

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования "Балтийский федеральный университет имени  
Иммануила Канта"**

На правах рукописи

**Денисенко Оксана Дмитриевна**

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ  
У НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук  
Л.С. Литвинова

Калининград – 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Понятие эритрона.....	12
1.2. Морфология, строение и функции эритроцитов .....	14
1.3. Резистентность эритроцитов.....	21
1.4. Адренореактивность эритроцитов, как индикатор состояния организма .....	24
1.5. Оценка состояния эритроцитов .....	25
1.6. Период ранней адаптации .....	27
1.7. Современные представления о гипоксии плода.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Объект и материалы исследования.....	36
2.2. Методы исследования .....	40
2.2.1.Определение кислотно - основного состояния крови новорожденных ....	40
2.2.2.Определение $\beta$ -адренореактивности эритроцитов крови.....	42
2.2.3. Подсчет ретикулоцитов и нормоцитов в мазках крови.....	43
2.2.4. Подготовка препарата монослоя эритроцитов.....	44
2.2.5. Анализ морфологии эритроцитов методом световой микроскопии .....	45
2.2.6. Анализ морфологических характеристик эритроцитов с применением метода атомно-силовой микроскопии.....	45
2.3. Статистическая обработка данных .....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
3.1.Оценка показателей кислотно-основного состояния в сосудах пуповины у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее .....	49
3.2.Оценка содержания нормобластов и ретикулоцитов в сосудах пуповины у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее. ....	52
3.3.Оценка $\beta$ -адренореактивности эритроцитов в сосудах пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее. ....	53
3.4.Оценка показателей кислотно-основного состояния у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования. ....	56
3.5.Оценка морфологических характеристик эритроцитов (форма, размер) новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, методом оптической микроскопии, на разных сроках исследования .....	58

3.6. Оценка морфологических форм эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, методом атомно-силовой микроскопии, на разных сроках исследования.....	60
3.7. Оценка количественных характеристик $hi$ (высоты $h_1$ и $h_2$ ) поверхности мембраны эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования.....	65
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	68
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ВЫВОДЫ .....	85
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	86

## **СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АРМ- адренореактивность

АСМ - атомно-силовая микроскопия

АТФ - аденозинтрифосфорная кислота

ОПК - остаточная пуповинная кровь

ОРЭ - осмотическая резистентность эритроцитов

КОС - кислотно-основное состояние

ПГ - перинатальная гипоксия

САС- симпатoadреналовая система

BE - буферные основания

$\text{HCO}_3^-$  - концентрация бикарбоната

$p\text{CO}_2$  - парциальное давление углекислого газ

$p\text{O}_2$  - парциальное давление кислорода

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Дистресс плода и асфиксия новорожденного широко распространены, представляя важнейшую медицинскую и социальную проблему во всем мире [Герасимова Н. С. и др., 2015; Pasquo di E. et al., 2022; Zhen-Zhen J. et al., 2022]. Усилия специалистов многих специальностей направлены на профилактику, раннюю диагностику и лечение этого состояния: в 2021 году показатель перинатальной смертности в России снизился почти в 2 раза, достигая 4,4‰ [Щербакова Ю. Г., Малышева Е. В., 2021] против 10,2‰ в 2005 году [Суханова Л. П., 2006]. Асфиксия является главной причиной перинатальной смертности, в структуре ее интранатальных причин первое место занимает гипоксия плода [Радзинский Е. В., 2017; Приходько А.М., 2022; Locatelli A. et al., 2022; Pasquo E. et al., 2022; Pereira S. et al., 2022; Amsalu S. et al., 2023]. Гипоксия, приводящая к тяжёлым неврологическим нарушениям у детей, возникает в антенатальном периоде в 63% случаев, интранатально в 21,2% случаев и в периоде новорожденности - до 5,7% случаев [Еремина О. В., 2014; Chen X. et al., 2023]. Перинатальная гипоксия, связанная с нарушениями плацентарного кровообращения, приводит к активации оксидативных процессов в организме плода, являясь пусковым механизмом гипоксических повреждений у новорожденных в неонатальном периоде [Радзинский Е. В., 2017]. Оксидативный стресс и ацидоз негативно влияют на все клетки организма, в том числе на эритроциты, которые весьма чувствительны к нарушениям гомеостаза [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007; Shankaran S., 2015; Chen X. et al., 2023].

**Степень разработанности темы.** Важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции функций организма в норме и при развитии патологии, в том числе у новорожденных, является симпатoadреналовая система, реализующая свои эффекты через действие гормонов – катехоламинов, связывающихся с адренорецепторами, расположенными на мембранах клеток, вызывая в них функциональные изменения [Стрюк Р. И., 2003, Тихомирова И. А., 2006; Kvetnansky R. et al., 2013; Nedoboy P. E. et al., 2021; Gaskill P.J., Khoshbouei H., 2022]. Длительная или сильная стимуляция организма катехоламинами меняет количество адренорецепторов и их функциональные свойства, способствуя десенситизации мембран клеток к стрессорным медиаторам и гормонам [Шукуров

Ф.А. и др., 2020]. Функциональное состояние детекторного звена симпатoadреналовой системы находится под контролем обратной связи с количеством адренореактивных веществ, которые действуют на клетку [Hamilton L. D. et al., 2008; Халимова Ф. Т., 2017; Шукуров Ф. А. и др., 2020]. Системные реакции организма, в ответ на изменения активности симпатoadреналовой системы, отражены в понятии адренореактивности [Гарганеева А.А. и др., 2020]. Эритроциты представляют самую значительную популяцию (около 84%) от общего клеточного состава организма [Sender R. et al., 2016]; их цитозольный протеом на 90% состоит из гемоглобина [Amon S. et al., 2019], посредством которого они выполняют буферную функцию; активно участвуют в метаболизме катехоламинов, ацетилхолина, иммунных комплексов и ряда лекарственных веществ [Masuda M. et al., 2002]. Эритроциты являются перспективным объектом для изучения адренореактивности организма [Namdar A., 2017, Rebrova T. Y. et al., 2021; Zyubanova I. V. et al., 2021]; на мембране эритроцита локализованы  $\alpha 1$ -АР,  $\alpha 2$ -АР,  $\beta 1$ -АР,  $\beta 2$ -АР и  $\beta 3$ -АР, число их на одном эритроците составляет от 90 до 300 [Lamsadze G. et al., 2011].

Установлено, что по уровню адренореактивности эритроцитов можно оценивать развитие стрессовой ситуации, которая возникает в процессе адаптации организма к новым экстремальным условиям среды, в том числе, при родах, осложненных перинатальной гипоксией [Гарганеева А. А. и др., 2020, Olofsson P., 2023]. В эритроцитах, при действии гипоксии происходит истощение продукции АТФ, запускается активация протеинкиназы С и фосфорилирование неселективных катионных каналов, что способствует входу в клетку ионов  $Ca^{+2}$  [Белевич Е. И. и др., 2015; Чумакова С. П. и др., 2018; Ващенко В. И., Вильянинов В. Н., 2019]; деформируемость и проницаемость мембран эритроцитов при этом возрастают, а транспорт кислорода - снижается [Мороз В. В. и др., 2012]. Процесс деформации сопровождается нарушениями цитоскелета и плазматической мембраны эритроцита [Сергунова В. А. и др., 2015; Шерстюкова Е.А., 2020]. Количественные или качественные дефекты в мембранных белках, приводят к уменьшению стабильности мембраны и последующему разрушению клеток и их программированной смерти – эритрозу [Мороз В. В. и др., 2012; Перепелица С.А., 2017; Шерстюкова Е.А., 2020; Хадарцев А. А. и др., 2022; Dreischer P. et al., 2022;

D'Alessandro A. et al., 2023]. Согласно многочисленным данным, существует тесная двусторонняя связь между состоянием организма и морфофункциональными изменениями эритроцитов [Hines P. S., 2003; Judkins A. J. et al., 2019; Gwozdziński K. et al., 2021; Strijkova-Kenderova V. et al., 2021]. Однако, несмотря на большое количество работ, посвященным изучению различных характеристик эритроцитов в норме и при патологии, на сегодняшний день нет четкого понятия о влиянии перенесенной перинатальной гипоксии на показатели адренореактивности эритроцитов и изменение их морфологических характеристик у новорожденных. Вышесказанное, в целом, обуславливает своевременность и актуальность данной тематики: знания закономерностей возникновения морфофункциональных и структурных нарушений эритроцитов крови могут значительно расширить представления о влиянии гипоксии на развитие критических состояний у плода и новорожденных.

**В связи с вышесказанным,** целью исследования явилось изучение морфофункциональных изменений эритроцитов у новорожденных с признаками гипоксии в раннем неонатальном периоде.

**Задачи исследования:**

1. Оценить взаимосвязь уровня  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов, определяемого в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, с параметрами кислотно-основного состояния и содержанием молодых форм эритроцитов, в зависимости от степени компенсации ацидоза (рН).
2. Выявить динамику морфологических характеристик эритроцитов крови (изменение формы, размера эритроцитов, наноструктуры мембраны) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию в раннем неонатальном периоде (от момента рождения до 7 суток жизни) во взаимосвязи с показателями их кислотно-основного состояния.
3. Выявить общие закономерности и особенности морфофункциональных изменений эритроцитов при перинатальной гипоксии.

## Научная новизна

Научную ценность представляют полученные данные, свидетельствующие, что  $\beta$ -адренореактивность эритроцитов, определяемая в пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, в целом, зависит от степени компенсации ацидоза, выявленной при рождении. Впервые установлено, что содержание ретикулоцитов в артериальной крови, полученной из сосудов (вена) пуповины у новорожденных с ацидозом, позитивно коррелирует с величиной рН и показателем  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов. Оригинальными являются данные об изменении формы эритроцитов (пойкилоцитоз) и их размеров (анизоцитоз), определяемых в остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. Выявлено, что морфологический состав эритроцитов детей с гипоксией представлен сниженным (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии) количеством нормальных форм эритроцитов (паноцитов), и, напротив, повышенным – стоматоцитов, на фоне снижения содержания нормоцитов. Приоритетными являются данные о том, что на фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови, выявленные изменения форм эритроцитов и их размеров у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, сохраняются в течение всего раннего неонатального периода (7 суток после рождения). Впервые, с применением метода атомно-силовой микроскопии, у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию доказано, что эритроциты остаточной пуповинной крови, а также венозной крови, полученной через 7 часов и 7 суток после рождения, характеризуются более выраженной (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот h1 (мембранный фликеринг) и h2 (цитоскелет, спектринный матрикс), что является компенсаторно-приспособительной реакцией эритроцита в ответ на гипоксию и сниженное содержание кислорода в плазме. Выявленные нами изменения морфофункциональных характеристик эритроцитов направлены на обеспечение их жизнедеятельности и выполнение газотранспортной функции в условиях гипоксии.

## **Теоретическая и практическая значимость**

Получены знания фундаментального характера об общих закономерностях и особенностях изменений морфофункциональных характеристик эритроцитов при перинатальной гипоксии.

**Практическая значимость работы** обусловлена доказательством, что динамика изменений параметров поверхности эритроцитов (мембранный фликеринг и спектриновый матрикс) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, может быть использована для оценки процессов восстановления эритроцитов в раннем неонатальном периоде. Внедрение в клиническую практику экспресс-метода определения адренореактивности организма, по наиболее удобному, в методическом плане, эритроцитам (для изучения действия агонистов или антагонистов катехоламинов), важно для раннего выявления нарушений симпатoadреналовой системы, профилактики и лечения заболеваний, связь которых с активностью симпатoadреналовой системы несомненна и уже доказана. Метод атомно-силовой микроскопии может применяться в клинической практике, наряду с оптической микроскопией, для оценки морфологической формы и размеров эритроцитов, а также для изучения структуры мембран красных клеток крови у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В соответствии с поставленными задачами, были выбраны высокоинформативные методы исследования, выполненные на базе современного высокотехнологического Центра иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта (г. Калининград). Материалом для исследования служила артериальная и венозная кровь, полученная из сосудов пуповины; остаточная пуповинная кровь; венозная кровь, взятая через 7 ч и 7 суток после рождения.

#### **Основные методы исследования:**

1. Определение кислотно-основного состояния крови новорожденных;
2. Определение  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов крови новорожденных;
3. Определение молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов,

нормобластов) в крови новорожденных

4. Анализ морфологических характеристик эритроцитов крови новорожденных:

- анализ морфологических форм эритроцитов и их размерных характеристик методом световой микроскопии;

- анализ морфологических форм и структурных характеристик (высоты h1 и h2, характеризующие мембранный фликеринг и цитоскелет, спектринный матрикс) эритроцитов с применением метода атомно-силовой микроскопии;

5. Статистический анализ данных.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. В артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных с признаками гипоксии в раннем неонатальном периоде, регистрируется повышение значений  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов, увеличение молодых форм эритроцитов (нормобластов и ретикулоцитов), определяется прямая зависимость этих показателей от степени компенсации ацидоза (величины рН).

2. В остаточной пуповиной крови новорожденных с признаками перинатальной гипоксии регистрируется более выраженный (по сравнению с новорожденными без гипоксии) анизоцитоз (уменьшение числа нормоцитов) и пойкилоцитоз (снижение количества планоцитов, увеличение содержания стоматоцитов и переходных форм (кодоциты)) эритроцитов; эритроциты детей с гипоксией характеризуются высокой нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот h1 (мембранный фликеринг) и h2 (цитоскелет, спектринный матрикс). Выявленные изменения морфологических характеристик эритроцитов сохраняются у данной категории детей через 7 суток после рождения, на фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным объёмом экспериментального материала с использованием современных высокотехнологичных методов исследования и современного оборудования, а также адекватного выбора критериев для статистической обработки полученных результатов. Основные результаты исследования рассмотрены на Всероссийской молодежной научно-практической конференции (Архангельск, 2012 г.); на XVII Всероссийской молодежной научной конференции с элементами научной школы (Сыктывкар, 2013г.);

на Международной научно-практической конференции (Уфа, 2013г.); на II Международной заочной электронной конференции «Кислотно-основной и температурный гомеостазис» (Красноярск, 2014г.); на VIII Международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофизической медицины» (Киев, 2014г.); на III-ей Международной научно-практической конференции (Тюмень, 2014г.); на V Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2014г., 2018г.); на XII Балтийском медицинском конгрессе «Янтарная осень» (Калининград, 2022г.); на XXIV Всероссийской конференции "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 2022г.); на V Всероссийском Конгрессе "Актуальные вопросы медицины критических состояний" (Санкт-Петербург, 2023г). Работа осуществлена при финансовой поддержке Государственного задания (№ FZWM-2020-0010).

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 4 полнотекстовых статьи в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, 1 глава в монографии, 11 статей и тезисов в материалах конференций и симпозиумов.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа проиллюстрирована 23 рисунками и 5 таблицами. Библиографический указатель включает 245 источников (113 отечественных и 132 иностранных).

**Личный вклад автора.** Автор принимал непосредственное участие в разработке дизайна и планировании исследования, а также проведении всех преаналитических и аналитических этапов исследования. Результаты получены, проанализированы и обобщены в положениях и выводах лично автором.

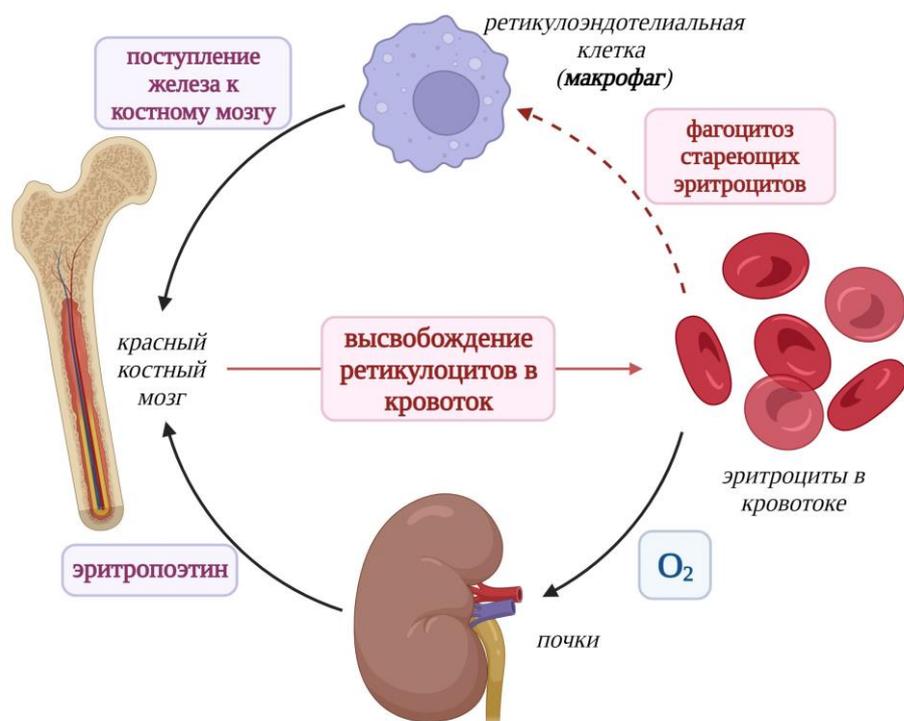
Автор выражает искреннюю благодарность д.м.н. С.А. Перепелице, заведующему кафедрой хирургических дисциплин образовательного научного кластера «Институт медицины и наук о жизни (ОНК МЕДБИО)» БФУ им. И. Канта г. Калининград, за консультативно-методические консультации и рекомендации при анализе клинических данных; В.А. Сергуновой, к.б.н., руководителю лаборатории биофизики мембран клеток при критических состояниях НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР, за помощь в организации исследований на атомно-силовом микроскопе и интерпретации полученных данных.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Понятие эритрона

Кровь является внутренней средой организма и выполняет множество функций, такие как: гомеостатическую, защитную (защитные белки плазмы, плазменные и клеточные факторы свертывающей системы, лейкоциты, включая иммуноциты) и транспортную (снабжение тканей пластическими и энергетическими субстратами, биологически активными веществами, гормонами, кислородом, выведение метаболитов и токсинов) [Липунова Е. А., Скоркина М. Ю., 2007; Palis J., 2008]. Эритрон человека – это узкоспециализированная ткань, отвечающая за транспорт кислорода. Его ключевыми компонентами являются эритроидный костный мозг, который отвечает за выработку эритроцитов (эритропоэз), и циркулирующие эритроциты, которые транспортируют кислород из легких в каждую клетку организма (**рисунок 1**) [Cazzola M., 2022].

В условиях физиологической нормы, примерно  $2,5 \times 10^6$  ретикулоцитов высвобождаются в кровообращение каждую секунду. Проведя в кровообращении около 120 дней, стареющие эритроциты фагоцитируются ретикулоэндотелиальными клетками селезенки, печени и самого костного мозга. Эритропоэз, в первую очередь, регулируется эритропоэтином (ЭПО), который вырабатывается кислородчувствительным аппаратом в почках, циркулирует в периферической крови и оказывает свое действие путем связывания с поверхностным рецептором (EPOR), присутствующим на эритроидных предшественниках и предшественники в костном мозге [Semenza G. L., 2022]. В общем объеме крови (3,5-5 л, 6-8 % от массы тела) одновременно находится около 25 триллионов красных кровяных телец (за норму принята величина  $4,5-5 \times 10^{12}/л$  для мужчин и  $4-4,5 \times 10^{12}/л$  для женщин). Ежедневно воспроизводится до 360 млрд. эритроцитов, что составляет примерно 7 кг биомассы в год [Semenza G. L., 2022].



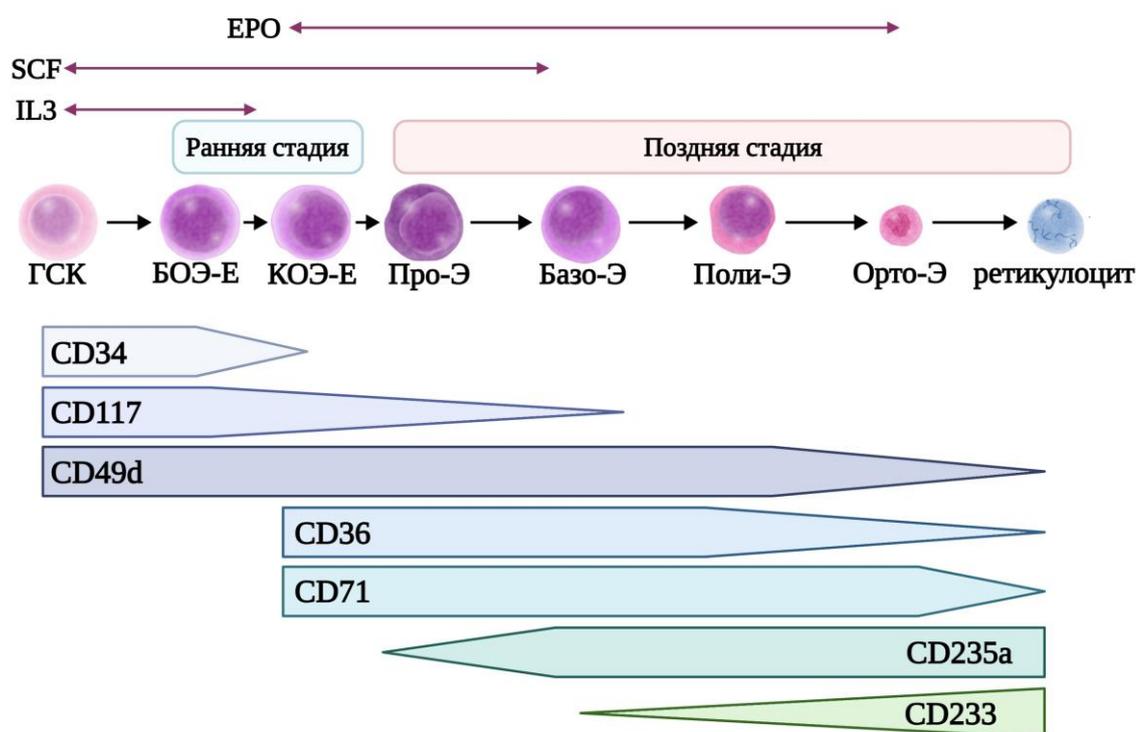
**Рисунок 1.** Схематическое изображение эритрона человека [адаптировано из Cazzola M., 2022]

Согласно данным литературы, кроветворение (гемопоз и, в частности эритропоз) начинается во внутриутробном периоде с 20 дня жизни плода и условно представляется в виде трех этапов [Liu J. et al., 2015]: мезодермальный этап кроветворения, образование эритроцитов происходит в желточном мешке внутрисосудисто и заканчивается к 4 месяцу внутриутробной жизни; **печеночное кроветворение** (с 5-ой недели и до 5-го месяца); костномозговой (миелоидный) тип кроветворения (с 5-го месяца внутриутробного развития) [Liu J. et al., 2015].

Схема эритропоза представлена на **рисунке 2**.

Эритропоз - многоэтапный процесс, который происходит в костном мозге взрослых в определенных областях, т.н. эритробластических островках, которые группируют дифференцирующиеся прекурсоры эритроида вокруг центрального субкомпартамента костного мозга с макрофагами [Yeо J. H. et al., 2018]. Эритробластические островки усиливают эритропоз, способствуя выживанию и пролиферации эритроидных клеток, за счет межклеточных контактов, а центральные макрофаги поглощают экстрадированные ядра из эритробластов [Caulier A. L., Sankaran V. G., 2022]. Эритропоз у человека длится ~14 дней и

включает от 7 до 8 этапов, состоящих из двух основных фаз [Matte A., De Franceschi L., 2019; Caulier A. L., Sankaran V. G., 2022].



**Рисунок 2.** Схема эритропоэза человека. Ранняя фаза относится к экспансии эритроидных предшественников и в основном поддерживается интерлейкином-3 (IL-3) и фактором стволовых клеток (SCF). Поздняя фаза характеризуется созреванием предшественников эритроида, вплоть до энуклеации и поддерживается эритропоэтином (ЭПО), SCF продолжает играть роль в экспансии предшественников эритроида на ранних стадиях этой фазы. В ходе дифференцировки эритроидов характер экспрессии некоторых поверхностных маркеров меняется, что позволяет характеризовать их с помощью проточной цитометрии. ГСК - гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники; БОЭ-Е — бурстобразующая эритроидная единица; КОЭ-Э – колониеобразующая эритроидная единица; Про-Э – проэритробласт; Базо-Э - базофильный эритробласт; Поли-Э - полихроматофильный эритробласт; Орто-Э - ортохроматофильный эритробласт; [адаптировано из Caulier A. L., Sankaran V. G., 2022].

## 1.2. Морфология, строение и функции эритроцитов

Эритроциты многофункциональные клетки организма [Kuo W. et al., 2017]. Они осуществляют ряд функций: питательную, защитную [Горев Р. А. и др., 2005], гуморальную относительно адаптационных процессов в норме, включая беременность и при патологии [Сидельникова В. М. и др., 2004], несут в себе

групповые признаки крови, участвуют в гемостазе [Alamin A. A., 2021] являются регуляторами сосудистого русла. Помимо определения вязкости крови, эритроциты осуществляют газотранспортную функцию, при этом являются универсальными, так как, перенося кислород, не потребляют его и не расходуют энергию [Зинчук В. В. и др., 2003; Воробьев А. И., 2005]. Благодаря гемоглобину, выполняют буферную функцию, участвуя в гемостазировании pH [Dzierzak E., Philipsen S., 2013]. Эритроциты активно участвуют в метаболизме катехоламинов, ацетилхолина, иммунных комплексов и ряда лекарственных веществ [Masuda M. et al., 2002; Rebrova T. Y. et al., 2020].

Большинство функций эритроцитов обусловлены их строением [Трошкина Н. А. и др., 2007; Alamin A. A., 2021]. Большую долю состава эритроцита занимает вода (70%), гемоглобин- 25% и в меньшей степени (5%) от общего состава приходится на липиды, сахара и ферментные белки. Зрелый эритроцит — нормоцит, неподвижен и оксифилен, не имеет ядра и клеточных органелл [Воробьев А. И., 2005]. При физико-химическом воздействии и нарушении внутриклеточного объема около 3% данных клеток имеют неправильную форму [Козинец Г. И., 2004]. Поддержание дискоидной формы обусловлено отрицательным осмотическим давлением внутри клетки [Сынин В. В. и др., 2005], состоянием мембраны, стромы эритроцита и работой  $\text{Na}^+$ -помпы [Ройтман Е. В., 2001]. Эти клетки способны менять свой диаметр при сдвиговых напряжениях или при прохождении через капилляр меньший в диаметре, принимая при этом разные формы, и восстанавливаться в дискоцит при устранении воздействий [Зинчук В. В. И др., 2003].

Мембрана определяет гомеостаз и функциональное состояние эритроцита. Она составляет 1 % от веса самой клетки [Воробьев А. И., 2005]. Наличие на мембране рецепторов, гормонов и биологически активных веществ, способствующих их реализации. В мембране эритроцитов выделяют три структурных элемента: двойной слой липидов, белки мембраны и цитоскелет [Воробьев А. И., 2005]. Они являются взаимостабилизирующими в поддержании асимметрии эритроцитарной мембраны. [Новицкий В. В. и др., 2004; Погорелов В. М. и др., 2004]. В норме размеры эритроцитов человека и содержание в них гемоглобина различаются в зависимости от возраста, пола, климатогеографических

условий проживания, времени суток, от возраста самих клеток, от места забора крови для анализа и метода определения их параметров. [Погорелов В. М. и др., 2004; Воробьев А. И., 2005; Мищенко В. П. и др., 2005]. Количество эритроцитов у новорожденных в артериальной и венозной крови практически одинаково, разброс значений находится в пределах от 3,6 до  $4,6 \cdot 10^{12}/л$  [Жадова О. И. и др., 2012; Румянцев А. Г., Румянцев С. А., 2012], средний диаметр 7,8 мкм., размер 6,5-9,2 мкм. [Воробьев А. И., 2005]. В течение первых часов жизни общая концентрация гемоглобина повышается до 165-225 г/л, через несколько дней и к концу первого месяца достигает значений взрослого человека [Шабалов Н. П., 2009]. Появление в крови эритроцитов с большим диаметром (макроцитов) происходит при стрессовом эритропоэзе, под влиянием неблагоприятных факторов (дефицит железа, белка, микроэлементов, витаминов, солнечного света), это приводит к истощению компенсаторных систем, в связи с чем, в кровотоке появляются одновременно микро и макроциты.

Эритроциты — эластичные безъядерные клетки двояковогнутой формы. Являясь высокоспециализированными клетками, выполняют транспортную функцию. Обеспечивают перенос кислорода из легких к тканям и углекислоты в обратном направлении. Жизненный цикл эритроцита составляет около 120 дней. Снижение образования в них аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) приводит к старению клетки. Морфологический состав эритроцитов крови здоровых людей, в большей степени, представлен дискоцитами (97%). Определенная особенность цитоскелета и клеточной мембраны позволяют эритроцитам производить значительные деформации и восстанавливать форму [Мороз В. В. и др., 2010; Мягкова Е. А., 2014]. Дискоцит имеет геометрическую форму (сплюснутый сфероид) и гладкую поверхность с углублением в центре (пэллор). Диаметр клетки составляет от 7,0 до 8,2 мкм. Эритроциты с неправильной формой составляют 3% от общего количества клеток. Эта группа включает эхиноциты, стоматоциты и сфероциты [Akrimi J. et al., 2013]. Эхиноциты - диски с шипами без углубления, диаметром от 5,5 до 14 мкм [Constantino V. T., 2011], у стоматоцитов имеется центральное просветление неправильной формы в виде линии и напоминает ротовое отверстие. Клетки шаровидной формы с большей толщиной и с

утраченным центральным просветлением относят к сфероцитам [Khairy K. et al., 2008].

Регенеративные эритроциты имеют обратимые изменения мембраны, дегенеративные изменения характерны для стареющих эритроцитов. Стареющие формы клеток в небольшом количестве постоянно присутствуют в крови здорового человека. В результате жизнедеятельности происходит апоптоз и замена их на нормоциты, которые образуются в костном мозге при эритропоэзе.

У новорожденных детей в раннем неонатальном периоде отмечается ускоренный эритропоэз. Для них характерно увеличение количества ретикулоцитов и чем ниже срок гестации, тем выше их количество. Количественная зависимость от пола отсутствует. Срок гестации не влияет на распределение ретикулоцитов по степени зрелости [Серебрякова Е. Н., 2020]. У недоношенных новорожденных высокие показатели фракций незрелых ретикулоцитов отмечены при рождении, в дальнейшем происходит постепенное снижение этих показателей. Экстремально низкая масса тела оказывает влияние на количество и фракции незрелых ретикулоцитов. Клеточный состав эритроцитов у здоровых новорожденных в периферической крови представлен единичными нормобластами, увеличенное их количество отмечается у недоношенных новорожденных, чем у доношенных. Появление нормобластов в периферической крови новорожденных считается неблагоприятным прогностическим признаком [Christensen R. D. et al., 2011]. При снижении срока гестации, происходит увеличение показателей MCV (mean cell volume, средний объем эритроцитов), MCH (mean cell hemoglobin, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах), RDW (red cell distribution width, ширина распределения эритроцитов по объему). У здоровых доношенных новорожденных, напротив, неонатальный период характеризуется снижением вышеобозначенных параметров: MCV, MCH, RDW [Tonbul A. et al., 2011; Серебрякова Е. Н., 2020]. Возможность использовать референсные значения для доношенных и недоношенных новорожденных представляется возможной в возрасте 20 недель [Takala T. I. et al., 2010].

Плазматическая мембрана эритроцита выполняет важную роль в переносе газов крови и ионов. Ее механические свойства и структурная организация зависят от функционального состояния клетки. Возникающие изменения в биологических

мембранах могут являться пусковым механизмом активации патологических процессов. Структура мембраны эритроцита представлена тонким липидным бислоем (различные фосфолипиды), периферическими, интегральными белками (оказывают влияние на процессы жизнедеятельности клетки) и цитоскелетом [Kim.Y. et al., 2017]. Взаимосвязь белков и липидов обеспечивает стабильность мембраны эритроцита [Бабушкина И.В. и др., 2017]. Самая большая часть поверхности мембраны принадлежит белкам; это барьер между окружающей средой и цитоплазмой эритроцитов. Тетрамеры спектрина представляют белковую сеть цитоскелета эритроцита, связанного с анкирином. Анкирин играет важную роль в организации мембраны аксона [Hurut R. R. et al., 1998]. Анкирин и белок 4.1R связывает цитоскелет с липидным бислоем [KimY. et al, 2017]. От тетрамера, на внутренней поверхности мембраны, отходят две спирали, которые образует спектрин. Белковые комплексы обеспечивают крепление к белку полосы 3 [Lux S.E., 2016]. В результате соединения актиновых колец, которые располагаются вдоль аксона, цитоскелет представляется двумерным цилиндром. Расстояние между актиновыми кольцами в аксоне в 2 раза больше, чем размер ячеек сети цитоскелета у эритроцитов и составляет 180-190 нм [Zhang Y. et al., 2017]. Формируя мембранный скелет, часть белков обеспечивают основу внутренней поверхности мембраны каркасом толщиной от 40 до 90 нм, [Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С.Л., 2007; Lux S.E., 2016]. Ячейки сети цитоскелета имеют размер 80-100 нм [Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л., 2007].

«Фликеринг» (мерцание) – колебательное движение мембраны [Jaferzadeh K. et al., 2019]. Максимальный размах его в физиологически нормальной среде составляет 0,4 мкм [Kro A.Y. et al., 1990], это около 5% от среднего диаметра эритроцитов. Уменьшение АТФ приводит к снижению фликеринга, изменяет двояковогнутую форму эритроцитов [Park Y. K. et al., 2010]. Изменения колебательных движений мембраны могут приводить к изменению формы клеток и их упругих свойств. Важное значение имеет количественный параметр изменения структуры мембран - шероховатость клетки. Различные изменения в виде дефектов на мембране эритроцитов могут приводит к изменению шероховатости. Нарушение этого показателя может достигать 50% в сравнении с нормальными клетками [Girasole M. et al., 2010]. Влиянию радикалов подвержен и цитоскелет эритроцитов

[Боровская М. К. и др., 2010]. В результате их пагубного влияния, происходит нарушение связанных комплексов спектрин - актин и спектрин – анкирин. Уменьшение связи между липидным бислоем и сетью цитоскелета влияет на стабильность мембраны и её структуру [Zhang R. et al., 2012] и влечет за собой значимые изменения морфологического состава эритроцитов. Белки полосы 3 отвечают за поддержание формы, появление деформации клетки и являются индикатором патологии. Процесс изменения морфологического состава включает трансформацию дискоцитов в эхиноциты или сфероэхиноциты и изменения мембраны; появляются различные дефекты [Новицкий В. В. и др., 2004; Ламзин И. М., Харуллин Р. М., 2014; Kozlova E. et al., 2018].

Повреждение связи между белками полосы 3 и спектринными филаментами способствует увеличению кластеризации белков полосы 3 [Kriebardis A. G. et al., 2007], и как следствие, мембрана эритроцита воспринимается иммунной системой как чужеродная; клетки выводятся из кровотока [Cata J. P. et al., 2013; Desai P.C. et al., 2015]. Интересным является тот факт, что за счет высвобождения везикул, эритроциты убирают поврежденные липиды и белки, чтобы исключить свое дальнейшее удаление из кровотока [Новицкий В. В. и др., 2004, Willekens F. L. A. et al., 2008].

Мембрана эритроцитов новорожденных характеризуется сниженной текучестью, проницаемостью и низким количеством липидов. Между недоношенными и доношенными новорожденными присутствуют различия в активности эритроцитарных ферментов (низкая активность СОД1, увеличенная активность Г-6-ФДГ и ГПО). Повышенная стабильность и устойчивость к повреждающим факторам выявлена в позднем неонатальном периоде, это указывает на изменение процесса и стабилизацию физиологических характеристик эритроцитарных мембран [Ruef P. et al., 2011].

Основную массу белков цитоплазмы эритроцита составляет гемоглобин (98%). Гемоглобин является гетеродимерным тетрамером, имеет две цепи глобина типа  $\alpha$  и две цепи другого типа ( $\beta$ ,  $\gamma$  или  $\delta$ ), которые соединены с молекулами гема, обеспечивая связку и транспорт не более четырех молекул  $O_2$ . Гемоглобин типа А (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ) - нормальный тип гемоглобина является основным типом гемоглобина взрослого человека; фетальный гемоглобин (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ) характерен для плода.

Замена HbF на HbA происходит в конце внутриутробного периода [Кривенцев Ю. А. и др., 2012; Сахарова Е. С. и др., 2015; Серебрякова Е. Н., 2020].

В неонатальном периоде и в последующие месяцы жизни ребенка уровень HbF снижается, и в возрасте 6 месяцев - количество HbF у большинства детей составляет менее 1%. Отмечена связь фетального гемоглобина при рождении с гестационным возрастом, чем ниже гестационный возраст, тем выше его уровень [Jopling J. et al., 2009; Ruef P. et al., 2011].

Особенность строения эритроцита, его способность к деформации, позволяет ему проходить через узкие просветы капилляров и обеспечивать адекватный транспорт кислорода [Higgins J. M. et al., 2009]. Способность беспрепятственно передвигаться по микроциркуляторному руслу, обеспечивает правильное кровообращение и поддерживает необходимый режим процессов диффузии газов. Нарушение этого процесса приводит к достаточно выраженным нарушениям гомеостаза и гемодинамики [Карпун Н. А. и др., 2013]. Нарушения реологии крови играют важную роль, вязкость крови, снижение количества гемоглобина, величины гематокрита, повышение вязкости плазмы усиливает агрегацию эритроцитов и может стать следствием нарушения газотранспортной функции и уменьшения доставки кислорода к тканям [Горионов А.С. и др., 2009]. Помимо перечисленных изменений, нельзя исключить и изменение свойств мембраны эритроцитов. [Reggiori G. et al., 2009].

Возникающие изменения функционально-метаболического комплекса и энергетического обмена в клетке являются следствием влияния гипоксии, степень выраженности изменений зависит от тяжести и длительности гипоксического воздействия. Гипоксия, независимо от генеза, может приводить к значительной гиперплазии эритроидного ростка кроветворения. Активация системы эритрона влияет на эритропоэз и способствует появлению молодых форм эритроцитов [Леонова Е.В. и др., 2009].

Основная причина развития гипоксии - нарушение транспорта кислорода, который зависит от ряда причин и подразделяется на несколько этапов: - респираторный; - гемический; - транспортный [Чеснокова Н. П. и др., 2006]. Потребность самого эритроцита в кислороде мала, глюкоза необходима ему как источник энергии. Так, в результате уменьшения активности гликолиза, в

эритроците происходит накопление ионов  $\text{Na}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и воды, которое способствует повреждению мембраны и снижает механическую и осмотическую устойчивость эритроцита, ускоряя разрушение клетки. Достаточно большое содержание кислорода в эритроцитах способствует быстрой скорости образования активных форм кислорода - супероксидного аниона, гидроксильного радикала, пероксида водорода, благодаря неферментативному окислению гемоглобина в метгемоглобин. Красные клетки имеют мощную систему антиоксидантных ферментов. Они предотвращают токсическое действие активных форм кислорода на гемоглобин и эритроцитарную мембрану [Серебрякова Е. Н., 2020]. Система антиоксидантных ферментов имеет большое значение, она обеспечивает связь эритроцитов с активными формами кислорода, которые продуцируются полиморфноядерными лейкоцитами и снижает интенсивность оксидативного стресса. Благодаря запасам клеточного мембранно-связанного мультимолекулярного ферментного комплекса, глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион, а глутатионсинтетаза обеспечивает образование глутатиона [Bracci R. et al., 2002].

## **1.2. Резистентность эритроцитов**

Осмотическая резистентность эритроцитов (ОРЭ) является универсальным показателем состояния мембран красных клеток. Эти клетки лишены ядра, а мембрана обладает сходством с мембранами клеток других тканей и органов [Мойсеенко В. А. и др., 2007]. Таким образом, эритроциты являются удобной моделью для анализа любых изменений, возникающих в их мембранах. Мембрана эритроцитов чувствительна к воздействию физических и химических факторов [Задорожная Г. А. и др., 2010]. Она является барьером между цитоплазмой и внеклеточной средой, осуществляет транспорт различных веществ и ионов, обеспечивая гомеостаз клетки и отвечает за связи между близкорасположенными клетками, так и удаленными друг от друга.

Факторы извне, воздействующие на клетку, способны менять её физиологические показатели. Энергетические и биохимические процессы эритроцитов зависят от целостности мембраны. В результате увеличения проницаемости мембран красных клеток, скорость диффузии ионов и других

веществ, меняется и влияет на протекающие процессы внутри клетки. Повреждающее действие различных факторов влияет на изменения структуры мембраны эритроцита, нарушения вязкости и проницаемости мембраны.

Процесс нарушения и повреждения мембраны эритроцита имеет два пути, первый из которых включает повреждения фосфолипидного бислоя мембран, вследствие интенсификации процессов перекисного окисления липидов. Причиной вышесказанному является угнетение активности антиоксидантной системы клетки. [Дудукин С. Г., 2020]. Вторым путем характеризуется интенсификацией процесса гидролиза фосфолипидов мембраны из-за активации эндогенной фосфолипазы А2. В мембране эритроцита происходит накопление производных липидов, свободных жирных кислот и других продуктов перекисного окисления липидов. Действия этих процессов могут быть взаимосвязанным или протекать отдельно друг от друга и приводить к повреждению фосфолипидного бислоя, в результате чего нарушаются барьерная и транспортная функция мембраны (нарушается ее целостность) [Мойсеенко В. А. и др., 2007; Куликов В. Ю. и др., 2010; Дудукин С. Г., 2020].

Уникальное строение безъядерных красных клеток, лишенных многих органоидов, характерных для других клеток, обуславливает их уникальные функции и возможность наиболее полно использовать внутриклеточное пространство [Мойсеенко В. А. и др., 2007; Задорожная Г. А. и др., 2010].

Клеточная мембрана эритроцита имеет достаточно однородную структуру с небольшими неровными участками. На мембране эритроцита расположены ферментные комплексы антиоксидантной системы, которые обеспечивают процессы гликолиза, пентозофосфатного цикла, реакции обмена, необходимые для усвоения энергии анаэробным путем. Влияние определенных факторов может приводить к значительным изменениям поверхности эритроцита. Деструкция поверхности проявляется изменением молекулярной структуры фосфолипидного бислоя, нарушением взаимодействия "белок-липид" и изменением модификации цитоскелета клетки [Трошкина Н. А. и др., 2007; Дудукин С.Г., 2020].

Адаптация организма включает в себя реакции приспособления к экстремальным воздействиям внешней среды. Реакции организма направлены на сохранение относительного постоянства внутренней среды; важную роль в этом процессе играет резистентность эритроцитов [Куликов В. Ю. и др., 2010; Дудукин

С. Г., 2020]. Резистентность характеризуется способностью эритроцита выдерживать до определенных пределов воздействие механических, химических, осмотических, температурных факторов. Данная способность клеток крови зависит от возраста форменных элементов и уменьшается по мере их старения [Андреева А. М, Рябцева И. П., 2011].

Оценка осмотической резистентности эритроцитов - весьма информативный тест, позволяющий определить состояние мембран, которое играет ключевую роль в обеспечении их резистентности к различным факторам [Задорожная Г.А. и др., 2010]. При изменении показателей можно судить о степени поврежденности мембраны после воздействия какого-либо фактора. Полученные результаты можно экстраполировать и на другие клетки и на основе полученных данных выдвигать предположения о том, какое влияние может оказывать данный фактор на мембраны [Мойсеенко В. А. и др., 2007].

Метод ОРЭ основан на явлении осмотического гемолиза эритроцитов, при помещении клеток в гипотонический раствор хлорида натрия NaCl. Так, в цитоплазме эритроцитов концентрация белков выше по сравнению с плазмой крови, а содержание низкомолекулярных веществ ниже. Таким образом, белки плазмы формируют онкотическое давление, которое не уравнивается полностью осмотическим давлением, возникающим из-за градиента концентраций низкомолекулярных веществ [Дудукин С. Г., 2020]. Эритроцит имеет специфическую форму в виде двояковогнутого диска; высокое отношение площади поверхности к объему обеспечивает ему значительную деформируемость. При помещении эритроцитов в гипотонические растворы NaCl (концентрация ниже 0,9%), осмотическое давление в цитоплазме эритроцита увеличивается и активизирует поток молекул воды в клетку по градиенту ее концентрации. Процесс набухания способствует увеличению клетки в объеме до значительных размеров с сохранением радиуса и изменению ее формы (дискоцит переходит в сфероцит). В результате высокого осмотического давления происходит разрыв плазматической мембраны, гемолиз и выход гемоглобина [Дудукин С. Г., 2020]. В сопротивлении внешнему воздействию на эритроцит принимают участие все компоненты мембраны, включая цитоскелет. Последовательные изменения затрагивают не только поверхностные структуры мембранного комплекса, но и глубокие слои, это

сопровождается денатурацией встроенных белков, в том числе интегральных, приводит к последующей глобальной перестройке локальных вязких структур [Борисов Ю. А. и др., 2007]. Тест на резистентность мембраны - это тест на ее способность противостоять образованию пор именно критического радиуса, которое влечет образование необратимых нарушений в липидном слое (сдвиг кислотной и осмотической резистентности эритроцитов) и может служить ранним маркером изменений функционального состояния эритроцитов при воздействии вредных и опасных факторов [Борисов Ю. А. и др., 2007; Савлуков А. И. и др., 2011; Дудукин С. Г., 2020].

### **1.3. Адренореактивность эритроцитов, как индикатор состояния организма**

Регуляция адренергической системы очень важна и необходима для поддержания механизмов и жизненно важных функций в организме на любом этапе развития организма. Установлено, что качественная и функциональная характеристика эритроцитов отражает состояние организма [Hines P. S. et al., 2003]. Изменения адренореактивных свойств тканей организма (мембранная и клеточная структура) и клеток (эритроциты) под действием катехоламинов имеют однонаправленный характер [Bristow M. R., 2000]. Катехоламины действуют на клетки-мишени через рецепторы, локализованные в плазматических мембранах. Симпатоадреналовая система обеспечивает поддержание гомеостаза при изменении условий внешней среды [Olofsson P., 2023]. Адренореактивность - функциональное состояние адренорецепторов, возникающее в результате реакции организма на изменение симпатоадреналовой системы. Она изменчива и зависит от ряда факторов [Тихомирова И. А., 2006; Крысова А. В. и др., 2013].

На мембране эритроцитов обнаружены молекулы адгезии, которые отвечают за внешние стимулы при действии адренергических гормонов. Установлено, что на мембране эритроцита локализованы  $\alpha 1$ -АР,  $\alpha 2$ -АР,  $\beta 1$ -АР,  $\beta 2$ -АР и  $\beta 3$ -АР [Lamsadze G. et al., 2011], число их на одном эритроците составляет от 90 до 300. Связывание адренорецепторов с адренергическими веществами вызывает функциональные изменения в клетках [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003; Тихомирова И. А. 2006]. На это взаимодействие влияет ряд факторов и может изменяться при различных

патологических состояниях или периода жизни человека. [Трошкина Н. А. и др., 2007]. При повышении уровня катехоламинов в крови, уменьшается количество адренорецепторов на мембранах крови. Свойства рецепторов зависят от молекулярной структуры, от сопряженности с белками, от особенностей регуляции экспрессии и кодирующих рецепторов генов. Онтогенетическая незрелость эритроцитов, проявляющаяся прежде всего незрелостью  $\beta$ -адренорецепторов [Молокова А. В., Казначеева Л. Ф., 2004], стала основой адренорецепторных нарушений концепции патогенеза аллергических заболеваний и характеризовала себя как генетически детерминированная мембранорецепторная патология [Федосеев Г. Б, Трофимов В. И., 2006]. Идентичность  $\beta$ -адренорецепторов отмечена между эритроцитами крови и гладкой мускулатуры бронхов [Минеев В. Н. и др., 2004]. Эта универсальная особенность позволяет использовать последние для изучения. Данные, полученные при использовании разных методов определения функционального состояния адренорецепторов мембраны эритроцитов [Циркин В. И., 2011], вносят новые представления о физиологии эритроцитов, о роли  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов в изменении агрегационной способности, об особенностях адренореактивности организма и функциональных свойств эритроцитов в норме и при различной патологии [Козочкин Д. А. и др., 2019].

### **1.5. Оценка состояния эритроцитов**

Определение морфофункциональных характеристик эритроцитов имеет важное значение, являясь неотъемлемыми параметрами общего анализа крови [Серебрякова Е. Н., 2020].

Состояние реологических свойств - важный компонент оценки микроциркуляции крови. Агрегация эритроцитов различается по видам: в регулярном сдвиговом потоке, при остаточном движении в микроскопической кювете, при оседании эритроцитов и при ультразвуковых колебаниях. Исследование кинетики образования эритроцитарных агрегатов у человека в норме и патологии происходит с применением вискозиметрических приборов, используют и абсорбционные фотометрические методы, основанные на интенсивности поглощения света. Биологическое состояние мембраны клетки тесно связано с

поверхностным зарядом, о наличии заряда можно судить по электрофоретической подвижности клеток. Таким образом регистрация перемещения клеток крови в электрическом поле позволяет оценить не только их электрокинетический потенциал (морфофункциональное состояние мембран), но и состояние гомеостаза организма в целом.

Резистентность эритроцитов тесно связана с функциями и возрастом красных клеток. При нормально протекающих физиологических процессах, соотношение эритроцитов с разной кислотной резистентностью, стабильно. Такое соотношение указывает на динамическое равновесие в системе эритрона. Воздействие на мембрану эритроцита повреждающих факторов разной этиологии влияет на соотношение между эритроцитами с разной кислотной устойчивостью и способствует сдвигу нормального протекающего процесса. Возникающие окислительные процессы и метаболические сдвиги способствуют появлению изменений в структурных компонентах мембран. На данный момент изучение устойчивости эритроцитов остается актуальным [Длусская И. Г. и др., 1991; Михайлис А. А., 2009; Алачева Л. В. и др., 2010, Кочарли Н. К. и др., 2012], но ему уделяется недостаточное внимание.

Мазок периферической крови под световым микроскопом необходимо анализировать у новорожденных и пациентов отделений интенсивной терапии [Льюис С. М. и др., 2009, Weimann A. et al., 2009]. У взрослых и у новорожденных подсчет ретикулоцитов и нормобластов сопоставим с подсчетом на анализаторе [Ali A. F. et al., 2010, Simionatto M. et al., 2010, Christensen R. D. et al., 2011]. Анализ ретикулоцитов в клинической практике позволяет провести анализ активности костномозгового эритропоэза [Льюис С. М. и др., 2009]. Актуальным для оценки здоровья детей является изучение клинической значимости параметров эритроцитов с применением современных научно-исследовательских подходов [Серебрякова Е. И., Волосников Д. К., 2011].

Метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) относят к разновидности зондовой микроскопии. Он один из самых перспективных методов изучения структурных особенностей макромолекул, который позволяет подробно изучить изображение объектов с высоким разрешением, он аналогичен уровню рентгеноструктурного анализа, без жесткой обработки макромолекул. В настоящее

время метод активно и достаточно широко используется для изучения структурных изменений, особенностей биологических макромолекул [Кусельман Ю. Н. и др., 2010].

Разные способы подготовки эритроцитов для исследования методами АСМ отличаются по фиксации клеток для получения качественных изображений клеток крови. Есть метод с фиксацией в растворах глутарового альдегида и без нее [Лобов И.А., Давлеткильдеев Н.А., 2013]. Для фиксирования результатов применяют специальные зондовые датчики. Датчики представляют упругую консоль на конце с острым зондом. Сила со стороны поверхности, действующая на зонд, приводит к изгибу консоли, перемещаясь относительно поверхности и реагируя на силовое взаимодействие [Миронов В. Л., 2004]. Качественный анализ изображений методом АСМ проводится после фиксации объектов на поверхности, с применением кристаллической слюды (имеет атомарно-гладкую поверхность), стекла, сапфировых пластин и т.д.

Наиболее полные и информативные данные получены с применением метода атомно-силовой микроскопии о структуре эритроцита и строении их цитоскелета. [Дрозд Е. С. и др., 2009]. По результатам проведенных сканов поверхности мембраны эритроцита был проведен расчет его объема и высотных геометрических характеристик [Нагорнов Ю. С. и др., 2013]. АСМ служит современным нанотехнологическим инструментом. С помощью его можно проводить измерения локальной упругости мембран клеток, эти данные необходимы для определения модуля Юнга и поверхностного потенциала эритроцитов и сред с эритроцитами [Ламзин И. М., Харуллин Р. М., 2014]. Методы сканирующей электронной, интерференционной и атомно-силовой микроскопии позволяют анализировать ультраструктуры эритроцитов и получать изображения эритроцитов в трехмерном формате с расчетом коэффициента сферичности их, количественно характеризующего способность эритроцитов к выполнению ими кислородтранспортной функции [Льюис С. М. и др., 2009].

## **1.6. Период ранней адаптации**

Патология плода может приводить к нарушению или невозможности

адаптации ребенка к вне утробной жизни. Адаптация включает в себя совокупность реакций организма матери и ребенка, направленных на поддержание физиологических констант [Шабалов Н. П., 2009; Азарова Е. В. и др, 2015а; 2015б]. Адаптационные особенности в период новорожденности зависят от организма матери, течения беременности и родов. Тогда как адаптационный процесс зависит от степени зрелости новорожденного, его неврологического статуса, выраженности патологического процесса. Оценка состояния новорожденного, в первую очередь, дает возможность определить его жизнеспособность и возможность адаптации к внешним факторам в течение первых пяти дней жизни [Азарова Е. В. и др., 2015а; 2015б]. Анализ гипоталамо-адреналовой системы позволяет установить фазы напряжения, угнетения и срыва адаптации.

Адаптация подразделяется на несколько видов: - функционирование органов без каких-либо отклонений; - адаптацию при чрезвычайном напряжении организма (гиперадаптация); - адаптацию, возникающая в результате воздействия патологических процессов, протекающих в организме [Шабалов Н. П., 2004].

Неонатальный период длится первые 4 недели внеутробной жизни и составляет 28 дней. Он в свою очередь подразделяется на: ранний неонатальный период (первые 7 дней жизни) и поздний неонатальный период (до 28 дня жизни). Поздний неонатальный период характеризуется окончанием адаптационных процессов важнейших жизненных функций практически у всех новорожденных. Он является самым важным, чем любой последующий. У недоношенных новорожденных он занимает особое место, так как связан с вопросами выживания и дальнейшего развития, находится в тесной связи с диагностикой угрожающих заболеваний и их целенаправленным лечением [Хазанов А. И., 2014].

Сам перинатальный период чрезвычайно важен и характеризует окончание внутриутробного формирования плода. Период жизни, который включает роды и ранний постнатальный период, сам по себе уникален, так как характерен экстремальными воздействиями, требующими непрерывной смены механизмов адаптации [Елизарова М. Г. и др., 2005]. Функциональная готовность здорового плода наступает к концу беременности, он полностью готов к самостоятельной жизни вне тела матери. Процесс родов подвергает новорожденного к воздействию многих факторов, а в раннем неонатальном периоде он проходит адаптацию к

внеутробной жизни. Перинатальный период является чрезвычайно важным периодом, он предопределяет постнатальное развитие и здоровье новорожденного [Азарова Е. В. и др., 2015а; 2015б].

Очень большая вероятность возникновения риска для жизни, здоровья и развития человека отмечается на раннем этапе онтогенеза (пренатальный и ранний неонатальный периоды). Ранней неонатальный период характерен напряжением адаптивных процессов даже у доношенных новорожденных при нормально протекающей беременности. Этот этап характеризуется множеством повреждающих агентов. Адаптация в этом периоде протекает с участием сложного комплекса нейроэндокринных изменений за счет становления реакций энергетического гомеостаза.

*Первые 7 дней жизни новорожденного включают несколько стадий:*

1. В первые 30 минут жизни происходит максимальное напряжение адаптивных реакций организма (острая респираторно-гемодинамическая адаптация). При нормальных родах плацентарная трансфузия заканчивается в течение 3 мин. после рождения ребенка. Пережатие по рекомендации ВОЗ должно происходить через одну - три минуты после рождения, по клиническим протоколам не ранее 1 минуты или после прекращения пульсации [Клинический протокол, 2015] разными способами [Katheria A. et. al., 2019; Orpak, Ü. S. et. al., 2019]. Недавние исследования показали преимущества отсроченного пережатия [Anton O. et. al., 2019; Cavallina F. et. al., 2019; Rabe H., Andersson O., 2019; Rana N. et. al., 2019; Nestor E. et. al., 2019; Sloan M., 2019; Zhao Y. et. al., 2019; Терекулова А. С., Джардемалиева Н. Ж. 2020], но внедрение его не нашло своего применения в практической деятельности.

2. Аутостабилизация сопровождается синхронизацией основных функциональных систем в условиях внеутробной жизни. Подключаются адаптационные сдвиги со стороны органов и систем к внеутробным условиям существования. Происходит становление легочного дыхания, стабилизируется внеутробное кровообращение, претерпевают изменения морфологические и физикохимические особенности крови, начинают функционировать органы пищеварения, активизируется собственная терморегуляция, повышается обмен веществ [Полин Р. А., Спитцер А. Р., 2013; Азарова Е. В. и др., 2015а].

Во время родов у плода значительно снижается парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ), повышается  $pCO_2$  и снижается  $pH$ , в связи с этим возникает импульс от рецепторов аорты и сонной артерии к дыхательному центру. Дыхательный центр пребывает в состоянии возбуждения. Наряду с этим поступают сигналы и с раздражения кожных рецепторов, вследствие перехода ребенка от внутриутробного окружения к пребыванию в атмосфере. При сокращении диафрагмы, отрицательное давление способствует поступлению воздуха в дыхательные пути и легкие, которые заполнены вязкой жидкостью. Жидкость достаточно быстро начинает поступать в лимфатические сосуды и кровеносные капилляры и начинается газообмен. В дальнейшем регуляция дыхания осуществляется преимущественно дыхательным центром. У недоношенных детей апноэ наиболее часты и длительны, причем, чем меньше масса тела, тем чаще и длительнее апноэ, это указывает на недостаточную зрелость дыхательного центра.

Период поздней неонатальной адаптации характеризуется стабилизацией гомеостатической функции почек. Происходит выделение избытков ионов водорода (нелетучих органических кислот), воды, азотистых соединений, калия, кальция, натрия, неорганических фосфатов; происходит колонизация микробов, становится активным пассивный гуморальный иммунитет, осуществляется адаптация к пищевым ингредиентам, синтез и активация ферментов расщепления и всасывания, начинает работать собственная система детоксикации печени [Азарова Е. В. и др., 2015б]. Переходные состояния, возникающие при внеутробном существовании, такие как: транзиторные нарушения гипервентиляции, кровообращения, желез внутренней секреции, потери первоначальной массы тела, теплового баланса, изменения кожных покровов, метаболизма, гемостаза и гемопоза, функций почек, имеют свои характерные особенности и не зависят от жизнеобеспечения плода и тех функций, которые до рождения выполнял организм матери [Азарова Е. В. и др., 2015б]. При осложнении течения беременности и родов особое место занимает гипоксия плода [Шабалов Н. П., 2006, Володин Н. Н., 2013]. Единая физиологическая система «плод – плацента – материнский организм», защищает плод от неблагоприятных воздействий окружающей среды, его состояние определяется состоянием здоровья матери, ее возрастом, течением гестации и социально-психологическим статусом [Азарова Е. В. и др., 2015б]; Сукало А. В. и

др., 2015; Liss J., Chromik I., 2016; Chauhan S. P. et.al., 2017; Пахомов С. П. и др., 2018; Пицхелаури Е. Г. и др., 2018; Stalman S. E., 2018; Алигаджиев М. А., 2019]. При развивающихся патологических процессах в системе мать – плацента – плод может развиваться перинатальная гипоксия плода и новорожденного.

Гипоксия - это сложный процесс, в который вовлекаются органы и системы (головной мозг, сердечно-сосудистая система, почки и костный мозг) [Агаджанян Н. А., Смирнов В. М., 2009; Шунькина Г. Л., 2011; Солкина А. А. и др., 2012; Даваа Я. Х., 2012]. Перинатальная гипоксия (асфиксия) и ее последствия занимает одно из первых мест среди заболеваемости и смертности у детей в первый год жизни [Rajaratnam J. K. et al., 2010; Байбарина Е. Н., Дегтярев Д. Н., 2013; Donn S. M. et al., 2014]. Проведение реанимационных мероприятий и современных нейропротективных стратегий не исключает влияния тяжелой сочетанной (анте- и интранатальная) асфиксии на новорожденных. Она оказывает влияние на рост, развитие плода в целом, на состояние отдельных органов и систем с разнообразной клинической картиной [Durkan A. M., Alexander R. T., 2011; Sweetman D. et al., 2011; Marret S. et al., 2014,] и вызывает гибель 0,5–3% новорожденных [Martinez V. M. et al., 2011; Singhal N. et al., 2011; Володин Н. Н., 2013].

### **1.7. Современные представления о гипоксии плода**

Гипоксия плода - комплекс изменений в организме плода под влиянием нарушения снабжения кислородом органов и тканей [Савельева Г. М., 2000]. В зависимости от продолжительности, гипоксию плода делят на острую, подострую и хроническую. Подразделяют на:

- гемическую (связывание кислорода гемоглобином происходит при анемии плода, врожденном или наследственном дефекте);
- гипоксическую (при снижении оксигенации крови);
- циркуляторную (в результате нарушения транспорта кислорода);
- тканевую (при нарушении потребления кислорода тканями организма).

Преплацентарная гипоксия является следствием наличия заболеваний у матери, которые влияют на транспорт кислорода. Маточно-плацентарная гипоксия возникает при нарушении плацентации и изменений в спиральных артериях. При

снижении маточно-плацентарного кровотока, нарушении целостности матки, компрессии сосудов пуповины и тромбозе её артерий, развивается постплацентарная гипоксия [Burton G. J. et al., 1996; Kingdom J. C., Kaufmann P., 1997; ко А. М., 2022].

При нарушении транспорта  $O_2$  от плаценты к плоду - происходит усиление кровотока к определенным органам плода (головному мозгу, сердцу и печени), снижение периферического кровообращения и развитие ацидоза. Метаболический ацидоз способствует изменению обменных процессов, с переходом на анаэробный гликолиз. Для улучшения оксигенации, у плода компенсаторно увеличивается ЧСС, однако при декомпенсации - ЧСС снижается, уменьшается скорость кровотока в капиллярах, а также в прилегающих к ним мелких артериях и венах, и как следствие – происходит нарушение газообмена. Декомпенсированный ацидоз может быть причиной отека тканей и кровоизлияний в жизненно важные органы новорожденного [Приходько А.М., 2022]. Логично, что в результате длительного дефицита  $O_2$  в крови происходит снижение компенсаторных реакций организма, снижается оксигенация, увеличивается парциальное давление  $CO_2$ , и усиливается метаболический ацидоз. Пониженная оксигенация тканей приводит к повреждению органов, в первую очередь, страдают почки и надпочечники плода (снижается уровень катехоламинов) [Yıldız E. P. et al., 2017].

Метаболический ацидоз характеризуется неспецифичными признаками и симптомами, диагностика его основывается на данных лабораторных исследований. Тип ацидоза новорожденных определяют по показателям кислотно-основного состояния (КОС) крови, взятой из артерии и вены сосудов пуповины. Параметры КОС остаточной пуповинной крови характеризуют связь между течением родов и состоянием новорожденного в раннем неонатальном периоде. Дефицит  $O_2$  в органах и тканях плода, возникающий в результате нарушения его утилизации и влияния материнских, плацентарных или плодовых факторов, способствует развитию интранатальной гипоксии плода (тканевая гипоксия во всех внутренних органах с избытком недоокисленных продуктов обмена в результате анаэробного гликолиза). Следует отметить, что показатели газового состава крови являются объективными данными для оценки состояния новорожденного и используются в качестве основных маркеров для оценки степени выраженности

интранатальной гипоксии [Ross M.G. et al., 2019; Приходько А. М., 2022].

Оценку КОС следует проводить во всех родах. Определение КОС в сосудах пуповины является наиболее объективным методом оценки состояния ребенка при рождении и определения последующего прогноза. Чаще всего, в клинической практике используют показатели - рН и ВЕ, для диагностики и определения степени и характера перенесенной гипоксии [Hankins G.D., Speer M., 2003; Wiberg-Itzel E. et al., 2008; Westerhuis M.E.M.H. et al., 2010].

Респираторный ацидоз (снижение рН крови менее 7,35) возникает в первые 30 минут от момента воздействия этиологических факторов. Установленный дыхательный ацидоз позволяет определить исходный уровень рН и начало появления ишемических нарушений до момента регистрации гипоксических изменений. Тогда как при метаболическом ацидозе не представляется возможным установить точное время начала гипоксии. Метаболические нарушения при асфиксии характеризуются изменением величины рН, парциального давления кислорода, лактата и ВЕ [Nodwell A. et al., 2005]. Взятие биологического материала, по возможности, проводится из определенного места пуповины. При смещении этой локализации (от плода к плаценте) происходит постепенное увеличение значений рН, рСО<sub>2</sub> и снижение значения рО<sub>2</sub> в артериальной крови, взятой из вены пуповины [Perlman S. et al., 2002]. В вене пуповины течет насыщенная кислородом кровь к плоду, а по парным пупочным артериям - небогатая кислородом кровь от плода к плаценте. Установлено, что в артериальной крови, взятой из вены пуповины определяются более низкие показатели рН и рСО<sub>2</sub> и более высокие - рО<sub>2</sub>, по сравнению с венозной кровью, взятой из артерии пуповины [Chen Y. et al., 2016; Приходько А.М., 2022]. Забора лактата из головки плода снижает риск оперативного родоразрешения и позволяет получить объективные данные о гипоксии плода [Jorgensen J. S., Weber T., 2014]. Показатели концентрации лактата из головки плода коррелируют с ВЕ при рождении в большей степени, чем уровень рН [Martin A. et al., 2003], однако до сих пор отсутствуют нормативные параметры этих показателей, а взятие материала (из подлежащей части плода) вызывает определенные трудности: - необходимый объем крови 35-50 мкл; - наличие сгустков крови и пузырьков искажают результаты [Prouhèze A. et al., 2021].

Оценка неврологического и соматического статуса ребенка проводится в

первые минуты жизни ребенка. Она является основным элементом оказания неотложной помощи и определяет всю дальнейшую лечебную тактику. С 1953г. и по настоящее время применяется одна из основных шкал, предложенная Вирджинией Апгар. Определение клинической оценки новорожденного на 1 и 5 минуте рождения позволяет дать объективную оценку состояния новорожденного и определяет прогноз. Система включает пять признаков с оценкой от 0 до 2 баллов в зависимости от степени их выраженности. Максимальная оценка составляет 10 баллов, 8-10 баллов относят к нормальной оценке, минимальная – 0 баллов. Средняя степень гипоксии (6-5 баллов), тяжелая (4-1 балл), мертворождение – 0 баллов [Шабалов Н. П., 2004; Polin R. A., Lorens J. M., 2008]. Важными критериями благополучия в неонатальном периоде новорожденного являются динамика массы тела и роста [Ледяйкина Л. В. и др., 2017]. Длина и масса тела являются общепринятыми индикаторами физического развития, для проведения оценки антропометрических данных важно сопоставлять эти два параметра. Нормальные показатели массы тела доношенного новорожденного имеют пределы от 2500г до 4000 г. Длина тела имеет диапазон- 46 - 54 см. При рождении новорожденные с низкой массой тела могут иметь высокую вероятность осложнений в неонатальном периоде, в раннем детстве и во взрослой жизни [Kuhle S. et al., 2017; Benítez-Marín M. J., 2021; Carnielli V. P., 2017; Nobile S. et al., 2017].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стресс играет значимую роль в формировании врожденных пороков развития. Одним из его последствий является гипоксия. Следствия негативного влияния дефицита кислорода для эмбриона и плода могут проявляться как внутриутробно, так и после рождения, приводя к различного рода врождённым порокам, заболеваниям, а иногда и к смерти плода. Поэтому оценка функционального состояния новорожденного важна и во многом определяет дальнейшее его развитие. Симпатоадреналовая система обеспечивает в организме важные метаболические и физиологические функции. Системные реакции организма, в ответ на изменения активности симпатоадреналовой системы, отражены в понятии адренореактивности. Эритроциты, являясь высокоспециализированными клетками, выполняют ряд жизненно важных функций. Известно, что качественная и функциональная характеристика их отражает, в целом, состояние организма. Изменения морфологических, структурных и адренореактивных свойств эритроцитов могут служить ранним маркёром изменений функционального состояния эритроцитов и оказывать влияние на кислородтранспортную функцию крови. Изучение морфофункциональных свойств эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, является важной задачей современной медицинской и биологической науки.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объект и материалы исследования

Исходя из цели исследования и реализации поставленных задач, выполнено проспективное исследование на базе ГБУЗ «Родильный дом Калининградской области №1». Были обследованы **135 новорожденных**, родившихся через естественные родовые пути.

В соответствии с задачами исследования, нами было выполнено **2 блока исследований**.

**БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 1** - был направлен на оценку функциональных особенностей эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию. В этом блоке работ материалом для исследования служила артериальная и венозная кровь, взятая из сосудов пуповины новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее.

Схема проведения работ блока №1 представлена на **рисунке 3**.

После взятия биологического материала – **артериальной и венозной крови из сосудов пуповины новорожденных детей**, проводили серию измерений показателей кислотно-основного состояния, определена  $\beta$ -адренореактивность эритроцитов, проведена оценка относительного содержания молодых форм эритроцитов (ретикулоциты, нормобласты).

**БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 2** был ориентирован на оценку морфологических особенностей эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее. Материалом для исследования в этом блоке работ служила остаточная пуповинная кровь, полученная сразу после пересечения пуповины, а также венозная кровь, взятая в ранний неонатальный период - через 7 ч и 7 суток после рождения.

Схема проведения работ блока №2 представлена на **рисунке 3**.

После взятия биологического материала – **остаточной пуповинной крови новорожденных детей**, а также венозной крови - через 7 ч и 7 суток после рождения, проводили серию измерений показателей кислотно-основного состояния в динамике, на всех этапах - исследовали морфологические характеристики (изменение формы и размера эритроцитов, изменения цитоскелета и жесткость мембран эритроцитов).

Работа проводилась с соблюдением всех биоэтических норм и в соответствии с одобрением комиссии по этике Балтийского федерального университета им. И. Канта: **протокол № 1 от 30.05.2020 г.** Оригиналы информированного добровольного согласия родителей (законных представителей) всех детей, включенных в настоящее исследование (**1 и 2 блок работ**), на проведение медицинских манипуляций, находятся в истории развития новорожденного, копии – подшиты в папки первичной документации по диссертационной работе.

Всем новорожденным, включенным в исследование, было проведено полное клинико-лабораторное обследование, которое включало в себя:

-общие методы обследования; -специальные методы исследования.

В исходе родов оценивали метод родоразрешения, оценку состояния новорожденных проводили по шкале Апгар через 1 и 5 минут после рождения [Приходько А.М., 2022], оценивали показатели кислотно-основного состояния пуповинной крови.

#### **Критерии включения в исследование:**

- новорожденные в сроке гестации **32 - 42 недели** с признаками перинатальной гипоксии при рождении и в ранний неонатальный период;
- нормальные значения параметров кислотно-основного состояния, определяемые в пуповинной крови новорожденных (в частности, рН - 7,35 - без гипоксии);
- рН < 7,35 (для новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию).

#### **Критерии исключения:**

- врождённые пороки развития у новорождённого.
- онкологические, аутоиммунные, инфекционные, наследственные и психические болезни; алкогольная и наркотическая зависимости у матери.

Новорожденные, включенные в исследование, не получали препараты, которые могли бы повлиять на количественные и качественные характеристики эритроцитов.

**Для выполнения 1 БЛОКА РАБОТ, из общего числа обследованных (135 детей) было выделено 108 новорожденных.** В процессе решения поставленных задач исследования, обследованные нами новорожденные, в зависимости от параметров КОС, определенных в полученной из разных сосудов пуповины крови, были выделены три группы (**таблица 1**).

**Группа 1 (28 новорожденных)** - без признаков гипоксии, в артериальной и

венозной крови сосудов пуповины признаков ацидоза обнаружено не было; показатели рН варьировали в пределах физиологической нормы, определяемой для пуповинной крови [Zaigham M. et al., 2019].

**Группа 2 (32 новорожденных)** – диагностирован **субкомпенсированный метаболический ацидоз**.

**Группа 3 (48 новорожденных)** - диагностирован **смешанный декомпенсированный ацидоз**.

**Таблица 1.** Основные клинические характеристики новорожденных, включенных в 1 блок работ, (M±σ), Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Показатели	Группа 1 n=28	Группа 2 n=32	Группа 3 n=48
Срок гестации, недель	38,8±0,3	39,3±0,3	39,2±0,3
Масса тела, гр	3316±78,7	3317±83,6	3428±61,4
Шкала Апгар на 1-й мин., балл	9(8;9)	8,5(8;9)	8(8;9)
Шкала Апгар на 5-й мин., балл	9(9;9)	9(9;9)	9(8;9)
Мальчики/девочки	16/12	13/19	23/25

Для выполнения 2 БЛОКА РАБОТ, из общего числа обследованных (из 135 детей) было выделено 27 новорожденных. В зависимости от показателей кислотно-основного состояния крови, определяемых при рождении, выделяли две группы для исследования, обозначенные как 1Н группа и 2НГ – группа (гипоксанты) (таблица 2).

**Таблица 2.** Основные клинические характеристики новорожденных, включенных во 2 блок работ (M±σ), Me (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

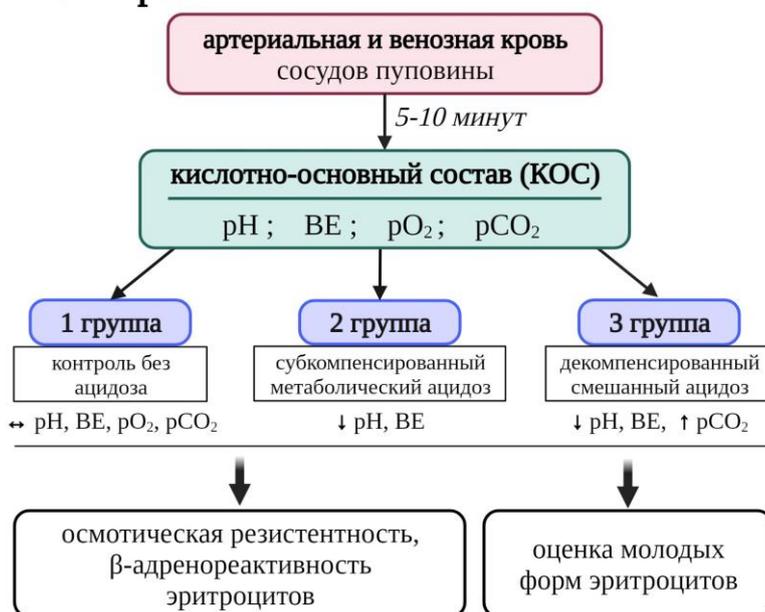
Показатели	1Н группа n=7	2НГ группа n=20
Срок гестации, недель	33,1±0,8	34±0,5
Масса тела, гр	2001,4±158,9	2224,2±151,8
Шкала Апгар на 1-й мин., балл	6[5:8]	6[6:8]
Шкала Апгар на 5-й мин., балл	7[6:8]	7[6:9]
Мальчики/девочки	3/4	11/9

**1Н группа (7 новорожденных)** - без признаков гипоксии, у которых в остаточной пуповиной крови признаков ацидоза обнаружено не было, величина рН

была  $>7,35$ .

**2НГ группа** (20 новорожденных) - с признаками гипоксии, у которых в остаточной пуповинной крови определялся смешанный декомпенсированный ацидоз, величина рН была  $< 7,35$ . Всем новорожденным, включённым во **2-ой блок работ**, была оказана квалифицированная помощь в соответствии с порядком оказания медицинской помощи по профилю «неонатология» [Володин Н. Н., 2019]. Новорожденные обеих групп с рождения получали комплексное лечение, направленное на обеспечение жизненно важных функций: инфузионную, кардиотоническую и симптоматическую терапию.

### 1 блок работ



### 2 блок работ

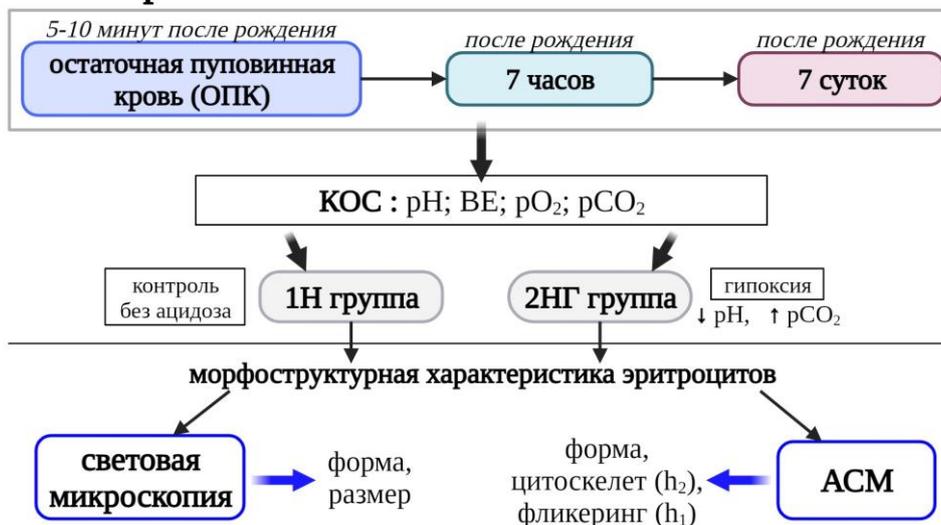


Рисунок 3. Дизайн исследования 1 и 2 БЛОКОВ РАБОТ

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Определение кислотно-основного состояния крови новорожденных

Для **1 БЛОКА РАБОТ** необходимое количество артериальной и венозной крови отбирали из соответствующих сосудов пуповины сразу после рождения в гепаринизированные шприцы, рекомендованные фирмой производителем аппарата, на котором проводилось дальнейшее исследование материала;

Для **2 БЛОКА РАБОТ** также отбирали необходимое количество остаточной пуповинной крови в гепаринизированные шприцы, рекомендованные фирмой производителем аппарата, на котором проводилось дальнейшее исследование материала. Далее, параметры КОС у детей, включенных **во 2 БЛОК РАБОТ**, согласно задачам исследования, определяли в венозной крови детей, через 7 часов и 7 суток после рождения.

Существуют данные о нейтральном влиянии гепарина на активную реакцию крови, однако аммоний гепарин вызывает сдвиг рН в пробе крови, а натрий-гепарин увеличивает концентрацию натрия в пробе [Руководство пользователя IS, 2004]. Применение жидкого гепарина исключили в связи с возможными ошибками.

Параметры, характеризующие кислотно-основное состояние крови: **рН, ВЕ, рСО<sub>2</sub> и содержание НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>**, определяли с помощью биохимического анализатора EasyStat, (Medica, США).

Параметры рН и рСО<sub>2</sub> анализатор измеряет с помощью ионоселективных электродов. Ионоселективные электроды определяют изменения напряжения. Напряжение пропорционально концентрации соответствующего иона. Отношение напряжения и концентрации иона описывается уравнением Нернста. Логарифмическая зависимость представлена формулой:

$$E = E^0 + \frac{rt \log (\gamma c)}{nf}$$

где: E-потенциал электрода;

E<sup>0</sup>-потенциал при стандартных условиях;

rt/nf-константа, имеет зависимость от температуры, крутизна (s);

n-валентность = 1 для Na и K, 2 для Ca;

log-основание десятичных логарифмов;

c-концентрация измеряемого иона в растворе.

Для расчета концентрации бикарбонатов ( $\text{HCO}_3^-$ ) применялось следующее уравнение:

$$\log [\text{HCO}_3^-] = \text{pH} - 7,608 + \log p\text{CO}_2,$$

где  $\text{HCO}_3^-$  - выражен в ммоль/л.

$\text{BE}_b$  - избыток оснований крови в пробе; этот параметр определяется как титруемая щелочность крови, которая может быть определена титрованием с сильной кислотой или щелочью до следующих показателей:  $\text{pH} = 7,400$  и  $p\text{CO}_2 = 40$  мм рт.ст. при  $37,0^\circ\text{C}$ .

$$\text{BE}_b = (1 - 0,014 [\text{Hb}]) ([\text{HCO}_3^-] - 25 + (1,43 [\text{Hb}] + 7,7) (\text{pH} - 7,4)),$$

где  $\text{Hb}$  выражен в г/дл,

$\text{HCO}_3^-$  выражен в ммоль/л,

$\text{BE}_b$  выражен в ммоль/л.

$\text{BE}_{\text{ect}}$  - избыток оснований во внеклеточной жидкости или стандартный избыток оснований, или избыток оснований *in vitro* и определяется по следующему уравнению:

$$\text{BE}_{\text{ect}} = [\text{HCO}_3^-] - 25 + 16,2 (\text{pH} - 7,4),$$

где  $\text{BE}_{\text{ect}}$  выражается в ммоль/л,

$\text{HCO}_3^-$  выражается в ммоль/л [Руководство пользователя IS, 2004].

Калибровка электродов осуществлялась растворами с определенным содержанием электролитов и растворенных газов. При исследовании, образцы крови находились внутри электродов при  $37^\circ\text{C}$  и были защищены от окружающего воздуха.

Согласно приказу Минздрава России от 26.05.03 №220, на протяжении всего периода исследования, ежедневно проводили контроль качества с применением наборов для используемого биохимического анализатора, включающих 3 типа контрольных растворов при изменении параметров на низком, среднем и высоком уровнях [Приказ Минздрава РФ, 2006].

Известно, что наибольшее число ошибок анализов проб крови встречается на преаналитической стадии, при взятии крови и обращении с ней перед введением в анализатор. Во избежание ошибок, нами соблюдались следующие правила:

- температура в помещении 24-26<sup>0</sup>С;
- относительная влажность до 85%;
- исключали наличие пузырьков воздуха до предварительного перемешивания. Тщательно перемешивали материал с гепарином с помощью магнита, перемещая его по всей длине не менее 20 раз или переворачивая шприц, избегая его встряхивания. Фиксировали время взятия пробы;
- проведение анализа проводили в первые 10 мин. после взятия пробы, исключая вариант хранения образцов.

### **2.2.2. Определение $\beta$ -адренореактивности эритроцитов крови**

Исследование адренореактивных свойств эритроцитов определяли по методу Р.И. Стрюк и И.Г. Длусской с использованием наборов «Бета-АРМ-Агат» [Стрюк Р.И., Длусская И.Г., 2003]. Определение осмотической резистентности эритроцитов основывается на количественном определении степени гемолиза, где основными параметрами являются значение концентрации NaCl. Однако в нашей методике мы определяли распад эритроцитов в забуференном растворе (натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный -17,9 г/л, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный -11,7 г/л, натрий хлористый -106,3 г/л).

Готовили рабочий раствор буфера из расчета 10 мл концентрированного буфера на 240 мл дистиллированной воды. Цельную кровь с антикоагулянтом разводили физиологическим раствором 1:1 и вносили 0,05 мл приготовленного биологического материала в 2,5 мл буферного раствора (разведение цельной крови составило 1:51). Трехкратно перемешивали без пенообразования с инкубированием в течение 15 мин при комнатной температуре 20-23<sup>0</sup>С. Центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Оптическую плотность надосадочной жидкости измеряли при длине волны 540 нм в кювете фотометра, которая имеет толщину поглощающего свет слоя 5 мм, против физиологического раствора.

Реакцию эритроцитов на адреноблокатор определяли параллельно во всех пробах. Применяли бета-адреноблокатор - пропранолол (1-(1-изопропиламино)-3-(1-нафталенил-окси)-2-пропанола гидрохлорид – 7,5 г/л). Препарат блокирует бета-адренорецепторы, применяется для родовспоможения и стимулирования родовой деятельности, проникает через плацентарный барьер. В забуференный раствор (2,5

мл) вносили 0,1 мл раствора блокатора и 0,05 мл крови (разведенной физиологическим раствором 1:1). Конечное разведение цельной крови составляло 1:53. Трехкратно перемешивали без пенообразования с инкубированием в течение 15 мин при комнатной температуре 20-23<sup>0</sup>С. Центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин.

Оптическую плотность гемолизата измеряли фотометрическим методом, описанным выше. Каждый анализируемый образец исследовали дважды.

Показатель **β-адренореактивности эритроцитов** рассчитывали по формуле:

$$\beta \text{ АРМ} = (E_1 + E_2) / (E_{к1} + E_{к2}) * 100\%,$$

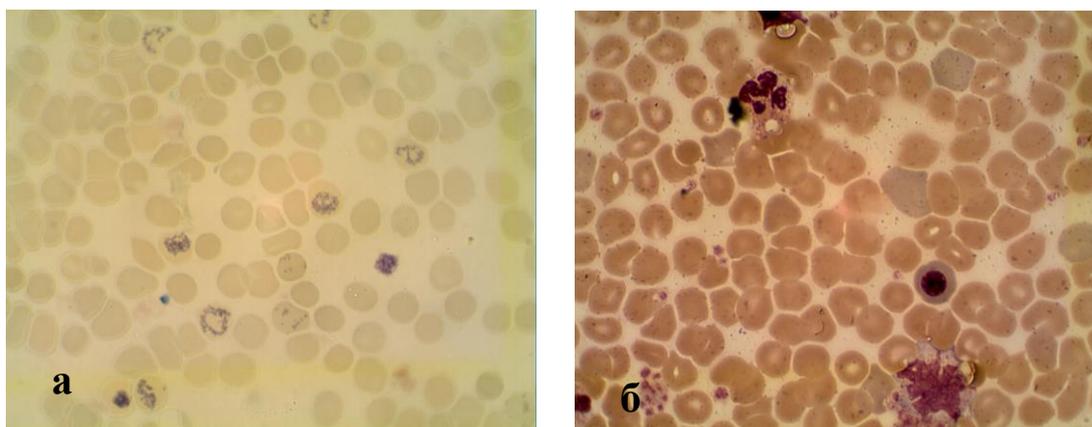
где: β АРМ – величина показателя адренореактивности эритроцитов, %;

E<sub>1</sub> и E<sub>2</sub> – оптические плотности опытных проб (с буферным раствором), ед. опт. плотн.;

E<sub>к1</sub> и E<sub>к2</sub> – оптические плотности контрольных проб (с буферным раствором и пропранолол), ед. опт. плотн.

### **2.2.3. Подсчет ретикулоцитов и нормоцитов в мазках крови**

Подсчет ретикулоцитов проводили в мазках. Для выявления зернисто-сетчатой субстанции эритроцитов в крови сосудов пуповины использовали метод окраски в пробирке [Кост Е.А., 1975]. В пробирку вносили 0,01 мл раствора красителя - бриллианткрезилового синего в абсолютном спирте (готовый раствор: 1,2г насыщенного раствора бриллианткрезилового синего на 100 мл. спирта) и 0,04 мл крови; тщательно перемешивали. Через 20-30 мин. делали мазки и производили подсчет ретикулоцитов III, IV и V групп зрелости на 1000 эритроцитов. К III группе относили ретикулоциты, имеющие зернистость в виде густой сети, к IV группе ретикулоциты с зернисто-сетчатой субстанцией в виде отдельных нитей, к V группе, содержащие отдельные зернышки (**рисунок 4а**). В норме почти 80% ретикулоцитов относятся к IV-V группам [Луговская С. А., 2006]. Результаты выражали в ‰.



**Рисунок 4.** Ретикулоциты (а) и нормобласты (б), определяемые в мазке крови новорожденных, методом световой микроскопии (окуляр - «10Х», объектив «100Х»)

Подсчет нормобластов проводили в мазках с одновременным подсчетом лейкоцитарной формулы. Мазки крови делали на предметных стеклах с помощью более узкого шлифованного предметного стекла. Материал фиксировали Эозин метиленовым синим по Май-Грюнвальду 2-3 мин. и красили Азур-Эозином по Романовскому 10 мин. После экспозиции краску смывали сильной струей воды и просушивали. Лейкоцитарную формулу считали под иммерсией, при увеличении в 1000 р на 100 лейкоцитов под микроскопом Микмед 6 (АО «Ломо», Россия) (рисунок 4б). Результаты выражали в %.

#### **2.2.4. Подготовка препарата монослоя эритроцитов**

Анализ морфологических характеристик эритроцитов (**2 БЛОК РАБОТ**) проводили сразу после рождения – в остаточной пуповинной крови, через 7 ч и 7 суток после рождения. Взятие материала осуществляли в пробирки объёмом 0,2 мл с добавлением консерванта ЭДТА, перемешивали и отстаивали в течение 30 мин. С помощью центрифуги DiffSpin 2 (StatSpin, США) готовили мазки из монослоя клеток для анализа эритроцитов. На определенные держатели устанавливали предметные стекла и автоматическим дозатором наносили по 20 мкл предварительно перемешанной крови, стеклянные пластины под действием рычага распределяли образец по предметному стеклу. Для каждого образца готовили по 3 мазка с монослоем эритроцитов. Готовые образцы материала анализировали под световым и атомно-силовым микроскопами.

### **2.2.5. Анализ морфологии эритроцитов методом световой микроскопии**

Готовый монослой эритроцитов, нанесенный на предметное стекло оценивали под световым микроскопом ZEISS Primo Star iLED («Carl Zeiss»; Германия) оснащенным специальной осветительной системой.

Оптическая система ахроматическая, оптика была скорректирована на бесконечность. Парфокальное расстояние составляло 45 мм, конечная длина тубуса 180 мм. Применялась поворотная насадка Siedentopf с верхней и нижней позициями с высотой окуляра 40 мм, насадка с вращением на 360°; угол обзора 30° (эргономичный угол). Объектив Plan-ACHROMAT 40x/0,65 D=0 рабочее расстояние: 0,45 мм, конденсор Аббе 0,9/1,25 (фиксированная система Келера), модульная концепция освещения с выдвижным приспособлением для освещения проходящим светом, светодиод белого свечения (3 Вт/6 В).

Анализ морфологических форм проводили на 1000 клеток, подбирая поля зрения, в которых имеется одинаковое количество эритроцитов. Для каждого образца исследовали не менее 50 полей. Методом световой микроскопии удалось выявить нормоциты, эхиноциты и другие морфологические формы эритроцитов, отсутствующие в классификационной таблице.

Для констатации изменения размеров клеток (анизоцитоз), проводили замеры площади эритроцитов, с применением программного обеспечения **Mcview**. Перед проведением измерений и съемкой изображения производили калибровку и выбирали правильное увеличение, т.к. на готовом изображении сменить увеличение объектива невозможно (разрешение (количество пикселей на единицу длины) записывали в файл при съемке). Анализ размерных характеристик проводили с применением технологии слоев, которая позволяет производить двумерные измерения как на «живом» изображении, так и на сохраненных снимках.

### **2.2.6. Анализ морфологических характеристик эритроцитов с применением метода атомно-силовой микроскопии**

Для более точного анализа морфологических форм эритроцитов применяли метод атомно-силовой микроскопии с использованием микроскопа ACM NTEGRA Prima (NT-MDT SpectrumInstruments, Россия) в методике осцилляционной резонансной ACM [Zhong O. et al., 1993].

На каждом предметном стекле при анализе проводили сканирование материала с получением 5 изображений размером  $100 \times 100 \text{ мкм}^2$  и  $10 \times 10 \text{ мкм}^2$ . Среднее число клеток на участке  $100 \times 100 \text{ мкм}^2$  составляло  $108 \pm 20$ . Всего было просканировано 810 изображений. Для получения данных о структуре мембран эритроцитов анализировали области размером  $1.5 \times 1.5 \text{ мкм}^2$  на 30 клетках для каждого образца. Всего было проанализировано 2430 участков. Полученные изображения и их профили проанализированы в двумерном (2D) и трехмерном (3D) форматах.

Изображения поверхности эритроцитов сканировали на воздухе в полуконтактном режиме с применением кремниевых кантилеверов серии NSG01 которые имеют золотое отражающее покрытие (NT-MDT SpectrumInstruments, РФ). Характеристики основных значений кантилевера представлены в **таблице 3**.

**Таблица 3.** Параметры основных характеристик кантилеверов серии NSG01

Длина балки, $L \pm 5 \text{ мкм}$	Ширина балки, $W \pm 5 \text{ мкм}$	Толщина балки, $T \pm 0,5 \text{ мкм}$	Резонансная частота, кГц	Коэффициент жесткости, н/м
125	30	1,5-2,5	87-230	1,45-15,1

Применяли иглу кантилевера высотой 14-16 нм, с радиусом закругления - 10 нм. Резонансная частота составляла 148 кГц, а коэффициент жесткости  $k = 5 \text{ Н/м}$ .

Необходимые поля сканирования выбирали от  $100 \times 100 \text{ мкм}^2$  до  $10 \times 10 \text{ мкм}^2$ . Количество точек в скане было 512 или 1024, частота сканирования строк имела диапазон 0.3 до 0.9 Гц. Для выявления небольших структурных изменений, количественной оценки в разных масштабах и статистического сравнения размеров применяли математическое программное обеспечение FemtoScanOnline. Возможность программного обеспечения позволила провести сравнительный анализ размерных параметров при получении пространственного преобразования Фурье после раскладки сложного АСМ-изображения поверхности на два более простых с разным пространственным разрешением. Параметры пространственных масштабов были выбраны в соответствии с естественными структурами мембран эритроцитов. Спектральное окно содержит изображения с низкими и высокими

пространственными частотами. К первым относят изображения мембранных структур с большим пространственным периодом от 600 нм до 1200 нм с высотой  $h_1$ , а к высоким - изображения мембранных структур с малым пространственным периодом от 80 нм до 200 нм с высотой  $h_2$ . Первый порядок соответствует фликерингу мембраны, который и отражает его макроструктурные свойства. Второй порядок связан с конфигурацией самого цитоскелета эритроцита [Шерстюкова Е. А. и др., 2021; Sergunova V. et al., 2022]. Изображения эритроцитов, полученные в результате исследования, классифицировали согласно общепринятой классификации [Новицкий В. В. и др., 2003; Льюис С. М. и др., 2009].

### **2.3. Статистическая обработка данных**

Статистический анализ клинических и лабораторных исследований проводили с применением программы GraphPad Prism 9.3.1.

Нормальность распределения проверялась с помощью теста Шапиро-Уилка. При статистической обработке при нормальном распределении данных для их статистического описания использовались среднее арифметическое и его стандартное отклонение. Если данные соответствовали нормальному распределению, гипотезу о равенстве выборочных средних проверяли с использованием *t*-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа для сравнения трех или более групп. Для выборок, не подходящих под нормальное распределение, определяли медиану и межквартильный размах. Дальнейшую оценку различий между непараметрическими выборками рассчитывали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни для сравнения двух групп или Крускала-Уоллиса для сравнения трех и более групп. Во втором блоке работ для сравнения показателей, которые изменялись во времени (сравнения между точками «ОПК», «7 часов» и «7 суток» в рамках одной группы), использовались попарные статистические тесты: однофакторный дисперсионный анализ для повторных измерений (для нормально-распределенных попарных данных) или тест Фридмана (для ненормально-распределенных попарных данных). Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты АСМ анализировали с использованием стандартной программы OriginPro 2019 (OriginLabCorporation, Northampton, MA (США)). Достоверность

различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, отличия считали достоверными при уровне статистической значимости  $p < 0,05$ .

Корреляционный анализ для подтверждения взаимосвязи между исследуемыми показателями проводили путем вычисления коэффициента линейной корреляции Пирсона ( $r$ ) и коэффициента регрессии ( $r$ ).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

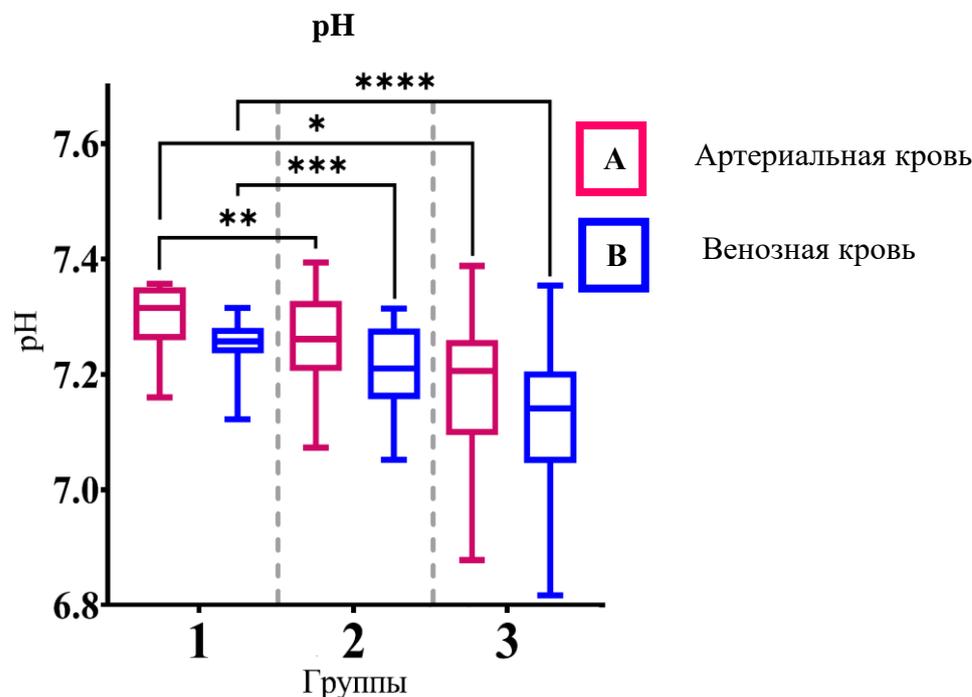
### БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 1. АКЦЕНТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

#### 3.1. Оценка показателей кислотно-основного состояния в сосудах пуповины у новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

Согласно дизайну исследования, из включенных в исследование новорожденных ( $n=108$ ), в зависимости от степени компенсации ацидоза (показатели кислотно-основного состояния), определяемого в артериальной и венозной крови сосудов пуповины, нами были сформированы три группы (**таблица 3**). Так, исследование параметров кислотно-основного состояния в сосудах пуповины: пупочной вене (артериальная кровь) и пупочной артерии (венозная кровь) у детей, перенесших перинатальную гипоксию (группы 2 и 3), позволило выявить значимые отличия от аналогичных значений, полученных у детей группы 1 (без гипоксии).

В исследуемых группах нами были определены следующие диагностические критерии ацидоза  $pH$ ,  $BE$ ,  $pO_2$  и  $pCO_2$ . Результаты представлены на **рисунках 5 - 8**.

Уровень  $pH$  в крови является одним из показателей развития окислительных процессов. Так, согласно полученным нами данным, показатель  $pH$  в артериальной и венозной крови новорождённых **группы 1** составил: 7,315 (7,259; 7,351) и 7,257 (7,236; 7,281) ед., соответственно. Данные варьировали в пределах физиологической нормы, определяемой для пуповинной крови [Zaigham M. et al., 2019] (**рисунок 5**). В группе 2 величина  $pH$  (артериальной и венозной крови) была ниже значений группы 1. Для новорожденных группы 3 уровень  $pH$  в артериальной и венозной крови сосудов пуповины был значимо ниже показателей группы 1 и группы 2 (**рисунок 5**).



**Рисунок 5.** Уровень рН в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

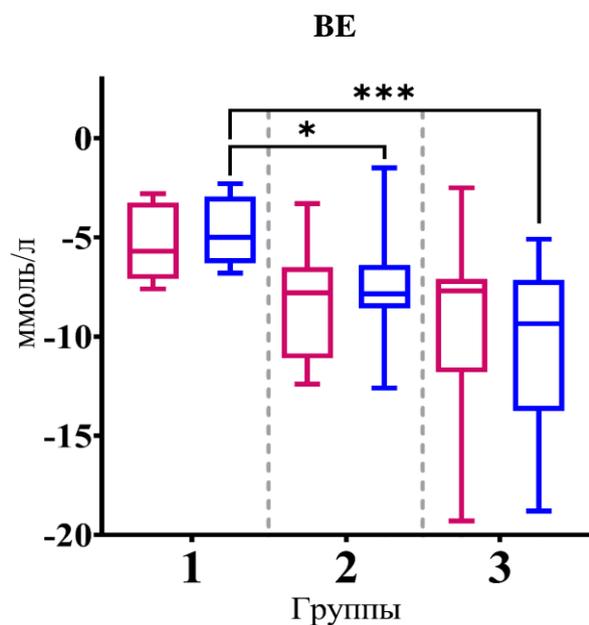
**Примечание:** здесь и в рисунках 6-11:

\* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  - уровни значимости при сравнении групп

Показатель ВЕ определяет характер ацидоза (дыхательный или метаболический), и отражает избыток или недостаток буферных оснований в крови. У детей 1 группы значения ВЕ в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины, соответствовали -5,7 (-7,1; -3,25) и -5 (-6,3; -2,95) ммоль/л, соответственно. У детей 2 и 3 группы в артериальной и венозной был выявлен дефицит оснований, статистически более значимый (в сравнении с 1 группой) в венозной крови (рисунок 6).

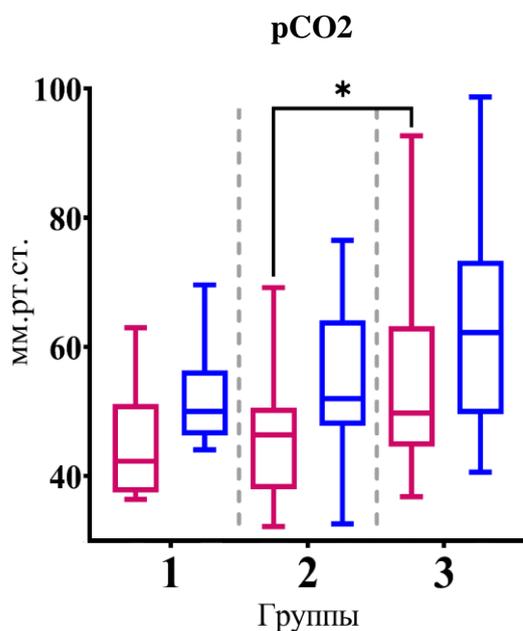
Показатель  $pCO_2$  в артериальной и венозной крови сосудов пуповины детей 1 группы, отражающий напряжение углекислоты в крови, был равным 42,3 (37,5;51,15) и 50 (43,6;56,35) мм.рт.ст., соответственно (рисунок 7).

Значения  $pCO_2$  в артериальной и венозной крови детей групп 2 и 3 значимо не отличались от группы контроля ( $p < 0,05$ ). Достоверные различия в заданном показателе фиксировались только между группами 2 и 3 (артериальная кровь) ( $p < 0,05$ ) (рисунок 7).

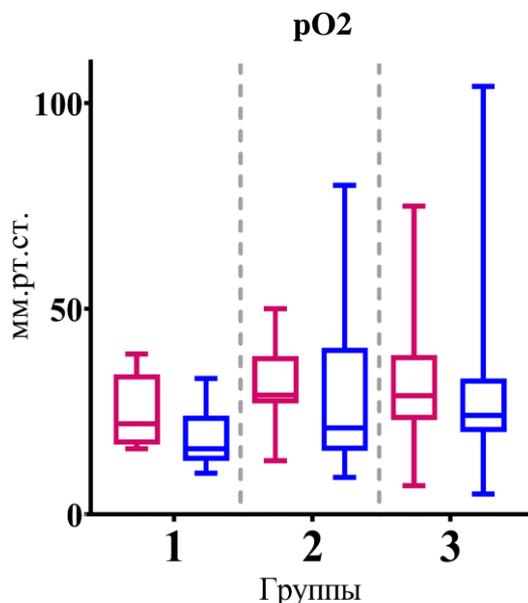


**Рисунок 6.** Уровень BE (base excess, BE) артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

Уровень  $pO_2$  в артериальной и венозной крови сосудов пуповины группы 1, отражающий парциальное давление кислорода в крови, был равным 22,1 (17,5;34,2) и 16 (13,2 24,7) мм.рт.ст., соответственно. Значения  $pO_2$  в артериальной и венозной крови детей групп 2 и 3 значимо не отличались от группы контроля и между собой ( $p < 0,05$ ) (рисунок 8).



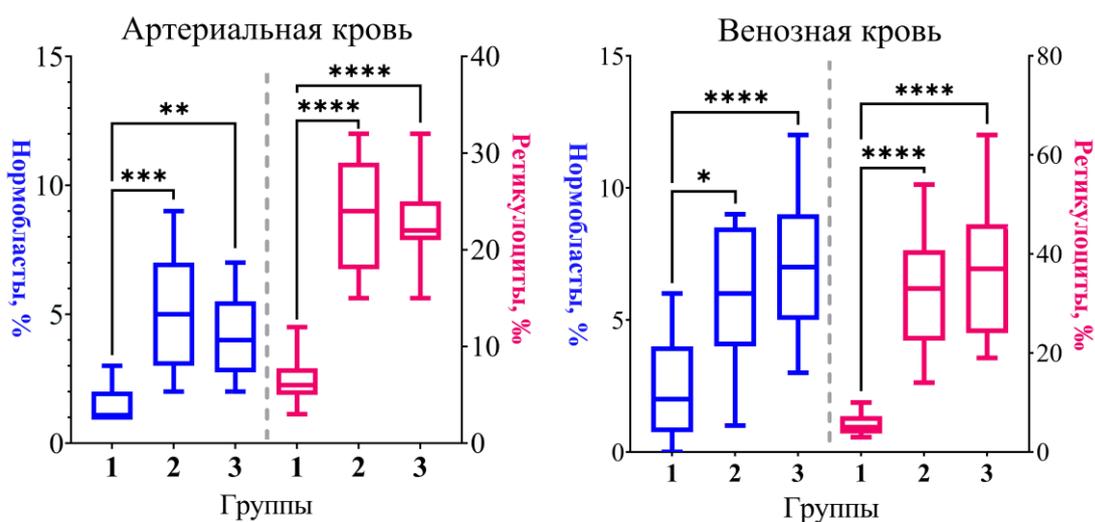
**Рисунок 7.** Уровень  $pCO_2$  в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее



**Рисунок 8.** Уровень  $pO_2$  в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

### 3.2. Оценка содержания нормобластов и ретикулоцитов в сосудах пуповины у новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

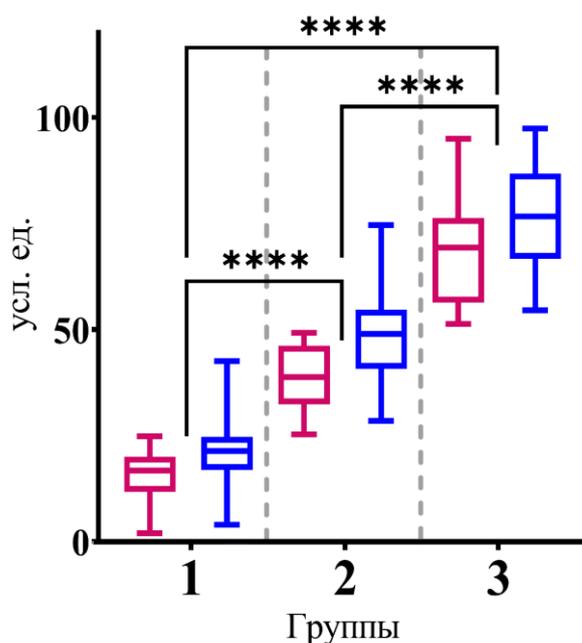
Согласно полученным нами данным, число нормобластов и ретикулоцитов в артериальной крови пуповины новорожденных 1 группы составило 1,2 (1,1; 2,0)% и 5,0 (3,0; 7,75)% и 2,0(0,75; 4,0) % и 3,75 (3,0; 7,25) %, соответственно. В группах 2 и 3 изучаемые показатели значительно превышали значения, полученные в группе 1; и не отличались достоверно между собой (**рисунок 9**).



**Рисунок 9.** Содержание нормобластов (%) и ретикулоцитов (%) в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

### 3.3. Оценка $\beta$ -адренореактивности эритроцитов в сосудах пуповины новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

В результате проведенного исследования, нами была выявлена высокая вариабельность показателя  $\beta$ -адренореактивности в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных с различной степенью ацидоза (рисунок 10).



**Рисунок 10.** Значения  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов, определяемой в артериальной и венозной крови, полученной из сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее

Так, в артериальной и венозной крови детей 1 группы значения, отражающие  $\beta$ -адренореактивность эритроцитов, были равными 16,8(11,75; 20,1) и 21,35 (16,93;24,65) усл. ед., соответственно.

В группе 2 изучаемые параметры были в 2 раза выше значений группы 1 и соответствовали: 38,75 (32,35; 46,18) для артериальной и 49,34 (40,73; 54,68) усл. ед. для венозной крови, соответственно.

В группе 3 новорожденных со смешанным декомпенсированным ацидозом регистрировались максимальные изменения (в сторону увеличения) показателя адренореактивности эритроцитов. Обнаружены статистически значимые различия между показателями, фиксируемыми в артериальной и венозной крови пуповины для групп 1 и 2 ( $p<0,0001$ ); 1 и 3 ( $p<0,001$ ); 2 и 3 ( $p<0,0001$ ) (рисунок 10).

Далее, нами были построены корреляционные матрицы, отражающие взаимосвязи между исследуемыми параметрами в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию (**рисунок 10**).

Корреляционный анализ позволил выявить ряд интересных взаимосвязей между изучаемыми показателями в группах новорожденных, с разной степенью компенсации ацидоза.

Так, в группе 1 нами была выявлены отрицательные взаимосвязи между показателями pH и pCO<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,858, p<0,01) и венозной крови (r= -0,809, p<0,01); pCO<sub>2</sub> и pO<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,769, p<0,01) (**рисунок 11**).

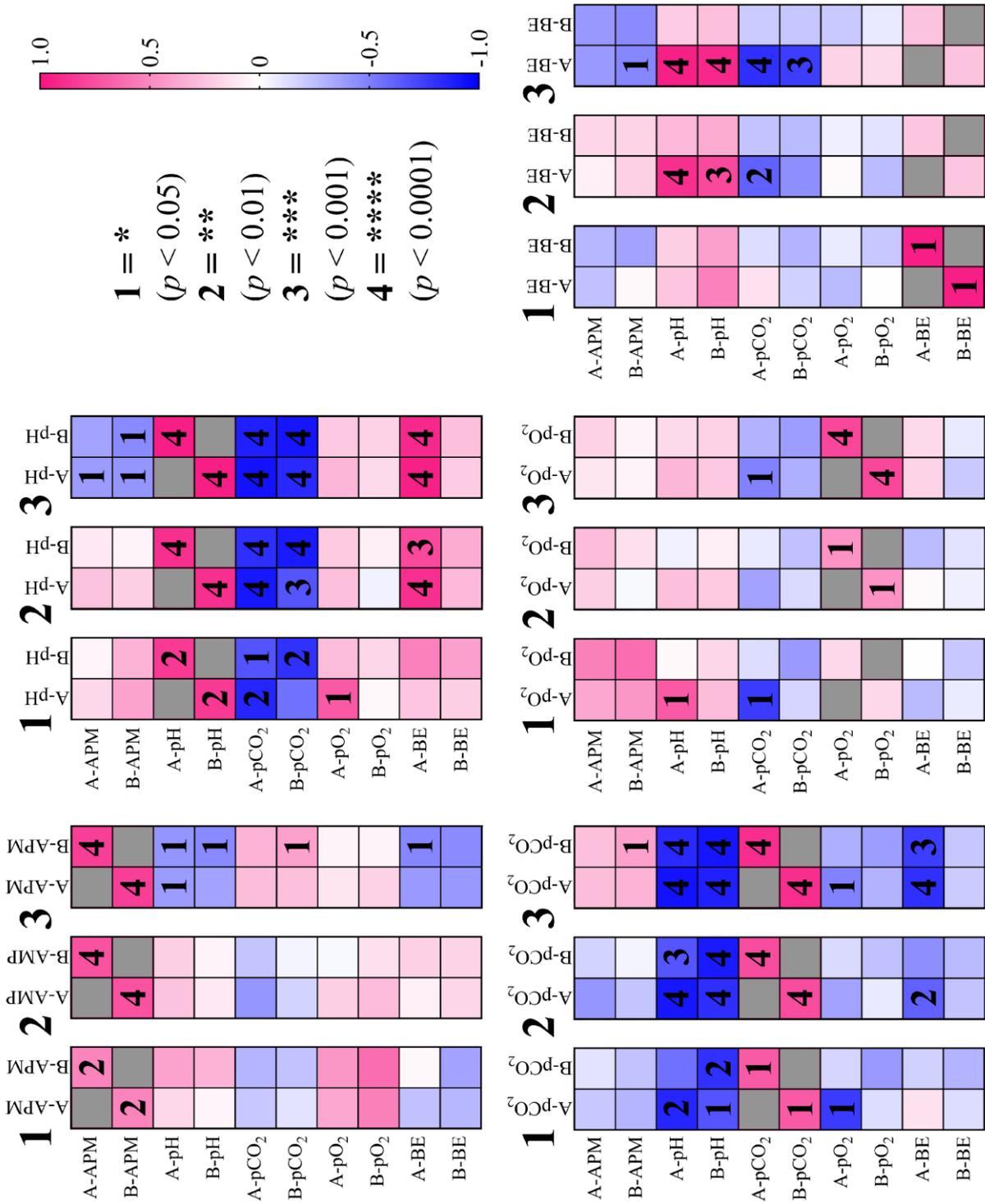
**В группе 2 были выявлены взаимосвязи:**

- между значениями pH и pCO<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,914, p<0,0001) и венозной (r= -0,901, p<0,0001) крови;
- pCO<sub>2</sub> и BE в артериальной (r= -0,623, p<0,01) крови;
- pH и BE в артериальной (r= 0,881, p<0,0001) крови (**рисунок 11**).

**В группе 3 новорожденных с ацидозом, были обнаружены следующие взаимосвязи:**

- между β-АРМ и pH в артериальной (r= -0,39, p<0,05) и венозной (r= -0,42, p<0,05) крови;
- β-АРМ венозной крови и BE артериальной (r= -0,478, p<0,05) крови;
- β-АРМ и pCO<sub>2</sub> венозной (r= 0,396, p<0,05) крови;
- pH и pCO<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,931, p<0,0001) и венозной крови (r= -0,919, p<0,01);
- pH и BE в артериальной (r= 0,947, p<0,01) крови;
- pCO<sub>2</sub> и pO<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,491, p<0,05) крови
- pCO<sub>2</sub> и BE в артериальной (r= -0,816, p<0,01) и венозной (r= -0,762, p<0,01) крови (**рисунок 11**).

Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость содержания ретикулоцитов в артериальной крови пуповины у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию с показателями pH (коэффициент регрессии: r<sup>2</sup> = 0,831; p <0,05) и уровнем значений β-адренореактивности эритроцитов (коэффициент регрессии: r<sup>2</sup> = 0,792; p <0,05).



**Рисунок 11.** Корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию

## БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 2. АКЦЕНТ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ

### 3.4. Оценка показателей кислотно-основного состояния у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования

Согласно задачам исследования и его дизайну, нами был поведен 2-ой блок работы, направленный на оценку морфофункциональных характеристик эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, на разных сроках их жизни: в ОПК – при рождении и в венозной крови, взятой через 7 часов и 7 суток после рождения. В остаточной пуповинной крови при рождении определяли значения рН, ВЕ, рСО<sub>2</sub>, НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>, как диагностические критерии ацидоза (табл.7). Ориентируясь на значения показателей КОС, определенных в ОПК новорожденных, нами были сформированы 2 группы, характеристика групп была ранее представлена в **таблице 2**. Показатели кислотно-основного состояния новорожденных, определенные при рождении в остаточной пуповинной крови представлены в **таблице 4**.

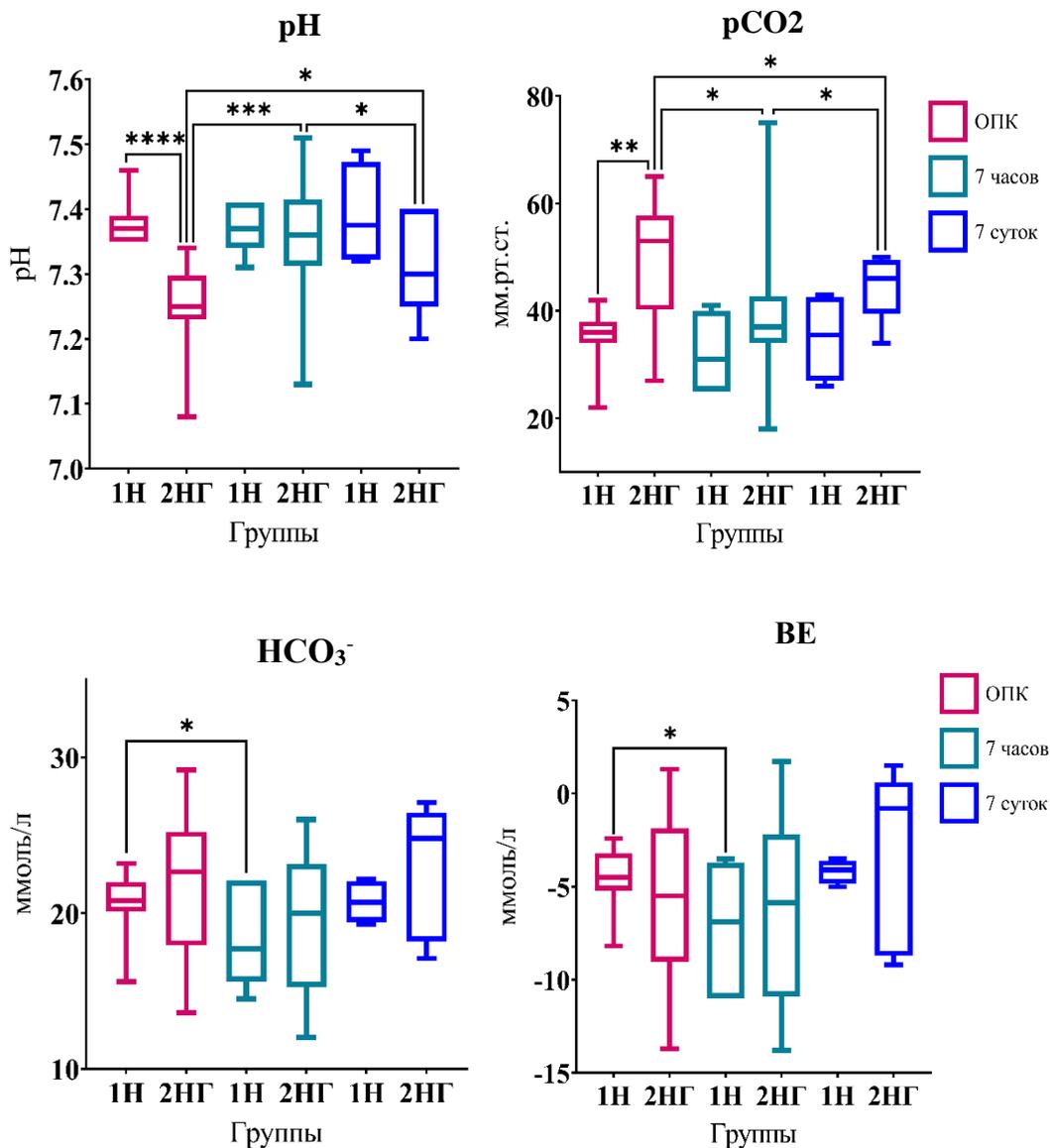
**Таблица 4.** Показатели кислотно-основного состояния крови новорожденных в остаточной пуповинной крови, Ме (Q<sub>1</sub>; Q<sub>3</sub>)

Параметры	1Н группа n=7	2НГ группа n=20
рН	7,37 (7,35; 7,39)	7,25 (7,23; 7,29)****
рСО <sub>2</sub> , мм рт. ст.	36,2 (34,1; 38,4)	53,4 (40,25; 57,75)**
НСО <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ммоль/л	20,8 (20,1; 22,4)	22,65 (17,93; 25,23)
ВЕ, ммоль/л	-4,5 (-5,2; -3,2)	-5,5 (-9,1; -3,85)

Примечание: \* - p<0,05; \*\* - p<0,01; \*\*\* - p<0,001; \*\*\*\* - p<0,0001 - уровни значимости в сравнении с 1Н группой

У детей 1Н группы в ОПК определялись более высокие значения рН крови и более низкие - рСО<sub>2</sub>, по сравнению с аналогичными значениями 2НГ группы (p<0,05). Между группами не установлено статистически значимых различий по уровням ВЕ и НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> (p>0,05). Учитывая выявленные изменения, у новорожденных

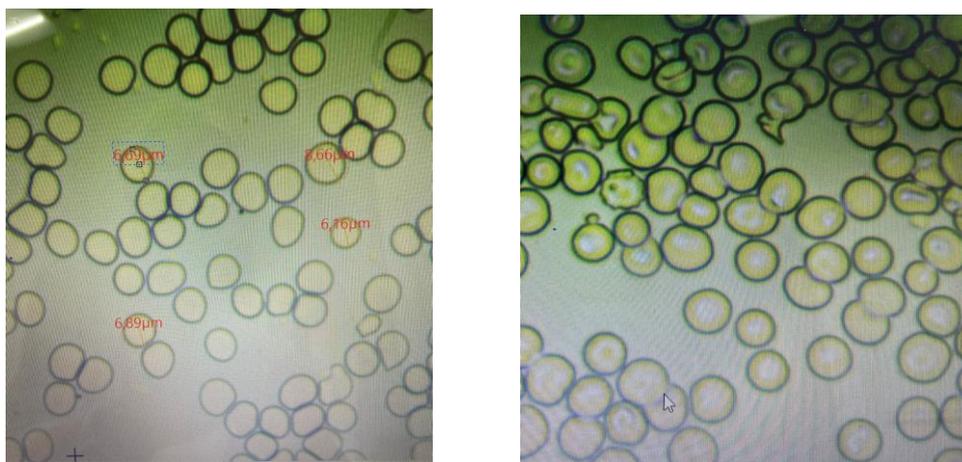
2НГ группы был диагностирован **субкомпенсированный смешанный ацидоз**, свидетельствующий о перенесенной перинатальной гипоксии. Следует отметить нормализацию параметров кислотно-основного состояния группы 2НГ на 7 суток после рождения (**рисунок 12**).



**Рисунок 12.** Показатели кислотно-основного состояния у новорождённых, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования  
*Примечание:* здесь и на рисунках 14, 16, 21 - \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  - уровни значимости при сравнении групп в рамках одной группы использовался парный t-тест; между группами использовался непарный t-тест

### 3.5. Оценка морфологических характеристик эритроцитов (форма, размер) новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, методом оптической микроскопии, на разных сроках исследования

Используя метод оптической микроскопии, в препаратах остаточной пуповинной крови, в поле 100x100 мкм нами были выявлены следующие формы эритроцитов: нормоциты, эхиноциты и другие формы клеток (**рисунок 13**).



**Рисунок 13.** Морфологические формы эритроцитов в остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших гипоксию (окуляр - «10X», объектив «40X»).

Дифференциальный анализ клеток методом световой микроскопии позволил определить в ОПК сниженное содержание нормальных форм эритроцитов (нормоцитов) у детей 2НГ группы (по сравнению с 1Н группой), что может свидетельствовать о неблагоприятном воздействии внутриутробной гипоксии на мембрану эритроцитов. У новорожденных 1Н группы морфологический состав эритроцитов был представлен, в большей степени, нормальными формами. Отмечалось незначительное наличие измененных и переходных форм эритроцитов. Внутриутробный пойкилоцитоз, выявленный у детей 2НГ группы в остаточной пуповинной крови, был характерен для 98% новорожденных с признаками ПГ. Мы предполагаем, что выявленный пойкилоцитоз в ОПК детей 2НГ группы является следствием перинатальной гипоксии, которая оказывала негативное влияние на мембрану эритроцитов.

Далее, в виду ограничения метода световой микроскопии, нами был произведен более точный анализ морфологических форм эритроцитов, методом

атомно-силовой микроскопии.

Немаловажной частью анализа крови является информация о размере эритроцитов. В состоянии условной физиологической нормы гомеостатические механизмы поддерживают определенные соотношения между эритроцитами, гемоглобином и гематокритом [Celkan T. T., Gode S., 2020]. Анизоцитоз характеризуется одновременным присутствием эритроцитов различной величины. Предпринятое нами изучение размерных параметров поверхности мембраны эритроцитов позволило дать индивидуальную оценку показателей, отражающих размеры клеток в исследуемых группах новорожденных (**таблица 5, рисунок 14**).

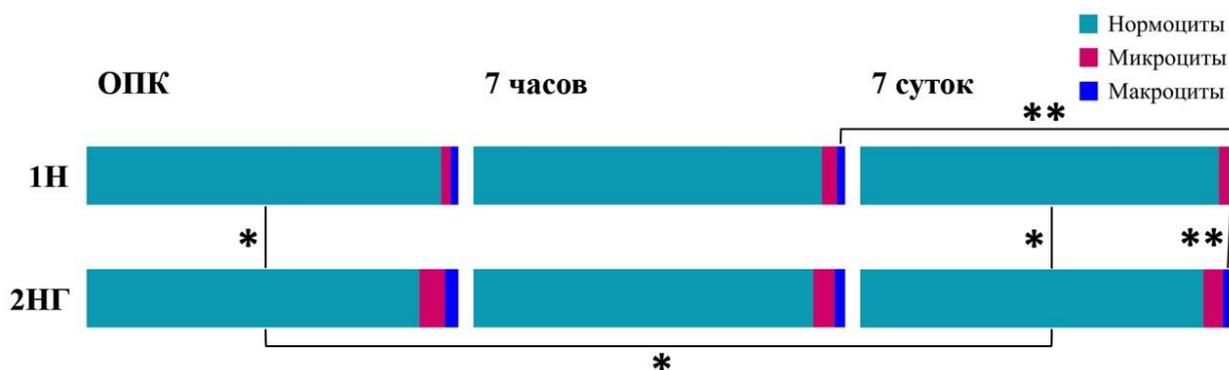
**Таблица 5.** Распределение эритроцитов по размеру (анизоцитоз) и оценка усредненной площади разных типов эритроцитов (мкм) в остаточной пуповинной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее ( $M \pm \sigma$ ),  $Me$  ( $Q_1; Q_3$ )

Показатели	1Н группа n=7	2НГ группа n=20
RBC, $\cdot 10^{12}/л$	4,97 $\pm$ 0,7	5,07 $\pm$ 0,6
Количество нормоцитов на 100 Эр, (%)	96 (95; 97)	87,25 (80,23; 92,11)*
Площадь нормоцитов, мкм	43,3 (42,15; 44,27)	43,05 (42,04; 43,34)
Количество микроцитов на 100 Эр, (%)	2 [1;3]	3 [2,75; 10,75]
Площадь микроцитов, мкм	19,9 (21,07; 23,92)	21,89 (19,04; 23,21)
Количество макроцитов на 100 Эр, (%)	2[1;3]	2 [2; 4,25]
Площадь макроцитов , мкм	61,94 (58,33; 62,33)	58,13 (55,03; 60,01)

Примечание: \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p < 0,01$ ; \*\*\* -  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* -  $p < 0,0001$  - уровни значимости в сравнении с 1Н группой

В результате проведенного нами анализа, выявлено достоверное снижение количества нормоцитов в ОПК новорожденных 2НГ группы в сравнении с показателями 1Н группы, за счет увеличения относительного содержания микро- и макроцитов (таблица). Выявленные изменения, на наш взгляд, являются следствием снижения рН, нарастания дефицита оснований и увеличения уровня лактата в крови у этой категории детей. Через 7 суток содержание нормоцитов у детей,

включенных в 2НГ группу увеличивалось по сравнению с цифрами, регистрируемыми в ОПК после рождения, однако было значимо ( $p < 0,05$ ) ниже значений детей 1Н группы (**рисунок 15**).



**Рисунок 14.** Распределение эритроцитов по размеру (анизоцитоз) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, в разные сроки исследования (ОПК - после рождения, венозная кровь через 7 ч и 7 дней после рождения)

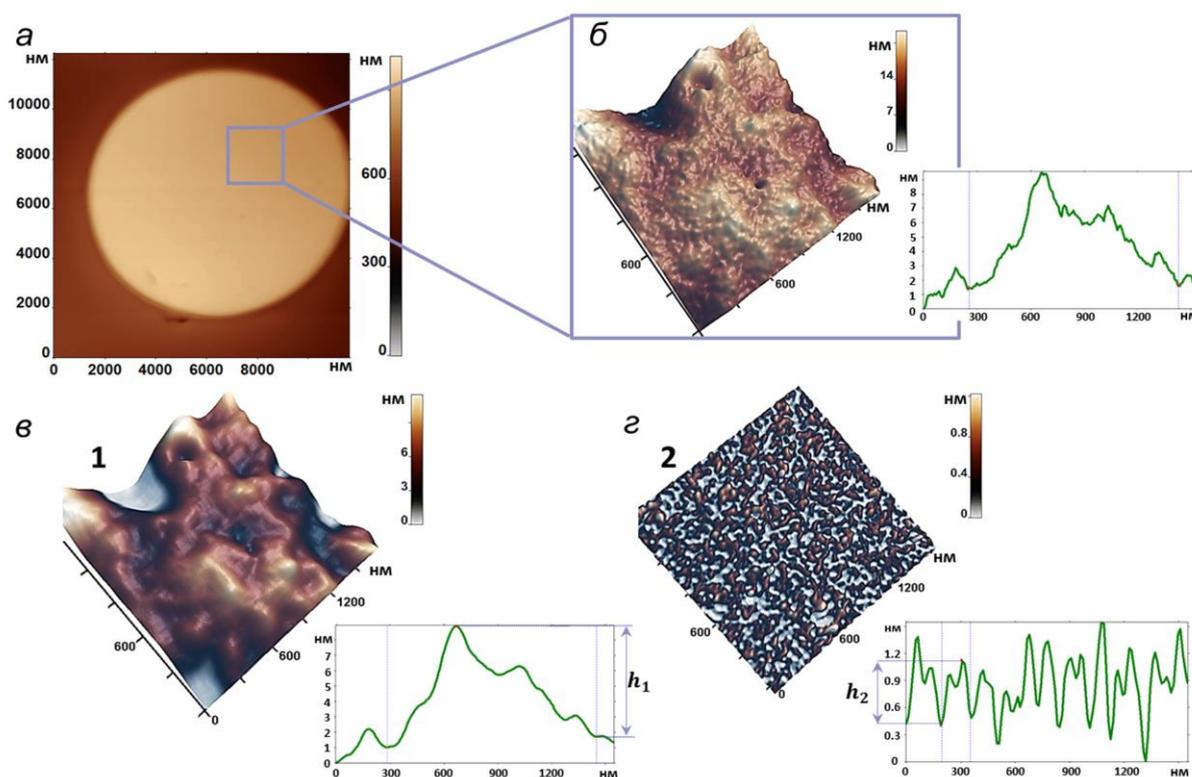
### 3.6. Оценка морфологических форм эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, методом атомно-силовой микроскопии, на разных сроках исследования

Более точный анализ морфологических форм эритроцитов был проведен методом атомно-силовой микроскопии, высокая разрешающая способность этого метода позволила выявить изменения структуры и дать полную характеристику большему количеству плоских клеток у новорожденных (**рисунок 15**).

В результате анализа, у групп новорождённых на разных сроках исследования (после рождения - в ОПК, через 7 часов и 7 суток - в венозной крови) нами были определены / выявлены следующие формы эритроцитов: дискоциты, эхиноциты, стоматоциты, планоциты и другие (переходные, отсутствующие в классификации) формы клеток.

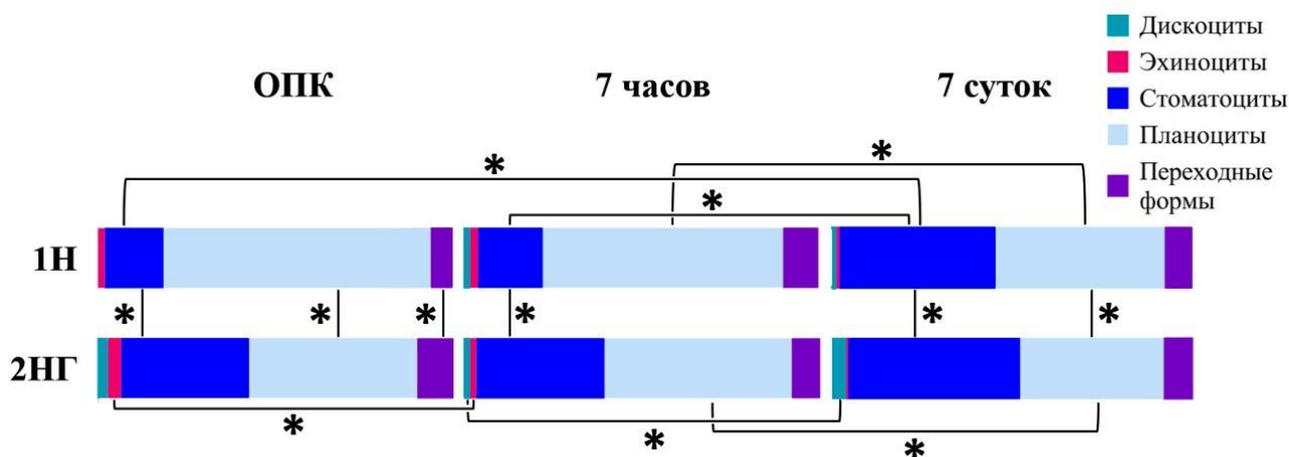
Установлено, что в остаточной пуповинной крови новорожденных, основной морфологической формой эритроцитов являются планоциты и стоматоциты. Количественные показатели различных морфологических форм эритроцитов, выявленные с помощью атомно-силовой микроскопии представлены на **рисунке 16**. Так, у новорожденных 1Н группы, относительное содержание планоцитов в ОПК составило  $71,43 \pm 6,93\%$ , значимо превышая (в 1,4 раза,  $p < 0,05$ ) аналогичные показатели новорожденных, включенных в 2НГ группу, перенесших

перинатальную гипоксию (**рисунок 16**). Содержание тромбоцитов в венозной крови детей обеих групп, через 7 часов и 7 суток статистически не отличалось (**рисунок 16**).

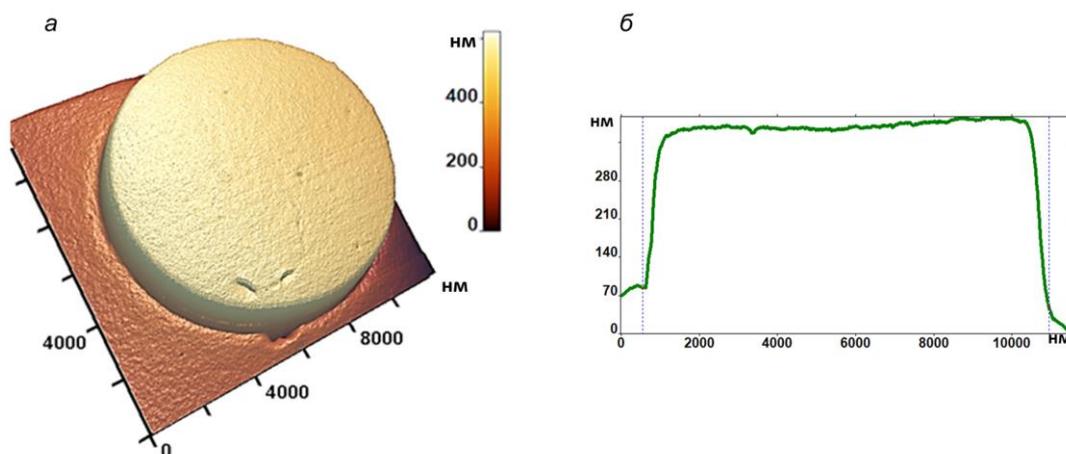


**Рисунок 15.** Анализ изображения эритроцита и участка его мембраны/профиля размером  $1,5 \times 1,5 \text{ мкм}^2$  методом АСМ. *а*- эритроцит, *б* - исследуемый участок поверхности с профилем. *в*, *г* - пространственные компоненты 1 (*в*) и 2 (*г*), суммирующиеся в исходном изображении и профиле *б*: профиль поверхности первого (1) порядка высотой  $h_1$  (*в*); профиль поверхности второго (2) порядка высотой  $h_2$  (*г*).

На **рисунке 17** представлено 3D-изображение тромбоцита (*а*) и его боковое сечение (профиль, *б*). Тромбоцит представляет собой диск с ровной поверхностью, имеет впадину и патологическую деформацию, диаметр клетки, в среднем, составил  $10413 \pm 301 \text{ нм}$ , высота -  $310 \pm 43 \text{ нм}$ .



**Рисунок 16.** Морфологические формы эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее на разных сроках исследования (в ОПК – сразу после рождения, в венозной крови - через 7 ч и 7 суток после рождения)



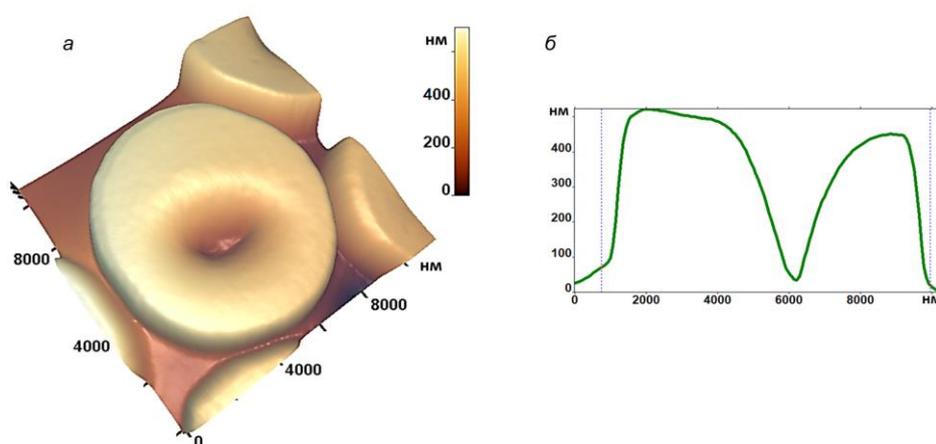
**Рисунок 17.** АСМ-изображение паноцита в формате 3D в ОПК (а), б - его боковое сечение. Изображение получено на воздухе в полуконтактном режиме сканирования; размер участка 10\*10мкм<sup>2</sup>

Содержание стоматоцитов у детей 1Н группы в ОПК было равным  $16,43 \pm 5,31\%$ . У детей 2НГ группы относительное количество стоматоцитов в ОПК было выше (почти в 2 раза) значений 1Н группы и составило  $36,05 \pm 4,53\%$ . Через 7 часов данная закономерность сохранялась. Через 7 суток содержание стоматоцитов в венозной крови обеих групп также значительно отличалось ( $p < 0,05$ ) (**рисунок 16**).

Стоматоцит представляет собой диск с ровной поверхностью, диаметр  $9226 \pm 170$  нм и высота  $495 \pm 31$  нм, имеет глубокую инвагинацию чашеобразной формы

(**рисунок 18**) (Lim H.W.G. et al., 2009). На профиле клетки (**рисунок б**) видно, что инвагинация смещается от центра, ее глубина достигает  $467 \pm 42$  нм.

Содержание эхиноцитов у детей 1Н группы в ОПК не превышало 3% и значимо не отличалось от значений в венозной крови, определяемых через 7 часов и 7 суток. Результаты, полученные у новорожденных 2НГ группы не отличались от контроля, значимо уменьшаясь в венозной крови через 7 часов и 7 суток в сравнении с цифрами, полученными в ОПК (**рисунок 16**).



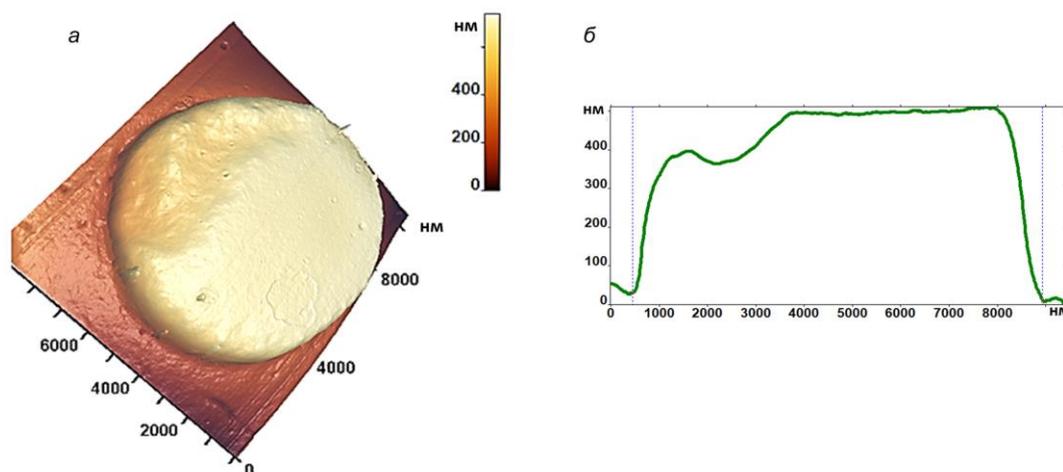
**Рисунок 18.** АСМ изображение стоматоцита в формате 3D в ОПК (а), б - его боковое сечение.

Следует отметить наличие в ОПК детей с признаками гипоксии единичных дискоцитов и их отсутствие у детей 1Н группы. Интересно, что процентное содержание дискоцитов в венозной крови детей 2НГ группы возросло через 7 суток относительно значений, полученных через 7 часов ( $p < 0,05$ ) (**рисунок 16**).

В результате исследования в обеих группах нами также были определены и другие измененные морфологические формы эритроцитов, не входящие в определенную классификацию; мы предполагаем, что они находятся в стадии промежуточной трансформации. Содержание переходных форм эритроцитов было выше в 2НГ группе в сравнении с 1Н группой.

На **рисунке 19** представлен эритроцит 7-суточного новорожденного, не входящий в общепринятую классификацию эритроцитов. Диаметр его составляет

8496 ± 280 нм, а высота - 513 ± 35 нм. На профиле (рисунок 19, б) видно, что клетка имеет смещенную к периферии впадину, занимающую примерно 1/3 поверхности, глубиной до 180±37 нм.



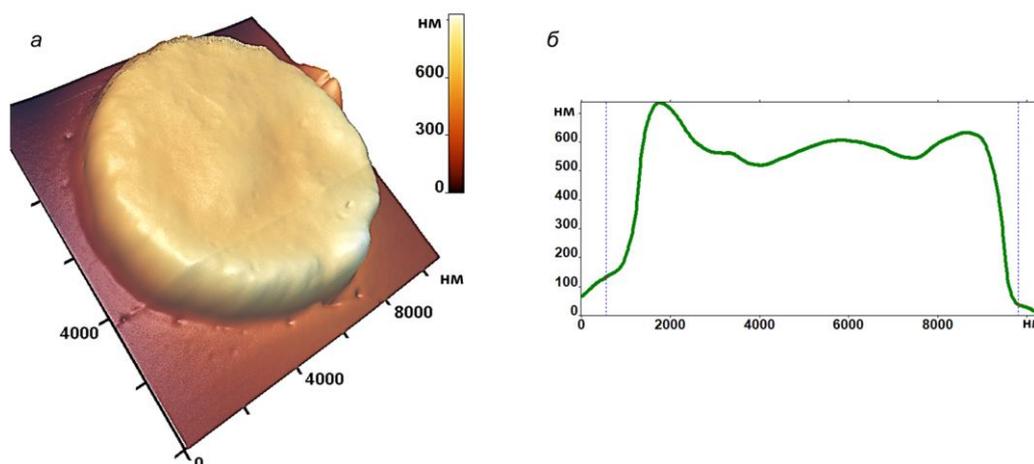
**Рисунок 19.** АСМ-изображение эритроцита, относящегося к категории «другие формы» в формате 3D в венозной крови на 7 сут жизни ребенка (а) и его боковое сечение (б).

В этот период (6-7 дней) также обнаруживаются эритроциты, имеющие на своей поверхности незначительные изменения (**рисунок 20**), которые, вероятно, обусловлены процессом активной трансформации из планоцита в кодоцит. Встречаются клетки с более рыхлой поверхностью, появляются перепады высот в диапазоне от 40 до 150 нм, что наблюдается на профиле клетки. По сравнению с планоцитом, его диаметр уменьшался до  $9267 \pm 260$  нм, а высота увеличивалась до  $630 \pm 78$  нм.

Резюмируя вышесказанное, на 7-е сутки жизни, когда заканчивается ранний неонатальный период, у детей 1Н группы без гипоксии, значительно изменяется форма эритроцитов: появляются единичные дискоциты, происходит снижение числа планоцитов и нарастание стоматоцитоза ( $p < 0,05$ ).

У детей 2НГ группы, перенесших перинатальную гипоксию, также происходят статистически значимые изменения в количественном распределении морфологических форм эритроцитов ( $p < 0,05$ ) (по сравнению с ОПК и сроком 7 ч после рождения). Отмечается уменьшение числа планоцитов, увеличение числа

ДИСКОЦИТОВ И СТОМАТОЦИТОВ.



**Рисунок 20.** АСМ-изображение кодоцита в формате 3D в ОПК (а), б - его боковое сечение

Таким образом, к концу неонатального периода планоциты и стоматоциты становятся основными формами эритроцитов в обеих группах, но в 2НГ группе стоматоцитоз был выше, а планоцитоз, напротив, ниже - чем у детей 1Н группы ( $p < 0,05$ ).

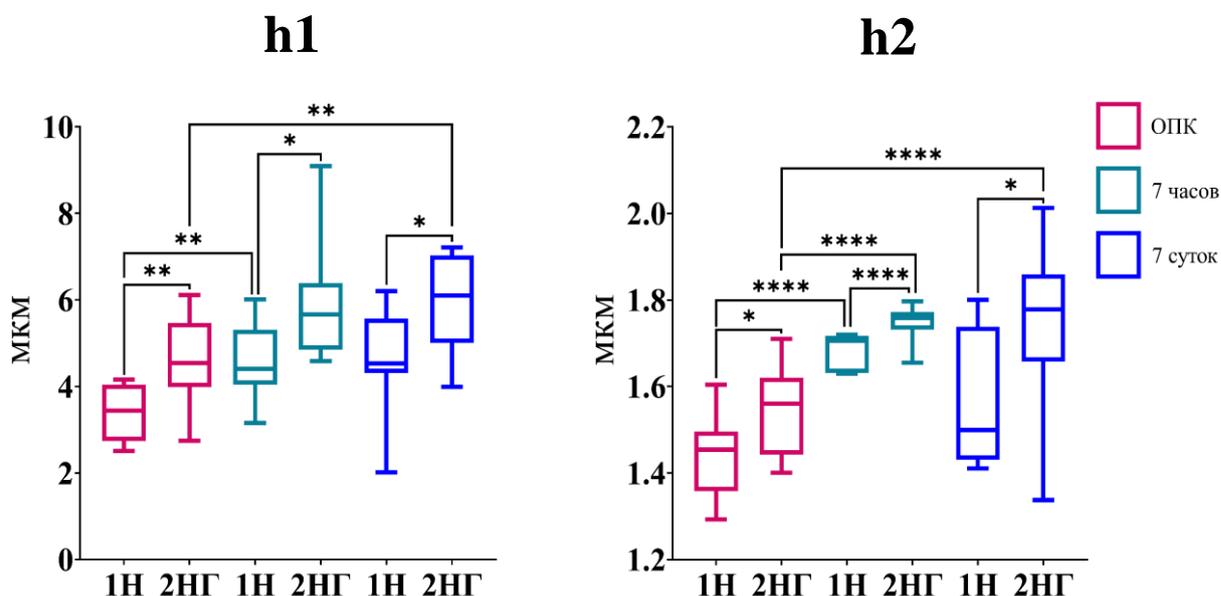
### **3.7. Оценка количественных характеристик $h_i$ (высоты $h_1$ и $h_2$ ) поверхности мембраны эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования**

Количественные характеристики  $h_i$  (высоты  $h_1$  и  $h_2$ ) поверхности мембраны эритроцитов с помощью пространственного преобразования Фурье представлены на **рисунке 21**.

Установлено, что у новорожденных 1Н группы показатель высоты  $h_1$  (изменение колебания поверхности мембран, то есть мембранный фликеринг) был равным: 3,49 (2,741; 4,038) мкм, тогда как у новорожденных 2НГ группы исследуемый показатель в 1,3 раза превышал значения 1Н группы ( $p < 0,01$ ) (**рисунок 21**).

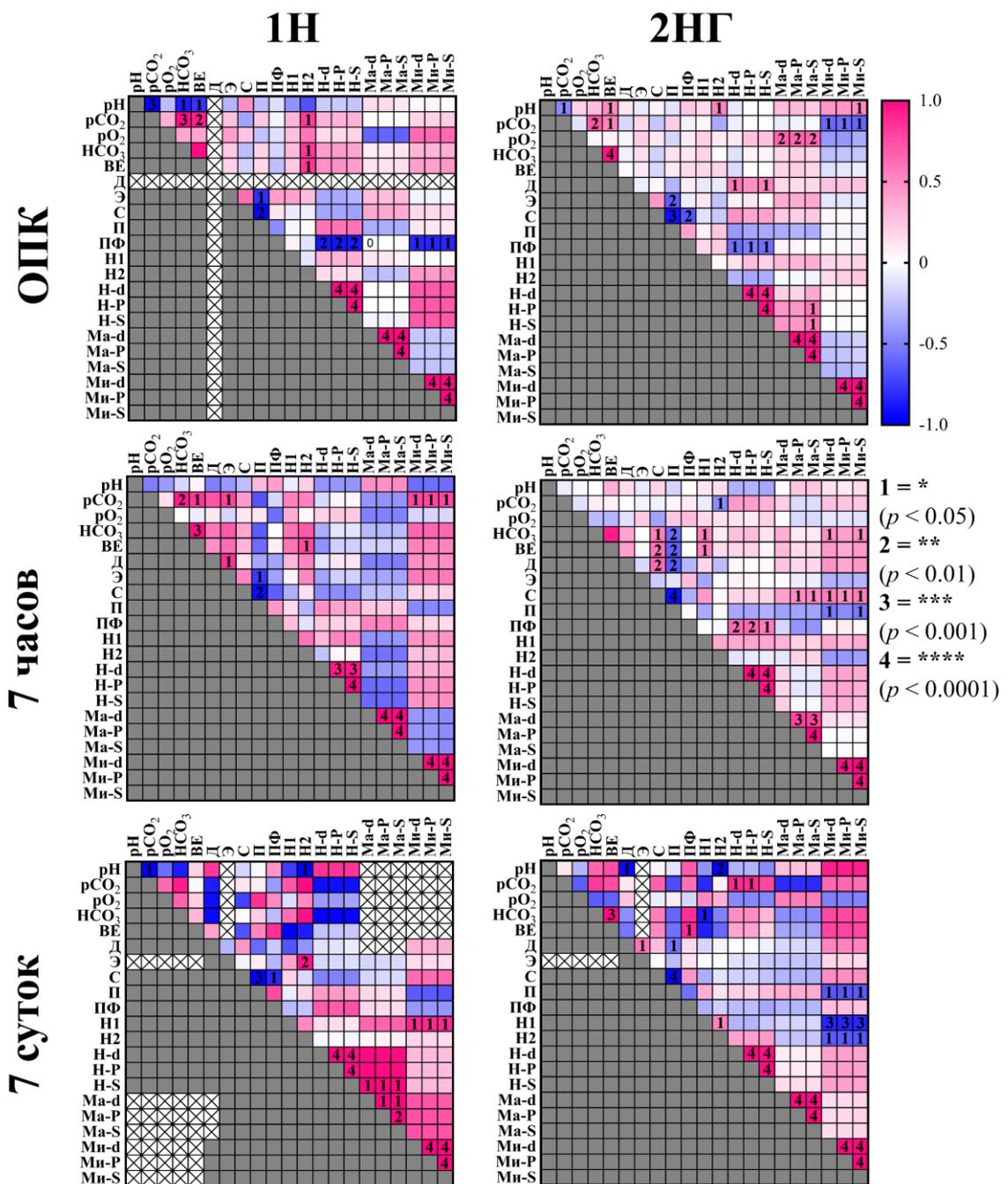
Через 7 ч после рождения в обеих группах происходил рост высоты  $h_1$  - в 1,3 раза в 2НГ группе, в 1,4 раза в 1Н группе ( $p < 0,05$ ) (**рисунок 21**). На 7-е сутки у детей обеих групп высота  $h_1$  не изменялась по сравнению с предыдущим периодом

исследования, но ее величина в 2НГ группе была статистически значимо выше, чем в 1Н группе ( $p < 0,05$ ) (рисунок 21).



**Рисунок 21.** Гистограммы высот  $h_1$ , и  $h_2$  поверхности мембраны эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования (в ОПК – сразу после рождения, в венозной крови - через 7 ч и 7 суток после рождения)

При изучении показателя  $h_2$ , отражающего изменение цитоскелета эритроцитов, спектриновый матрикс [Kozlova E. et al., 2013], установлено, что в остаточной пуповинной крови детей 2НГ группы его величина была выше значений, полученных в 1Н группе ( $p < 0,05$ ). На 7-е сут у детей обеих групп высота  $h_2$  не изменялась по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина в 2НГ группе была статистически значимо выше значений 1Н группы ( $p < 0,05$ ). Далее, нами были построены корреляционные матрицы, отражающие взаимосвязи между исследуемыми параметрами в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию (рисунок 22). Корреляционный анализ позволил выявить ряд интересных взаимосвязей между изучаемыми показателями в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее.



**Рисунок 22.** Корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами в группах новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, на разных сроках исследования

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

### БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 1. АКЦЕНТ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ ПРИ ГИПОКСИИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Хуго Лагеркранц назвал неонатальный стресс нормальных родов «счастьем рождения» [Lagercrantz H., 2016]. Нормальные роды — это эустрессовая реакция, полезный стресс с чрезвычайно высоким содержанием катехоламинов, которые защищают ребенка от внутриутробной гипоксии и способствуют быстрому переходу к внеутробной жизни, способствуя изменениям в функции легких, кровообращении и обмену веществ. Никогда в жизни уровень катехоламинов не бывает выше, чем при рождении [Olofsson P., 2023].

Иногда потребность клеток в  $O_2$  в родах становится критической, тогда дефицит кислорода в крови (гипоксемия) может перерасти в тканевый дефицит (гипоксия) и, наконец, в риск повреждения органов (асфиксия) [Olofsson P., 2023]. Увеличение концентрации ионов водорода отражается на снижении величины рН, что вместе с увеличением дефицита оснований, является показателем недостатка уровня кислорода. Дефицит оснований (или его отрицательное значение, избыток оснований) был введен для того, чтобы отразить метаболическую составляющую низкого рН и отличить его от респираторной причины низкого рН, то есть высокой концентрации  $CO_2$ . Исследование различных показателей гомеостаза у новорожденных детей является важным направлением в перинатологии [Перепелица С. А. и др., 2015]. Новорожденные очень чувствительны к гипоксии и оксидативному стрессу, которые оказывают негативное влияние на организм в критическом состоянии, вызывая повреждение органов и систем [Перепелица С. А. и др., 2017]. Так, перинатальная гипоксия и возникающие изменения гомеостаза оказывают воздействие на течение неонатального периода у новорожденных [Durkan A. M., Alexander R.T., 2011; Sweetman D., 2012; Al Tawil K. et al., 2013; Marret S. et al., 2014]. В развитых странах частота встречаемости тяжелой асфиксии в родах имеет интервал от 0,5 до 6‰ живорожденных [Shankaran S., 2015]. Диагностированный в крови ацидоз используется как критерий степени тяжести перенесенной асфиксии. Декомпенсированный метаболический ацидоз

ассоциирован с высокой смертностью и, в случае выживаемости детей, с неврологическими расстройствами, проявляющимися в различные периоды жизни [Executive summary, 2014; MacLennan A. H. et al., 2015; Зарубин А. А. и др., 2016; Racinet C. et al., 2016].

В связи с вышесказанным, важную роль в оценке состояния новорожденного играют газовый состав и кислотно-основное состояние крови. Данные исследований позволяют оценить степень тяжести и длительность гипоксии [Lindroos L. et al., 2018], при которой изменяется системное и регионарное кровообращение, приводящее к нарушениям в кислотно-основном состоянии крови: респираторному или метаболическому ацидозу. Степень выраженности/компенсации ацидоза при рождении является маркером тяжести перинатальной гипоксии. В нашей работе были использованы следующие диагностические критерии ацидоза, определяемые в артериальной и венозной крови сосудов пуповины: рН, ВЕ, рО<sub>2</sub> и рСО<sub>2</sub>.

рН крови - важная характеристика кислотно-основного гомеостаза. Только узкий диапазон нормальных значений рН обеспечивает физиологические метаболические процессы. Изменение рН за пределы нормальных величин приводит к появлению патологических изменений, влияющих на функцию клеток, в том числе, эритроцитов. Чем сильнее выражены эти изменения, тем больше меняется гомеостаз организма. Определение рН в артериальной и венозной крови сосудов пуповины представляет как научную, так и практическую ценность в выявлении степени тяжести перинатальной гипоксии и степени компенсации ацидоза плода и новорожденного, а также позволяет разрабатывать стратегию лечения и коррекцию выявленных нарушений [Приходько А. М., Баев О. Р., 2018; Приходько А. М. и др., 2019; Zaigham M. et al., 2019].

Согласно полученным нами результатам, в **1 группе** новорожденных уровень рН в артериальной и венозной крови сосудов пуповины соответствовала нормальным значениям [Zaigham M. et al., 2019], во **2 группе** величина рН (артериальной и венозной крови сосудов пуповины) была ниже значений **1 группы**. Для новорожденных **группы 3** уровень рН в артериальной и венозной крови сосудов пуповины был значимо ниже показателей **группы 1** и **группы 2** (рисунок 5). Другим важным показателем, определяющим характер ацидоза (дыхательный

или метаболический), является избыток или недостаток буферных оснований. Для всех новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, включенных в исследование, был характерен дефицит оснований, который определяет степень выраженности метаболического ацидоза. Если у детей **2 группы** определялся субкомпенсированный метаболический ацидоз, новорожденным **группы 3**, согласно показателям рН и ВЕ – был диагностирован декомпенсированный ацидоз (**рисунок**). У новорожденных, включенных в группы 1 и 2 содержание рСО<sub>2</sub> в разных сосудах пуповины находилось в пределах нормальных величин (**рисунок 8**). В 3 группе уровень рСО<sub>2</sub> был достоверно повышен относительно других групп, что дало основание у этой категории новорожденных диагностировать **смешанный декомпенсированный ацидоз**. Таким образом, в исследуемых нами группах новорожденных детей регистрировался **метаболический/смешанный ацидоз разной степени компенсации**. Наиболее выраженные нарушения были характерны для новорожденных **3 группы**.

Важнейшим компонентом нейрогуморальной регуляции функций организма в норме, при развитии гипоксии, нарушениях гомеостаза, в том числе у новорожденных, является **симпатоадреналовая система**. Симпатоадреналовая система обеспечивает в организме важные метаболические и физиологические процессы, из которых наиболее значимы: углеводный обмен, катаболизм белков, окислительные процессы, гормональная активность и мн. др. Катехоламины - физиологически активные вещества, выполняющие функцию посредников и молекул (медиаторов и нейрогормонов) в межклеточных взаимодействиях у животных и человека, действуют на клетки-мишени через рецепторы, локализованные в плазматических мембранах, при взаимодействии с которыми они изменяют биохимические процессы в ней. Присутствующие на мембранах клеток крови  $\alpha_2$ - и  $\beta_2$  - адренорецепторы быстро реагируют на изменение содержания катехоламинов [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003, Тихомирова И. А., 2006]. Функционирование **симпатоадреналовой системы** зависит от внешних стрессорных воздействий и нарушений гомеостаза, вследствие сочетания различных концентраций вырабатываемых катехоламинов, а также плотности и функциональной активности адренорецепторов.

Как уже упоминалось ранее, эритроциты являются самой значительной

популяцией (около 84%) от общего клеточного состава [Sender R. et al., 2016]. Известно, что на мембранах эритроцитов человека функционируют, в том числе,  $\beta$ -адренергические рецепторы, активирующие систему G-белок-аденилатциклаза, что, в конечном итоге, влияет на функциональное состояние мембран эритроцитов, синтез белков и гемоглобина. Изменение поверхности мембраны сопровождается интернализацией адренорецепторов с её поверхности. В этих условиях, несмотря на уменьшение количества адренорецепторов при десенситизации, остающиеся адренорецепторы могут передавать сигнал агонистов на аденилатциклазу при условии защиты G-белка, которая может обеспечиваться, в частности, увеличением внутриклеточного  $Ca^{2+}$  или действием ацетилхолина [Тихомирова И. А., 2006; Трясучев А.В., 2017].

Основное действие катехоламинов, опосредуемое  $\beta$ -адренорецепторами, направлено на стимуляцию энергетической системы клеток в соответствии с их органной специфичностью и обусловлено регуляцией ионного обмена в клетке. При активации или блокаде  $\beta_2$ -адренорецепторов такая связь может обеспечить мгновенную перестройку ионообменных механизмов [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003, Тихомирова И. А., 2006]. Результаты исследований, полученные при разных методах определения функционального состояния адренорецепторов мембраны эритроцитов, вносят новые представления о физиологии эритроцитов, об особенностях адренореактивности организма, функциональных свойств их в норме и при различной патологии [Козочкин Д. А. и др., 2019]. По уровню адренореактивности эритроцитов можно судить о развитии стрессовой ситуации в организме, которая возникает в процессе его адаптации к новым экстремальным условиям среды [Гарганеева А. А. и др., 2020].

Под влиянием длительной или сильной стимуляции катехоламинами, например, при гипоксии, адренорецепторы могут изменяться количественно и функционально, способствуя десенситизации мембран к стрессорным медиаторам и гормонам. Адренорецепторы представляют собой специфический, но нестабильный компонент клеточной мембраны. Это позволяет считать  $\beta$ -адренореактивность эритроцитов системным показателем адренореактивности организма [Hamilton L. D. et al., 2008; Халимова Ф. Т. 2017; Шукуров В. А. и др., 2020; Халимова Ф. Т. и др., 2022;]. В результате проведенного исследования, нами

была выявлена высокая вариабельность уровня адренореактивности эритроцитов у новорожденных с различной степенью компенсации ацидоза (**рисунок 10**). Самые низкие показатели  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов, определяемые в венозной и артериальной крови сосудов пуповины, регистрировались в **1 группе** новорожденных без гипоксии (**рисунок 10**). У них регистрировалась повышенная осмоустойчивость эритроцитов (низкая степень гемолиза) и функциональная активность мембраны. Т.е., иными словами, для детей 1 группы была характерна высокая адренореактивность организма, которая характеризовалась повышенной чувствительностью адренорецепторов клеточных мембран к увеличению уровня катехоламинов, при этом целостность клеточных мембран эритроцитов сохранялась [Стрюк Р. И., Длусская И. Г., 2003].

**Во 2-ой группе новорожденных** отмечалось увеличение показателя  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов (**рисунок 10**), который, по принципу биологической обратной связи, характеризовал снижение системного показателя адренореактивности организма - при умеренном увеличении содержания катехоламинов. Так, систематический выброс в кровь физиологически допустимых доз адреналина приводит к частичному снижению чувствительности адренорецепторов мембран эритроцитов к воздействию данного гормона. Это, в свою очередь, отражается на функциональных возможностях клеток, основной функцией которых является снабжение тканей кислородом [Тупиневич Г. С., Шамратова В. Г., 2018].

**В 3 группе детей** с глубокими нарушениями кислотно-основного состояния, обусловленных более выраженным дефицитом буферных оснований, повышением парциального давления углекислого газа, его накоплением и низкими показателями рН [Кирьяков К. С. и др., 2018; Приходько А. М., Баев О. Р., 2019], регистрировались более высокие цифры  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов (**рисунок 10**), что характеризовало низкую адренореактивность организма. Логично предположить, что увеличение активности симпатoadреналовой системы, сопровождающееся ростом концентрации катехоламинов, характерной для детей 3 группы, способствует значительному изменению количества и функционального состояния адренорецепторов, в том числе, на изучаемом нами объекте - эритроцитах.

Резюмируя вышесказанное, нарушения метаболических процессов (изменение показателей КОС), выявленные нами у новорожденных, сопровождались активацией симпатoadреналовой системы разной степени выраженности. Корреляционный анализ позволил выявить ряд интересных взаимосвязей между изучаемыми показателями в группах новорожденных **с разной степенью компенсации ацидоза**. Так, в группе 2 с субкомпенсированным метаболическим были выявлены взаимосвязи между значениями рН и рСО<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,914, p<0,0001) и венозной (r= -0,901, p<0,0001) крови; - рСО<sub>2</sub> и ВЕ в артериальной (r= -0,623, p<0,01) крови; - рН и ВЕ в артериальной (r= 0,881, p<0,0001) крови (**рисунок 11**). Тогда как в группе 3 новорожденных со смешанным декомпенсированным ацидозом были обнаружены следующие взаимосвязи: - между β-АРМ и рН в артериальной (r= -0,39, p<0,05) и венозной (r= -0,42, p<0,05) крови; - β-АРМ венозной крови и ВЕ артериальной (r= -0,478, p<0,05) крови; - β-АРМ и рСО<sub>2</sub> венозной (r= 0,396, p<0,05) крови; - рН и рСО<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,931, p<0,0001) и венозной крови (r= -0,919, p<0,01); - рН и ВЕ в артериальной (r= 0,947, p<0,01) крови; - рСО<sub>2</sub> и рО<sub>2</sub> в артериальной (r= -0,491, p<0,05) крови (**рисунок 11**).

Выявленные нами корреляции свидетельствуют о четкой взаимосвязи показателей кислотно-основного состояния новорожденных со значениями β-адренореактивности эритроцитов и их взаимном влиянии друг на друга, т.е. чем ниже степень компенсации ацидоза (т.е. величина рН), тем выше β-адренореактивность эритроцитов, и, соответственно, ниже адренореактивность организма.

Следуя логике, ингибирование осмоллиза эритроцитов зависит от количества функционально активных β-адренорецепторов на поверхности клеток и указывает на их адренореактивность. Количественные показатели β-реактивности эритроцитов венозной и артериальной крови сосудов пуповины новорожденных **3 группы** почти в 5 раз превышали аналогичные показатели детей **1 группы**. Становится очевидным, что высокая активность симпатoadреналовой системы оказывает дестабилизирующее влияние на системном и клеточном уровнях. Согласно результатам нашего исследования, *процесс десенситизации* имеет несколько стадий.

1. Начальная стадия процесса с разобщением рецепторов с комплексами G-белок-аденилатциклаза без уменьшения количества адренорецепторов на поверхности мембраны, на наш взгляд, регистрируется у детей 1 группы, что подтверждают низкие показатели  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов.

2. В условиях оксидативного стресса у детей 2 и 3 групп отрицательные последствия действия катехоламинов проявляются на системном и клеточном уровнях, что выражается в защитной десенситизации адренорецепторов и дополнительном выбросе катехоламинов.

*Формирование такого порочного круга приводит к систематическому повышению активности симпатoadреналовой системы, обратимому на первых этапах и устойчивому под действием этиопатогенетических факторов [Тихомирова И. А., 2006].*

Таким образом, в нашем исследовании метод оценки адренореактивности эритроцитов по величине  $\beta$ -адренорецепции их мембран, выявил изменения функционального состояния эритроцитов в ответ на воздействие адренореактивного вещества. Результаты проведенных нами исследований адренореактивности эритроцитов новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, показали повышенное число гемолизированных эритроцитов, имеющих, по-видимому, скрытые нарушения структурных компонентов мембраны, которые формируются на ранних этапах повреждения клетки и являются первичным признаком дисбаланса в системе свободнорадикальное окисление - антиоксидантная защита [Мороз В. В. и др., 2012; Белевич Е. И. и др., 2015; Чумакова С. П. и др., 2018; Ващенко В. И., Вильянинов В. Н., 2019]. Изменение осмотической резистентности эритроцитов в сторону ее уменьшения можно связать с регуляцией  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - обмена клетки, на фоне повышения продукции активных форм кислорода и метаболитов перекисного окисления липидов [Sundahl N. et.al., 2015].

Интересными, на наш взгляд, оказались результаты оценки числа молодых форм эритроцитов (нормобластов, ретикулоцитов) у новорожденных с разной степенью компенсации ацидоза. Появление в периферической крови родоначальных, незрелых клеток может быть физиологическим в ранний период новорожденности, а в последующем - служит показателем усиленной работы

красного костного мозга под влиянием каких-либо патологических раздражителей [Ткачук Е. А, Мартынович Н. Н. 2020; Yamada M. et al., 2020]. Результаты оценки молодых форм эритроцитов в артериальной и венозной крови сосудов пуповины представлены на **рисунке 9**. В **группах 2 и 3** изучаемые показатели значимо превышали значения, полученные **в группе 1**; и не отличались достоверно между собой (**рисунок 9**). Предполагаемым механизмом повышения числа ретикулоцитов и нормобластов в крови сосудов пуповины у детей с гипоксией (с разной степенью компенсации ацидоза) может быть спазм сосудов костного мозга, опосредованный активацией симпатoadреналовой системы и выбросом катехоламинов, в том числе, во время родов. Результаты проведенного нами регрессионного анализа позволили продемонстрировать положительную зависимость содержания ретикулоцитов в артериальной крови пуповины у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию с рН (коэффициент регрессии:  $r^2 = 0,831$ ;  $p < 0,05$ ) и уровнем значений  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов (коэффициент регрессии:  $r^2 = 0,792$ ;  $p < 0,05$ ).

Доказано, что гипоксия, независимо от генеза, может приводить к значительной гиперплазии эритроидного ростка кроветворения. Активация системы эритрона влияет на эритропоэз и способствует появлению молодых форм эритроцитов [Леонова Е.В. и др., 2009]. Кроме того, мы предполагаем, что выброс молодых форм эритроцитов из костного мозга у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, может иметь компенсаторный характер: десенситизация мембран клеток к стрессорным медиаторам, вследствие систематической стимуляции катехоламинами при гипоксии, приводит к компенсаторному эритропоэзу, и как следствие: происходит выброс молодых, более высокорезистентных клеток в кровяное русло, при усиленном разрушении старых эритроцитов.

**Таким образом,** при воздействии перинатальной гипоксии изменение функционального состояния эритроцитов происходит уже внутриутробно. Выявленные изменения адренореактивности организма свидетельствуют о влиянии степени гипоксии на гомеостаз, концентрацию вырабатываемых катехоламинов, чувствительность эритроцитов и функциональное состояние адренорецепторов. Интранатальный период характеризуется не стабильностью адренореактивности организма и большой вариабельностью показателей  $\beta$ -адренореактивности

эритроцитов. Ряд исследований подтверждают наличие таких изменений у новорожденных, перенесших гипоксию [Зарубин А. А. и др., 2016; Racinet C. et al., 2016].

## **БЛОК ИССЛЕДОВАНИЙ 2. АКЦЕНТ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ НОВОРОЖДЕННЫХ, ПЕРЕНЕСШИХ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ГИПОКСИЮ**

В связи с вышесказанным, второй блок нашего исследования был посвящен оценке морфологических изменений эритроцитов, опосредованных перинатальной гипоксией. Как уже упоминалось ранее, пусковым механизмом гипоксических повреждений у новорожденных в неонатальном периоде является типовой патологический процесс – перинатальная гипоксия, связанная с нарушениями плацентарного кровообращения, приводящая к активации оксидативных процессов в организме плода [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007; Shankaran S., 2015; Чайка Н. А. и др., 2019]. Описанные ранее механизмы изменения функциональных свойств эритроцитов под влиянием гипоксии, приводят к повышенной деформируемости и проницаемости их мембран, что проявляется снижением газотранспортной функции [Мороз В. В. и др., 2012]. В свою очередь, количественные или качественные дефекты в мембранных белках способствуют уменьшению стабильности мембраны эритроцитов и последующему их разрушению, и гибели [Мороз В. В. и др., 2012; Хадарцев А. А. и др., 2022].

В состав мембраны эритроцита входят три основных компонента: тонкий липидный бислой (4—5 нм), белки (периферические и интегральные) и цитоскелет [Новицкий В. В. и др., 2004; Трошкина Н. А. и др., 2007; Kim Y. et al., 2017; Шерстюкова Е. А., 2020]. Большинство белков периферической мембраны образуют мембранный цитоскелет толщиной от 40 до 90 нм, который составляет основу внутренней поверхности мембраны и выполняет роль каркаса клетки [Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л., 2007]. Цитоскелет представляет собой белковую сеть, состоящую в основном из тетрамеров спектрина, которые связаны с белковыми комплексами актина, белка 4.1R, анкирина, тропомиозина, тропомодулина, аддуцина и дематина. Связывание цитоскелета с липидным

бислоем осуществляется с помощью анкирина и белка 4.1R через белок полосы 3 [Kim Y. et al., 2017; Шерстюкова Е. А., 2020]. Размер ячеек сети цитоскелета составляет 80--100 нм [Мушкамбаров Н. Н., Кузнецов С. Л., 2007; Kodippili G. S. et al., 2009; Шерстюкова Е. А., 2020] Для мембраны эритроцитов характерно колебательное движение – «фликеринг» (мерцание) [Кононенко В. Л., 2009; Jaferzadeh K. et al., 2019]. *Возникшие под влиянием неблагоприятных факторов патологические колебания мембраны, закономерно приводят к изменению формы эритроцитов.*

Эритроциты новорожденных детей и взрослых имеют отличия по таким параметрам, как размер, морфология, состояние клеточных мембран, состав глобина и другие [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007]. Основной морфологической формой эритроцитов у новорожденных являются planoциты, имеющие внешние отличия от дискоцитов, однако они считаются физиологической транзиторной формой, обеспечивающей полноценную газотранспортную функцию [Перепелица С.А. и др., 2014а, 2014б]. В перинатальном периоде повреждение эритроцитов у новорожденных индуцируется тяжелой гипоксией и ацидозом [Perrone S. et al., 2012], что приводит к неоднородности морфологического состава красных клеток и выраженному анизоцитозу и пойкилоцитозу [Перепелица С. А. и др., 2017].

В связи с вышесказанным, целью второго блока работы явилось изучение влияния ацидоза, как маркера перинатальной гипоксии, на мембрану эритроцитов у новорожденных в раннем неонатальном периоде. Задачи этого блока работ включали сравнительное исследование морфологических форм эритроцитов и изменения структуры мембран эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее. При рождении в остаточной пуповинной крови определяли значения рН, ВЕ, рСО<sub>2</sub> НСО<sub>3</sub><sup>-</sup>, как диагностические критерии ацидоза (**таблица 4, рисунок 12**). Показано, что при рождении у новорожденных 2НГ группы, по сравнению с 1Н группой, величина рН крови была статистически значимо ниже (p<0,05), а рСО<sub>2</sub> - выше (p<0,05). Однако между группами нами не было установлено статистически значимых различий по уровням ВЕ и НСО<sub>3</sub><sup>-</sup> (p>0,05). Учитывая выявленные изменения, у новорожденных 2НГ группы был диагностирован субкомпенсированный смешанный ацидоз, свидетельствующий о перенесенной перинатальной гипоксии.

Немаловажной частью анализа крови является информация о размере эритроцитов. В состоянии условной физиологической нормы, гомеостатические механизмы поддерживают определенные соотношения между эритроцитами, гемоглобином и гематокритом [Celkan T., Gode S., 2020]. У новорожденных, из-за отсутствия пропорциональности между функциональной зрелостью и пролиферативной активностью органов кроветворения, а также в результате адаптации организма к существующим условиям окружающей среды, механизмы не стабильны [Мягкова Е. А., 2014]. Анизоцитоз характеризуется одновременным присутствием эритроцитов различной величины. Изменение диаметра клеток характеризует размер эритроцитов (уменьшение или увеличение) [Tonbul A. et al., 2011; Robert D, Hassan M., 2015].

Предпринятое нами изучение размерных параметров поверхности мембраны эритроцитов позволило дать индивидуальную оценку показателей, отражающих размеры клеток в исследуемых группах новорожденных (**таблица 5, рисунок 14**). Нами было выявлено достоверное снижение количества нормоцитов в остаточной пуповинной крови новорожденных 2НГ группы в сравнении с показателями 1Н группы, однако содержание микро- и макроцитов достоверное не отличалось (**таблица 5**). Выявленные изменения, на наш взгляд, являются следствием снижения рН в крови у этой категории детей. Через 7 суток содержание нормоцитов в венозной крови у детей, включенных в 2НГ группу, увеличивалось по сравнению с цифрами, регистрируемыми в остаточной пуповинной крови после рождения, однако по-прежнему было значимо ниже ( $p < 0,05$ ) значений детей **1Н группы (рисунок 15)**.

Функциональное значение эритроцитов с измененной формой и размерами до конца остается неясным, но основная функция красных клеток крови – это транспорт кислорода и углекислого газа. Мы предполагаем, что выявленный нами анизоцитоз эритроцитов может быть также обусловлен высоким эритропозом у новорожденных на низких сроках гестации (33-34 недели), включенных в исследование [Tonbul A. et al., 2011]. Тогда как согласно данным других авторов, возможность использовать референсные значения показателей MCV, MCH, RDW для доношенных и недоношенных новорожденных представляется возможной в возрасте 20 недель [Takala T. I. et al., 2010].

Вероятно, что под влиянием гипоксии, эритроциты стремятся компенсаторно изменить форму и размер, и, тем самым, увеличить свою поверхность для более эффективного захвата кислорода из плазмы с низким его содержанием. Это подтверждается данными литературы, что при воздействии гипоксии происходит компенсаторное изменение формы эритроцитов для более полного и эффективного выполнения ими газотранспортной функции и обеспечения жизнеспособности самого эритроцита при возникновении критических ситуаций [Steiner L. A., Gallagher P. G., 2007; Мягкова Е. А., 2014].

Точный анализ морфологических форм эритроцитов был проведен методом атомно-силовой микроскопии, высокая разрешающая способность этого метода позволила выявить изменения структуры и дать полную характеристику большому количеству плоских клеток у новорожденных (**рисунок 16**). Атомно-силовая микроскопия (АСМ) относится к классу сканирующей зондовой микроскопии. Этот метод позволяет визуализировать структуры клеток, размер которых колеблется в диапазоне от 0.5 нм до 100 нм. Поверхность мембраны эритроцитов представляет собой сложную неоднородную структуру, а с помощью пространственного преобразования Фурье сложное изображение поверхности мембран эритроцитов, полученное на АСМ, раскладывается на поверхности двух порядков (1 и 2) [Kozlova E. et al., 2018, 2019; Шерстюкова Е.А. и др., 2021]. По сравнению со световой микроскопией, которая позволяет исследовать только морфологию и размер клетки, АСМ позволяет детально изучить структуры клеточной мембраны в норме и при патологических состояниях [Kamruzzahan A. S. M. et al., 2004; Zhang Y. et al., 2013; Мельченко Е. А., 2015; Стародубцева М. Н. и др., 2015; Revin V. V. et al., 2019], а также оценить влияние лекарственных препаратов на структуру мембраны эритроцитов [Niece K. L. et al., 2015; Demchenkov E. L. et al., 2020; Starodubtseva M. N. et al., 2022].

Согласно проведенному нами исследованию и данным литературы [Перепелица С. А. и др., 2014а, 2014б], в остаточной пуповинной крови новорожденных основной морфологической формой эритроцитов являются planoциты (**рисунок 16**). Последние имеют внешние отличия от дискоцита и считаются физиологической транзиторной формой, обеспечивающей полноценную газотранспортную функцию у новорожденных [Перепелица С. А. и др., 2014а,

20146]. Следует отметить, что у детей 2НГ группы относительное количество тромбоцитов, определяемое в остаточной пуповинной крови, было достоверно ниже аналогичных значений детей 1Н группы ( $p < 0,05$ ). Напротив, содержание стоматоцитов у детей, перенесших перинатальную гипоксию, было почти в два раза выше ( $p < 0,05$ ), в сравнении с цифрами, полученными у детей 1Н группы (**рисунок 16**). Интересно, что у детей, перенесших перинатальную гипоксию (2НГ группа), встречались единичные дискоциты; число измененных эритроцитов, не входящих в определенную классификацию (кодоциты), которые, вероятно, находятся в стадии промежуточной трансформации, было выше в этой группе детей ( $p < 0,05$ ).

Первые 6 ч постнатальной жизни являются периодом острой адаптации новорожденных к новым условиям внешней среды. Так, через 7 ч после рождения у детей 2НГ группы сохранялся статистически значимый стоматоцитоз ( $p < 0,05$ ) (**рисунок 16**).

Интересно, что на 7-е сутки жизни, в момент окончания раннего неонатального периода, у детей 2НГ группы (по сравнению с ОПК и сроком 7 ч после рождения) значимо уменьшалось число тромбоцитов, на фоне увеличения содержания стоматоцитов и дискоцитов. Следует отметить, что аналогичные изменения происходили и в венозной крови детей 1Н группы: регистрировалось снижение числа тромбоцитов, и, напротив, рост содержания стоматоцитов ( $p < 0,05$ ). Таким образом, к концу 7-х суток, т.е. к окончанию неонатального периода в обеих группах - тромбоциты и стоматоциты становятся основными формами эритроцитов ( $p < 0,05$ ). Однако стоит отметить, что стоматоцитоз был более выражен в венозной крови детей 2НГ группы (в сравнении с 1Н группой), тогда как число тромбоцитов было ниже аналогичных значений, полученных у детей 1Н группы (**рисунок 16**).

Сложная структура [Трошкина Н. А. и др., 2007; Kodippili G. S. et al., 2009; Kim Y. et al., 2017], характерное колебательное движение эритроцитов - «фликеринг» возникающее под влиянием неблагоприятных факторов [Кононенко В. Л., 2009; Jaferzadeh K. et al., 2019] и возможность разложить изображение поверхности мембран эритроцитов, на поверхности двух порядков (1 и 2) [Kozlova E. et al., 2018, 2019; Sergunova V. et al., 2022], дали возможность провести анализ патологических колебаний мембраны эритроцитов.

Так, с применением метода атомно-силовой микроскопии нами были

получены количественные характеристики  $hi$  (высоты  $h_1$  и  $h_2$ ) поверхности мембраны эритроцитов (**рисунок 21**) с помощью пространственного преобразования Фурье. Установлено, что при рождении у новорожденных **2НГ группы** - высота  $h_1$ , отражающая изменение колебания поверхности мембран, то есть мембранный фликеринг, была статистически значимо выше по сравнению с новорожденными **1Н группы** ( $p < 0,05$ ). Через 7 ч после рождения в венозной крови, полученной от обеих групп новорожденных, происходил рост значений высоты  $h_1$  ( $p < 0,05$ ), в среднем, в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки у новорожденных обеих групп высота  $h_1$  не изменялась, по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее величина в 2НГ группе была статистически значимо выше, чем в 1Н группе ( $p < 0,05$ ).

При анализе показателя  $h_2$  (**рисунок 21**), отражающего изменение цитоскелета эритроцитов, т.н. спектриновый матрикс [Kozlova E. K. et al., 2013], нами было установлено, что в остаточной пуповинной крови детей группы 2НГ его величина была выше, чем в 1Н группе ( $p < 0,05$ ). На 7-е сутки у пациентов обеих групп высота  $h_2$  не изменялась по сравнению с предыдущим периодом исследования, но ее уровень в группе детей, перенесших перинатальную гипоксию, была статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ) (**рисунок 21**).

Известно, что в первые часы после рождения на мембране эритроцитов происходят активные процессы, обусловленные постнатальной перестройкой организма ребенка, что проявляется статистически значимым увеличением высот  $h_1$  и  $h_2$ . В процесс постнатальной клеточной адаптации вовлечены два параметра структуры мембраны эритроцитов — это фликеринг (колебания) мембраны и цитоскелет.

Согласно полученным нами результатам, в группе детей, перенесших перинатальную гипоксию, этот процесс был наиболее выражен, т.к. уже при рождении обнаруживаются статистически значимые различия по исследуемым показателям; мы предполагаем, что выявленные изменения обусловлены влиянием ацидоза на мембрану эритроцитов. Следует отметить, что к окончанию раннего неонатального периода снижения величин  $h_1$  и  $h_2$  не происходило. Подтверждением вышесказанному явились обнаруженные нами корреляционные взаимосвязи величин  $h_1$  и  $h_2$  со значениями рН в обеих группах на разных сроках исследования

(с  $h_2 - r = 0,55$ ,  $p < 0,05$  - для 2НГ группы в остаточной пуповинной крови; с  $h_2 - r = 0,45$ ,  $p < 0,05$  и  $r = -0,53$ ,  $p < 0,05$  – для 1Н группы и 2НГ группы в венозной крови на 7 сутки, соответственно).

Как уже упоминалось ранее, в нормальном физиологическом состоянии организма соотношение морфологических форм эритроцитов постоянно, но многие экзогенные и эндогенные факторы, при воздействии которых изменяется гомеостаз, приводят к активации процессов на мембране и появлению других морфологических форм эритроцитов. Нарушение электролитного состава крови, в частности, гипонатриемия, гипохлоремия, ацидоз и гипохолестеринемия вызывают дисбаланс между липидными, белковыми компонентами мембраны и белками цитоскелета, что приводит к трансформации дискоцитов и появлению стоматоцитов; гипернатриемия, гиперхлоремия, алкалоз, гиперхолестеринемия, снижение содержания аденозинтрифосфата – к появлению эхиноцитоза [Rudenko S. V., 2010; Geekiyanage N. M. et al., 2019]. В большинстве случаев, когда гомеостаз крови быстро нормализуется, эта трансформация носит обратимый характер [Geekiyanage N. M. et al., 2019]. В одной из работ показано, что морфологические изменения эритроцитов представляют собой трехфазную последовательность, включающую превращение дискоцитов в эхиноциты и стоматоциты, или двухфазную модель: дискоцит  $\rightarrow$  эхиноцит, дискоцит  $\rightarrow$  стоматоцит, т.е. изменения варьируют между четырьмя основными формами. Этот процесс, в первую очередь, зависит от изменений рН крови [Rudenko S. V., 2010].

Нарушения маточно-плацентарного и плодово-плацентарного кровообращения приводят к антенатальному изменению гомеостаза и кислородного баланса, появлению ацидоза у плода [Dod J. M. et al., 2017; O'Sullivan M. P. et al., 2019], который является маркером степени тяжести перинатальной гипоксии у новорожденных в раннем неонатальном периоде [Perrone S. et al., 2012]. Т.о., гипоксия является пусковым моментом выявленных изменений морфологии и структуры мембран эритроцитов, при которой уже антенатально происходят нарушения структуры мембран эритроцитов.

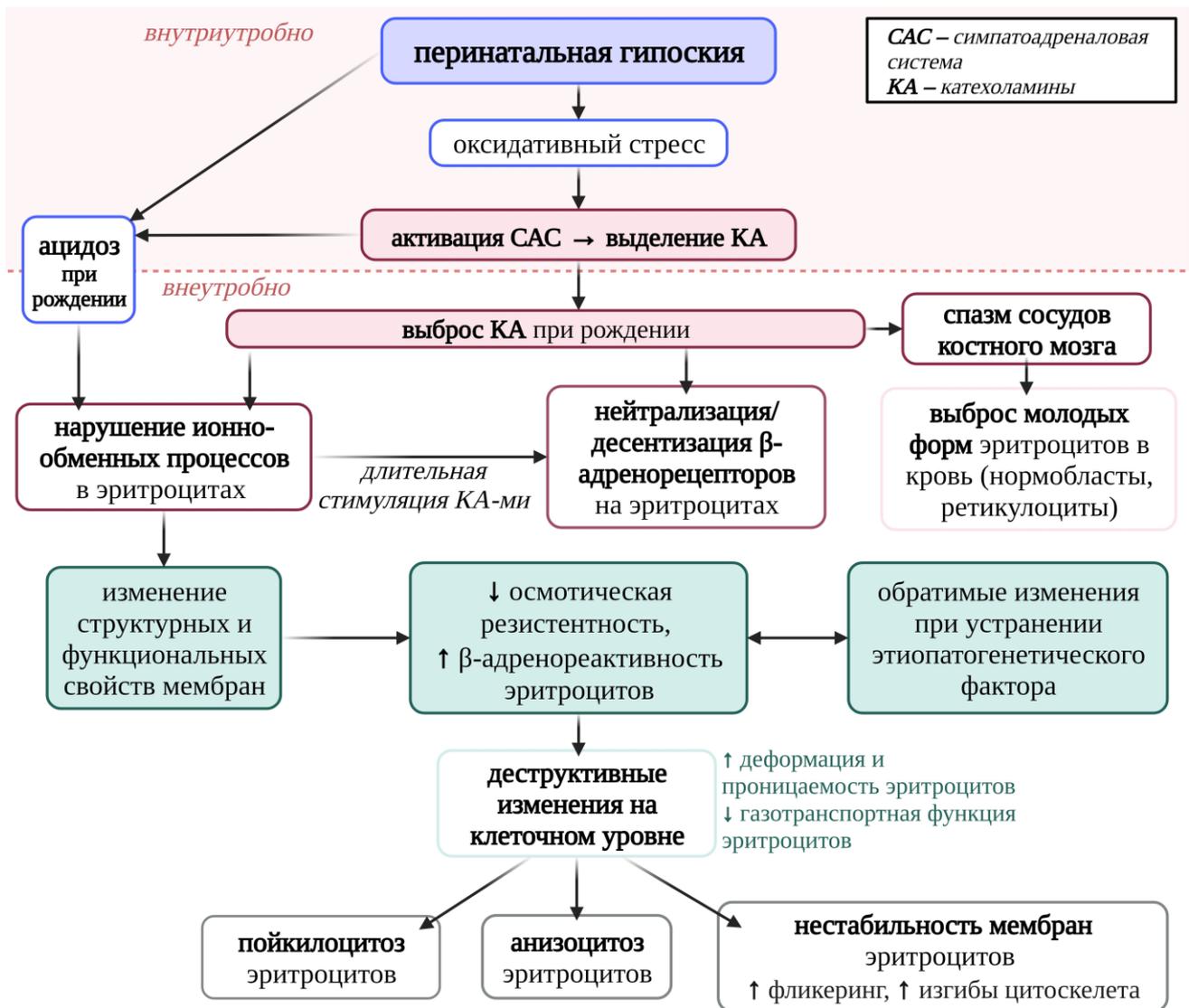
Резюмируя вышесказанное, течение раннего неонатального периода у новорожденных обеих групп характеризовалось выраженным пойкилоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов, которые проявлялись изменениями высот

$h_1$  и  $h_2$ , отражающих мембранный фликеринг и изгибы цитоскелета, выраженными, в большей степени у детей, перенесших перинатальную гипоксию. Такая приспособительная реакция, вероятно, обеспечивает сохранение функциональной способности эритроцита при гипоксии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при воздействии внутриутробной перинатальной гипоксии изменение функционального состояния эритроцитов происходит уже внутриутробно. При гипоксии происходит активация симпатoadреналовой системы, увеличение синтеза катехоламинов, что влечет за собой нарушение функциональной активности эритроцитов, а также структуры их мембраны и изменение морфологии, появление молодых форм эритроцитов (**рисунок 23**). Выявленные нами изменения адренореактивности эритроцитов свидетельствуют о влиянии степени перинатальной гипоксии на гомеостаз, концентрацию вырабатываемых катехоламинов, чувствительность эритроцитов и нормальное функциональное состояние адренорецепторов. Нестабильность адренореактивности организма и большая вариабельность показателей  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов отмечена на протяжении всего интранатального периода.

Ацидоз, как проявление перинатальной гипоксии, также оказывает воздействие на мембрану эритроцитов новорожденных (**рисунок 23**). Обнаружение адаптационных изменений в виде изменения высот и пространственных периодов поверхностей мембран эритроцитов, на наш взгляд, является ответной реакцией на возникшие изменения кислотно-основного состояния крови. Вероятно, стремление клеток сохранить свои функциональные способности является приспособительной реакцией. Течение раннего периода адаптации у детей, перенесших гипоксию, характеризуется большой вариабельностью морфологических форм, уменьшением количества платоцитов и появлением большого количества измененных и переходных форм эритроцитов. Выявленные изменения свидетельствуют об активности процессов на мембране эритроцитов.



**Рисунок 23.** Схема, отражающая изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов крови новорождённых при действии перинатальной гипоксии

## ВЫВОДЫ

1. В артериальной и венозной крови сосудов пуповины новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, высокая (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии)  $\beta$ -адренореактивность эритроцитов, косвенно характеризующая активацию симпатoadреналовой системы организма, в целом, зависит от степени компенсации ацидоза, выявленного при рождении.
2. Содержание молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов) в артериальной крови, полученной из сосудов (вена) пуповины у новорожденных, напрямую зависит от величины рН и позитивно коррелирует с уровнем  $\beta$ -адренореактивности эритроцитов.
3. В остаточной пуповиной крови новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, регистрируется снижение (в сравнении с новорожденными без перинатальной гипоксии) количества нормальных форм эритроцитов (паноцитов), и, напротив, повышение – стоматоцитов и переходных форм, отсутствующих в классификации (кодоциты). На фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови, выявленный пойкилоцитоз эритроцитов у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, сохраняется в течение всего раннего неонатального периода (7 суток после рождения).
4. В остаточной пуповиной крови новорожденных с признаками перинатальной гипоксии, регистрируется более выраженный (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) анизоцитоз эритроцитов (уменьшение числа нормоцитов). Выявленные изменения у данной категории детей сохраняются через 7 суток после рождения, на фоне нормализации показателей кислотно-основного состояния крови.
5. У новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию, эритроциты остаточной пуповиной крови, а также венозной крови, полученной через 7 часов и 7 суток после рождения, характеризуются более выраженной (по сравнению с новорожденными без перинатальной гипоксии) нестабильностью мембран, оцениваемой по изменениям высот  $h_1$  (мембранный фликеринг) и  $h_2$  (цитоскелет, спектринный матрикс).
6. Течение раннего неонатального периода (до 7 суток после рождения) у новорожденных, перенесших перинатальную гипоксию и без нее, в целом, характеризуется пойкилоцитозом, анизоцитозом, нестабильностью мембран эритроцитов (изменения высот  $h_1$  и  $h_2$ , отражающих мембранный фликеринг и изгибы цитоскелета), выраженными, в большей степени у детей с гипоксией.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агаджанян Н.А. Нормальная физиология / Н.А. Агаджанян, В.М. Смирнов. Москва: Медицинское информационное агентство, 2009. - 272с.
2. Адсорбция белка, глюкозы и холестерина на эритроцитах при действии адаптивных гормонов / Р.А. Горев, З.Ш. Смагулова, С.Г. Макарушко и др. // Научные труды I съезда физиологов СНГ. - Москва. - 2005. - С.15.
3. Азарова Е.В. Современные аспекты ранней неонатальной адаптации (обзор литературы) / Е.В. Азарова, Космович Т.В., Димова С.Г. и др. // Оренбургский медицинский вестник // 2015а. - Т. 3, № 2. - С. 59-67.
4. Азарова Е.В. Ранняя неонатальная адаптация: этиологические, патогенетические и клинические аспекты / Е.В. Азарова, А.А. Вялкова, Т.В. Космович и др. // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. - 2015б. - № 1. - С. 1-19.
5. Алигаджиев М.А. Особенности течения беременности у многорожавщих женщин. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики / М.А. Алигаджиев // Серия: Естественные и технические науки. - 2019. - № 4. - С. 110-112.
6. Андреева А.М. Механизмы адаптаций дыхательной функции крови у Teleostei / А.М. Андреева, И.П. Рябцева // Вопр. ихтиологии. - 2011. - Т. 51, № 6. - С. 834-843.
7. Асимметрия крови / В.П. Мищенко, Ю.М. Гришко, О.В. Коковская и др. // Науч. тр. I съезда физиологов СНГ. - 2005. - С. 98.
8. АСМ-диагностика патологии эритроцитов на основе физико-механического образа клеточной поверхности / М.Н. Стародубцева, Е.В. Воропаев, Д.Р. Петренёв и др. // Проблемы здоровья и экологии. - 2015. - Т. 44, № 2. - С. 99.
9. Атомно-силовая микроскопия в оценке механических свойств мембран эритроцитов при воздействии различных физико-химических агентов / Е.А. Шерстюкова, В.А. Иноземцев, А.П. Козлов и др. // Альманах клинической медицины. 2021.- Т. 49, № 6. - С. 427-434.

10. Байбарина Е.Н. Перинатальная медицина: от теории к практике / Е.Н. Байбарина, Д.Н. Дегтярев // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2013. № 5. - С. 4-7.
11. Белевич Е.И. Активность каспазы-3 в эритроцитах человека при окислительном стрессе / Е.И. Белевич, Д.Г. Костин, Е.И. Слобожанина // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биол. наук. - 2015. - № 2. - С. 34-37.
12. Белковый спектр мембраны эритроцитов и его изменения при патологии / И.В. Бабушкина, Ю.И. Пивоваров, Т.Е. Курильская и др. // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. - 2015. - Т. 32, № 3. - С. 168-168.
13. Бета-адренергическая реактивность эритроцитов и прогрессирование сердечной недостаточности у пациентов после инфаркта миокарда / А.А. Гарганеева, В.А. Александренко, Е.А. Кужелева и др. // Российский кардиологический журнал. - 2020. - Т. 25, №1. - 3407.
14. Борисов Ю.А. Резистентность эритроцитарных мембран: механизмы, тесты, оценка (обзор литературы) / Ю.А. Борисов, В.Н. Спиридонов, Е.Д. Суглобова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2007. - № 12. - С. 36-40.
15. Варианты адаптационных реакций у новорожденных группы высокого риска по внутриутробному инфицированию / М.Г. Елизарова, Е.В. Михалев, Г.П. Филлипов и др. //Акушерство и гинекология. - 2005. № 4. - С. 19-22.
16. Ващенко В.И. Эриптоз (квазиаптоз) эритроцитов человека и его роль в лекарственной терапии / В.И. Ващенко, В.Н. Вильянинов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2019. - Т. 17, № 3. - С. 5.
17. Вихревое влияние импульсного магнитного поля на осмотическую резистентность эритроцитов крыс / Г.А. Задорожная, В.П. Ляшенко, Т.Г. Чаус и др. // Вестник Днепропетровского университета. Биология. Медицина. - 2010. - Т. 2, №1. - С. 25-30.
18. Влияние блокаторов альфа и бета-адренорецепторов на способность адреналина изменять осмотическую резистентность эритроцитов небеременных женщин / А.В. Крысова, А.Д. Ноздрачев, А.А. Куншин и др. // Вестник Санкт-Петербургского университета. - 2013. - Т.3, №1 - С.54-68.

19. Володин Н.Н. Неонатология / Н.Н. Володин. - Национальное руководство. - Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2013. - 848 с.
20. Володин Н.Н. Неонатология / Н.Н. Володин. - Национальное руководство. - Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2019. - 896 с.
21. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. В 3-х томах. Т.3. / А.И. Воробьев. - Москва: Ньюдиамел, 2005. - 416 с.
22. Вычисление объема эритроцитов при анализе данных Атомно-силовой микроскопии / Ю.С. Нагорнов, А.С. Богомолов, Е.А. Аксенова и др // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 1. - С. 181-184.
23. Даваа Я.Х. Церебральная ишемия новорожденных: факторы риска и структурно-функциональное состояние мембран эритроцитов пуповинной крови: дис. канд. мед. наук: 14.01.08 / Я.Х. Даваа. - 2012. - 20 с.
24. Динамика показателей гемограммы у детей, рожденных с экстремально низкой массой тела / Л.В. Ледяйкина, Л.А. Балыкова, А.В. Герасименко и др. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2017. - Т. 62, № 6. - С. 51-56.
25. Длусская И.Г. Реакция некоторых звеньев системы красной крови на периодическое действие субмаксимальных перегрузок / И.Г. Длусская, Н.А. Гайдамакин, Р.К. Киселев // Космическая биология и авиакосмическая медицина. - 1991. - Т. 25, № 2. - С. 47-50.
26. Дрозд Е.С. Атомно-силовая микроскопия структурно-механических свойств мембран эритроцитов / Е.С. Дрозд, С.А. Чижик, Е.Э. Константинова // Российский журнал биомеханики. - 2009. - Т. 13, № 4. - С. 22-30.
27. Дудукин С.Г. Эритроциты как модель для изучения влияния неионизирующих ЭМИ на резистентность мембран клеток / С.Г. Дудукин // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. - 2020. -Т. 1, №2 (29). - С. 13-17.
28. Еремина О.В. Совершенствование диагностики и тактики ведения родов при интранатальной гипоксии плода: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.01.01 / О.В. Еремина. - 2014. - 24 с.
29. Жадова О.И. Определение уровня энергетических затрат у новорожденных детей до начала легочного дыхания / О.И. Жадова, Л.И. Иржак, Т.А. Потапова // В мире научных исследований. - 2012. - С. 148-151.

30. Зинчук В.В. Функциональная система транспорта кислорода: фундаментальные и клинические аспекты / В.В. Зинчук, Н.А. Максимович, М.В. Борисюк. - Гродно: ГГМУ, 2003. - 236 с.
31. Изменения ультраструктуры поверхности мембран эритроцитов после кровопотери и их коррекция лазерным облучением / В.В. Мороз, А.К. Кирсанова, И.С. Новодержкина и др. // Общая реаниматология. - 2010. - Т. 6, № 2. - С. 5-9.
32. Измерение упругоэластичных свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro* / В.А. Сергунова, Е.К. Козлова, Е.А. Мягкова и др. // Общая реаниматология. - 2015. - Т. 11, № 3. - С. 39.
33. Карпун Н.А. Инфекционная защита пострадавших с тяжёлой сочетанной травмой/ Н.А. Карпун, Е.А. Евдокимов, Н.И. Чаус // Медицинский алфавит. Неотложная медицина. 2013. - № 4. - С. 38-41.
34. Клинический протокол «Ведение родов» № 19 от «10» декабря 2015 года - 8 с.
35. Клинический патоморфоз эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. - Атлас. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 2003. - 166 с.
36. Козинец Г.И. Клетки крови и костного мозга / Г.И. Козинец. - Москва: МИА, 2004. - 203 с.
37. Кононенко В.Л. Фликкер эритроцитов. 1. Теоретические модели и методы регистрации / В.Л. Кононенко // Биологические мембраны. - 2009. - Т. 26, № 5. - С. 352-369.
38. Коррекция кислотно-основного состояния при гипоксически-ишемическом поражении головного мозга у новорожденных / К.С. Кирьяков, Р.Б. Хатагова, Е.В. Тризна и др. // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2018. №1 - С. 40-45.
39. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Е.А. Кост. - Москва, 1975. - С. 85-89.
40. Кочарли Н.К. Влияние ионов тяжелых металлов на мембранную устойчивость эритроцитов в норме и при различной патологии организма / Н.К. Кочарли, С.Т. Гумматова, Х.Д. Абдуллаев и др. // Фундаментальные исследования. - 2012. - № 11. - С. 299-303.

41. Кривенцев Ю.А. Современный взгляд на гетерогенную систему гемоглобина / Ю. А. Кривенцев, Р.А. Бисалиева, П.А. Иванов // Астраханский мед. журн. - 2012. - Т. 7, № 3. - С. 19-34.
42. Ламзин И.М. Исследование изменений биофизических свойств эритроцитов при хранении в эритроцитсодержащих средах с помощью атомно-силовой микроскопии / И.М. Ламзин, Р.М. Харуллин // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2014. - Т. 10, № 1. - С. 44-48.
43. Леонова Е.В. Патофизиология системы крови / Е.В. Леонова, А.В. Чантурия, Ф.И. Висмонт. - Минск: БГМУ, 2009. - 13 с.
44. Липунова, Е.А. / Физиология крови: моногр. исслед. / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2007. – 324 с.
45. Лобов И.А. / Влияние способа подготовки образца на морфофункциональные характеристики эритроцитов при исследовании методом атомно-силовой микроскопии / И.А. Лобов, Н.А. Давлеткильдеев // Вестник Омского университета. 2013. - № 2. - С. 129-132.
46. Луговская С.А. Ретикулоциты / С.А. Луговская, М.Е Почтарь. - Москва: Триада, 2006. - 60 с.
47. Льюис С.М. Практическая и лабораторная гематология / С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Бэйтс. - Москва:ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 720 с.
48. Мельченко Е.А. Применение атомно-силовой микроскопии при исследовании биофизических свойств мембран эритроцитов / Е.А. Мельченко // Наука. Инновации. Технологии. - 2015 - № 3. - С. 131-136.
49. Минеев В.Н. Исследование мембрано-рецепторного комплекса эритроцитов с помощью экзогенного цАМФ при бронхиальной астме / В.Н. Минеев, И.И. Нестерович, Н.Н. Лукашевская // Пульмонология. - 2004. - № 4. - С. 28-33.
50. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии: учеб. пособие / В.Л. Миронов. - Н. Новгород, 2004. - 114 с.
51. Михайлис А.А. Стресс-индуцированная динамика гемолитической стойкости эритроцитов при различных видах повреждающих воздействий / А.А. Михайлис // Вестн. Рос. университета дружбы народов. Серия: Медицина. - 2009. - № 4. - С. 94-100.

52. Модификация осмотической резистентности эритроцитов под действием глюкокортикостероида / Д.А. Козочкин, О.В. Чибирева, М.С. Лапшин и др. // Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. - 2019. Т.1, № 4. - С. 24-28.
53. Молокова А.В. Гиперреактивность бронхов у детей с атопическим дерматитом и сочетанными формами аллергии / А.В. Молокова, Л.Ф. Казначеева // Аллергология. - 2004. - № 2.- С. 22-26.
54. Мороз В.В. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / В.В. Мороз, А.М. Голубев, А.В. Афанасьев // Общая реаниматология. - 2012. - Т. 8, № 1. - С. 52.
55. Морфология и агрегация эритроцитов в нанодисперсиях углерода/ А. С. Горионов, А.Г. Борисова, С.П. Рожков и др. // Экспериментальная биология. - 2009. - № 3. - С. 30-37.
56. Морфология эритроцитов при изоиммунизации новорожденных по резусфактору и авосистеме / С.А. Перепелица, В.А Сергунова., С.В. Алексеева и др. // Общая реаниматология. - 2015. - №2. - С. 25-34.
57. Мушкамбаров Н.Н. Молекулярная биология: учеб. пособие для студентов мед. вузов / Н.Н. Мушкамбаров, С.Л. Кузнецов // Изд. 2-е, испр. - Москва : Медицинское информационное агентство (МИА), 2007. - 535 с.
58. Мягкова Е.А. Повреждение клеток крови при травме и кровопотере: дисс. канд. мед. наук: 14.01.20 / Е.А. Мягкова. - 2014. - 98 с.
59. Нанотехнологии в педиатрии: перспективы использования атомно-силовой микроскопии для диагностики / Ю.Н. Кусельман, В.В. Басырова, Б.Б. Светухин и др. // Вопросы диагностики в педиатрии. - 2010. - Т. 2, № 1. С. 5-8.
60. Новицкий В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. - Томск: Издательство Томского университета, 2004. - 202 с.
61. Осмотическая резистентность эритроцитов в условиях различной напряженности геомагнитного поля и при действии дигоксина в условиях *in vitro* / В.Ю. Куликов и др. // Медицина и образование в Сибири. - 2010. - № 3. - С. 10.

62. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при адаптации к гипоксии / А.А. Солкина, Н.Н. Белявский, В.И. Кузнецов и др. // Вестник ВГМУ. - 2012. - Т. 11, №1. - С. 6-14.
63. Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных при многоплодной беременности / С.А. Перепелица, В.А Сергунова., О.Е. Гудкова и др. // Общая реаниматология. 2014b. - Т. 10, № 1. - С.12. DOI:10.15360/1813-9779-2014-1-12-24).
64. Особенности течения беременности и родов у первородящих и многорожавших женщин Белгородской области / С.П. Пахомов, И.А Юдина, Ю.В. Степенко и др. // В сборнике: наука и образование: отечественный и зарубежный опыт пятнадцатая международная научно-практическая конференция. Белгород. - 2018. - С. 331-335.
65. Особенности физиологии эритроцитов. Гемолиз и эриптоз / С.П. Чумакова, О.И. Уразова, А.П. Зима и др. // Гематология и трансфузиология. - 2018. - Т. 63, № 4. - С. 343.
66. Оценка морфофункциональных особенностей периферического отдела эритрона у детей с патологией органов дыхания / Л.В. Алачева, С.Л. Сашенков, Д.К. Волосников и др. // Вестн. Южно-Уральского гос. университета. Серия: образование, здравоохранение, физическая культура. - 2010. - Т. 19, № 195. - С. 38-42.
67. Перепелица С.А. Влияние перинатальной гипоксии на морфологию эритроцитов у новорожденных / С.А. Перепелица, В.А Сергунова., О.Е. Гудкова // Общая реаниматология. - 2017. - Т. 13. № 2. - С.14-23.
68. Перепелица С.А. Состояние мембраны эритроцитов недоношенных новорожденных в раннем неонатальном периоде / Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е. // Общая реаниматология. - 2014а. - Т. 10, № 6. - С. 46-54.
69. Пицхелаури Е.Г. Здоровье детей после вспомогательных репродуктивных технологий: вероятные риски и возможные осложнения / Е.Г. Пицхелаури, А.Н. Стрижаков, Е.В Тимохина // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2018. - Т. 12, № 3. - С. 56-63.
70. Погорелов В.М. Лабораторно-клиническая диагностика анемий / В.М. Погорелов, Г.И. Козинец, Л.Г. Ковалева. - Москва: МИА, 2006. - 173 с.

71. Показатель проницаемости эритроцитарных мембран в оценке функционального состояния организма / В.А. Мойсеенко, Л.И. Антоненко, Л.Л. Аршинникова и др. // Крымский терапевтический журнал. - 2007. - Т. 2, №2. - С. 103-106.
72. Полин Р.А. Секреты неонатологии и перинатологии / Р.А. Полин, А.Р. Спитцер. - Москва: Бионорм, 2013. - 622 с.
73. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов. Приказ Минздрава РФ от 26.05.03. - №220 // Справочник заведующего КДЛ, 2006. - № 3. - С.54-62.
74. Приходько А.М. / Современные технологии оценки состояния плода в родах. Прогнозирование гипоксии плода и исхода для новорожденного: дис. док. мед. наук: 3.1.4 / А.М. Приходько. - 2022. - 257 с.
75. Приходько А.М. Определение кислотно-основного состояния пуповинной крови. Показания и техника / А.М. Приходько, О.Р. Баев //Акушерство и гинекология. - 2018, № 5. - С. 127-131
76. Приходько А.М. Показатели кислотно-основного равновесия и газовый состав артериальной и венозной пуповинной крови в норме и при гипоксии плода / А.М. Приходько, А.Ю. Романов, Д.А. Шуклина и др. // Акушерство и гинекология. - 2019. - №2. - С. 93-97.
77. Радзинский В.Е. Прототип Электронное издание на основе: Гинекология: учебник / В.Е. Радзинского. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2017. - 400 с.
78. Различие кинетики кислотного и осмотического гемолиза эритроцитов при микроскопии / В.В. Сынин, В.Г. Лычев, А.В. Андриенко и др. Мат. междунар. конф. «Гемореалогия в микро- и макроциркуляции». - Ярославль, 2005. - 214 с.
79. Репарация ДНК в составе хроматина / Н.С. Герасимова, Н.А. Пестов, О.И. Кулаева и др. // Вестник Московского университета. Биология. - 2015. - Т. 16, № 3. - С. 21-25.
80. Ройтман Е.В. Биореалогия. Клиническая гемореалогия. Основные понятия, показатели, оборудование (лекция) / Е.В. Ройтман // Клиническая лабораторная диагностика. - 2001. - № 5. - С. 25-32.
81. Руководство пользователя анализатора MEDICA EasyStat, 2004. - 115 с.

82. Румянцев А.Г. Пуповинная кровь, как источник информации о состоянии плода / А.Г. Румянцев, С.А. Румянцев // Педиатрия. - 2012. - Т. 91, № 3. - С. 44-51.
83. Савельева Г.М. Акушерство // Под ред. Г.М. Савельевой. - Москва: Медицина, 2000. - С. 481-490.
84. Сахарова Е.С. Анемия недоношенных детей. Патогенез, диагностика, лечение и профилактика / Е.С. Сахарова, Е.С. Кешишян, Г.А. Алямовская // Медицинский совет. - 2015. - № 6. - С. 10-16.
85. Серебрякова Е.И. Клиническое значение эритроцитарных индексов у недоношенных новорожденных с синдромом полиорганной недостаточности / Е.И. Серебрякова, Д.К. Волосников // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2011. - № 1. - С. 17-32.
86. Серебрякова Е.Н. Система эритрона в патогенезе критических состояний у новорожденных детей: дис. д-ра мед. наук: 14.01.08 / Е.Н. Серебрякова, 2020. - 330 с.
87. Сидельникова В.М. Механизмы адаптации и дезадаптации гемостаза при беременности / В.М. Сидельникова, Р.Г. Шмаков. - Москва: Триада-Х, 2004. - 192 с.
88. Системная лечебная гипотермия в терапии тяжелой асфиксии у новорожденных / А.А. Зарубин, И.Е. Голуб, О.С. Федорова и др. // Анестезиология реаниматология. - 2016. - №4. - С. 269-272.
89. Современные представления о роли адипоцитокинов в программировании гормонально-метаболических процессов у маловесных к сроку гестации детей / А.В. Сукало, В.А. Прилуцкая, А.В. Солнцева и др. // Педиатрия. Восточная Европа. - 2015. - №1. - С. 130-141.
90. Состояние устойчивости эритроцитов как звено адаптации организма. / А. И. Савлуков, В.М. Самсонов, Р.Ф. Камиллов и др. // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. - Т. 4, № 6.- С. 13-17.
91. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская, Э.Э. Кузнецова, В.Г. горохова и др. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2010. - Т. 73, № 3. - С. 334-354.

92. Стрюк Р.И. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система / Р.И. Стрюк, И.Г. Длусская. - Москва, 2003. - 160с.
93. Суханова Л.П. Оптимизация перинатальной помощи как важнейший фактор сохранения здоровья населения России: дис. д-ра биол. наук: 03.33.13 / Л.П. Суханова. - 2006. - 335 с.
94. Терекулова А.С. Отсроченное пережатие пуповины новорожденных от матерей с артериальной гипертензией (обзор литературы) / А.С. Терекулова, Н.Ж. Джардемалиева // Вестник КазНМУ. - 2020. - № 2.- С. 36-39.
95. Тихомирова И.А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов. - автореф. дис. д-ра биол. наук: 03.00.13 / И.А. Тихомирова. - 2006. - 48 с.
96. Ткачук Е.А. Возрастные особенности кроветворной и иммунной систем у детей и подростков. Методика исследования и семиотика нарушений: учебное пособие для студентов / Е.А. Ткачук, Н.Н. Мартынович // ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра педиатрии. – Иркутск: ИГМУ, 2020. – 116 с.
97. Трошкина Н.А. Эритроцит: строение и функции его мембраны / Н.А. Трошкина, В.И. Циркин, С.А. Дворянский // Вятский медицинский вестник. - 2007. - № 2-3. - С. 32-40.
98. Тупиневич Г.С., Шамратова В.Г. Адренореактивность эритроцитов как показатель физической выносливости организма / Г.С. Тупиневич, В.Г. Шамратова // Современные проблемы науки и образования. - 2018. - № 6. - С. 1-8.
99. Трясучев А.В. Адreno- и холинореактивность эритроцитов, их взаимосвязи с сердечным ритмом и свободнорадикальным балансом крови в норме и при воздействии на нейромедиаторные процессы: дис. канд. биол. наук: 03.03.01 /А.В. Трясучев. – 2017. – 161 с.
100. Федосеев Г.Б. Бронхиальная астма / Г.Б. Федосеев, В.И. Трофимов. - СПб.: Нормедиздат, 2006. - 308 с.
101. Хадарцев А.А. Эритроциты и окислительный стресс (обзор литературы) / А.А. Хадарцев, Э.М. Наумов, Б.Г. Валентинов // Вестник новых медицинских технологий. - 2022. - Т. 29, № 1. - С. 93.

102. Хазанов А.И. Клиническая неонатология / А.И. Хазанов. - Москва: Нестор-История, 2014. - 408 с.
103. Халимова Ф.Т. Кластерный подход к оценке репродуктивного здоровья женщин /Ф.Т. Халимова // Вестник Академии Медицинских Наук Таджикистана. – 2017. - Т. 22, № 2, - С. 72-76.
104. Халимова Ф.Т. Особенности адаптации организма пришлого населения агропромышленного региона России (обзор литературы) / Ф.Т. Халимова, Ф.А. Шукуров, З.У. Арабова // Биология и интегративная медицина. - 2022. - № 3. - С. 48-93.
105. Циркин В.И. Способ оценки осмотической резистентности эритроцитов / В.И. Циркин, А.В. Крысова, А.А. Куншин // Патент на изобретение RU 2419792 С1 от 27.05.2021; номер заявки 2009145267/15 от 07.12.2009 г.
106. Чайка Н.А. Преэклампсия и здоровье новорожденных / Н.А. Чайка, Л.А. Данилова, Л.А. Литвиненко // Медицина: теория и практика. - 2019. - № 4. С. 593.
107. Чеснокова Н.П. Современные представления о патогенезе гипоксий, классификация гипоксий и пусковые механизмы развития / Н.П. Чесноков, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные наукоемкие технологии. - 2006. - № 5. - С. 23-26.
108. Шабалов Н.П. Неонатология / Н.П. Шабалов. - СПб, 2009. - Т. 1. - 735 с.
109. Шабалов Н.П. Неонатология: учеб. пособие: В 2 т. / Н.П. Шабалов. - 3-е изд. - Москва: МЕДпресс-информ, 2004. - Т. 1. - 608 с.
110. Шерстюкова Е.А. Нарушения молекулярной структуры мембран длительно хранящихся эритроцитов, предназначенных для гемотрансфузии: дис. канд. мед. наук: 14.03.03 / Е.А. Шерстюкова. - 2020. - 166 с.
111. Шукуров В.А. Показатели гомеостаза при краткосрочной адаптации человека к условиям высокогорья и реадаптации / Ф.А. Шукуров, Ф.Т. Халимова, З.У. Арабова // Биология и интегративная медицина. - 2020. - Т. 46, № 6. - С. 5-22.
112. Шунькина Г.Л. Биохимические аспекты диагностики нарушений функций почек у новорожденных детей, перенесших гипоксию: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.01.04 / Г.Л. Шунькина. - 2011. - 24 с.

113. Щербакова Ю.Г. Судороги в практике неонатолога. Символ науки / Ю.Г. Щербакова, Е.В. Малышева // Символ науки. - 2021. № 5. - С. 154-157.
114. A coarse-grained red blood cell membrane model to study stomatocyte-discocyte-echinocyte morphologies / N.M. Geekiyanage, M.A. Balanant, E. Sauret et al. // PLoS One. - 2019. - V. 14: 0215447.
115. Age related alterations of adrenoreceptor activity in erythrocyte membrane / G. Lomsadze, R. Khetsuriani, M. Arabuli et al. // Georgian Med. News. - 2011. - № 195. - P. 58-61.
116. Alamin A.A. The Role of Red Blood Cells in Hemostasis / A.A. Alamin // Semin Thromb Hemost. - 2021. - Vol. 47, № 1. - P. 26-31. Ali A. F. Is manual reticulocyte count a reliable option for under resourced countries? / A.F. Ali, B. Moiz, S. Omer // J. Pak Med Assoc. - 2010. - Vol. 60, № 11. - P. 892-896.
117. Alloimmunization is associated with older age of transfused red blood cells in sickle cell disease / P.C. Desai, A.M. Deal, E.R. Pfaff et al. // American journal of hematology. - 2015. - Vol. 90, № 8. - P. 691-695.
118. Analysis of nanostructure of red blood cells membranes by space Fourier transform of AFM images / E.K. Kozlova, A.M. Chernysh, V.V. Moroz et al. // Micron. - 2013. - V. 44. - P. 218-227.
119. Anton O. Strategies for implementing placental transfusion at birth: A systematic review / O. Anton, H. Jordan, H. Rabe. // Wiley Library - 2019. Vol. 43, № 3. - P. 411-427.
120. Assay of catechol-O-methyltransferase activity in human erythrocytes using norepinephrine as a natural substrate / M. Masuda, M. Tsunoda, Y. Yusa et al. // Ann. Clin. Biochem. - 2002. - Vol. 39, № 6. - P. 589-594.
121. Assay of catechol-O-methyltransferase activity in human erythrocytes using norepinephrine as a natural substrate / M. Masuda, M. Tsunoda, Y. Yusa et al. // Ann Clin Biochem. - 2002. - Vol. 39, № 6. - P. 589-94.
122. Association of umbilical cord milking vs delayed umbilical cord clamping with death or severe intraventricular hemorrhage among preterm infants / A. Katheria, F. Reister, J. Essers et al. // JAMA. - 2019. - Vol. 322, № 19. - P. 1877-1886.

123. Atomic force microscopy study of red blood cell membrane nanostructure during oxidation-reduction processes / E. Kozlova, A. Chernysh, V. Sergunova et al. // *Journal of Molecular Recognition*. - 2018. - V. 31, № 10: 2724.
124. Automated Quantification of Fragmented Red Blood Cells: Neonatal Reference Intervals and Clinical Disorders of Neonatal Intensive Care Unit Patients with High Values / A.J. Judkins, B.C. MacQueen, R.D. Christensen et al. // *Neonatology*. - 2019. - Vol. 115, № 1. - P. 5-12.
125. Birth asphyxia, determinants, and its management among neonates admitted to NICU in Harari and Dire Dawa Public Hospitals, eastern Ethiopia / S. Amsalu, M. Dheresa, Y. Dessie et al. // *BMC Pregnancy Childbirth*. - 2020. - Vol. 20, № 1. - P. 186.
126. Birth weight for gestational age, anthropometric measures, and cardiovascular disease markers in children / S. Kuhle, B. Maguire, N. Ata et al. // *J Pediatr*. - 2017. - Vol. 182. - P. 99-106.
127. Blood cell and iron status analytes of preterm and full-term infants from 20 weeks onwards during the first year of life / T.I. Takala, E. Makela, P. Suominen et al. // *Clin Chem Lab Med*. - 2010. - Vol. 48, № 9. - P. 1295-1301.
128. Bracci R. Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period / R. Bracci, S. Perrone, G. Buonocore // *Acta Paediatr Suppl*. - 2002. - Vol. 91, № 438. - P. 130-134.
129. Brain sparing effect on neurodevelopment in children with intrauterine growth restriction: a systematic review / M.J. Benítez-Marín, J. Marín-Clavijo, J.A. Blanco-Elena et al. // *Children (Basel)*. - 2021. - Vol. 8, № 9. - P. 745.
130. Bristow M.R.  $\beta$  – Adrenergic receptor blockade in chronic heart failure / M.R. Bristow // *Circulation*. – 2000. – Vol. 10. – P. 558 – 569.
131. Cardiac biomarkers in neonatal hypoxic ischaemia / D. Sweetman, K. Armstrong, J.F. Murphy et al. // *Acta Paediatr*. - 2012. - Vol. 101, № 4. - P. 338-343.
132. Cardiotocography plus ST analysis of fetal electrocardiogram compared with cardiotocography only for intrapartum monitoring: a randomized controlled trial / M.E.M.H. Westerhuis, G.H.A. Visser, K.G.M. Moons et al. // *Obstet Gynecol*. - 2010. - Vol. 115, № 6. - P. 1173–80.

133. Caulier A.L. Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis / A.L. Caulier, V.G. Sankaran // *Blood*. – 2022. - Vol. 139. – №16. – P. 2450-2459.
134. Cazzola M. Ineffective erythropoiesis and its treatment / M. Cazzola // *Blood*. 2022. - Vol. 139, № 16. - P. 2460-2470.
135. CD71+ erythroid suppressor cells impair adaptive immunity against *Bordetella pertussis* / A. Namdar, P. Koleva, S. Shahbaz et al. // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7, № 1. - P. 1–2.
136. Celkan T. Blue toe syndrome as a complication of intra-arterial chemotherapy for retinoblastoma / T. Celkan, S. Gode // *Publication history*. Published online. - 2020. - Vol. 131, № 6. - P. 801-802.
137. Chen X. Maternal and Fetal Risk Factors for Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Retrospective Study. / X. Chen, H. Chen, D. Jiang // *Int J Gen Med.* - 2023. - V. 16. - P. 537-545.
138. Comparison of cut and intact cord milking regarding cerebral oxygenation, hemodynamic and hematological adaptation of term infants / Ü. S. Orpak, H. Ergin, C. Çıralı et al. // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* - 2019. - Vol. 34, № 14. - P. 2259-2266.
139. Conformational distortions of the red blood cell spectrin matrix nanostructure in response to temperature changes in vitro / E. Kozlova, A. Chernysh, V. Sergunova et al. // *Scanning.* - 2019. - V. 2019: 8218912.
140. Constantino B.T. The Red Cell Histogram and The Dimorphic Red Cell Population / B.T. Constantino // *Labmedicine.* - 2011. - Vol. 42. - № 5. - P. 309.
141. Delayed cord clamping versus early cord clamping in elective cesarean section: a randomized controlled trial/ F. Cavallina, B. Galeazzob, V. Loretellib et al. // *Neonatology.* - 2019. - Vol. 116, №. 3. - P. 252-259.
142. Delayed cord clamping was not associated with an increased risk of hyperbilirubinaemia on the day of birth or jaundice in the first 4 weeks / N. Rana, L.J. Ranneberg, M. Målqvist et al. // *Actapeadiatrica.* - 2019. Vol. 109, №. 1. - P. 71-77.

143. Detection of erythrocytes in patients with multiple myeloma using atomic force microscopy / Y. Zhang, W. Zhang, S. Wang et al. // *Scanning*. - 2012. - V. 34. P. 295. DOI: 10.1002/sca.21008.
144. Determination of pH or lactate in fetal scalp blood in management of 231 intrapartum fetal distress: randomised controlled multicentre trial / E. Wiberg-Itzel, C. Lipponer, M. Norma et al. // *BMJ*. - 2008. - Vol. 336. - P. 1284–7.
145. Durkan A.M. Acute kidney injury post neonatal asphyxia / A.M. Durkan, R.T. Alexander // *J. Pediatr*. - 2011. - Vol. 158. - P. 29–33.
146. Dynamics of adreneractivity after transfer of myocardial infarction: annual observation / T.Y. Rebrova, E.F. Muslimova, V.A. Alexandrenko et al. // *Ter Arkh.* – 2021. - Vol. 93, № 1. - P. 44-48.
147. Dzierzak E. Erythropoiesis: development and differentiation / E. Dzierzak, S. Philipsen // *Cold Spring Harb Perspect Med*. - 2013. - V. 3, № 4: 011601.
148. Early alterations of red blood cell rheology in critically ill Patients / G. Reggiori, G. Occhipinti, A. De. Gasperi et al. // *M. Crit Care Med*. - 2009. - Vol. 37, № 12. P. 1-10.
149. Effects of delayed cord clamping on infants after neonatal period: A systematic review and meta-analysis / Y. Zhao, R. Hou, X. Zhu et al. // *International Journal of Nursing Studies*. - 2019. -Vol. 92. - P. 97-108.
150. Elective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds / N. Sundahl, J. Bridelance, C. Libert et al. // *Pharmacol Ther*. - 2015. - Vol. 152. - P. 28-41.
151. Eryptosis: Programmed Death of Nucleus-Free, Iron-Filled Blood Cells / P. Dreischer, M. Duszenko, J. Stein et al. // *Cells*. - 2022. - Vol. 11, № 3. - P. 503.
152. Erythrocyte membranes beta-adrenoreactivity changes after renal denervation in patients with resistant hypertension, relationship with antihypertensive and cardioprotective intervention efficacy / I.V. Zyubanova, A.Y.Falkovskaya, V.F. Mordovin et al. // *Kardiologiya*. - 2021. - Vol. 61, № 8. - P. 32-39.
153. Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism? / F.L.A. Willekens, J.M. Werre, Y. Groenen-Döpp et al. // *British journal of haematology*. - 2008. - Vol. 141, № 4. - P. 549-556.

154. Establishment of a predictive nomogram model for predicting the death of very preterm infants during hospitalization / J. Zhen-Zhen, S. Juan, Z. Zhu-Ye et al. // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. - 2022. - Vol. 15, № 24. - P. 654-661.
155. Executive summary: Neonatal encephalopathy and neurologic outcome, second edition. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Neonatal Encephalopathy. *Obstet. Gynecol.* - 2014. - Vol. 123, № 4. - P. 896-901.
156. Fanaroff M.L. Medico-legal implications of hypoxic-ischemic birth injury / S. M. Donn, M.L. Chiswick, J.M. Fanaroff // *Semin Fetal Neonatal Med.* - 2014. - Vol. 19, № 5. - P. 317-321.
157. Fetal scalp blood sampling: Do pH and lactates provide the same information? / A. Prouhèze, A. Girault, M. Barrois et al. // *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* - 2021. - Vol. 50, №4. – P. 101964.
158. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy / Q. Zhong, D. Inniss, K. Kjoller et al. // *SurfaceScienceLetters*. - 1993. - V. 290. - P. 688.
159. Frequency Rate of Abnormal Morphologic Shapes of the Erythrocytes upon the Different Types of Anemia / J. Akrimi, K. Jashamy, L. George et al. // *International Journal of Scientific & Engineering Research*. - 2013. - Vol. 7, № 4. - P. 2476-2482.
160. Gaskill P.J. Dopamine and norepinephrine are embracing their immune side and so should we / P.J. Gaskill, H. Khoshbouei // *Curr Opin Neurobiol.* - 2022. - Vol. 77. - P. 102626.
161. Genetic analyses in small for gestational-age newborns / S.E. Stalman, N. Solanky, M. Miho Ishida et al. // *J Clin Endocrin Metab.* - 2018. - Vol. 103, №3. - P. 917-925.
162. Gwozdziński K. Reactive Oxygen Species and Their Involvement in Red Blood Cell Damage in Chronic Kidney Disease / K. Gwozdziński, A. Pieniżek, L. Gwozdziński // *Oxid Med Cell Longev.* - 2021. – P. 6639199.
163. Hankins G.D.V. Defining the pathogenesis and pathophysiology of neonatal encephalopathy and cerebral palsy / G.D.V. Hankins, M. Speer // *Obstet Gynecol.* - 2003. - Vol. 102, № 3. - P. 628–36.

164. Helping Babies Breathe: global neonatal resuscitation program development and formative educational evaluation. *Resuscitatio* / N. Singhal, J. Lockyer, H. Fidler et al. // *Resuscitation*. - Vol. 83, № 1. - P. 90-96.
165. Hypoxic-ischemia and encephalopathy in at-term new-born / S. Marret, V. Jadas, A. Kieffer et al. // *Arch. Pediatr*. - 2014. Vol. 21, № 9. - P. 1026–1034.
166. I.Effects of polyphenol compounds and nitrogen oxide donors on lipid oxidation, membrane-skeletal proteins, and erythrocyte structure under hypoxia / V.V. Revin, N.V. Gromova, E.S. Revina et al. // *BioMed. Res. Int*. - 2019. – P. 6758017.
167. Imaging morphological details and pathological differences of red blood cell susing tapping-mode AFM / A.S.M. Kamruzzahan, F. Kienberger, C.M. Stroh et al. // *Biol. Chem*. - 2004. - V. 385. - P. 955.
168. Inflammatory response, immunosuppression, and cancer recurrence after perioperative blood transfusions / J.P. Cata, H. Wang, V. Gottumukkala et al. // *British journal of anaesthesia*. - 2013. - Vol. 110, № 5. - P. 690-701.
169. Investigation of red blood cells by atomic force microscopy / V. Sergunova, S. Leesment, A. Kozlov et al. // *Sensors (Basel)*. - 2022. - Vol. 22. - P. 2055.
170. Is perinatal asphyxia predictable? / A. Locatelli , L. Lambicchi , M Incerti et al. // *BMC Pregnancy Childbirth*. - 2020. - Vol. 20. - P. 186.
171. Is the sampling site along the umbilical artery significant? / S. Perlman, H Maatuk., E. Ron, et al. // *Gynecol Obstet Invest*. - 2002. - Vol. 54. №3. - P. 172-5.
172. Jorgensen J.S. Fetal scalp blood sampling in labor--a review / J.S. Jorgensen, T. Weber // *Acta Obstet Gynecol Scand*. - 2014. - Vol. 93, №6. - P. 548-55.
173. Khairy K. Shapes of Red Blood Cells: Comparison of 3D Confocal Images with the BilayerCouple Model / K. Khairy, F. Jijinn, J. Howard // *Cellular and Molecular Bioengineering*. - 2008. – Vol. 1. - P. 173-181.
174. Kim Y. Diagnostic approaches for inherited hemolytic anemia in the genetic era / Y. Kim, J. Park, M. Kim // *Blood research*. - 2017. - Vol. 52, № 2. - P. 84-94.
175. Kingdom J.C. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia / J.C. Kingdom, P. Kaufmann // *Placenta*. - 1997. - Vol. 18, № 8. - P. 613-21.

176. Kodippili G.C. Imaging of the diffusion of single band 3 molecules on normal and mutant erythrocytes / G.C. Kodippili, J Spector., C. Sullivan // *Blood*. - 2009. - V. 113, № 24. - P. 6237.
177. Lactate measurements and acid-base balance in cord blood / A. Martin, M. Gaillard, S. Miot et al. // *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. - 2003. - Vol. 32, № 8. - P. 713–9.
178. Lagercrantz H. The good stress of being born / H. Lagercrantz // *Paediatric Essay*. - 2016. - Vol. 14. - P. 1413-1416.
179. Lindroos L. The effect of twinto-twin delivery time intervals on neonatal outcome for second twins. / L. Lindroos, A. Elfvin, L. Ladfors // *Wennerholm U.B. BMC Pregnancy Childbirth*. - 2018. - Vol. 18, № 1. - P. 36.
180. Liss J. Gurrent metods for preimplantation genetic diagnosis / J. Liss, I. Chromik // *Ginecol Polska*. - 2016. - V. 87, № 7. - P. 522–6.
181. Liu J. Novel methods for studying normal and disordered erythropoiesis / J. Liu, X. Han, X. An // *Sci. China Life Sci*. - 2015. - Vol. 58. - P. 1270–1275.
182. Local mechanical oscillations of the cell surface within the range 0.2–30 Hz / A. Y. Krol, M.G. Grinfeldt, S.V. Levin et al. // *European Biophysics Journal*. - 1990. - Vol. 19, № 2. - P. 93-99.
183. Lux S.E. Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions / S. E. Lux IV // *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. - 2016. - Vol. 127, № 2. - P. 187-199.
184. MacLennan A.H. Cerebral palsy: causes, path ways, and the role of genetic variants / A.H. MacLennan, S. C. Thompson, J. Gecz // *Am. J. Obstet. Gynecol*. - 2015. - Vol. 213, № 6. - P. 779-788.
185. Manual and automated reticulocyte counts / M. Simionatto, J.P. de Paula, M.A. Chaves et al. // *Hematology*. - 2010. - Vol. 15, № 6. - P. 406-409.
186. Matte A. Oxidation and erythropoiesis / A. Matte, L. De Franceschi // *Curr Opin Hematol*. - 2019. - V. 26, № 3. - P. 145-151.
187. Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers / R.R. Huruta et al. // *Blood*. - 1998. - Vol. 92, № 8. - P. 2975-2977.

188. Metabolic remodeling of the human red blood cell membrane / Y.K. Park, C.A. Best, T. Auth et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2010. - Vol. 107, № 4. - P. 1289- 1294.
189. Modeling of the axon membrane skeleton structure and implications for its mechanical properties / Y. Zhang, K. Abiraman, H. Li et al. // *PLoS computational biology*. - 2017. -Vol. 13, № 2. – P. e1005407.
190. Morphometry and Stiffness of Red Blood Cells-Signatures of Neurodegenerative Diseases and Aging / V. Strijkova-Kenderova, S. Todinova, T. Andreeva et al. // *Int J Mol Sci*. 2021 - Vol. 23, № 1. - P. 227.
191. Nedoboy P.E. Slow but Steady-The Responsiveness of Sympathoadrenal System to a Hypoglycemic Challenge in Ketogenic Diet-Fed Rats / P.E. Nedoboy, M. Cohen, M.M. Farnham // *Nutrients*. - 2021. - Vol. 13, № 8. - P. 2627.
192. Neonatal eucapnic pH at birth: application in a cohort of 5392 neonates / C. Racinet, J.F. Peresse, G. Richalet et al. // *Gynecol. Obstet. Fertil.* - 2016. - Vol. 44, № 9. - P. 468-474.
193. Neonatal morbidity of small- and large-for-gestational-age neonates born at term in uncomplicated pregnancies / S.P. Chauhan, M.M. Rice, W.A. Grobman et al. // *Obstet Gynecol.* - 2017. - Vol. 130, № 3. - P. 511-519.
194. Neonatal reticulocyte count during the early postnatal period / M. Yamada, M. Chishiki, Y. Kanaib et al. // *Pediatrics & Neonatology*. - 2020. - Vol. 61, № 5. - P. 490-497.
195. Neonatal, postneonatal, childhood, and under-5-mortality for 187 countries, 1970–2010; a systematic analysis of progress towards Millennium Development Goal 4 / J.K. Rajaratnam, J.R. Marcus, A.D. Flaxman et al. // *Lancet*. - 2010. - № 14. - P. 1988-2008.
196. Niece K.L. In vitro study of the variable effects of proton pump inhibitors on voriconazole / K.L. Niece, N.K. Boyd, K.S. Akers // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2015. - Vol. 59. - P. 5548.
197. Nobile S. Neonatal outcome of small for gestational age preterm infants / S. Nobile, P. Marchionni, V.P. Carnielli // *Eur J Pediatr*. - 2017. - Vol. 176. - P. 1083-1088.

198. Nonlinear biomechanical characteristics of deep deformation of native rbc membranes in normal state and under modifier action / E. Kozlova, A. Chernysh, E. Manchenko et al. // *Scanning*. - 2018. - Vol. 2018. – P. 1810585.
199. Novel epinephrine and cyclic cAMP – mediated action on BCAM/Lu dependent sickle (SS) RBC adhesion / P.S. Hines, Q. Zen, S.N. Burney et al. // *Blood* - 2003. - Vol. 101, № 8. - P. 3281-3287.
200. Olofsson P. Umbilical cord pH, blood gases, and lactate at birth: normal values, interpretation, and clinical utility / P. Olofsson // *Expert review*. - 2023. - Vol. 228. - № 5. - P. 1222-1240.
201. Olofsson P. Umbilical cord pH, blood gases, and lactate at birth: normal values, interpretation, and clinical utility / P. Olofsson // *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. - 2023. - Vol. 228, № 5. - P. 1222-1240.
202. Oxidative injury in neonatal erythrocytes / S. Perrone, M.L. Tataranno, G. Stazzoni et al. // *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* - 2012. - V. 25. - P. 104.
203. Palis J. Ontogeny of erythropoiesis/ J. Palis // *Current Opinion in Hematology*. – 2008. - Vol. 15, № 3. - P. 155-161.
204. Physiological CTG categorization in types of hypoxia compared with MRI and neurodevelopmental outcome in infants with HIE / S. Pereira, R. Patel, A. Zaima et al. // *J Matern Fetal Neonatal Med.* - 2022. - Vol. 25. - P. 9675-9683.
205. Physiological stress response of young adults exposed to bullying during adolescence / L.D. Hamilton, M.L. Newman, C.L. Delville et al. // *Physiol. Behav.* - 2008. - Vol. 95, №5. - P. 617-624.
206. Placental compared with umbilical cord blood to assess fetal blood gas and acid-base status / A. Nodwell, L. Carmichael, M. Ross et al. // *Obstet Gynecol.* - 2005. - Vol. 105, № 1. - P.129–38.
207. Polin R.A. Neonatology / R.A. Polin, J.M. Lorens // *Combridge University Press*, 2008. - 585 p.
208. Predicting motor outcome and death in term hypoxic-ischemic encephalopathy / M. Martinez-Biarge, J. Diez-Sebastian, O. Kapellou et al. // *Neurology*. - 2011. - Vol. 76, № 24. - P. 2055-2061.

209. Prenatal administration of progestogens for preventing spontaneous preterm birth in women with a multiple pregnancy / J.M. Dod , R.M. Grivell, C.M. OBrien et al. *Cochrane Database Syst Rev.* - 2017. - Vol. 10, № 10. P. CD012024.
210. Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells / A.G. Kriebardis et al. // *Journal of cellular and molecular medicine.* – 2007. – Vol. 11, № 1. – P. 148-155.
211. Quantitative analysis of three-dimensional morphology and membrane dynamics of red blood cells during temperature elevation / K. Jaferzadeh, M. Sim, N. Kim et al. // *Scientific reports.* - 2019. - Vol. 9, № 1. - P. 1-9.
212. Rabe H. Maternal and infant outcomes after different methods of umbilical cord management / H. Rabe, O. Andersson // *JAMA.* - 2019. - Vol. 322, № 19. - P. 1864-1865.
213. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment / X. Chen, M. Song, B. Zhang et al. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016: 1580967.
214. Rebrova T.Y. Age-dependent changes in adrenoreactivity in experimental postinfarction cardiosclerosis / T.Y. Rebrova , S.A. Afanasiev, M.O. Ostrovik // *Adv Gerontol.* - 2020. - Vol. 33, № 4. - P. 729-734.
215. Red Blood Cell Metabolism In Vivo and In Vitro / A. D'Alessandro, A.T. Anastasiadi, V.L. Tzounakas et al. // *Metabolites.* - 2023. - Vol. 13, № 7. - P. 793.
216. Red Blood Cells: A Source of Extracellular Vesicles / W. Kuo, J. Tigges, V. Toxavidis et al. // *Methods in Molecular Biology.* - 2017. - Vol. 1660. - P. 15-22.
217. Red cell distribution width (RDW) in the newborn: normative data / A. Tonbul, C. Tayman, F. Catal et al. // *J Clin Lab Anal.* - 2011. - Vol. 25, № 6. - P. 422-425.
218. Red cell distribution width (RDW) in the newborn: normative data / A. Tonbul, C. Tayman, F. Catal et al. // *J. Clin Lab Anal.* - 2011. - Vol. 25, № 6. - P. 422-425.
219. Reference ranges for blood concentrations of nucleated red blood cells in neonates / R.D. Christensen, E. Henry, R. L. Andres et al. // *352 Neonatology.* - 2011. - Vol. 99, № 4. – P. 289-294.
220. Reference ranges for hematocrit and blood hemoglobin concentration during the neonatal period: data from a multihospital health care system / J. Jopling, E. Henry, S. E. Wiedmeier et al. // *Pediatrics.* - 2009. - Vol. 123, № 2. - P. 333-337.

221. Risk factors, characteristics and outcomes of necrotizing enterocolitis in late preterm and term infants / K. Al Tawil, H. Sumaily, I.A. Ahmed et al. // *J. Neonatal Perinatal. Med.* - 2013. - Vol. 6, № 2. - P. 125-130.
222. Robert D. Red blood cell distribution width: reference intervals for neonate / D. Robert, M. Hassan // *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* - 2015. - Vol. 28, № 8. - P. 338-343.
223. Ross M.G. Threshold of metabolic acidosis associated with newborn cerebral palsy: medical legal implications. / M.G. Ross // *Am J Obstet Gynecol.* – 2019. - Vol. 220, №4. - P. 348 - 353.
224. Rudenko S.V. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories / S.V. Rudenko // *Biochim.Biophys.Acta-Biomembranes.* 2010. - V. 1798. - P. 1767.
225. Ruef, P. Shear stress and force required for tether formation of neonatal and 369 adult erythrocytes / P. Ruef, J. Gehm, L. Gehm et al. // *Clin Hemorheol Microcirc.* - 2011. - Vol. 48, № 1. - P. 119-128.
226. Semenza G.L. Breakthrough science: hypoxia-inducible factors, oxygen sensing, and disorders of hematopoiesis / G.L. Semenza // *Blood.* - 2022. - Vol. 139, № 16. - P. 2441-2449.
227. Sender R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body / R. Sender, S. Fuchs, R. Milo // *PLoS Biol.* - 2016. - Vol. 14, № 8. - e1002533.
228. Sensitive quantitative proteomics of human hematopoietic stem and progenitor cells by data-independent acquisition mass spectrometry / S. Amon, F. Meier-Abt, L.C. Gillet et al. // *Mol. Cell. Proteomics.* - 2019. - Vol. 18, № 7. - P. 1454–67.
229. Shankaran S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy / S. Shankaran // *Curr. Opin. Pediatr.* - 2015. - Vol. 27, № 2. - P. 152-157.
230. Short-term morbidity and types of intrapartum hypoxia in the newborn with metabolic acidaemia: a retrospective cohort study / E. Pasquo, A. Commare, B. Masturzo et al. // *Bjog.* - 2022. - V. 129, № 11. - P. 1916-1925.
231. Sloan M. Association of a delayed cord-clamping protocol with hyperbilirubinemia in term neonates / M. Sloan // *Obstetrics and Gynecology.* - 2019. - V. 133, № 40. - P. 754-761.

232. Spectrin: structure, function and disease / R. Zhang, C. Zhang, Q. Zhao et al. // *Science China Life Sciences*. - 2013. - Vol. 56. - №12. - P. 1076-1085.
233. Starodubtseva M.N. The Effects of intravitreal administration of antifungal drugs on the structure and mechanical properties peripheral blood erythrocyte surface in rabbits / M.N. Starodubtseva, S. Karachrysafi, N.M. Shkliarava // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - Vol. 23. - P. 10464.
234. Statistical Dynamics of Flowing Red Blood Cells by Morphological Image Processing/ J.M. Higgins, D.T. Eddington, S.N. Bhatia et al. // *PLoS Computational*. - Vol. 5, № 2. - e1000288.
235. Steiner L.A. Erythrocyte disorders in the perinatal period / L.A. Steiner, P.G. Gallagher // *Semin. Perinatol.* - 2007. - Vol. 31. - P. 254.
236. Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress / G.J. Burton, O.S. Reshetnikova, A.P. Milovanov et al. // *Placenta*. - 1996. - Vol. 17, № 1. - P. 49–55.
237. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems / R. Kvetnansky, X. Lu, M.G. Ziegler // *Adv Pharmacol.* - 2013. - Vol. 68. - P. 359-97.
238. The effect of early umbilical cord clamping versus delayed clamping on maternal and newborn outcomes: a Jordanian study archives of disease in childhood / E. Nestor, S. Daniela, J. Esteban Gordillo et al. // *Fetal and neonatal edition*. - 2019. - Vol. 34, № 2. - P. 231-237.
239. The how, when, and why of the aging signals appearing on the human erythrocyte membrane: an atomic force microscopy study of surface roughness / M. Girasole, G. Pompeo, A. Cricenti et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2010. - Vol. 6, №. 6. - P. 760-768.
240. Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl<sub>2</sub> on red blood cells membrane / E.L. Demchenkov, A.A. Nagdalian, R.O. Budkevich et al. // *Ecotoxicol Environ.* - 2020. - Vol. 208. – P. 111683.
241. Validation of altered umbilical cord blood microRNA Expression in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy / M.P. O'Sullivan, A.M. Looney, G.M. Moloney et al. // *JAMA Neurol.* - 2019. - V. 76. P. 333.
242. Weimann A. Laboratory haematological changes in the field of intensive care medicine--the extended differential blood count / A. Weimann, K. Weimann, A. Lun

- // *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* - 2009. - Vol. 44, № 3. - P. 164-170.
243. Yeo J.H. Analyzing the Formation, Morphology, and Integrity of Erythroblastic Islands / J.H. Yeo, M.P. Cosgriff, S.T. Fraser // *Methods Mol Biol.* - 2018. - V. 1698. - P. 133-152.
244. Yıldız E.P. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: an update on disease pathogenesis and treatment / E.P. Yıldız, B. Ekici, B. Tatlı // *Expert Rev Neurother.* - 2017. - Vol. 17, № 5. - P. 449-59.
245. Zaigham M. Gestational age-related reference values for Apgar score and umbilical cord arterial and venous pH in preterm and term newborns / M. Zaigham, K. Källén, P. Olofsson // *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica.* - 2019. - Vol. 98, № 12. - P. 1618-1623.