-D picture in the atomic force microscopy field of 100×100 μm and 10×10 μm .

ребенка, рожденного от матери с ранним титром RhD-антител и появлением в 34 недели беременности IgG3 в титре 1:100 и IgG1 в титре 1:10. Эхиноциты характерны для 45,5% детей с изоиммунизацией. Морфология эритроцитов при рождении у новорожденных с изоиммунизацией вариабельная и зависит от многих факторов: на величину стоматоцитоза влияет уровень билирубина в ОПК. Для изоиммунизации характерно появление дефектов на поверхности мембраны эритроцитов (рис. 3).

При анализе наноструктуры мембран эритроцитов выявлено, что при рождении у новорожденных с резус-конфликтом наибольшим изменениям подвержена высота первого порядка (h_1), ее величина достоверно превышала аналогичный показатель здоровых новорожденных ($p < 0,05$).

Выявлены корреляционные связи:

- обратная сильная связь содержания билирубина в крови и высотой h_1 мембраны эритроцитов ($r = -0,8$; $p = 0,007$);
- прямая сильная связь количества ретикулоцитов и высотой h_3 мембраны эритроцитов ($r = 0,8$; $p = 0,01$).

То есть на наноструктуру мембран эритроцитов влияют уровень билирубина и ретикулоцитоз, отражающие тяжесть течения заболевания. Максимальное увеличение высоты h_1 происходило на 2-е сутки жизни. Высоты второго (h_2) и третьего (h_3) порядков достоверно не отличались от детей группы сравнения ($p > 0,05$), т.е. спектринный матрикс и структурное состояние белков эритроцитов были стабильными (рис. 4). Таким образом, изоиммунизация новорожденного характеризуется внутриутробным пойкилоцитозом эритроцитов и нарушением макроструктуры мембран на уровне h_1 .

После введения внутривенных иммуноглобулинов происходит нормализация состава эритроцитов, исчезают топологические дефекты на поверхности мембраны (рис. 5).

Течение заболевания характеризовалось нормализацией уровня билирубина, достоверным уменьшением

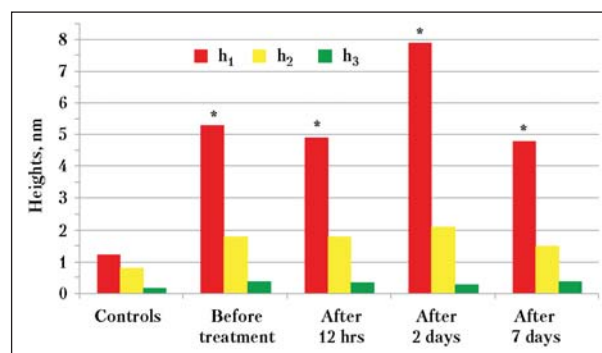


Рис. 4. Гистограммы высот h_1 , h_2 , h_3 мембраны эритроцитов в различные периоды исследования при изоиммунизации новорожденных.

Fig. 4. Histograms of heights h_1 , h_2 , h_3 of red blood cells in different periods of the study in case of isoimmunisation of the newborns.

Note (примечание). Controls — контроли; after — через; before treatment — до лечения; hrs (hours) — часы; days — дни.

The following correlation links were found:

- a strong negative correlation between bilirubin level in blood and the and the height h_1 ($r = -0,8$; $P = 0,007$);
- a strong positive correction between the number of reticulocytes and the height parameter h_3 ($r = 0,8$; $P = 0,01$).

Therefore, the RBC nanostructure is affected by bilirubin level and reticulocytosis, which reflects the severity of the disease. The maximum increase in height h_1 occurred on the 2nd day of life. The height parameters h_2 and h_3 did not differ significantly from the ones of the comparison group ($P > 0,05$), i.e. spectrin matrix and the structural state of RBC proteins were stable (Fig. 4). Thus, isoimmunization of newborns is characterized by intrauterine poikilocytosis of RBCs and the violation of RBC membrane macrostructure at the level of h_1 .

After intravenous administration of immunoglobulins, the normalization of RBC structure occurs, topological defects on the membranes disappear (Fig. 5). Clinical course of the disease was characterized by normalization of bilirubin level, reliable decrease of reticulocytosis and hemoglobin level, the mean hemoglobin concentration in

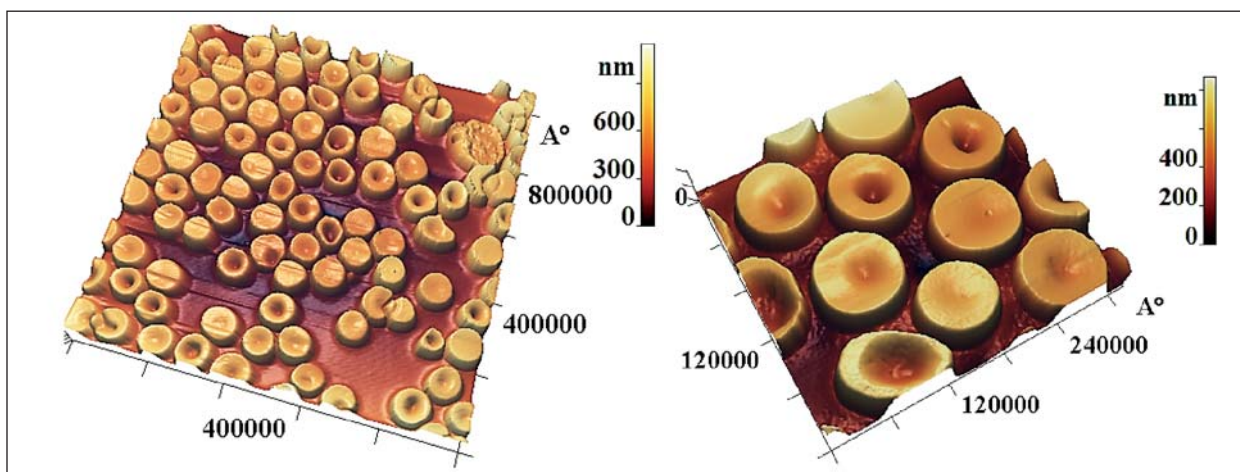


Рис. 5. Нормализация состава эритроцитов и исчезновение дефектов на поверхности мембраны после введения иммуноглобулинов. Изображение в поле атомно-силового микроскопа, формат 3D, поле 100×100 мкм.

Fig. 5. Red blood cells composition and disappearance of the defects on the surface of red blood cells membranes after the administration of immunoglobulins. 3D picture in the atomic force microscopy field of 100×100 μm .

ретикулоцитоза, снижением к 5–7 суткам жизни уровня гемоглобина и средней концентрации гемоглобина в эритроците, а также относительной ширины распределения эритроцитов по объему ($p < 0,05$). Состояние наноструктуры мембран эритроцитов изменилось, произошло снижение высоты h_1 , но ее величина была достоверно выше по сравнению с группой контроля и аналогичным показателем до начала лечения ($p < 0,05$). Внутренняя, цитоплазматическая, поверхность устойчива к токсическому влиянию билирубина и других факторов, т.к. высоты h_2 и h_3 мембраны эритроцитов при рождении соответствовали аналогичным высотам здоровых новорожденных. В течение всего времени исследования отмечались незначительные изменения высот h_2 и h_3 мембраны эритроцитов, но достоверных отличий не выявлено ($p > 0,05$) (рис. 4).

Комплексная терапия изоиммунизации новорожденного по резус-фактору или АВО-системе прекращает каскад иммунологических реакций, приводит к прекращению гемолиза эритроцитов, снижению билирубина, влияет на морфологический состав и макроструктуру мембран эритроцитов. Последствия перинатального воздействия на мембрану эритроцитов сохраняются в течение определенного времени и выходят за рамки раннего неонатального периода.

Выводы

1. Методом атомной силовой микроскопии установлено, что у новорожденных с изоиммунизацией, независимо от этиологического фактора, определяется полиморфизм и деструкция эритроцитов.
2. В ранние сроки развития изоиммунизации основными формами являются планоциты, стоматоциты и эхиноциты, а также переходные формы клеток.
3. При анализе наноструктуры мембран эритроцитов выявлено, что при рождении у новорожденных с резус-конфликтом наибольшим изменениям подвержена высота первого порядка.

RBCs and relative width of RBC distribution by volume by 5–7th day of life ($P < 0,05$). The state of RBC nanostructures changed, a decrease of the height h_1 was observed, but its value was still significantly higher if compared to the control group and similar data before the treatment ($P < 0,05$). The inner cytoplasmic surface was resistant to the toxic effects of bilirubin and other factors, since the height parameters h_2 and h_3 were equal versus those from healthy newborns. There were minor changes of height parameters h_2 and h_3 , but no significant differences were detected ($P > 0,05$) (Fig. 4).

Combination therapy for newborn Rh factor or ABO-system isoimmunization stopped the cascade of immunological reactions and RBC hemolysis, increased the bilirubin level but does not affect the morphological composition and macrostructure of RBC membranes. The consequences of perinatal exposure of RBC membranes was remaining for a certain time and went beyond the early neonatal period.

Conclusion

1. AFM revealed that infants with isoimmunization are characterized by cell shape polymorphism of the cell membrane and destruction of RBCs regardless of the etiological factor.
2. In the early stages of isoimmunization development of the main forms of RBCs include planocytes, stomatocytes, echinocytes and transitional cell shape.
3. When analysing the RBC membrane nanostructure the parameter «height of the first order» was found to undergo the greatest changes.
4. Combination isoimmunization therapy of newborns causes the cessation of RBC hemolysis and decrease of bilirubin level. After the administration of intravenous immunoglobulins some alterations of RBC membrane surface disappeared. The main cell shape of RBCs was presented by planocytes in 45.5% of newborns.

Critical Illness in Newborns

4. Комплексная терапия изоиммунизации новорожденного по резус-фактору или АВО-системе приводит к прекращению гемолиза эритроцитов, снижению билирубина. После введения внутривен-

ных иммуноглобулинов исчезают дефекты на поверхности мембраны эритроцитов, у 45,5% новорожденных основная часть эритроцитов представлена планочитами.

Литература

1. Goossens D., da Silva N., Metral S., Cortes U., Callebaut I., Picot J., Mouro-Chanteloup I., Cartron J.P. Mice expressing RHAG and RHD human blood group genes. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e80460. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080460>. PMID: 24260394
2. Сидельникова В.М., Антонов А.Г. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. М.: Триада X; 2004: 192.
3. Савельева Г.М., Конопляников А.Г., Курцер М.А., Панина О.Б. Гемолитическая болезнь плода и новорожденного. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013: 144.
4. Перепелица С.А., Кашина Н.А., Сидорова Н.Л. Альтернативный метод лечения желтушно-анемической формы изоиммунизации новорожденного по резус-фактору. *Анестезиология и реаниматология*. 2010; 1: 60–62. PMID: 20564941
5. Минеева Н.В., Елхина Е.В., Бодрова Н.Н., Заварзина О.А., Приезжева Л.С., Поединенко И.В. Разновидности антигена D и определение резус-принадлежности крови. *Клин. лаб. диагностика*. 2009; 3: 17–19. PMID: 19388479
6. Мейл Д., Бростовф Дж., Рот Д.Б., Ройтт А. Иммунология. М.: Логосфера; 2007: 554.
7. Лазанович В.А., Просекова Е.В. Внутривенные иммуноглобулины: механизмы терапевтических эффектов. *Медицинская иммунология*. 2014; 16 (4): 311–322.
8. Brinc D., Lazarus A.H. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2009: 185–191. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.185>. PMID: 20008198
9. Kurjak A., Chervenak F.A. (eds.). Textbook of perinatal medicine. 2nd ed. Abingdon: Informa Healthcare; 2006.
10. Фёдорова Т.А., Митря И.В. Плазмаферез и иммуноглобулинотерапия в комплексном лечении резус-сенситизации. *Акушерство и гинекология*. 2010; 1: 38–42.
11. Сухих Г.Т., Сидельникова В.М., Файзуллин Л.З., Тетруашвили Н.К., Фёдорова Н.И., Амбрумянц Д.В., Карнаухов В.П. Неинвазивная диагностика резус-принадлежности плода по крови матери на ранних сроках беременности. *Вестн. РУДН. Серия: Медицина*. 2009; 6: 137–141.
12. Gotink M.J., Benders M.J., Lavrijsen S.W., Rodrigues Pereira R., Hulzebos C.V., Dijk P.H. Severe neonatal hyperbilirubinemia in the Netherlands. *Neonatology*. 2013; 104 (2): 137–142. <http://dx.doi.org/10.1159/000351274>. PMID: 23887661
13. Vos M.J., Martens D., van de Leur S.J., van Wijk R. Neonatal hemolytic anemia due to pyknocytosis. *Eur. J. Pediatr*. 2014; 173 (12): 1711–1714. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-014-2374-7>. PMID: 25001230
14. 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. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-5>
15. 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): 11–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-11>
16. 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>
17. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. Состояние мембраны эритроцитов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (6): 46–54. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-6-46-54>
18. Linderkamp O., Meiselman H.J. Geometric, osmotic and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. *Blood*. 1982; 59 (6): 1121–1127. PMID: 7082818

Поступила 02.03.15

References

1. Goossens D., da Silva N., Metral S., Cortes U., Callebaut I., Picot J., Mouro-Chanteloup I., Cartron J.P. Mice expressing RHAG and RHD human blood group genes. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e80460. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0080460>. PMID: 24260394
2. Sidelnikova V.M., Antonov A.G. Gemolicheskaya bolezнь ploda i novorozhdennogo. [Hemolytic disease of the fetus and newborn]. Moscow: Triada X; 2004: 192. [In Russ.]
3. Savelyeva G.M., Konoplyannikov A.G., Kurtser M.A., Panina O.B. Gemolicheskaya bolezнь ploda i novorozhdennogo. [Hemolytic disease of the fetus and newborn]. Moscow: GEOTAR-Media; 2013: 144. [In Russ.]
4. Perepelitsa S.A., Kashina N.A., Sidorova N.L. Alternativnyi metod lecheniya zheltushno-anemicheskoi formy izoimmunizatsii novorozhdennogo po rezus-faktoru. [An alternative method of treatment for the icteric-anemic form of neonatal iso-immunization to rhesus factor]. *Anesteziology i Reanimatologiya*. 2010; 1: 60–62. PMID: 20564941. [In Russ.]
5. Mineyeva N.V., Elkhina E.V., Bodrova N.N., Zavarzina O.A., Priezeheva L.S., Poedinenko I.V. Raznovidnosti antigena D i opredelenie rezus-prinadlezhnosti krovi. [D antigen varieties and determination of Rhesus factor]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2009; 3: 19–21. PMID: 19388479. [In Russ.]
6. Mail D., Brostoff J., Rot D.B., Roitt A. Immunology. [Immunology]. Moscow: Logosfera; 2007: 554. [In Russ.]
7. Lazanovich V.A., Prosekov E.V. Vnutrivennye immunoglobuliny: mekhanizmy terapevticheskikh effektiv. [Intravenous immunoglobulins: mechanisms of therapeutic effects]. *Meditsinskaya Immunologiya*. 2014; 16 (4): 311–322. [In Russ.]
8. Brinc D., Lazarus A.H. Mechanisms of anti-D action in the prevention of hemolytic disease of the fetus and newborn. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*. 2009: 185–191. <http://dx.doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.185>. PMID: 20008198
9. Kurjak A., Chervenak F.A. (eds.). Textbook of perinatal medicine. 2nd ed. Abingdon: Informa Healthcare; 2006.
10. Fedorova T.A., Mitya I.V. Plazmaferез i immunoglobulinoterapiya v kompleksnom lechenii rezus-sensibilizatsii. [Plasmapheresis and immunoglobulin therapy in the complex treatment of rhesus sensitization]. *Akusherstvo i Ginekologiya*. 2010; 1: 38–42. [In Russ.]
11. Sukhikh G.T., Sidelnikova V.M., Faizullin L.Z., Tetruashvili N.K., Fedorova N.I., Amburyants D.V., Karnaukhov V.P. Neinvazivnaya diagnostika rezus-prinadlezhnosti ploda po krovi materi na rannikh srokakh beremennosti. [Noninvasive diagnosis of fetal rhesus factor from maternal blood during early pregnancy]. *Vestnik RUDN. Seriya: Meditsina*. 2009; 6: 137–141. [In Russ.]
12. Gotink M.J., Benders M.J., Lavrijsen S.W., Rodrigues Pereira R., Hulzebos C.V., Dijk P.H. Severe neonatal hyperbilirubinemia in the Netherlands. *Neonatology*. 2013; 104 (2): 137–142. <http://dx.doi.org/10.1159/000351274>. PMID: 23887661
13. Vos M.J., Martens D., van de Leur S.J., van Wijk R. Neonatal hemolytic anemia due to pyknocytosis. *Eur. J. Pediatr*. 2014; 173 (12): 1711–1714. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-014-2374-7>. PMID: 25001230
14. Moroz V.V., Golubev A.M., Kozlova E.K., Afanasyev A.V., Gudkova O.E., Novoderzhkina I.S., Marchenkov Yu.V., Kuzovlev A.N., Zarzhetsky Yu.V., Kostin A.I., Volkov D.P., Yakovlev V.N. Dinamika morfologicheskikh izmeneniy eritrotsitov i biokhimicheskikh pokazatelei konservirovannoi tselnoi krovi v razlichnye sroki khraneniya. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Time course of morphological changes in red blood cells and stored whole blood biochemical parameters in different storage periods. *General Reanimatology*]. 2013; 9 (1): 5–13. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-1-5>. [In Russ.]
15. Perepelitsa S.A., Alekseyeva S.V., Sergunova V.A., Gudkova O.E. 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; 9 (6): 11–24. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-11>. [In Russ.]
16. 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.]
17. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E. Sostoyaniye membrany eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh v rannem neonatalnom periode. *Obshchaya Reanimatologiya*. [The red blood cell membrane of preterm infants in the early neonatal period. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (6): 46–54. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-6-46-54>. [In Russ.]
18. Linderkamp O., Meiselman H.J. Geometric, osmotic and membrane mechanical properties of density-separated human red cells. *Blood*. 1982; 59 (6): 1121–1127. PMID: 7082818

Submitted 02.03.15