

НАНОСТРУКТУРА МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ С РЕСПИРАТОРНЫМ ДИСТРЕСС-СИНДРОМОМ

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

¹ НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

² ФГАОУ ВПО Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград

³ ГБУЗ Родильный дом №1, Калининград

Цель — исследование методом атомно-силовой микроскопии наноструктуры эритроцитов недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом (РДСН). *Материал и методы.* В исследование включено 27 новорожденных, из них — 13 недоношенных новорожденных с РДСН, составивших группу исследования. Средний гестационный возраст составил $33,1 \pm 2,3$ нед., масса тела при рождении — $1800 \pm 299,3$ г. Группа сравнения — 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и срочными родами. Средний гестационный возраст детей составил $39,4 \pm 0,5$ недель, масса тела при рождении — $3131,7 \pm 588,8$ грамм, оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни — $8 \pm 0,4$ балла. Проводилось исследование эритроцитов в поле атомно-силового микроскопа (АСМ). Объектом исследования явились: остаточная пуповинная кровь (ОПК) недоношенных новорожденных, центральная венозная кровь через 7 часов после рождения и венозная кровь новорожденных 7-х суток жизни. *Результаты.* В остаточной пуповинной крови доношенных новорожденных планоциты являются основной морфологической формой эритроцитов. При благоприятном течении беременности и остро развившейся гипоксии плода морфологический состав эритроцитов недоношенных новорожденных с РДСН приближался к показателям доношенных детей. Планоциты являются основной морфологической формой эритроцитов и у недоношенных новорожденных, частота их встречаемости различная. Стоматоциты характерны для всех новорожденных группы «РДСН», частота встречаемости варьирует в значительных пределах: от 8 до 65% от общего количества эритроцитов. В исследовании выявлено, что для недоношенных детей с гестационным возрастом 31–36 недель характерны и аномальные формы эритроцитов, которые имеют высокую вариабельность. При рождении у недоношенных новорожденных выявляются изменения наноструктуры мембран эритроцитов, на что влияет внутриутробная гипоксия. В наибольшей степени меняется величина первого порядка, отражающая flickering мембраны эритроцитов. *Заключение.* С помощью атомно-силового микроскопии показано, что наибольшие изменения структуры мембран эритроцитов выявлены в остаточной пуповинной крови. Для недоношенных новорожденных с РДСН 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, отражающая явление flickering мембраны эритроцитов, нормализация этого показателя происходит медленно. *Ключевые слова:* мембрана эритроцита, наноструктура, планоциты, стоматоциты, недоношенные новорожденные, респираторный дистресс-синдром.

Предметом пристального изучения является морфофункциональное состояние эритроцитов, которые обеспечивают кислородно-транспортную функцию. Для этого используются различные современные методы: световая и просвечивающая электронная микроскопия, а также атомно-силовая микроскопия (АСМ), которая дает возможность исследовать структуру мембран эритроцитов при различных критических состояниях [1, 2].

Известно, что эритроциты имеют форму диска, однако ее могут иметь не только созревшие эритроциты, но и ретикулоциты [3, 4]. Внешняя клеточная мембрана этих клеток одинакова, но на электронограммах выявляется высокая оптическая плотность содержимого протоплазмы эритроцитов по сравнению с ретикулоцитами. В последних часто встречаются внутриклеточные органеллы. В эксперименте у новорожденных крысят выявлены изменения ультраструктуры эритроцитов при осмотических нагрузках: отмечено преобла-

дание клеток недискоидной конфигурации, обнаружены признаки некробиотического процесса [5].

Различные формы эритроцитов имеют свои морфологические отличия: у дискоцитов выявляется утолщение зоны наружного слоя липидного бислоя клеточной оболочки, в планоцитах происходит кольцевидное перераспределение гранул гемоглобина, связанное с изменением белков цитоскелета. Спектрофотометрическое исследование показало, что аутофлуоресценция эритроцитов находится в диапазоне 480–490 нм, интенсивность свечения тороидальной области в ультрафиолетовых лучах может отличаться в 1,5–3 раза. Ультраструктура дискоцитов характеризуется равномерной клеточной мембраной, равномерным внутриклеточным распределением гемоглобина, отсутствием складок. Ультраструктура стоматоцитов гетерогенная, с формированием дубликатуры клеточной мембраны. Внутри клеток выявляются цепочечные образования цитоскелетных белков с неравномерной концентрацией вокруг них гранул гемоглобина. Для стоматоцитов характерно большее число локальных повреждений клеточной мембраны [6].

Особое внимание в исследованиях отводится недоношенным новорожденным. Считается, что морфологическая незрелость оказывает влияние на клетки

Адрес для корреспонденции:

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

крови. Однако показано, что система крови недоношенного ребенка с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) в целом готова к внеутробному функционированию. Индивидуальные качественные и количественные изменения эритроцитов зависят в основном от причины, вызвавшей наступление преждевременных родов [7–9].

Пуповинная кровь является ценным источником информации о процессах, протекающих в организме плода в период родов [10–13].

Цель исследования — выявление методом атомно-силовой микроскопии характера изменений мембран наноструктуры эритроцитов недоношенных новорожденных с респираторным дистресс-синдромом.

Материал и методы

В исследование было включено 27 новорожденных, из них — 13 недоношенных новорожденных с РДСН. Антропометрическая характеристика детей, данные о характере околоплодных вод, длительности ИВЛ представлены в таблице 1. Средний гестационный возраст составил $34,1 \pm 1,7$ нед., масса тела при рождении — $2065,4 \pm 304,8$ г. При рождении состояние детей было тяжелым. В проведении искусственной вентиляции легких (ИВЛ) нуждались все недоношенные новорожденные, т.к. ведущим клиническим признаком была тяжелая дыхательная недостаточность, обусловленная течением РДСН. Всем новорожденным на 3–5 минутах жизни эндотрахеально вводили сурфактант — курсурф. Средняя доза препарата — 153 ± 24 мг/кг. Продолжительность ИВЛ составила $68 \pm 15,6$ час.

Во всех случаях беременность протекала неблагоприятно, с угрозой прерывания. Вторая половина беременности осложнилась тяжелой формой гестоза, резистентного к проводимой терапии, что явилось причиной досрочного родоразрешения. У большинства беременных проводили экстренное кесарево сечение по Гусакову.

Исследовали эритроциты пуповинной крови 14 доношенных новорожденных с благоприятным течением беременности и срочными родами. Средний гестационный возраст детей составил $39,4 \pm 0,5$ недель, масса тела при рождении — $3131,7 \pm 588,8$ грамм, оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни — $8 \pm 0,4$ балла. 78,5% новорожденных родились через естественные родовые пути, 21,4% — путем экстренного кесарева сечения. При рождении у детей признаков острой гипоксии не было, ранний период адаптации протекал физиологически, ИВЛ им не проводили.

Использовали следующие методы:

1. Атомно-силовая микроскопия (АСМ). Объектом исследования явились: эритроциты пуповинной крови (ПК) недоношенных новорожденных, эритроциты центральной венозной крови через 7 часов после рождения и

эритроциты венозной крови новорожденных 7-х суток жизни. ПК забирались 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 дальнейшего исследования в поле атомно-силового микроскопа: 20 мкл крови наносили на предметное стекло и готовили монослой эритроцитов с помощью центрифуги Diff Spin 2 (США). Изображение эритроцитов получали с помощью атомного силового микроскопа «NTEGRA prima» (Россия) в полу-контактном режиме. В качестве зондов использовали кантилеверы NSG01-A. Число точек сканирования — 512 и 1024, поля сканирования — 100×100 мкм, 10×10 мкм. Процентное содержание различных форм эритроцитов определяли на АСМ при подсчете 300-х клеток.

Анализ наноструктур мембран эритроцитов проводили с помощью пространственного преобразования Фурье с разложением наноповерхности мембран эритроцитов на три порядка: 1 порядок — спектральное окно 1000–600 нм, 2 порядок — спектральное окно 80–300 нм, 3 порядок — спектральное окно 20–60 нм. Первый порядок коррелирует с явлением flickering (flickering — феномен хаотических низкочастотных колебаний клеточной мембраны эритроцита) [14] мембраны и отражает его макроструктурные свойства. Второй и третий порядки связаны с конфигурацией спектрального матрикса и состояниями протеиновых узлов соединения. Параметр h измеряли на плоской части различных видов клеток. Подробная методика анализа наноструктуры изложена в ранее опубликованных работах [15–18].

2. Во время проведения ИВЛ исследовали газовый состав капиллярной крови на анализаторе GemPremier 3000 (USA).

3. Статистическую обработку данных проводили с помощью стандартной программы Origin 6.1, которая входит в состав Microsoft Office (USA). Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA). Отличия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$. С помощью пакета прикладных программ «Statistica 6» проводился корреляционный анализ с расчетом коэффициента корреляции (r) и его достоверности.

Результаты и обсуждение

1. Морфология эритроцитов и клиническое состояние новорожденных. Форма эритроцитов является важным информативным показателем, отражающим метаболические процессы, протекающие в организме и влияющие на состояние мембраны эритроцитов. Известно, что в крови здорового человека в основном циркулируют двояковогнутые клетки с ровной поверхностью — дискоциты (рис. 1, а).

Таблица 1

Общая характеристика новорожденных с РДСН

Показатели	Значение показателей ($M \pm \sigma$), $n=13$
Гестационный возраст, недель	$33,1 \pm 2,3$
Масса тела, грамм	$1800 \pm 299,3$
Оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни, балл	$4,9 \pm 0,8$
Пол ребенка:	
мужской	7 (53,9%)
женский	6 (46,1%)
Характер околоплодных вод: светлые	61,5%
Окрашены кровью	30,8%
С примесью мекония	7,6%
Длительность ИВЛ, часов	$68 \pm 15,6$

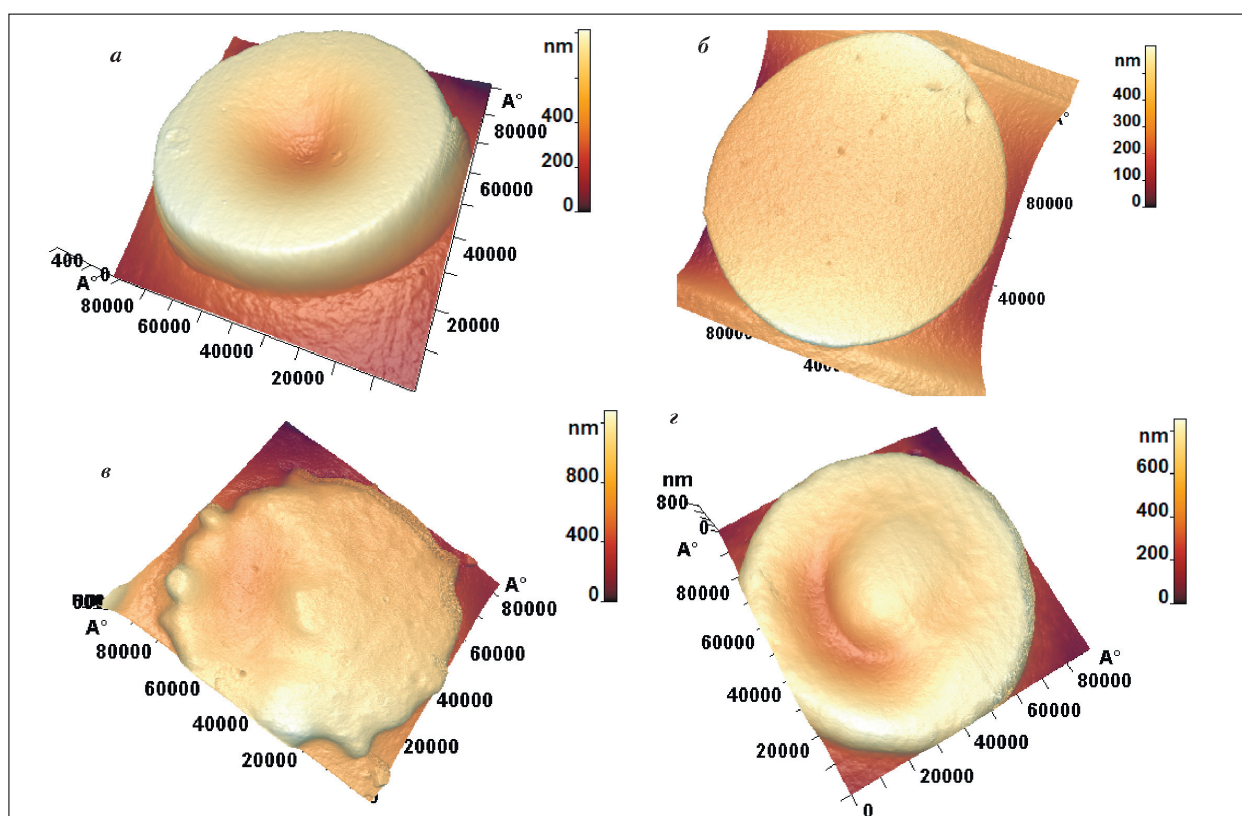


Рис. 1. Формы эритроцитов.

а — дискоцит; б — планоцит; в — эхиноцит; з — стоматоцит.

Таблица 2

Морфологические формы эритроцитов недоношенных новорожденных с «РДСН» в ОПК

Формы эритроцитов	% содержания ($M \pm \sigma$), $n=13$
Дискоциты	$28 \pm 16,5$
Планоциты	$44 \pm 16,5$
Стоматоциты	$26 \pm 12,8$
Эхиноциты	$20 \pm 8,3$
Другие	$19 \pm 8,3$

Примечание. ОПК — остаточная пуповинная кровь.

При исследовании выявлено, что в ПК доношенных новорожденных циркулируют 85% эритроцитов плоской формы — планоциты (рис. 1, б) и 15% трансформированных эритроцитов, их них: 3% клеток представлены эхиноцитами (рис. 1, в), 3% — стоматоцитами (рис. 1, з), 9% — другими аномальными клетками. Выявлены эритроциты, которые по своим характеристикам не входят в общепринятую классификацию.

Учитывая, что для новорожденных характерно повышенное количество эритроцитов (внутриутробный физиологический эритроцитоз) и уровень гемоглобина, включающий фетальный гемоглобин, возможно, планоциты у доношенных новорожденных являются транзиторной формой. В этой группе детей не выявлено зависимости клинического состояния новорожденных от формы эритроцитов.

Морфологический состав эритроцитов недоношенных новорожденных представлен в таблице 2. В пуповинной крови у детей с РДСН дискоциты и планоциты составили 72% от общего количества эритроцитов.

Дискоциты определяли у 5 (38,5%) новорожденных, в 4 случаях течение беременности осложнилось острым нарушением маточно-плацентарного кровотока (отслойка плаценты), тяжелой формой гестоза второй половины беременности, угрозой антенатальной гибели плода. Дискоциты не определяли у детей от многоплодной беременности.

Планоциты являются основной морфологической формой эритроцитов и у недоношенных новорожденных, частота их встречаемости различна: от единичных в поле зрения до 90% от общего количества эритроцитов. При благоприятном течении беременности морфологический состав эритроцитов приближался к показателям доношенных детей.

Стоматоциты характерны для всех новорожденных группы РДСН, их количество варьировало от 8 до 65% от общего количества эритроцитов. Для недоношенных детей с гестационным возрастом 31–36 недель характерны аномальные формы эритроцитов (рис. 2).

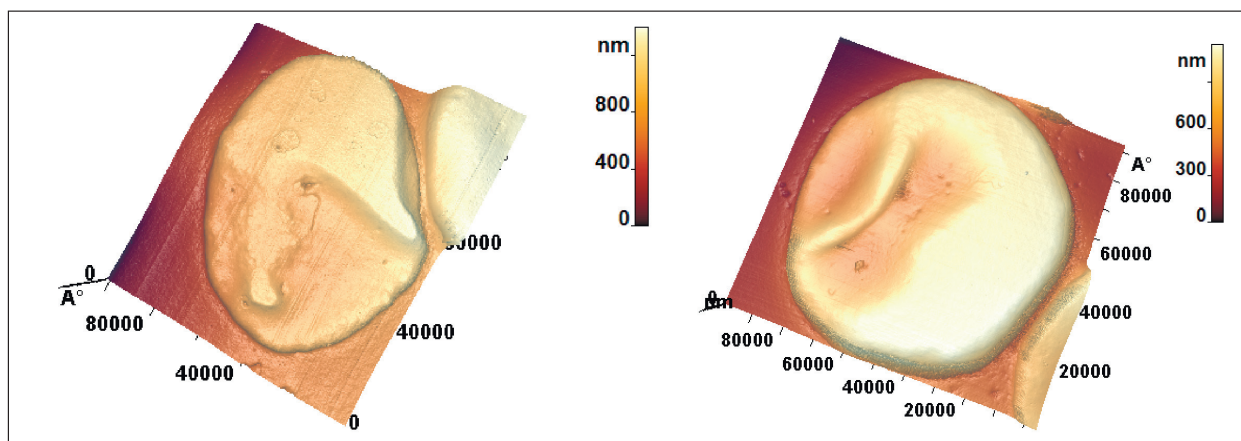


Fig. 2. Аномальные формы эритроцитов.

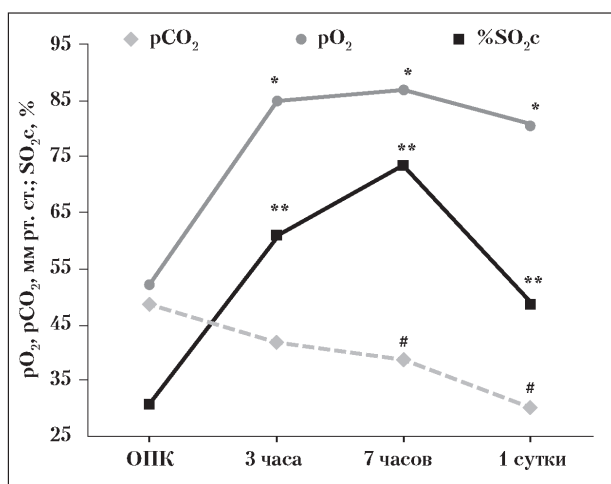


Рис. 3. Динамика показателей газового состава крови недоношенных новорожденных группы РДСН.

*, **, # — ($p < 0,05$) достоверность отличий по сравнению с данными в остаточной пуповинной крови.

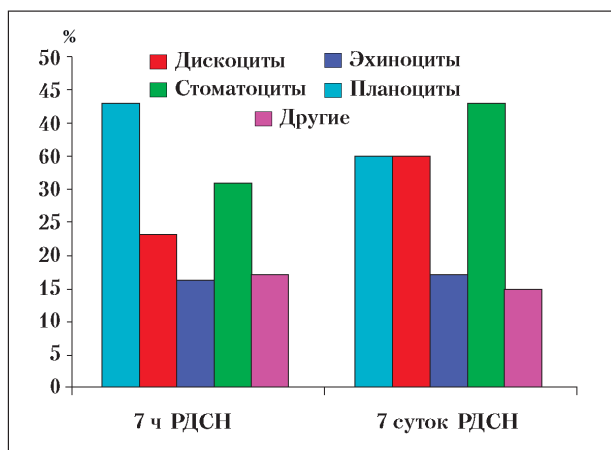


Рис. 4. Морфологические формы эритроцитов в различные периоды исследования.

Динамика исследуемых показателей кислородного статуса, а также состояние метаболизма новорожденного представлена на рис. 3. При рождении в ПК медиана рН составила 7,27 (7,14–7,39), чему соответствовали показате-

тели газообмена: напряжение кислорода (pO_2) — $31,3 \pm 7,3$ мм рт. ст., насыщение гемоглобина кислородом (SO_2c) — $52,8 \pm 22,1\%$. Полученные данные свидетельствуют о перенесенной антенатальной гипоксии плода. Через 3 часа после рождения в результате проведения ИВЛ отмечена нормализация кислородного статуса: достоверно увеличились pO_2 и SO_2c , величина рН крови к 3 часам жизни достоверно увеличилась ($p < 0,05$) и находилась в пределах физиологических значений в течение всего времени исследования. В течение первых часов проведения ИВЛ нормализовалась оксигенация крови.

При проведении корреляционного анализа у новорожденных группы РДСН выявлены корреляционные связи морфологических форм эритроцитов ОПК с показателями метаболизма, характером околоплодных вод и оценкой по шкале Апгар.

Так, количество планоцитов коррелировало со значениями рН крови ($r=0,8$; $p=0,02$), характером околоплодных вод ($r=-0,6$; $p=0,04$), значениями оценки по шкале Апгар на первой минуте жизни ($r=-0,6$; $p=0,02$). Количество стоматоцитов прямо коррелировало со значениями оценки по шкале Апгар на первой минуте жизни ($r=0,5$; $p=0,05$), в то время как количество других аномальных клеток коррелировало с характером родов ($r=0,7$; $p=0,03$).

Кроме того, выявлены сильные корреляционные связи длительности периодов родов и безводного промежутка с морфологическим составом эритроцитов ПК.

У новорожденных с РДСН через 7 часов после рождения почти половина эритроцитов представлена планоцитами, 30% — стоматоцитами, 20% — дискоцитами. К 7-м суткам жизни основную часть клеток составили планоциты и дискоциты, увеличился стоматоцитоз (рис. 4). При этом произошла нормализация газообмена, восстановилось самостоятельное дыхание, и дети были экстубированы.

2. Анализ наноструктуры мембраны эритроцитов. Высота и период порядков позволили получить индивидуальную количественную оценку параметра для каждого ребенка. При рождении у недоношенных новорожденных с РДСН выявили изменения наноструктуры мембраны эритроцитов: наибольшие изменения ха-

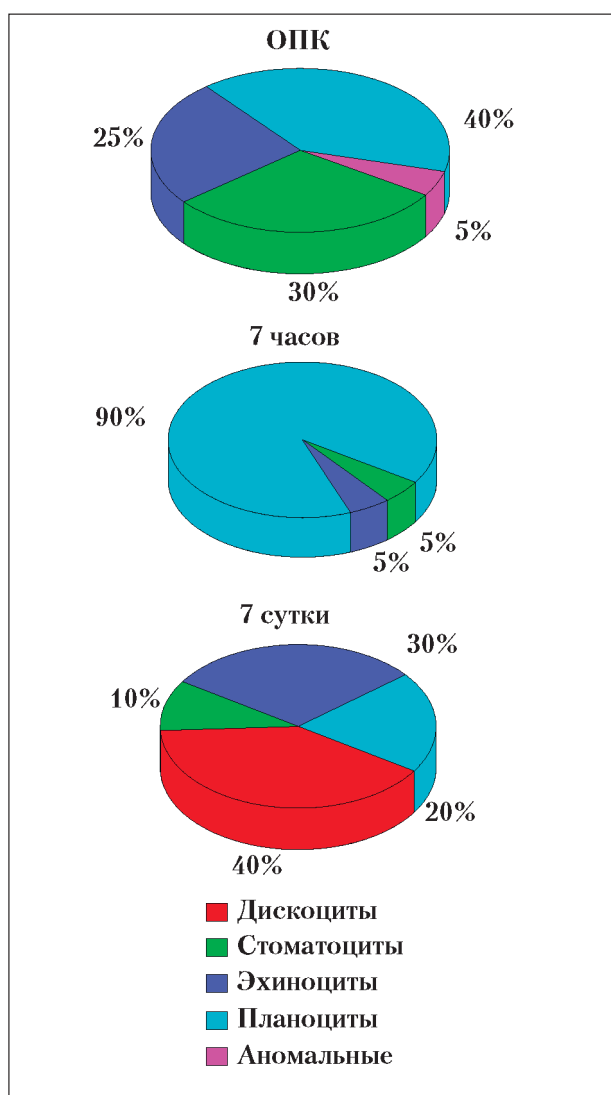


Рис. 5. Морфологический состав эритроцитов новорожденного М. в различные периоды исследования. Здесь и на рис. 6–8: ОПК — остаточная пуповинная кровь.

рактены для величины первого порядка (h_1), отражающей мембранный flickering, она достоверно превышала показатель доношенных детей ($p < 0,05$). У 6 недоношенных новорожденных величина этого порядка превышала показатель доношенных детей в 3,8–10 раз, в 4-х случаях величина первого порядка была повышена в 1,5–3,2 раза, только у 3-х детей этот показатель не отличался от доношенных новорожденных.

Высота второго порядка (h_2) у половины недоношенных детей превышала показатель контрольной группы в 1,5–2,5 раза, спектринный матрикс изменялся у новорожденных из двойни, от матерей с тяжелой формой гестоза, предлежанием плаценты. У 5 детей изменения спектринного матрикса сочетались с явлением flickering мембраны эритроцитов. Величина третьего порядка достоверно не отличалась между группами.

Через 7 часов после рождения у трех новорожденных с РДСН отмечали рост величины первого порядка, т.е. сохранялся flickering мембраны эритроцитов, второй порядок увеличился только у одного ребенка, у ос-

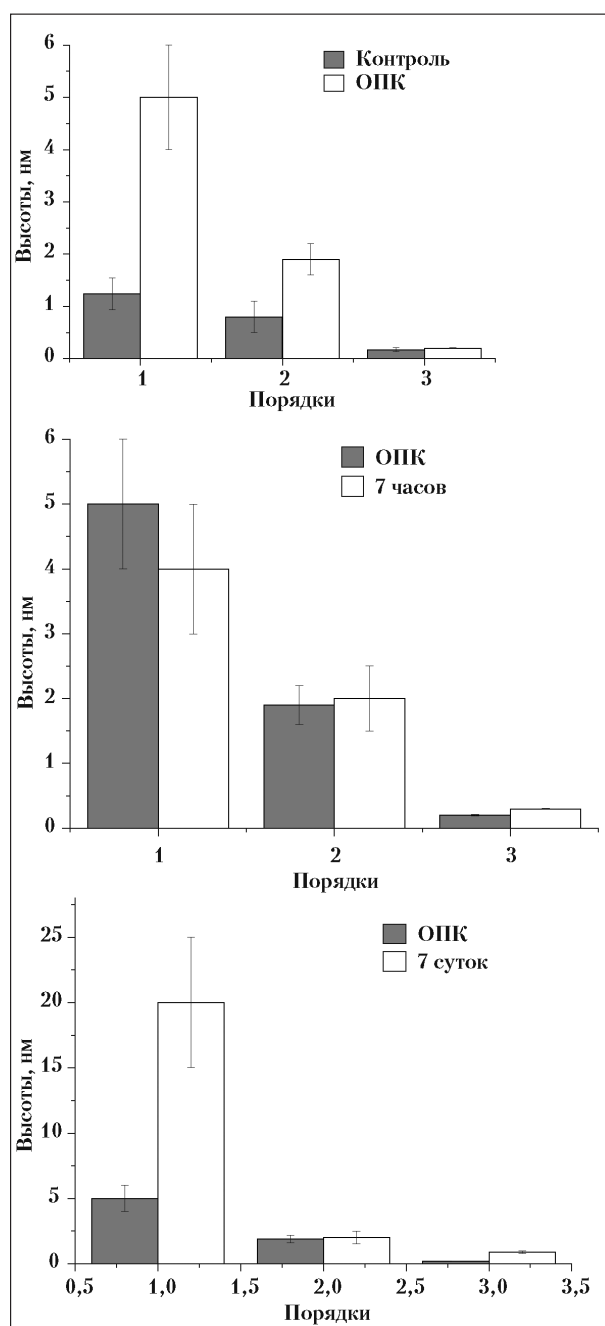


Рис. 6. Гистограммы параметров h_1 , h_2 , h_3 мембран эритроцитов новорожденного М. в различные периоды исследования.

тальных детей произошло снижение исследуемого показателя. К 7-м суткам жизни величина первого порядка возросла у 4 недоношенных новорожденных.

Корреляционный анализ показал, что через 7 часов после рождения существуют множественные корреляционные связи между количеством стоматоцитов и (а) уровнем pCO_2 крови ($r=0,6$, $p=0,049$); (б) концентрацией бикарбоната крови (HCO_3), ($r=0,6$; $p=0,03$); (в) общим содержанием углекислоты в крови (TCO_2), ($r=0,6$; $p=0,03$); (д) избытком оснований в крови (BEb), ($r=0,5$; $p=0,048$); (е) насыщением гемоглобина кислородом в крови ($r=-0,6$; $p=0,02$). Прямые корреляционные взаимоотношения установлены между значениями pH кро-

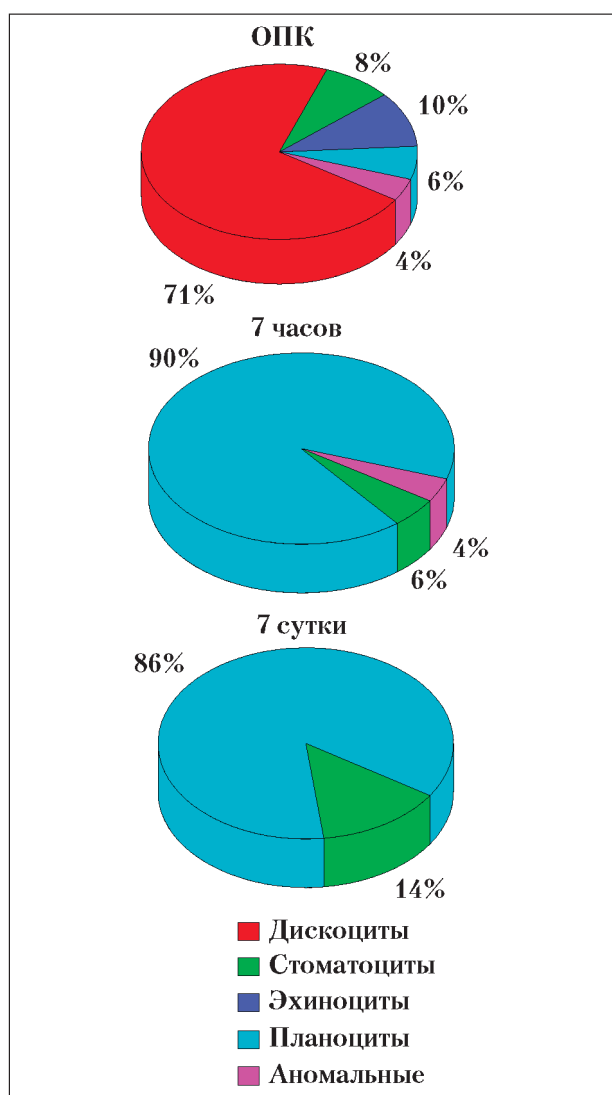


Рис. 7. Морфологический состав эритроцитов новорожденной С. в различные периоды исследования.

ви и наличием других аномальных клеток ($r=0,8$; $p=0,002$), а также между значениями pO_2 и высотой 2-го порядка ($r=0,6$; $p=0,04$). Морфологические формы эритроцитов и гистограммы параметров высот (h) представлены на рис. 5–8.

Таким образом, выявлены корреляционные связи между показателями метаболизма, кислородного статуса крови, морфологическими формами эритроцитов и конфигурацией спектринного матрикса.

Заключение

Методом атомно-силовой микроскопии выявлены изменения структуры мембран эритроцитов пуповинной крови. Для недоношенных новорожденных с РДСН характерен внутриутробный пойкилоцитоз, обусловленный воздействием неблагоприятных факторов, что

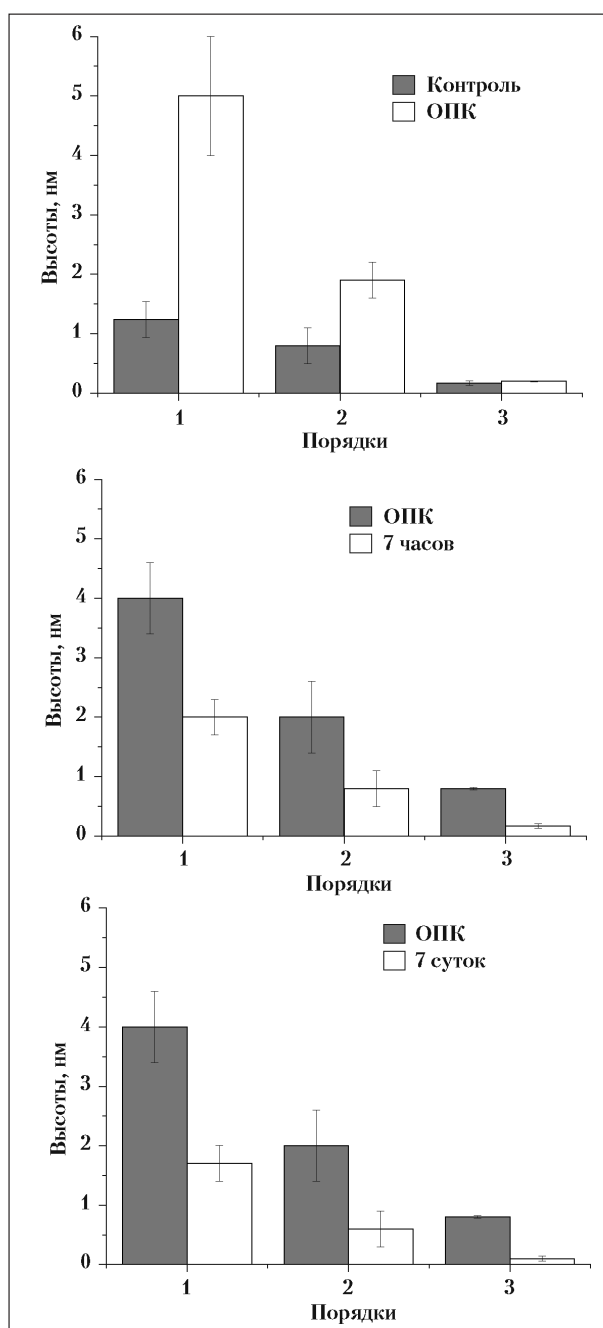


Рис. 8. Гистограммы параметров h_1 , h_2 , h_3 мембран эритроцитов новорожденной С. в различные периоды исследования.

подтверждается множественными корреляционными связями.

При анализе наноструктуры мембран эритроцитов отмечено, что наиболее чувствительно отражает явление flickering мембраны эритроцитов и свидетельствует о внутриутробном нарушении микроstructures мембран величина первого порядка. При рождении выявляются также изменения спектринного матрикса мембран эритроцитов, но его стабилизация происходит достаточно быстро. Структурное состояние белков при этом не изменяется.

Литература

1. Гуцина Ю.Ю., Плескова С.Н., Звонкова М.Б. Исследование различий морфологических параметров клеток крови человека методом сканирующей зондовой микроскопии. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. 2005; 1: 48–53.
2. Мороз В.В., Козлова Е.К., Черныш А.М., Гудкова О.Е., Бушуева А.В. Изменения структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (6): 5–10.
3. Льюис С.М., Вэйн Б., Бэйтс И. Практическая и лабораторная гематология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2009: 672.
4. Шиффман Д.Ф. Патология физиологии крови. М.-СПб.: Бином-Невский Диалект; 2000: 448.
5. Карташова Н.М., Кидалов В.И., Наумова Э.М., Хадарцев А.А. Изменения конфигурации ультраструктуры эритроцитов в экстремальных для клеток условиях. *Вестн. новых мед. технологий*. 2005; 11 (1): 5–8.
6. Карташова Н.М., Кидалов В.И., Наумова Э.М., Хадарцев А.А., Цоголев А.С. К вопросу о физиологической значимости изменения формы, ультраструктуры и флуоресценции эритроцитов периферической крови при их трансформации в стоматоциты. *Вестн. новых мед. технологий*. 2005; 11 (1): 8–11.
7. 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.
8. Ковтун О.П., Шеринев В.Н. Динамические исследования показателей периферической крови у глубоко недоношенных детей в неонатальном периоде. Мат.-лы конф. *Бюл. Сибирского отделения РАМН*. Новосибирск; 2008: 15–17.
9. Стоцкая Г.Е., Литвинова А.М., Пестряева Л.А. Особенности гемопоэза в раннем неонатальном периоде у детей с экстремально низкой массой тела. *Педиатрия*. 2010; 89 (1): 37–40.
10. Перепелица С.А., Голубев А.М., Мороз В.В., Алексеева С.В., Буева Ж.В., Редина Н.В., Шудьга Р.А., Салазкина Т.А., Леонтьев Н.В. Провоспалительные и противовоспалительные цитокины у недоношенных новорожденных с ОРДС. *Общая реаниматология*. 2009; 5 (6): 21–30.
11. Lim F.T., Scherjon S.A., Beckhoven J.M., Brand A., Kanhai H.H., Hermans J.M., Falkenburg J.H. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 183 (5): 1144–1152. PMID: 11084556
12. Зимина Н.Н., Румянцев С.А., Майорова О.А., Яковлева М.В., Курцер М.А. Особенности клеточного состава пуповинной крови доношенных новорожденных при различных вариантах острой и хронической гипоксии плода. *Вопросы практ. педиатрии*. 2010; 5 (3): 16–20.
13. McCarthy J.M., Capullari T., Thomson Z., Zhu Y., Spellacy W.N. Umbilical cord nucleated red blood cell counts: normal values and the effect of labor. *J. Perinatol.* 2006; 26 (2): 89–92. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jp.7211437>. PMID: 16407961
14. Кононенко В.Л. Фликкер эритроцитов. 2. Результаты экспериментальных исследований. *Биол. мембраны*. 2009; 26 (5): 451–467.
15. Черныш А.М., Козлова Е.К., Мороз В.В., Борщевская П.Ю., Ближнюк У.А., Рысаева Р.М. Поверхность мембран эритроцитов при калиброванной электропорации: исследование методом атомной силовой микроскопии. *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2009; 148 (9): 347–352.
16. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С. Нарушения наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология*. 2011; 7 (2): 5–9.
17. Мороз В.В., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С., Александрин В.В., Назарова Г.А. Мембранопротекторное действие перфторана на эритроциты при острой кровопотере (экспериментальное исследование). *Общая реаниматология*. 2011; 7 (1): 5–10.
18. Мороз В.В., Голубев А.М., Черныш А.М., Козлова Е.К., Васильев В.Ю., Гудкова О.Е., Сергунова В.А., Федорова М.С. Изменения структуры поверхности мембран эритроцитов при длительном хранении донорской крови. *Общая реаниматология*. 2012; 8 (1): 5–12.

Поступила 27.07.13

Nanostructure of Red Blood Cell Membranes in Premature Neonates with Respiratory Distress Syndrome

S. A. Perepelitsa^{1,2}, S. V. Alekseeva³, V. A. Sergunova¹, O. E. Gudkova¹¹ V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow² Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad³ Kaliningrad Regional Maternity Hospital One, Kaliningrad

Objective: to study the nanostructure of red blood cell membranes in premature babies with neonatal respiratory distress syndrome (NRDS), by applying atomic force microscopy. **Subjects and methods.** The investigation included 27 newborn infants, of them 13 premature babies with NRDS formed a study group. The mean gestational age was 33.1 ± 2.3 weeks; their birth weight was 1800 ± 299.3 g. A comparison group consisted of 14 full-term babies with favorable pregnancy and term labor. The mean gestational age of the babies was 39.4 ± 0.5 weeks; their birth weight was 3131.7 ± 588.8 g; the infants had a one minute Apgar score of 8 ± 0.4 . Their red blood cells were examined using an atomic force microscope. The objects to be examined were residual umbilical cord blood (RUCB) from the premature infants; central venous blood after 7 hours of birth and neonatal venous blood taken on day 7 of life. **Results.** RUCB from full-term babies contained planocytes that were a major morphological type of red blood cells. In physiological pregnancy and acute fetal hypoxia, the morphological composition of red blood cells in premature neonates with NRDS was close to that in full-term babies. The planocytes are also a major morphological type of red blood cells in the premature infants; the frequency of their occurrence varies. Stomatocytes are typical of all the neonates in the NRDS group; their frequency levels vary greatly: from 8 to 65% of the total number of erythrocytes. The examination revealed that the premature infants of 31–36 weeks gestation were characterized by abnormal erythrocyte shapes that showed a high variability. At birth, the premature babies were found to have changes in the nanostructure of red blood cell membranes, which were influenced by intrauterine hypoxia. The first-order value reflecting flickering in the red blood cell membrane varies to the most extent. **Conclusion.** Atomic force microscopy showed that the greatest changes in the structure of red blood cell membranes were found in RUCB. The premature babies with NRDS had intrauterine poikilocytosis caused by unfavorable factors, as confirmed by the presence of multiple correlations. Analysis of the nanostructure of red blood cell membranes revealed that the first-order value reflecting flickering in the red blood cell membrane was most sensitive; this indicator showed a slow normalization.

Key words: red blood cell membrane, nanostructure, planocytes, stomatocytes, premature newborn infants, respiratory distress syndrome.

Correspondence to:

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

The aim of our study was to characterize morpho-functional patterns of erythrocytes performing oxygen — transport function. A variety of actual methods used with the same purpose included light and transmission electron microscopy. However, only atomic force microscopy (AFM) enabled to explore the structure of their membranes in different critical illness [1, 2].

It is known that erythrocytes are disc-shaped, but this shape is common for reticulocytes [3, 4]. External cell membranes of these cells seem equal, but the protoplasm content of erythrocyte is characterized by higher optical density on electronograms than that of reticulocytes. Intracellular organelles are often detected in reticulocytes. In newborn rat erythrocytes because of osmotic loads the prevalence of non-disk erythrocyte are considered as patterns of necrobiosis [5].

Different forms of erythrocytes possess a number of morphological features. In discocytes a thick zone of outer lipid bilayer of cell membrane was observed. In planocytes ring-shaped redistribution of hemoglobin granules associated with the change of cytoskeletal proteins was detected. Spectrophotometric study have demonstrated that autofluorescence of erythrocytes occurs at the wavelength of 480–490 nm; the intensity of the radiation of the toroidal field in the ultraviolet rays can differ by 1,5–3 times. The ultrastructure of discocytes is characterized by regular cell membrane, regular intracellular distribution of hemoglobin and lack of folds.

The ultrastructure of stomatocytes is heterogeneous forming double cell membrane. Chain-shaped cytoskeletal proteins with irregular concentration of hemoglobin granules around are detected inside the cells. A large number of local damages of cell membranes is common in stomatocytes [6].

Special attention has been given to studying pre-term neonates. The neonate immaturity is considered to affect blood cells. However, in general the blood system of a pre-term infant with an extremely low weight is ready for an outside life. Individual qualitative and quantitative changes of erythrocytes mostly depend on the cause of a preterm delivery [7–9].

Cord blood is a suitable source of information about the processes that occur in a fetus body during the birth [10–13].

The aim of the study: to study the morphological structure of erythrocytes in pre-term infants with respiratory distress syndrome (RDS) by AFM.

Materials and methods

The study included 27 newborns of which 13 pre-term infants were diagnosed with RDS. Anthropometric characteristics of neonates, features of amniotic fluid and duration of mechanical ventilation (MV) are presented in Table 1. The average gestation age was $34,1 \pm 1,7$ weeks, birth weight $2065,4 \pm 304,8$ g. At birth the condition of the neonates were severe. All pre-term infants were under the MV because of the severe respiratory insufficiency caused by RDS. Surfactant Curosurf® was applied to all newborns 3–5 minutes after the birth via the endotracheal route. The average dosage of the preparation was 153 ± 24 mg/kg. The average duration of MV was $68 \pm 15,6$ hours.

In all the cases the course of pregnancy was unfavorable with the threat of interruption. The second half of the pregnancy was complicated by severe preeclampsia resistant to pharmacotherapy. The latter was the reason of a preterm delivery. The majority of the pregnant women were carried on an emergency caesarean cessation by the Gusakov's method.

Erythrocytes of 14 full-term newborns with normal course of pregnancy and urgent delivery were separated from the cord blood. The average gestational age of the newborns was $39,4 \pm 0,4$, the score of the first minute of life was $8 \pm 0,4$ points (Apgar), the birth weight was $3131,7 \pm 588,8$ g. 78.5% of the newborns were delivered by vaginal route, and in 21,4% of cases the emergency caesarean cessation was used. At birth all the infants had no signs of acute hypoxia, the early period of adaptation was normal, they were not carried out MV.

Methods included the following:

(1) Atomic force microscopy (AFM). Cell preparations included erythrocytes of cord blood of pre-term neonates, central venous blood of the newborns 7 hours and 7 days after birth. The blood samples were taken immediately after crossing the umbilical cord. They were taken in special 0,25 ml tubes containing EDTA as a preservative. The blood was mixed with the preservative, then settled for 30 minutes, diluted to 20 ml and a monolayer of erythrocytes on a glass slide was prepared with the aid of a centrifuge StatSpin™ DiffSpin™ 2 Slide Spinner (Fisher Scientific, USA). The picture of erythrocytes was received using the NTEGRA prima Atomic Force Microscope (NT-MDT Development Co., Zelenograd, Russia) in the semi-contact mode. Cantilevers NSG01-A were used as probes. The number of scan dots was 512 and 1024, the area of the scan was 100×100 microns, 10×10 microns. The proportions of various erythrocyte forms were determined with the aid of AFM, and the calculations were performed with 300 cells. The analyses of nanostructures of erythrocyte membranes were performed by using the spatial Fourier transform decomposition of erythrocyte membrane surfaces into three orders according to spectral windows of 1000–600 nm, 80–300 nm 20–60 nm for the first, sec-

Table 1

General characteristics of neonates

Parameters	Values
Neonates with RDS	13
Gestational age, weeks	$33,1 \pm 2,3$
Birth weight, g	$1800 \pm 299,3$
Scores (Apgar scale, first minute of life)	$4,9 \pm 0,8$
Males	7 (53,9%)
Females	6 (46,1%)
Clear amniotic fluid	61,5%
Amniotic fluid with blood	30,8%
Amniotic fluid with meconium	7,6%
Duration of MV, hours	$68 \pm 15,6$

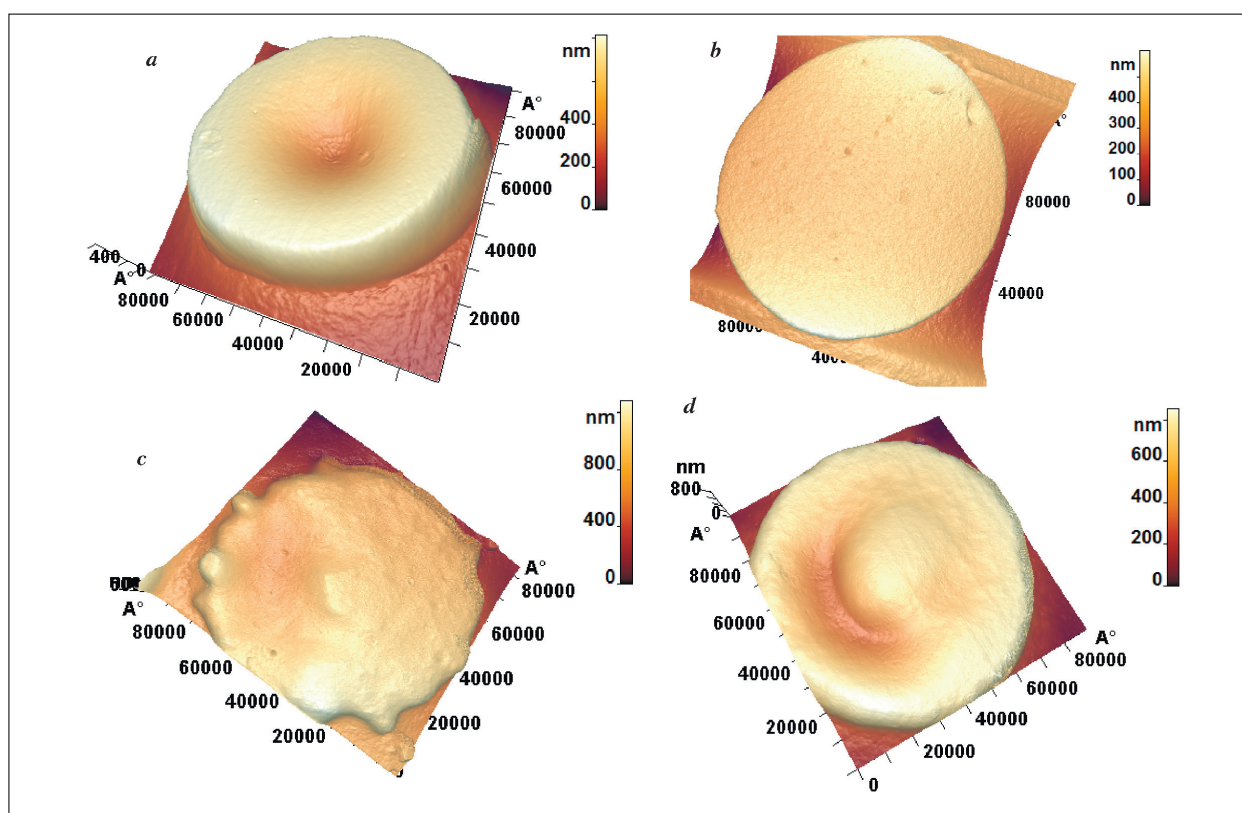


Fig. 1. Shapes of red blood cells.

a – discocyte; *b* – planocyte; *c* – echinocyte; *d* – stomatocyte.

Table 2

Morphological shapes of erythrocytes of pre-term neonates in peripheral blood

Forms of erythrocytes	Values, %
Discocytes	28±16,5
Planocytes	44±16,5
Stomatocytes	26±12,8
Echinocytes	20±8,3
Others	19±8,3

ond and third orders, correspondingly. The first order correlates with the phenomenon of membrane flickering reflecting the macrostructure properties of the membrane. The second and the third orders correlate with the configuration of spectrinal matrix and reflect the conditions of protein connection nodes. The parameters were measured on the plane part of cells of different forms. The method of analysis of nanostructures has been described in details in previously published papers [14,15].

(2) During MV gas composition in capillar blood was routinely performed by Gem Premier 3000 (USA).

(3) Statistical processing of the data was carried out using the standard program Origin 6.1 (Microsoft, USA). Pearson and Spearman correlation coefficients were determined by Statistica 6. The significance of differences were estimated by factor analysis of variance (one-way ANOVA). The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

The morphology of erythrocytes and clinical conditions of newborns. The shape of erythrocytes is an important informative indicator reflecting the metabolic processes occurring in the body and affecting the conditions of erythrocyte membranes. It is known that mainly discocytes

– the double-concave cells with a flat surface circulate in the blood of a healthy person (Fig. 1, *a*).

The study showed that 85% of RB erythrocytes in neonates were presented by flat shaped planocytes (Fig. 1, *b*) and 15% were presented by transformed erythrocytes that include 3% echinocytes (Fig. 1, *c*), 3% stomatocytes (Fig. 1, *d*) and 9% other abnormal cells.

Erythrocytes whose characteristics are not included in the standard classification were detected. Newborns are characterized by a high number of erythrocytes (intrauterine physiologic erythrocytosis) and a high level of hemoglobin including fetal hemoglobin. Planocytes might be a transient form in full-term neonates. In this group the correlation between the clinical condition of the neonates and the shape of erythrocytes was not detected.

The morphological structure of erythrocytes of pre-term newborns is presented in Table 2. Discocytes and planocytes reached 72% of the total number of erythrocytes in the cord blood of RDS neonates. Discocytes were found in five infants (38,5%), four pregnancies were complicated by acute disturbances of utero-placental blood

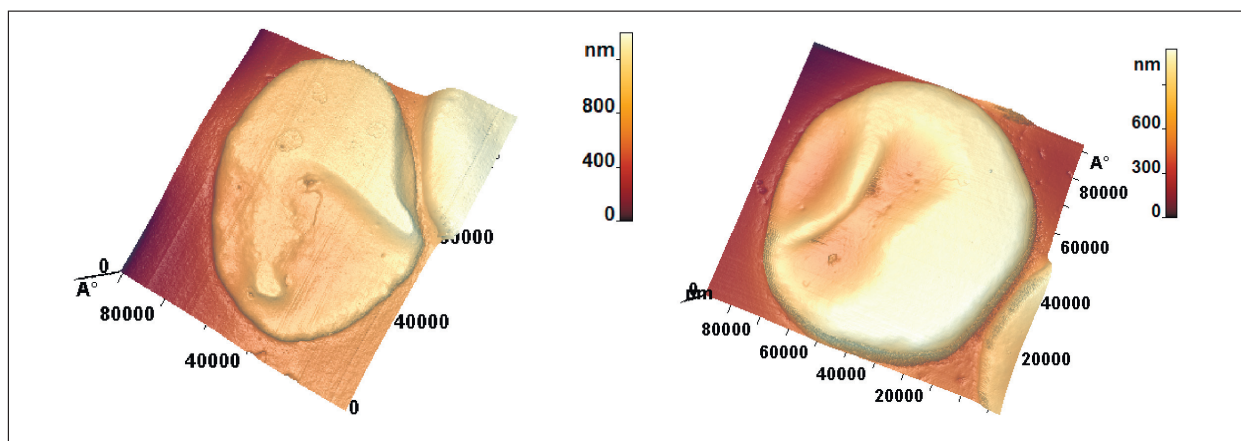


Fig. 2. Abnormal forms of red blood cells

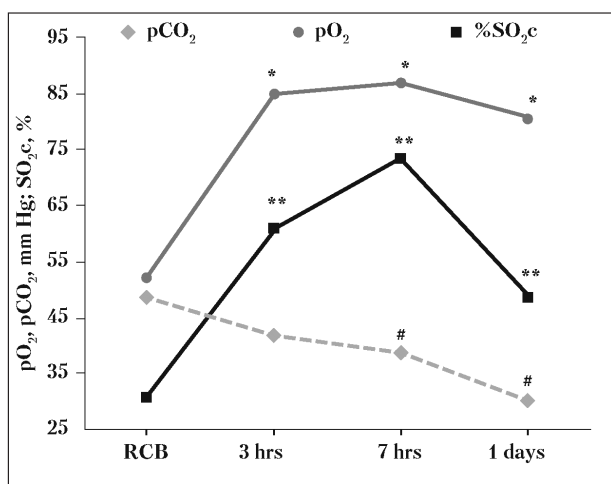


Fig. 3. Dynamics of blood gases in premature infants of RDS group.

*, **, # — reliability of difference in comparison with the residual cord blood.

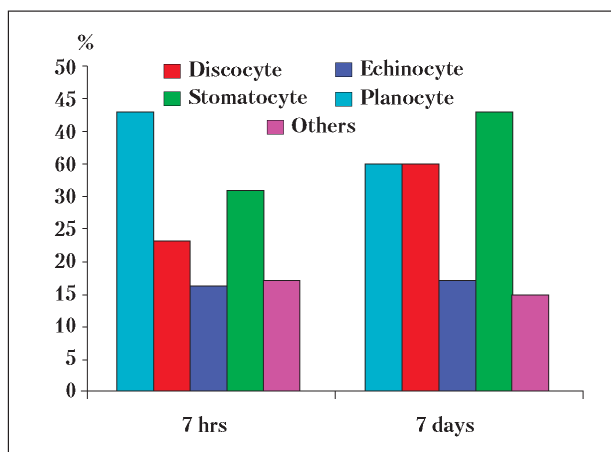


Fig. 4. Morphological shapes of RBC at different study points.

flow (placental abruption), severe preeclampsia, threat of antenatal fetal death in the second half of pregnancy. Discocytes were not found in blood of newborns from multiple pregnancy.

The main morphological shape of erythrocytes in pre-term neonates was presented by planocytes, frequencies of which varied from one per field of view to 90% of the total number of erythrocytes. In normal pregnancies with following acute fetal hypoxia the morphological structures of erythrocytes were similar to ones from full-term infants.

Stomatocytes were common for all RDS newborns, their number varied from 8% to 65% of the total number of erythrocytes. All the pre-term infants with gestational age of 31–36 weeks were characterized by abnormal and variable shapes of erythrocytes. Two of the shapes are presented in figure 2.

The estimation of oxygen status and status of the metabolism of a newborn is important criteria. The dynamics of these indicators is presented in Fig. 3. At birth the median of pH was 7,27 (7,14–7,39) which corresponded to the following parameters of pulmonary gas exchange: the partial pressure of oxygen (PO₂) was 31,3±7.3 mm Hg, the saturation of the hemoglobin by oxygen (SO_{2c}) was 52,8±22.1%. The data obtained confirms antenatal fetal hypoxia. Three hours after the birth normalization of the oxygen status occurred as a result of MV: PO₂ and SO_{2c} were increased. Blood pH increased significantly ($p<0.05$) by the third hour of life and was kept within the physiological norms during the whole study. During the first hours of MV the oxygenation of the blood became normalized.

The following correlation links between morphological forms of CR erythrocytes, indices of metabolism, the nature of amniotic fluid and the scores on Apgar scale in RDS newborns were detected by correlation analysis:

(1) between the number of planocytes and (a) blood pH ($r=0,8$; $p=0,02$); (b) nature of amniotic fluid ($r=-0,6$; $p=0,04$); (c) the Apgar scale score at the first minute of life ($r=-0,6$; $p=0,02$);

(2) between the numbers of stomatocytes and the scores on Apgar scale within the first minute of life ($r=0,5$; $p=0,05$);

(3) between the numbers of other abnormal cells and the way of delivery ($r=0,7$; $p=0,03$).

Moreover, strong correlations were detected between the duration of delivery, the anhydrous period of delivery and morphological composition of erythrocytes in cord blood.

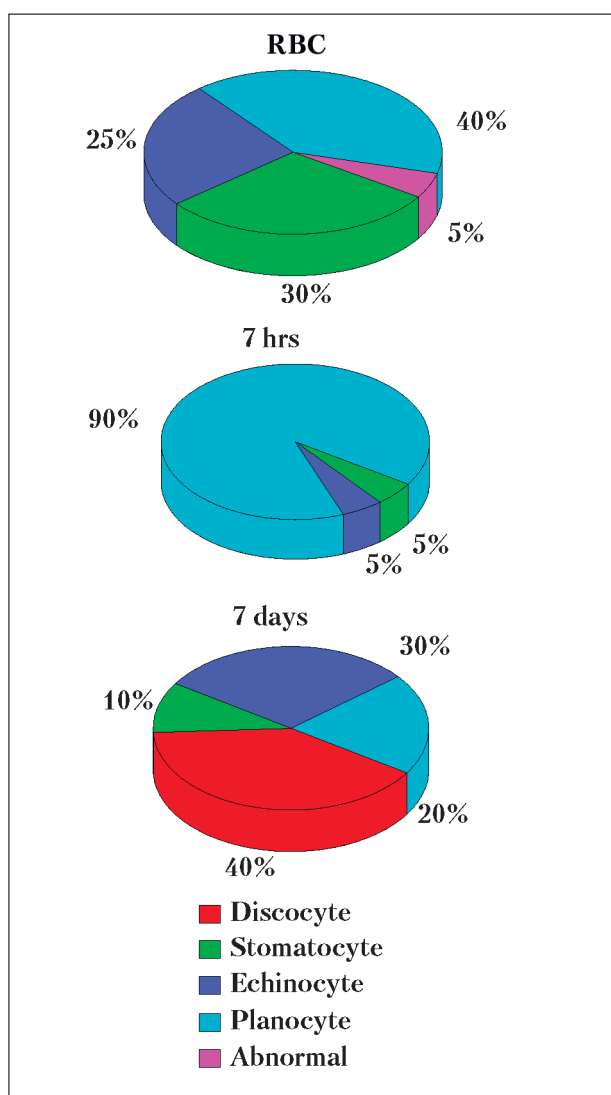


Fig. 5. Morphology of RBC of newborn M. at different study periods.

Seven hours after the birth almost half of erythrocytes of RDS neonates was presented by planocytes, and another half contained stomatocytes (30%) and discocytes (20%). By the seventh day of life the major portion of erythrocytes was presented by planocytes and discocytes while the number of stomatocytes were increased (Fig. 4). The gas exchange was normalized, independent breath recovered and the neonates were extubated.

Analysis of nanostructures in erythrocyte membrane. The value and period of the order allowed the performing an individual quantitative estimation of nanostructural parameters of erythrocyte membrane in each neonate. Numerous changes in nanostructure of erythrocyte membranes were detected at birth in RDS pre-term infants. The value of the first order (h_1) (reflecting the membrane flickering) was mostly changed and significantly exceeded the corresponding parameter of full-term infants ($p < 0.05$). In six pre-term newborns the value of this order was 3.8–10 times more than in full-term infants. In

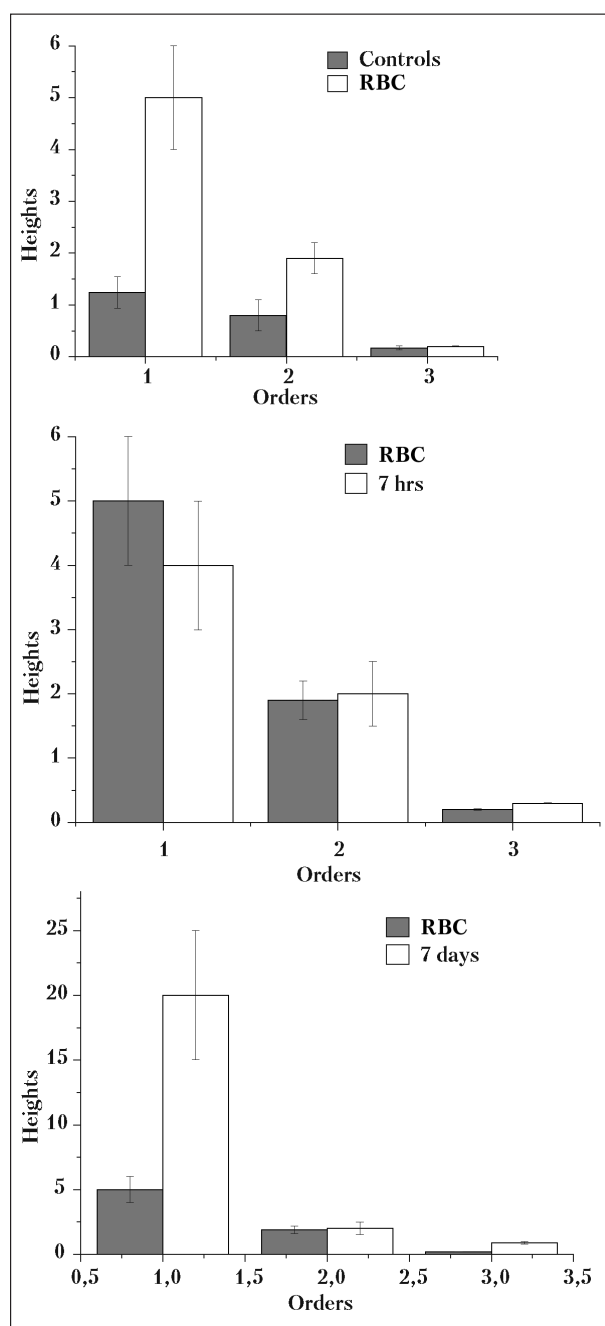


Fig. 6. Histograms of h_1 , h_2 , h_3 parameters of erythrocyte membranes newborn M. at different study periods.

four cases the value of the first order increased 1.5–3.2-fold. In three infants this indicator was the same as for full-term newborns.

In half of pre-term infants the value of the second order (h_2) exceeded the one in control group by 1.5–2.5 times, spectrin matrix changed in twins born from mothers with severe preeclampsia and placental previa. In five children changes in spectrin matrix were combined with the phenomenon of flickering of erythrocyte membranes. The values of the third order did not differ significantly between the groups ($p > 0.05$).

Seven hours after the birth in three RDS newborns the value of the first order were increased demonstrating

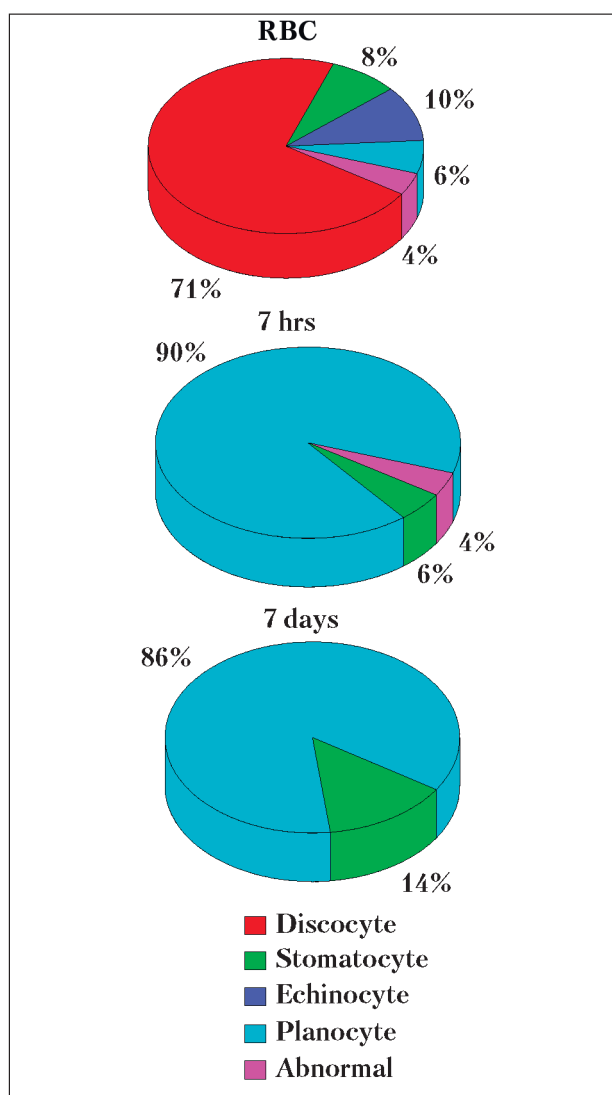


Fig. 7. Morphology of RBC of newborn C. at different study periods.

that the erythrocyte membrane flickering remained whereas the values of the second order changed in one newborn. In other infants the values of the latter parameter were decreased. By the seventh day of life the value of the first order increased in four pre-term neonates.

Seven hours after birth the parameters correlated as follows:

(1) between the number of stomatocytes and (a) pCO_2 of blood ($r=0,6$; $p=0,049$); (b) concentration of bicarbonates in blood: ($r=0,6$; $p=0,03$); (c) total concentration of carbon dioxide in blood (TCO_2) ($r=0,6$; $p=0,03$); (d) saturation of hemoglobin with oxygen ($r=-0,6$; $p=0,02$); (e) total concentration of bases in blood ($r=0,5$; $p=0,048$);

(2) between blood pH and the number of other abnormal cells ($r=0,8$; $p=0,002$); (3) between pO_2 and the height of the second range ($r=0,6$; $p=0,04$).

Therefore, correlation links between indicators of metabolism, oxygen condition of blood and the configuration of spectrin matrix were detected.

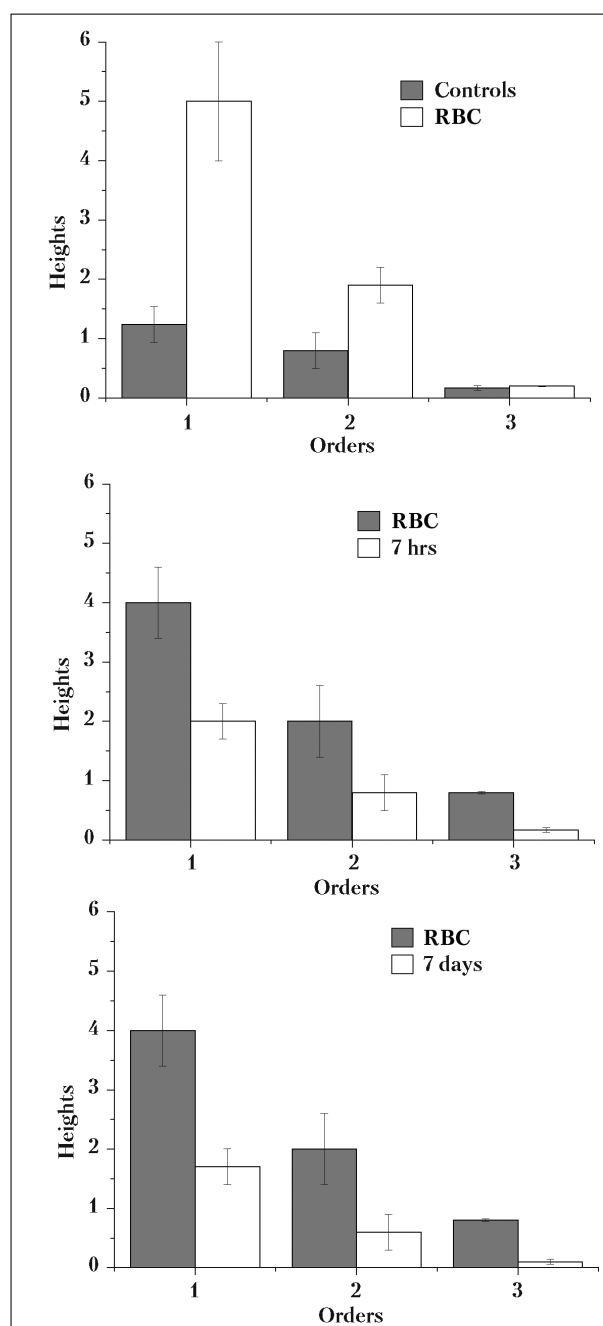


Fig. 8. Histograms of h_1 , h_2 , h_3 parameters of erythrocyte membranes newborn C. at different study periods.

Conclusions

Using the atomic force microscopy technology the patterns of nanostructural changes in cord blood erythrocyte membranes were detected. Prenatal poikilocytosis due to the influence of multiple adverse factors was common for RDS pre-term infants.

This study established that the nanostructural patterns of the erythrocyte membranes characterized by the values of the first order (reflecting the phenomenon of erythrocyte membrane flickering) were the most sensitive to confirm the prenatal irregularity of membrane nanostructure. Changes in spectrin matrix of erythrocyte membranes were observed at birth, however, stabi-

lization of the matrix was relatively fast. Nanostructural analysis of erythrocyte membranes with the aid of AFM

revealed the stability of nanostructural parameters of exposed proteins.

References

1. Gushchina Yu.Yu., Pleskova S.N., Zvonkova M.B. Issledovanie razlichii morfoloicheskikh parametrov kletok krovi cheloveka metodom skaniruyushchei zondovoi mikroskopii. [Investigation of differences in the morphological parameters of human blood cells by scanning probe microscopy]. *Poverkhnost. Rentgenovskie, Sinkhrotronnye i Neitronnye Issledovaniya*. 2005; 1: 48–53. [In Russ.]
2. Moroz V.V., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Gudkova O.E., Bushueva A.V. Izmeneniya struktury membran eritrotsitov pri deistvii gemina. [Hemin-induced changes in the red blood cell membrane structure]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (6): 5–10. [In Russ.]
3. Lewis S.M., Bein B., Beits I. Prakticheskaya i laboratornaya gematologiya. [Practical and laboratory hematology]. Moscow: GEOTAR-Media; 2009: 672. [In Russ.]
4. Shifman D.F. Patofiziologiya krovi. [Pathophysiology of blood]. Moscow – Sankt-Peterburg: Binom – Nevsky Dialekt; 2000: 448. [In Russ.]
5. Kartashova N.M., Kidalov V.I., Naumova E.M., Khadartsev A.A. Izmeneniya konfiguratsii ultrastruktury eritrotsitov v ekstremalnykh dlya kletok usloviyakh. [Changes in the configuration of the red blood cell ultrastructure in extreme conditions for cells]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii*. 2005; 11 (1): 5–8. [In Russ.]
6. Kartashova N.M., Kidalov V.I., Naumova E.M., Khadartsev A.A., Tsogoev A.S. K voprosu o fiziologicheskoi znachimosti izmeneniya formy, ultrastruktury i fluorestsentsii eritrotsitov perifericheskoi krovi pri ikh transformatsii v stomatotsity. [On the physiological significance of a change in the shape, ultrastructure, and fluorescence of peripheral red blood cells in their transformation to stomatocytes]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologii*. 2005; 11 (1): 8–11. [In Russ.]
7. Serebryakova E.N., Volosnikov D.K., Simakova N.V. Morfologiya eritrotsitov i pokazateli perekisnogo okisleniya lipidov v plazme u novorozhdennykh s sindromom poliorgannoi nedostatochnosti. [The morphology of red blood cells and the parameters of lipid peroxidation in the plasma of newborn infants with multiple organ dysfunction syndrome]. *Pediatriya*. 2012; 91 (1): 25–31. [In Russ.]
8. Kovtun O.P., Shershnev V.N. Dinamicheskie issledovaniya pokazatelei perifericheskoi krovi u glubokonedonoshennykh detei v neonatalnom periode. Materialy konferentsii. [Dynamic studies of peripheral blood parameters in extremely premature infants in the neonatal period. Proceedings of the Conference] *Byulleten Sibirskogo Otdeleniya RAMN*. Novosibirsk; 2008: 15–17. [In Russ.]
9. Stotskaya G.E., Litvinova A.M., Pestryaeva L.A. Osobennosti gemopoeza v rannem neonatalnom periode u detei s ekstremalno nizkoi massoi tela. [Early neonatal hematopoietic features in extremely low birth weight babies]. *Pediatriya*. 2010; 89 (1): 37–40. [In Russ.]
10. Perepelitsa S.A., Golubev A.M., Moroz V.V., Alekseyeva S.V., Bueva Zh.V., Redina N.V., Shulga R.A., Salazkina T.A., Leontyuk N.V. Provospalitelnye i protivovospalitelnye tsitokiny u nedonoshennykh novorozhdennykh s ORDS. [Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in premature neonates with acute respiratory distress syndrome]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2009; 5 (6): 21–30. [In Russ.]
11. Lim F.T., Scherjon S.A., Beckhoven J.M., Brand A., Kanhai H.H., Hermans J.M., Falkenburg J.H. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 183 (5): 1144–1152. PMID: 11084556
12. Zimina N.N., Rumyantsev S.A., Maiorova O.A., Yakovleva M.V., Kurtser M.A. Osobennosti kletochnogo sostava pupovinnoi krovi donoshennykh novorozhdennykh pri razlichnykh variantakh ostroi i khronicheskoi gipoksii ploda. [Specific features in the cell composition of umbilical cord blood of premature neonates in different variants of acute and chronic fetal hypoxia]. *Voprosy Prakticheskoi Pediatrii*. 2010; 5 (3): 16–20. [In Russ.]
13. McCarthy J.M., Capullari T., Thomson Z., Zhu Y., Spellacy W.N. Umbilical cord nucleated red blood cell counts: normal values and the effect of labor. *J. Perinatol.* 2006; 26 (2): 89–92. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jp.7211437>. PMID: 16407961
14. Kononenko M.L. Flicker eritrotsitov. 2. Rezultaty eksperimentalnykh issledovaniy. [Red blood cell flickering. 2. Results of experimental studies]. *Biologicheskie Membrany*. 2009; 26 (5): 451–467. [In Russ.]
15. Chernysh A.M., Kozlova E.K., Moroz V.V., Borshchegovskaya P.Yu., Bliznyuk U.A., Rysaeva R.M. Poverkhnost membran eritrotsitov pri kalibrovannoi elektroporatsii: issledovanie metodom atomnoi silovoi mikroskopii. [The surface of red blood cells during calibrated electroporation: atomic force microscopic study]. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. 2009; 148 (9): 347–352. [In Russ.]
16. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S. Narusheniya nanostruktury membran eritrotsitov pri ostroi krovopote i ikh korrektsiya perfortugirovannoi emulsiei. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; 7 (2): 5–9. [In Russ.]
17. Moroz V.V., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S., Aleksandrin V.V., Nazarova G.A. Membranoprotektoornoe deistvie perfortorana na eritrotsity pri ostroi krovopote (eksperimentalnoe issledovanie). [Membrane-protecting effects of perfluorane on red blood cells in acute blood loss (an experimental study)]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2011; 7 (1): 5–10. [In Russ.]
18. Moroz V.V., Golubev A.M., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Vasilyev V.Yu., Gudkova O.E., Sergunova V.A., Fedorova M.S. Izmeneniya struktury poverkhnosti membran eritrotsitov pri dlitelnom khranении donorskoi krovi. [Structural changes in the surface of red blood cell membranes during long-term donor blood storage]. *Obshchaya Reanimatologiya*. 2012; 8 (1): 5–12. [In Russ.]

Submitted 27.07.13

ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

Научно-практический журнал «Общая реаниматология»,
входящий в перечень ВАК РФ, предназначен для врачей анестезиологов-реаниматологов
и научных сотрудников.

Тематика журнала: патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика и патологическая анатомия критических, терминальных и постреанимационных состояний. Вопросы оказания догоспитальной помощи при критических состояниях. Вопросы обучения населения и медицинского персонала приемам оказания неотложной помощи при критических состояниях.

Аудитория: лечебные учреждения; высшие учебные заведения медицинского профиля; медицинские учреждения последилового образования, Федеральные и региональные органы управления здравоохранением, медицинские научно-исследовательские институты; медицинские библиотеки.

ПОДПИСКА

В любом почтовом отделении связи по каталогу «Роспечать»

- индекс 46338 — для индивидуальных подписчиков
- индекс 46339 — для предприятий и организаций