

## Влияние перинатальной гипоксии на морфологию эритроцитов у новорожденных

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

<sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского, ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии  
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>2</sup> Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта,  
Россия, 236041, г. Калининград, ул. Александра Невского, д. 14

<sup>3</sup> Родильный дом Калининградской области №1,  
Россия, 236016, г. Калининград, Клиническая ул., д. 81

## The Effect of Perinatal Hypoxia on Red Blood Cell Morphology in Newborns

Svetlana A. Perepelitsa<sup>1,2,3</sup>, Viktoria A. Sergunova<sup>1</sup>, Olga E. Gudkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

<sup>2</sup> Immanuel Kant Baltic Federal University,  
14 Aleksandr Nevsky Str., Kaliningrad 236041, Russia

<sup>3</sup> Kaliningrad District Maternity House No. 1,  
81 Klinicheskaya Str., Kaliningrad 236016, Russia

**Цель работы.** Выявление особенностей морфологии эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, методом атомной силовой микроскопии.

**Материал и методы.** Изучили состояние мембран эритроцитов у 10 новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Все новорожденные родились с низкой оценкой по шкале Апгар, при рождении им провели реанимационные мероприятия: интубацию трахеи, перевод на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ). Из родильного зала новорожденных группы исследования переводили в палату реанимации, где их подключали к аппарату ИВЛ. Для получения изображения нормальных эритроцитов в поле атомного силового микроскопа (АСМ) выделили группу сравнения из 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и нормальными срочными родами.

**Результаты.** В остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, дискоциты и планоциты составляли 36% от общего количества эритроцитов, отмечалось сниженное содержание нормальных форм эритроцитов, что свидетельствовало о неблагоприятном воздействии гипоксии на мембрану эритроцитов новорожденных. Для детей, перенесших перинатальную гипоксию, был характерен пойкилоцитоз, визуализировались переходные формы эритроцитов: стоматоциты и эхиноциты. Стоматоцитоз и эхиноцитоз были характерны для 80% новорожденных. Стоматоцитоз сохранялся у доношенных новорожденных, перенесших гипоксию, осложнившуюся неонатальной аспирацией меконием. Анализ наноструктуры мембран эритроцитов показал, что при рождении у новорожденных с перинатальной гипоксией наибольшим изменениям была подвержена высота первого порядка ( $h_1$ ): ее величина в 4,2 раза превышала аналогичный показатель здоровых новорожденных. Высота второго порядка ( $h_2$ ) превышала аналогичный показатель в 2 раза, т.е. спектринный матрикс также изменялся под влиянием гипоксии. Величина третьего порядка ( $h_3$ ) также была достоверно выше у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, по сравнению со здоровыми новорожденными. Перинатальная гипоксия вызывала антенатальное полное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов.

**Закключение.** Перинатальная гипоксия вызывает изменение морфологии эритроцитов и нарушение наноструктуры мембран. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на все исследованные компоненты наноструктуры мембраны эритроцита: фосфолипидный бислой, белковые компоненты мембраны, спектринный матрикс. Изменение высот и пространственных периодов поверхностей мембран  $h_1$  и  $h_3$  эритроцитов, связанное с гипоксией, по-видимому, направлено на компенсаторное увеличение поверхности мембраны эритроцита, способствующее увеличению площади газообмена. Данные изменения, вероятно, являются приспособительной реакцией, направленной на сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии. Течение раннего периода адаптации (постгипоксический период) характеризовалось нестабильностью всех исследованных компонентов наноструктуры мембран эритроцитов, большой вариабельностью морфологических форм. Последствия перинатального воздействия гипоксии на мембрану эритроцитов сохранялись в течение определенного времени, и выходили за рамки раннего неонатального периода.

**Ключевые слова:** перинатальная гипоксия; мембрана эритроцитов; наноструктура мембран; новорожденные

**Адрес для корреспонденции:**

Светлана Перепелица  
E-mail: sveta\_perepeliza@mail.ru

**Correspondence to:**

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

**Aim.** To study the red blood cell (RBC) morphology in newborn infants with a history of perinatal hypoxia using the atomic-force microscopy.

**Material and methods.** The state of RBC membranes of 10 newborns with a history of perinatal hypoxia was studied. All infants were born with low Apgar scoring; the following resuscitative measures were carried out at birth: tracheal intubation, mechanical ventilation (MV). The study group newborns were transferred from the delivery room to the ICU, where MV was started. To obtain images of normal red blood cells in the field of the atomic force microscope (AFM), 14 full-term newborns delivered after a favorable course of pregnancy and normal term labor were enrolled in a reference group.

**Results.** Discocytes and planocytes comprised 36% of the total red blood cell count in the residual umbilical cord blood of newborns with a history of perinatal hypoxia; there was a decreased amount of normal RBC forms, thus demonstrating an unfavorable effect of hypoxia on newborn's RBC membrane. Poikilocytosis was typical for infants exposed to perinatal hypoxia; transitional forms of RBCs (stomatocytes and echinocytes) were visualized. Stomatocytosis and echinocytosis were typical for 80% of newborns. Stomatocytosis persisted in full-term newborns exposed to hypoxia complicated with aspiration of neonatal meconium. The analysis of RBC membrane nanostructure demonstrated that the first-order height ( $h_1$ ) experienced the greatest alterations at birth in newborns with perinatal hypoxia; it was 4.2 times as much as the similar parameter in healthy newborns. Estimations of second-order height ( $h_2$ ) parameter values demonstrated a two-fold increase showing that the spectrin matrix also changed under the effect of hypoxia. The third order value ( $h_3$ ) was significantly higher in newborns with perinatal hypoxia, than that in healthy infants. Therefore, perinatal hypoxia causes antenatal complete damage of nanostructures of RBC membranes.

**Conclusion.** Perinatal hypoxia alters RBC morphology and impairs the nanostructure of membranes. These changes confirmed the effect of the hypoxia degree on all nanostructures of RBC membranes: phospholipid bilayer, protein elements of the membrane, spectrin matrix. Changes in heights and spatial periods of the red blood cell membrane surfaces  $h_1$  and  $h_3$  associated with hypoxia apparently are aimed at a compensatory increase in the red blood cell membrane surface contributing to the increase of the gas exchange area. These changes may represent adaptive responses to hypoxia aimed to preserve the functional capabilities of red blood cells. The course of an early adaptation period (post-hypoxic period) is characterized by the instability of all nanostructures of red blood cell membranes and a greater variability of morphological forms. Effects of perinatal hypoxia on the red blood cell membrane persist for some time and go beyond the early neonatal period.

**Key words:** perinatal hypoxia; RBC membrane; nanostructure of membranes; newborns

DOI:10.15360/1813-9779-2017-2-14-23

## Введение

Перинатальная гипоксия (ПГ) остается актуальной проблемой перинатологии, что обусловлено рядом факторов, отягощающих течение беременности и родов. Усилия специалистов многих специальностей направлены на профилактику, раннюю диагностику и лечение этого состояния. При развитии перинатальной асфиксии крайне важна ранняя диагностика возможных повреждений органов и систем новорожденного ребенка. Использование стандартных постнатальных методов контроля для диагностики повреждений не всегда позволяет выявлять их в ранние сроки заболевания, в связи, с чем необходимо углубленное изучение причин и последствий перинатальной асфиксии у новорожденных [1–3].

Эритроциты являются важнейшими клетками, которые, с одной стороны, осуществляют транспорт кислорода, с другой — подвергаются изменениям при воздействии гипоксии. Существуют физиологические отличия эритроцитов новорожденного ребенка. Понимание различий между эритроцитами новорожденных и взрослых очень важно в оценке перинатальных повреждений клеток. Эти различия включают изменения в размере и формах эритроцитов, составе глобина и клеточ-

## Introduction

Perinatal hypoxia (PH) remains an urgent problem of perinatology due to a number of factors which complicate the course of pregnancy and labor. Numerous studies are directed at prevention, early diagnosis and treatment of hypoxia of neonates. If perinatal asphyxia develops, early diagnosis of possible damage of newborn's organs and systems is urgently needed. Despite standard postnatal monitoring methods, however, injuries may not always be diagnosed during the early stages of the disease, and therefore, thorough investigation of causes and consequences of perinatal asphyxia in newborns is required [1–3].

Red blood cells (RBC) are the most important cells that, on the one hand, perform the oxygen transport, and on the other hand, they are subject to changes when exposed to hypoxia. There are physiological differences in RBCs morphology of a newborn infant. Understanding the differences between RBC of newborn infants and adults is very important in assessing the perinatal cell damage. These differences include changes in the size and shapes of RBC, globin composition, and cellular metabolism. A normal RBC membrane is composed of lipids and proteins that interact to preserve RBC physiological

ного метаболизма. В норме мембрана эритроцита состоит из липидов и белков, которые взаимодействуют так, чтобы сохранить эритроциту физиологическую деформируемость и гибкость, обеспечивающие циркуляцию крови. Количественные или качественные дефекты в мембранных белках, которые возникают при воздействии неблагоприятных условий на мембрану эритроцита, приводят к уменьшению деформируемости мембраны и неустойчивости, последующему разрушению клеток [4]. Способность эритроцитов к деформации мембран обусловлена состоянием самих мембран [5]. Прогрессирующие изменения форм эритроцитов сопровождаются нарушениями цитоскелета и плазматической мембраны, снижением внутриклеточной концентрации АТФ [6–8], а также изменением функциональных свойств эритроцитов: снижением транспортной функции, повышенной деформируемостью мембран [9].

Мембрана эритроцитов особенно чувствительна к оксидативному стрессу. Информация о том, как запускается оксидативный стресс, и о механизмах его воздействия на эритроциты может дать ответ на вопросы о причинах анемии недоношенных и о механизме повреждения эритроцитов при гипоксии. Последние гипотезы о механизме окислительного повреждения красных клеток, и доказательства связей между эритроцитами, оксидативным стрессом и гипоксией предполагают, что повреждение эритроцитов у новорожденных индуцируется тяжелой гипоксией и ацидозом в перинатальный период [10].

В качестве подтверждения асфиксии при рождении предложено исследование количества образованных ядер эритроцитов (NRBC) в остаточной пуповинной крови (ОПК). Комбинация NRBC и гипоксически-ишемическая энцефалопатия обладает высокой предсказательной силой для определения прогноза асфиксии у новорожденных, т.е. дисбаланс NRBC является прогностическим биомаркером перенесенной асфиксии новорожденного [11].

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 фликкерингом мембраны эритроцитов и изменениями спектринного матрикса. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на наноструктуру мембран эритроцитов. Течение раннего неонатального периода характеризуется постнатальной перестройкой кровообращения, сохранением пойкилоцитоза. Макроцитоз и планоцитоз отражают компенсаторное состояние эритропоэза, являются физиологическим состоянием эритроци-

deformability and flexibility and ensure the blood circulation. Quantitative or qualitative defects in membrane proteins that occur when the RBC membrane is exposed to adverse environment result in reduction of the membrane deformability and instability followed by the destruction of cells [4]. The ability of RBC to deform is due to the state of the membranes themselves [5]. Progressing changes in RBC shapes are accompanied by impairment of the cytoskeleton and plasma membrane, decreased intracellular ATP concentration [6–8], as well as changes in the functional characteristics of RBC: reduced transport function and increased membrane deformability [9].

The RBC membrane is particularly sensitive to the oxidative stress. Information on how the oxidative stress and mechanisms of its effect on RBC are triggered will answer a questions about the causes of anemia of premature newborns and the mechanism of RBC damage in hypoxia. The latest concepts on the mechanism of oxidative damage of RBC and evidence of links between RBC, oxidative stress and hypoxia suggest that the RBC damage in newborns is induced by severe hypoxia and acidosis in the perinatal period [10].

Tests for the nucleated RBC (NRBC) count in the residual umbilical cord blood (RUCB) are suggested to confirm perinatal asphyxia. The combination of NRBC and hypoxic-ischemic encephalopathy has a high predictive potential for determining the prognosis of asphyxia in newborns, i.e. the NRBC imbalance is a prognostic biomarker of neonatal asphyxia [11].

The adverse course of pregnancy complicated with intrauterine fetal hypoxia affect the morphological structure of RBC, causes functional changes in membrane nanostructures, which manifest themselves in premature newborns as severe poikilocytosis, pronounced flickering of RBC membranes and changes in the spectrin matrix. These changes confirmed the effect of the hypoxia degree on the nanostructure of RBC membranes. The course of the early neonatal period is characterized by postnatal rearrangement of the blood circulation, active process on RBC membranes, and persistence of poikilocytosis. Macrocytosis and planocytosis reflect the compensatory state of erythropoiesis and represent the physiological state of RBC for premature newborns [12]. In the case of intrauterine hypoxia, the permeability of newborns' red blood cell membranes is increased. Studies of the diffusion of water molecules in RBC demonstrated that the time of proton exchange of «membrane» water with intra- and extracellular water increased in newborns with a history of intrauterine hypoxia [13].

The greatest changes in the red blood cell membrane structure were found in residual umbilical cord blood (RUCB) of premature newborns with respira-

тов для недоношенных детей [12]. При внутриутробной гипоксии повышена проницаемость мембран эритроцитов новорожденных. При изучении диффузии молекул воды в эритроцитах, установлено, что время обмена протонов «мембранной» воды с внутри- и внеклеточной водой повышено у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию [13].

Наибольшие изменения структуры мембран эритроцитов выявлены в остаточной пуповинной крови ОПК недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДСН). Для пациентов этой группы характерен внутриутробный пойкилоцитоз, обусловленный воздействием неблагоприятных факторов, что подтверждается наличием множественных корреляционных связей. При анализе наноструктуры мембран эритроцитов выявлено, что наиболее чувствительной является величина первого порядка, свидетельствующая о внутриутробном нарушении микроструктуры мембран [14]. Во время неблагоприятно протекающей многоплодной беременности происходит антенатальное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов новорожденных. Течение раннего периода адаптации у детей характеризуется сменой морфологических форм эритроцитов, что обусловлено активными процессами трансформации поверхности мембраны эритроцитов [15].

Цель работы — выявление особенностей морфологии эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, методом атомной силовой микроскопии.

### Материал и методы

В группу исследования состояния мембран эритроцитов включили 10 новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию (группа 1). Все новорожденные родились с низкой оценкой по шкале Апгар, при рождении им провели реанимационные мероприятия: интубацию трахеи, перевод на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ). При рождении у новорожденных выявили метаболический лактат — ацидоз различной степени тяжести, что свидетельствовало о перенесенной перинатальной гипоксии. Из родильного зала новорожденных группы исследования перевели в палату реанимации, где детей подключали к аппарату ИВЛ, которую проводили в режиме контролируемой вентиляции. Течение раннего неонатального периода у новорожденных осложнилось развитием полиорганной недостаточности, в первую очередь, дыхательной недостаточностью, нарушениями центральной гемодинамики, в связи с чем, проводили комплексное интенсивное лечение.

Для получения нормальных эритроцитов выделили группу сравнения из 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и нормальными срочными родами (группа 2). 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

tory distress syndrome (RDS). Intrauterine poikilocytosis caused by adverse factors is typical for patients of this group, as evidenced by the presence of multiple correlations. The analysis of RBC membrane nanostructure demonstrated that the first-order value indicating the intrauterine impairment of membrane microstructure is the most sensitive one [14]. Antenatal impairment of newborns' RBC membranes occur during a multiple pregnancy with an adverse course. The course of the early adaptation period in infants is characterized by the change of morphological forms of RBC, which is caused by an active process on the RBC membrane [15].

The aim of this study is to assess the morphology of RBC in newborns with perinatal hypoxia using the atomic-force microscopy.

### Materials and Methods

The state of RBC membranes of 10 newborns with perinatal hypoxia was studied (group 1). All infants were born with low Apgar scoring; the following resuscitative measures were carried out at birth: tracheal intubation, mechanical ventilation (MV). At birth, different degrees of metabolic lactate-acidosis were diagnosed at birth thus confirming the perinatal hypoxia. The study group newborns were transferred from the delivery room to the ICU, where MV in the controlled ventilation mode was started. The course of the early neonatal period was complicated with the multiple organ failure, first of all, with respiratory compromise and central hemodynamic disorders, therefore, a complex intensive therapy was performed.

To obtain images of normal red blood cells in the field of the atomic force microscope (AFM), 14 full-term newborns delivered after a favorable course of pregnancy and normal term labor were enrolled in a reference group (group 2). The median gestational age of infants was  $39.4 \pm 0.5$  weeks, the birthweight was  $3131.7 \pm 588.8$  g, Apgar score at 1 minute of life was  $8 \pm 0.4$ . The main clinical characteristics of the newborns are presented in table 1. No significant difference in the birthweight and gestational age was found. The Apgar scoring of the study newborns was significantly lower than that of healthy infants ( $P < 0.01$ ). Lethal outcomes were registered in the study group alone.

All newborns received professional care in accordance with the procedure for rendering medical care in neonatology [16].

The following methods were used in the study:

Clinical assessment of the infant's birth status, including Apgar scoring (AS) at the 1<sup>st</sup> minute after the birth.

Catheterization of v. umbilicalis using a thermoplastic catheter was performed for the infusion therapy and lab tests.

Newborns' red blood cells were studied using the atomic force microscope (AFM). There were the following study objects: residual umbilical cord blood (RUCB) of premature newborns, central venous blood sampled 12 hours after birth and venous blood of newborns sampled on Day 7 after birth. RUCB was sampled immediately after cutting the umbilical cord. The blood is sampled to special 0.25 ml test tubes with the EDTA preservative added; the blood was mixed with the preservative; it was left for 30

## Critical States in Newborns

**Основные клинические характеристики новорожденных ( $M \pm \sigma$ ).  
Main clinical characteristics of newborn infants ( $M \pm \sigma$ ).**

Parameters	Values of parameters in groups	
	1 (n=10)	2 (n=14)
Gestational age, weeks	36.3±3.1	39.4±0.5
Body weight, g	2907±687.5	3131.7±588.8
Apgar score at the 1 <sup>st</sup> minute	4(2;7)*	8(8;9)
The number of children on MV	10 (100%)	—

**Note.** \* —  $P < 0.01$  — significance of differences between groups.

**Примечание.** Parameters — показатели; Values of parameters in groups — значения показателей в группах; Gestational age, weeks — срок гестации, недель; Body weight, g — масса тела, гр; Apgar score at the 1<sup>st</sup> minute — шкала Апгар на 1-й мин., балл; The number of children on MV — количество детей на ИВЛ. \* —  $p < 0.01$  — достоверность различий между группами.

на 1-й минуте жизни  $-8, \pm 0,4$  балла. Основные клинические характеристики новорожденных представлены в табл. 1. Достоверных отличий по массе тела при рождении, гестационному возрасту не выявили. У исследуемых новорожденных оценка по шкале Апгар достоверно ниже, по сравнению со здоровыми детьми ( $p < 0,01$ ). Только в группе исследования были летальные исходы.

Всем новорожденным оказали квалифицированную помощь в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю «неонатология» [16].

Клиническая оценка состояния ребенка при рождении включала оценку по шкале Апгар (ОА) на 1-й минуте после рождения.

Для проведения инфузионной терапии и лабораторных исследований выполняли катетеризацию v. Umbilicalis термопластичным катетером.

Исследование эритроцитов новорожденных проводили в поле АСМ. Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК) недоношенных новорожденных, центральная венозная кровь через 12 часов после рождения и венозная кровь новорожденных 7-х суток жизни. ОПК забирали сразу после пересечения пуповины. Забор осуществляли в специальные пробирки объемом 0,25 мл с добавлением консерванта ЭДТА, кровь перемешивали с консервантом, отстаивали в течение 30 минут, затем готовили монослой эритроцитов для дальнейшей обработки в поле АСМ: 20 мкл крови наносили на предметное стекло и приготавливали монослой эритроцитов с помощью центрифуги Diff Spin 2 (США).

Изображение эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа

«NTEGRA prima» (Россия) в полуконтактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования 512 и 1024, поля сканирования  $100 \times 100$  мкм,  $20 \times 20$  мкм. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Origin 6.1, которая входит в состав Microsoft Office (USA), специально предназначенной для обработки результатов научных исследований. Эта программа позволяет построить гистограммы, определить среднее значение, величину среднеквадратического отклонения и получить интервальную оценку, оценку достоверности полученных результатов, оценку достоверности различий. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA).

Полученные результаты обработаны методами дескриптивной и непараметрической статистики с исполь-

мин, and then an RBC monolayer was prepared for further processing in the AFM field: 20  $\mu$ l of blood was placed onto a slide, and an RBC monolayer was prepared using a Diff Spin 2 centrifuge (USA).

An image of red blood cells was obtained using an NTEGRA Prima atomic force microscope (Russia) in a tapping mode. NSG01-A cantilevers were used as probes. The number of scanning points was 512 and 1024, the scanning fields were  $100 \times 100$   $\mu$ m,  $20 \times 20$   $\mu$ m. Data were statistically processed using a standard Origin 6.1 software, which is a part of the Microsoft Office software (USA) specially designed for processing of scientific research results. This software allows to make histograms, determine the mean and the standard deviation, and obtain an interval estimate, assess the significance of findings and the significance of differences. The significance of differences was assessed using single-factor analysis of variance (one-way ANOVA).

The obtained results were processed by methods of descriptive and non-parametric statistics using the Statistica 6.0 software package. The differences were considered significant when the level of statistical significance was  $P < 0.01$ .

## Results and Discussion

Our previous studies have shown that 85% of flat RBC (planocytes) and 15% of transformed RBC circulate in the RUCB of newborn infants. This study demonstrated that the newborns had red blood cells whose characteristic did not comply with the accepted classification, i.e. there are intermediate forms of red blood cells associated with the peculiarities of intrauterine poikilocytosis. Since a high RBC count (intrauterine physiological erythrocytosis) and a high hemoglobin level (including fetal hemoglobin) are typical for newborns, planocytes in full-term newborns are a transient form. No dependence of the clinical state of newborns on the shape of red blood cells was found in this group of infants [14, 15].

The morphological forms of red blood cells in the RUCB of newborns with a severe PH are presented in Fig. 1. Discocytes and planocytes comprised 36% of the total RBC count, i.e. intrauterine poikilocytosis, reduced number of normal forms of RBC, was found, thus demonstrating an adverse effect of intrauterine hypoxia on the membrane of

зованием пакета программ «Statistica 6.0». Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,01$ .

## Результаты и обсуждение

В наших предыдущих исследованиях показано, что в ОПК доношенных новорожденных циркулируют 85% эритроцитов плоской формы (паноциты) и 15% трансформированных эритроцитов. Проведенное исследование выявило наличие у новорожденных эритроцитов, которые по своим характеристикам не входят в общепринятую классификацию, т.е. определяются промежуточные формы эритроцитов, связанные с особенностями внутриутробного пойкилоцитоза. Учитывая, что для новорожденных характерно повышенное количество эритроцитов (внутриутробный физиологический эритроцитоз) и уровень гемоглобина, включающий фетальный гемоглобин, возможно, паноциты у доношенных новорожденных являются транзитной формой. В этой группе детей не выявлено зависимости клинического состояния новорожденных от формы эритроцитов [14, 15].

Морфологический состав эритроцитов в ОПК новорожденных, перенесших тяжелую ПГ представлен на рис. 1. Дислоциты и паноциты составляют 36% от общего количества эритроцитов, т.е. отмечается внутриутробный пойкилоцитоз, сниженное содержание нормальных форм эритроцитов, что свидетельствует о неблагоприятном воздействии внутриутробной гипоксии на мембрану эритроцитов. Стоматоцитоз и эхиноцитоз характерны для 80% новорожденных, родившихся с низкой оценкой по шкале Апгар. Так как при рождении новорожденные еще не получали никакого лечения, выявленный пойкилоцитоз являлся следствием ПГ, которая оказывала негативное влияние на мембрану эритроцитов, выраженность процесса зависела от длительности гипоксии.

Через 12 часов после рождения, на фоне проводимого лечения и ИВЛ, клеточный состав эритроцитов изменялся, увеличивался паноцитоз, снижался стоматоцитоз, т.е. под воздействием лечения и стабилизации кислородного статуса, морфологический состав эритроцитов стремился к нормализации (рис. 2).

К концу раннего неонатального периода (7-е сутки жизни) количество паноцитов оставалось стабильным, происходило дальнейшее уменьшение эхиноцитов, но у большинства новорожденных сохранялся стоматоцитоз, т.е. не происходило стабилизации мембран и нормализации морфологического состава эритроцитов (рис. 2). Стоматоцитоз сохранялся у доношенных новорожденных, перенесших ПГ, осложнившуюся неонатальной аспирацией меконием, сохраняющи-

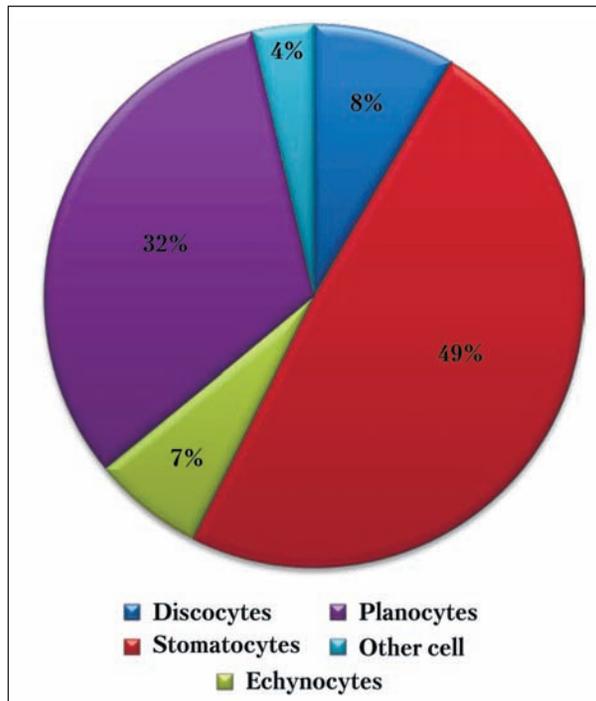


Рис. 1. Морфологические формы эритроцитов в остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших гипоксию.

Fig. 1. Morphological forms of red blood cells in the residual umbilical cord blood of newborns with hypoxia.

Примечание. Для рис. 1, 2: Discocytes — дискоциты; Stomatocytes — стоматоциты; Echinocytes — эхиноциты; Planocytes — паноциты; Other cell types — другие клетки.

RBC. Stomatocytosis and echinocytosis are typical for 80% of infants born with a low Apgar score. Since the newborns have not received any treatment yet, the detected poikilocytosis is a consequence of PH, which negatively affects the RBC membrane, and the severity of the process depends on the duration of hypoxia.

The cell composition of red blood cells changes 12 hours after birth due to the ongoing treatment and MV; planocytosis increases, stomatocytosis decreases, i.e. under the effect of the treatment and stabilization of the oxygen status, the morphological composition of red blood cells tends to normalization (Fig. 2).

By the end of the early neonatal period (Day 7 of life), the number of planocytes remained stable; further reduction in the echinocyte count takes place, but stomatocytosis persisted in most newborns, i.e. there was no membrane stabilization and normalization of red blood cell morphology (Fig. 2). Stomatocytosis persists in full-term newborns with PH complicated with neonatal meconium aspiration; the persistent changes in the red blood cell morphology demonstrate the severity of hypoxia (Fig. 3).

A study of heights and spatial periods of red blood cell membrane surfaces allow to obtain an individual quantitative estimation of the parameter for

## Critical States in Newborns

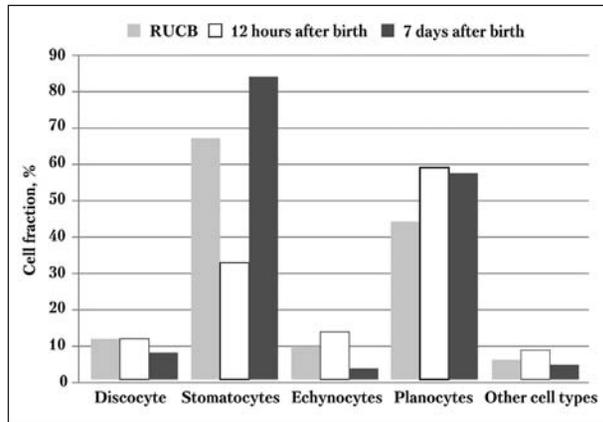


Рис. 2. Клеточный состав эритроцитов у новорожденных, перенесших гипоксию.

Fig. 2. Cellular composition of red blood cells in newborns with hypoxia.

Note. For Fig. 2, 4: RUCB — the residual umbilical cord blood.

Примечание. Cell fraction — клеточная фракция. Для рис. 2, 4: RUCB — остаточная пуповинная кровь; 12 hours after birth — 12 часов после рождения; days — суток.

еся изменения морфологии эритроцитов свидетельствовали о тяжести перенесенной гипоксии (рис. 3).

Изучение высот и пространственных периодов поверхности мембраны эритроцитов позволяет получить индивидуальную количественную оценку параметра для каждого новорожденного, перенесшего ПГ [17, 18]. При анализе наноструктуры мембраны эритроцитов здоровых новорожденных получены индивидуальные количественные характеристики высот и периодов порядков. Высота 1-го порядка ( $h_1$ ) составляла  $1,2 \pm 0,3$  нм, 2-го порядка ( $h_2$ ) —  $0,8 \pm 0,3$  нм, 3-го порядка ( $h_3$ ) —  $0,2 \pm 0,04$  нм, что принято в исследовании за исходные величины [14, 15].

Анализ наноструктуры мембран эритроцитов показал (рис. 4), что при рождении у новорожденных с ПГ наибольшим изменениям была подвержена высота первого порядка ( $h_1$ ), отражающего мембранный фликеринг. Уже при рождении ее величина достоверно превышала аналогичный показатель у здоровых новорожденных ( $p < 0,01$ ). Высота второго порядка ( $h_2$ ) у детей с ПГ достоверно превышала этот показатель у здоровых новорожденных в 2 и более раза ( $p < 0,01$ ), т.е. спектринный матрикс также изменялся под влиянием гипоксии. У 50% детей изменения спектринного матрикса сочетались с явлением фликеринга мембраны эритроцитов. Величина третьего порядка ( $h_3$ ) была достоверно выше у новорожденных, перенесших ПГ, по сравнению со здоровыми новорожденными ( $p < 0,01$ ), т.е. при рождении структурное состояние белков было не стабильным ( $p > 0,05$ ). Перинатальная гипоксия вызывала антенатальное полное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов.

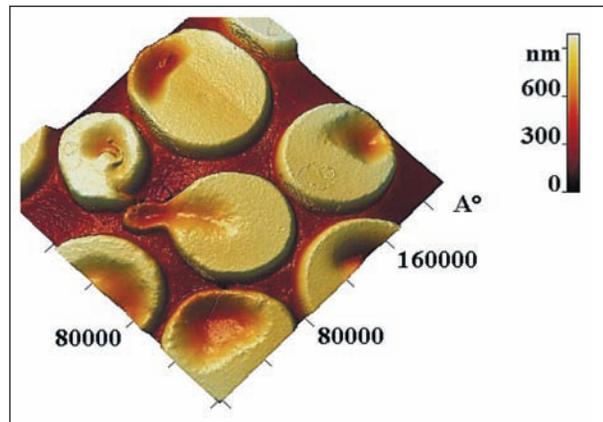


Рис. 3. Дакриоцит со стоматоцитами у новорожденного, перенесшего гипоксию. Изображение в поле АСМ, формат 3 D поле  $100 \times 100$  мкм.

Fig. 3. Dacyrocyte with stomatocytes in a newborn with hypoxia. An image in the field of AFM, 3 D format, field  $100 \times 100$   $\mu\text{m}$ .

each newborn with PH [17, 18]. The analysis of the RBC membrane nanostructure in healthy infants permitted to obtain individual quantitative characteristics of heights and order periods. The 1-order height ( $h_1$ ) was  $1.2 \pm 0.3$  nm, the 2-order height ( $h_2$ ) was  $0.8 \pm 0.3$  nm, the 3-order height ( $h_3$ ) was  $0.2 \pm 0.04$  nm, and these values were taken as a baseline value in the study [14, 15].

The analysis of the red blood cell nanostructure has shown (Fig. 4) that most changes occur in the first-order height ( $h_1$ ) at birth of newborns with PH, reflecting the membrane flickering: even at birth, its value significantly exceeded the same parameter of healthy infants ( $P < 0.01$ ). The second-order height ( $h_2$ ) in infants with PH was significantly higher ( $P < 0.01$ ) than that of healthy newborns by more than twofold, i.e. the spectrin matrix had also changed under the effect of hypoxia. In 50% of children, changes of the spectrin matrix were combined with flickering of RBC membranes. The third-order value ( $h_3$ ) was significantly higher in newborns with PH than that in healthy newborns ( $P < 0,01$ ), i.e. the structural state of proteins at birth was instable ( $P > 0.05$ ). Perinatal hypoxia causes an antenatal complete damage of the RBC membrane nanostructure.

The course of the early neonatal period was characterized by instability of RBC membranes, which became apparent in the form of persistent changes in the heights (membrane flickering); the spectrin matrix and the structural state of proteins were not stabilized.

Perinatal hypoxia triggers the identified changes in morphology and nanostructure of RBC membranes. Changes in the RBC morphology differ in newborn infants. For example, in infants with RDS, an unfavorable course of pregnancy complicated with intrauterine hypoxia affects the morphologi-

Течение раннего неонатального периода характеризовалось нестабильностью мембран эритроцитов, которое проявлялись сохраняющимися изменениями высот: мембранным фликкерингом, нестабильностью спектринного матрикса и структурного состояния белков.

Пусковым моментом выявленных изменений морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов являлась перинатальная гипоксия. Изменения морфологии эритроцитов у новорожденных детей отличались. Так, у детей с РДСН неблагоприятное течение беременности, осложненное внутриутробной гипоксией, влияло на морфологическую структуру эритроцитов, вызывало функциональные изменения наноструктуры мембран. Это проявлялось у недоношенных новорожденных выраженным пойкилоцитозом, наибольшим изменениям была подвержена величина  $h_1$ . Течение РДСН характеризовалось высокой интенсивностью этого процесса у каждого третьего ребенка вплоть до 7-х суток жизни. Спектринный матрикс мембран эритроцитов был изменен внутриутробно, но в дальнейшем величина  $h_2$  постепенно снизилась. Структурное состояние белков ( $h_3$ ) у недоношенных новорожденных с РДСН было стабильным [14].

У недоношенных новорожденных при неблагоприятно протекающей многоплодной беременности также происходило антенатальное повреждение наноструктуры мембран эритроцитов. Течение раннего периода адаптации характеризовалось сменой морфологических форм эритроцитов: планоцитоз сменялся стоматоцитозом, а также определялись другие формы, появление которых обусловлено процессами трансформации поверхности мембраны эритроцитов. Мембранный фликкеринг был наиболее выражен у второго ребенка из двойни, не зависимо от хориальности плаценты, второго и третьего ребенка из тройни, причем величина показателя увеличивалась от первого к третьему. Коллизия близнецов сопровождалась мембранным фликкерингом высокой интенсивности у обоих детей и высоким стоматоцитозом [15].

Уже внутриутробно происходило нарушение наноструктуры мембран на всех уровнях. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на все наноструктуры мембраны эритроцита: фосфолипидный бислой, белковые компоненты мембраны, спектринный матрикс. Изменение высот поверхности мембраны эритроцитов  $h_1$  и  $h_3$ , связанное с гипоксией, по-видимому, направлено на увеличение поверхности мембраны эритроцита, способствующее увеличению площади газообмена. Данные изменения, по-видимому, являются приспособительной реакцией, направленной на сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии. Гипо-

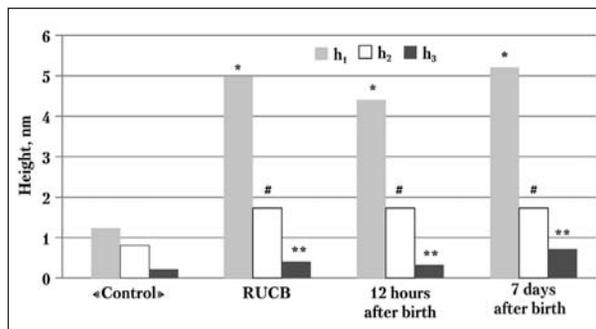


Рис. 4. Гистограммы высот  $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$  поверхности мембраны эритроцитов в различные периоды исследования.

Fig. 4 Histograms of heights  $h_1$ ,  $h_2$ ,  $h_3$  of red blood cell membranes during various periods of the study.

Note. \*, #, \*\* –  $P < 0.01$  vs. «Control» – RUCB group 2.

Примечание. «Control» – остаточная пуповинная кровь группы 2. Height, nm – высота, нм. \*, #, \*\* –  $p < 0,01$ , достоверность отличий, по сравнению с контролем (остаточная пуповинная кровь группы 2).

cal structure of RBC, causes functional changes in the membrane nanostructure which manifest themselves as severe poikilocytosis in premature newborns. The  $h_1$  value underwent the greatest changes; the course of RDS was characterized by a high intensity of this process in every third child up to Day 7 of life. The spectrin matrix of RBC membranes changed in utero, but then the  $h_2$  value decreased gradually. The structural state of proteins ( $h_3$ ) in premature newborns with RDS was stable [14]. Antenatal impairment of RBC membrane nanostructure occurs in premature newborns during a multiple pregnancy with an adverse course. The course of the early adaptation period is characterized by changes of RBC morphological forms: planocytosis is replaced by stomatocytosis and other forms resulting from an active process on the RBC membrane. The membrane flickering is most pronounced in the second twin irrespective of the placental chorionicity and in the second and third triplets; at that, the value is increased from the first to the third one. Twins collision is accompanied by a high intensity membrane flickering in both children and high stomatocytosis [15].

Impairment of membrane nanostructure at all levels occur already in utero. These changes confirmed the effect of the hypoxia degree on all nanostructures of RBC membranes: phospholipid bilayer, protein elements of the membrane, spectrin matrix. Changes in heights and spatial periods of the RBC membrane surfaces  $h_1$  and  $h_3$  associated with hypoxia apparently are aimed at a compensatory increase in the RBC membrane surface contributing to the increase of the gas exchange area. These changes may represent an adaptive response to hypoxia aimed to preserve the functional ability of a RBC. Hypoxia negatively affects the membrane of RBC, and the severity of the process depends on the severity and duration of hypoxemia. The course of and early adap-

ксия оказывала негативное влияние на мембрану эритроцитов. Выраженность процесса зависела от тяжести и длительности гипоксемии. Течение раннего периода адаптации (постгипоксический период) характеризовалось нестабильностью всех исследованных элементов наноструктуры мембраны эритроцитов, большой вариабельностью морфологических форм. Последствие перинатального воздействия гипоксии на мембрану эритроцитов сохранялось в течение определенного времени и выходило за рамки раннего неонатального периода.

Новорожденные очень чувствительны к гипоксии и оксидативному стрессу, которые оказывают негативное влияние на пациентов в критическом состоянии, вызывая повреждение органов и систем [11]. Для более глубокого понимания патогенеза перинатальной гипоксии и прогнозирования течения постгипоксического периода особое внимание уделяется изучению мембран эритроцитов [10, 12]. У новорожденных с полиорганной недостаточностью снижено количество дискоцитов, увеличено количество эритроцитов с измененной формой. У новорожденных с полиорганной недостаточностью (ПОН) наиболее часто встречающимися аномалиями формы эритроцитов являются эхиноциты, овалциты, сфероциты, шистоциты. Появление в периферической крови эритроцитов с измененной формой может быть обусловлено различными факторами, в том числе воздействием на эритроцитарную мембрану оксидативного стресса [19]. Для новорожденных от матерей с тяжелыми формами гестоза, характерна тенденция к низким показателям текучести эритроцитарных мембран, отсутствие адаптивной динамики биофизического состояния мембран в раннем неонатальном периоде, что сочетается с более тяжелым клиническим течением данного периода [20].

### Заключение

При воздействии ПГ нарушение наноструктуры мембран происходит уже внутриутробно. Уровень повреждения зависит от тяжести и длительности гипоксии. Выявленные изменения свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на все наноструктуры мембраны эритроцита: фосфолипидный бислой, белковые компоненты мембраны, спектринный матрикс. Изменение высот и пространственных периодов поверхностей мембран эритроцитов  $h_1$  и  $h_3$ , связанных с гипоксией, по-видимому, направлено на компенсаторное увеличение поверхности мембраны эритроцита, способствующее увеличению площади газообмена. Данные изменения, вероятно, являются приспособительной реакцией в ответ на гипоксию, направленной на сохранение функциональной способности эритроцита.

период (post-hypoxic period) is characterized by the instability of all nanostructures of RBC membranes and a greater variability of morphological forms. Effects of perinatal hypoxia on red blood cell membrane persist for some time and go beyond the early neonatal period.

Newborns are very sensitive to hypoxia and oxidative stress, which have a negative impact on critical illness patients, causing damage of organs and systems [11]. Special attention is paid to studies of RBC membranes for a better understanding of the pathogenesis of the perinatal hypoxia and prognosis during the course of the post-hypoxic period [10, 12]. In infants with a multiple organ failure (MOF), the number of discocytes reduced and the number of RBC with modified shapes increased. In infants with MOF, the echinocytes, ovalocytes, spherocytes, and schistocytes are the most common forms of RBC shape abnormalities. The presence of RBC with modified shapes in the peripheral blood may be explained by different factors, including the effect of the oxidative stress on the RBC membrane [19]. A tendency to lowering the fluidity of RBC membrane, lacking the adaptive dynamics of the biophysical patterns of membranes in early neonatal period is typical for infants born from mothers who experienced severe forms of pre-eclampsia and eclampsia; this feature is associated with a more severe clinical course of this form of pathology of pregnancy [20].

### Conclusion

Therefore, hypoxia results in impairment of the membrane nanostructure. The degree of the alterations depends on the severity and duration of hypoxia. These changes confirmed the effect of the hypoxia degree on all nanostructures of RBC membranes: phospholipid bilayer, protein elements of the membrane, spectrin matrix. Changes in heights and spatial periods of the red blood cell membrane surfaces  $h_1$  and  $h_3$  associated with hypoxia apparently is aimed at a compensatory increase in the RBC membrane surface contributing to the increase of the gas exchange area. These changes may represent an adaptive response to hypoxia aimed to preserve the functional ability of an RBC.

The course of early adaptation period (post-hypoxic period) is characterized by the instability of all nanostructures of RBC membranes and a greater variability of morphological forms. Effects of perinatal hypoxia on RBC membrane persist for some time and go beyond the early neonatal period that should be considered in clinics.

Течение раннего периода адаптации (постгипоксический период) характеризуется нестабильностью всех наноструктур мембран эритроцитов,

большой вариабельностью морфологических форм. Последствия перинатального воздействия гипоксии на мембрану эритроцитов сохраняются

в течение определенного времени, и выходят за рамки раннего неонатального периода, что необходимо учитывать в практической работе.

#### Литература

1. Muraoka M., Takagi K., Morita Y., Nagano H., Henmi N., Hasegawa H. Is the neonatal creatine phosphokinase level a reliable marker for fetal hypoxia? *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017; 43 (1): 114–121. <http://dx.doi.org/10.1111/jog.13176>. PMID: 27862683
2. El Bana S.M., Maher S.E., Gaber A.F., Aly S.S. Serum and urinary malondialdehyde (MDA), uric acid, and protein as markers of perinatal asphyxia. *Electron. Physician.* 2016; 8 (7): 2614–2619. <http://dx.doi.org/10.19082/2614>. PMID: 27648187
3. Перепелица С.А., Голубев А.М., Мороз В.В., Алексеева С.В. Причины острой интранатальной и постнатальной гипоксии у новорожденных. *Общая реаниматология.* 2012; (8) 6: 17–22. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-6-17>
4. Steiner L.A., Gallagher P.G. Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin. Perinatol.* 2007; 31 (4): 254–261. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2007.05.003>. PMID: 17825683
5. Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 44 (1): 63–74. <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1253>. PMID: 20134094
6. Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мяжкова Е.А., Черныш А.М. Измерение упруго-эластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (3): 39–44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-39-44>
7. Карташова Н.М., Кидалов В.Н., Наумова Э.М., Цогоев А.С. К вопросу о физиологической значимости изменения формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови при их трансформации в стоматоциты. *Вестн. новых мед. технологий.* 2005; 12 (1): 8–11.
8. Кидалов В.Н., Сясин Н.И., Хадартцев А.А. К вопросу о физиологической значимости изменений формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови, трансформирующихся в эхиноциты. *Вестн. новых мед. технологий.* 2005; 12 (2): 6–9.
9. Мороз В.В., Голубев А.М., Афанасьев А.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Черныш А.М. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (1): 52–60. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-52>
10. Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Del Vecchio A., Buonocore G. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2012; 25 (Suppl 5): 104–108. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.715471>. PMID: 23025782
11. Boskabadi H., Zakerhamidi M., Sadeghian M.H., Avani A., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A. Nucleated red blood cells count as a prognostic biomarker in predicting the complications of asphyxia in neonates. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2016; 24: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1080/14767058.2016.1256988>. PMID: 27809621
12. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Алексеева С.В., Гудкова О.Е. Морфология эритроцитов при изоиммунизации новорожденных по резус-фактору и аво-системе. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (2): 25–34. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-2-25-34>
13. Софронов В.В., Тугаева Н.О., Анисимова Т.Е., Сигбатуллин Т.А., Мишагина Е.А., Зиятдинова Г.К., Анисимов А.В., Любин С.А. Изменения проницаемости мембран эритроцитов у новорожденных, перенесших внутриутробную гипоксию. *Казанский мед. журнал.* 2010; 91 (1): 62–64.
14. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В. Nano-структура 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>
15. 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): 12–18. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-18>
16. Володин Н.Н. (ред.). Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2008: 749.
17. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
19. Серебрякова Е.Н., Волосников Д.К., Симакова Н.В. Морфология эритроцитов и показатели перекисного окисления липидов в плазме у новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности. *Педиатрия.* 2012; 91 (1): 25–31.
20. Манчук В.Т., Шубина М.В., Даваа Я.Х., Терещенко С.Ю. Состояние эритроцитарных мембран у новорожденных от матерей с гестозами. *Рос. вестн. перинатол. и педиатрии.* 2014; 59 (5): 45–46.

Поступила 19.02.17

#### References

1. Muraoka M., Takagi K., Morita Y., Nagano H., Henmi N., Hasegawa H. Is the neonatal creatine phosphokinase level a reliable marker for fetal hypoxia? *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 2017; 43 (1): 114–121. <http://dx.doi.org/10.1111/jog.13176>. PMID: 27862683
2. El Bana S.M., Maher S.E., Gaber A.F., Aly S.S. Serum and urinary malondialdehyde (MDA), uric acid, and protein as markers of perinatal asphyxia. *Electron. Physician.* 2016; 8 (7): 2614–2619. <http://dx.doi.org/10.19082/2614>. PMID: 27648187
3. Perepelitsa S.A., Golubev A.M., Moroz V.V., Alekseyeva S.V. Causes of acute intranatal and postnatal hypoxia in neonatal infants. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2012; 8 (6): 17–22. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-6-17>. [In Russ., In Engl.]
4. Steiner L.A., Gallagher P.G. Erythrocyte disorders in the perinatal period. *Semin. Perinatol.* 2007; 31 (4): 254–261. <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2007.05.003>. PMID: 17825683
5. Oliveira S., Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2010; 44 (1): 63–74. <http://dx.doi.org/10.3233/CH-2010-1253>. PMID: 20134094
6. Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M. *In vitro* measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2015; 11 (3): 39–44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3-39-44>
7. Kartashova N.M., Kidalov V.N., Naumova E.M., Tsogoev A.S. On the question concerning the physiological significance of changes of the form, ultrastructure and fluorescence of erythrocytes of peripheral blood during their transformation into stomatocytes. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii.* 2005; 12 (1): 8–11. [In Russ.]
8. Kidalov V.N., Syasin N.I., Khadartsev A.A. On the question concerning the physiological significance of changes of the form, ultrastructure and fluorescence of erythrocytes of peripheral blood during their transformation into echinocytes. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii.* 2005; 12 (2): 6–9. [In Russ.]
9. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. The structure and function of a red blood cell in health and critical conditions. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2012; 8 (1): 52–60. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-1-52>. [In Russ., In Engl.]
10. Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G., Del Vecchio A., Buonocore G. Oxidative injury in neonatal erythrocytes. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2012; 25 (Suppl 5): 104–108. <http://dx.doi.org/10.3109/14767058.2012.715471>. PMID: 23025782
11. Boskabadi H., Zakerhamidi M., Sadeghian M.H., Avani A., Ghayour-Mobarhan M., Ferns G.A. Nucleated red blood cells count as a prognostic biomarker in predicting the complications of asphyxia in neonates. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2016; 24: 1–6. <http://dx.doi.org/10.1080/14767058.2016.1256988>. PMID: 27809621
12. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Alekseyeva S.V., Gudkova O.E. Erythrocyte morphology in neonatal rhesus factor and abo isoimmunization. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2015; 11 (2): 25–34. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-2-25-34>. [In Russ., In Engl.]
13. Sofronov V.V., Tugaeva N.O., Anisimova T.E., Sigbatullin T.A., Mishagina E.A., Ziyatdinova G.K., Anisimov A.V., Lyubin S.A. Changes in the permeability of erythrocyte membranes in neonates which underwent intrauterine hypoxia. *Kazansky Meditsinsky Zhurnal.* 2010; 91 (1): 62–64. [In Russ.]
14. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. Nanostructure of red blood cell membranes in premature neonates with respiratory distress syndrome. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2013; 9 (6): 11–23. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2013-6-11>. [In Russ., In Engl.]
15. Perepelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. The specific features of red blood cell membranes in premature neonates due to multiple pregnancy. *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatologiya.* 2014; 10 (1): 12–18. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1-12-18>. [In Russ., In Engl.]
16. Volodin N.N. (red.). Neonatology. National guide. Moscow: GEOTAR-Media; 2008: 749. [In Russ.]
17. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images. *Micron.* 2013; 44: 218–227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2012.06.012>. PMID: 22854216
18. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A. Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
19. Serebryakova E.N., Volosnikov D.K., Simakova N.V. Morphology of erythrocytes and indices of lipid peroxidation in plasma in newborns with multi-organ insufficiency syndrome. *Pediatrya.* 2012; 91 (1): 25–31. [In Russ.]
20. Manchuk V.T., Shubina M.V., Davaa Ya.Kh., Tereshchenko S.Yu. The state of erythrocyte membranes in newborn infants born to mothers with gestosis. *Rossiyskiy Vestnik Perinatologii i Peditrii.* 2014; 59 (5): 45–46. [In Russ.]

Received 19.02.17