

На правах рукописи

Поповичева Александра Николаевна

**ОНТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОСТАЗА, РЕОЛОГИИ И
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА КРОВИ
В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ
(НА ПРИМЕРЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА)**

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Нижегородский государственный агротехнологический университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Мартусевич Андрей Кимович

Официальные оппоненты:

Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Минздрава России, научный сотрудник отдела биохимии свободнорадикальных процессов

Иванова Ирина Павловна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный педагогический университет им. К.Д. Ушинского»

Защита диссертации состоится «06» февраля 2025 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.023.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем РАН по адресу: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем РАН по адресу: 123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76 А и на сайте:

<http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/ScienceN/DisserSov/Popovicheva2024/Popovicheva.html>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Транспорт дыхательных газов и всего спектра веществ для метаболизма клеток является скоординированной функцией крови, зависящей от адекватной работы системы ее микроциркуляции (Муравьев, Михайлов, Тихомирова, 2017; Stroobach, Naya, Fenech, 2019). Эритроциты за счет своих реологических свойств (агрегации и деформируемости) играют основную роль в микроциркуляции (Barshtein, Ben-Ami, Yedgar, 2007; Соколова, 2010; Baskurt, Meiselman, 2013; Nader et al., 2019; Lazari et al., 2020). Наряду с ключевым участием в процессе гемостаза, большое влияние на кровоток оказывают тромбоциты (Струкова, 2004; Kumar, 2021). Изучение системы микроциркуляции на разных стадиях онтогенеза является актуальным направлением в возрастной физиологии, позволяющим выявлять не только закономерности формирования микроциркуляторного русла в пространстве, но и характер его функционирования. Особое значение данные исследования приобретают в пре-, пубертатный и постпубертатный период развития организма (Бабошина, 2017; Литвин, 2009; Козлов, 1993; Тверитина, Федорова, 2010; Жмеренецкий с соавт., 2012). В литературе присутствуют обширные данные, определяющие отличия функциональных свойств эритроцитов и тромбоцитов практически здоровых детей от аналогичных показателей взрослых людей (Филатова, Сидоренко, Агаркова, 2015; Ким с соавт., 2020; van Elteren et al., 2016; Hvas, Favaloro, 2017). Метаболическую активность развивающегося организма также отражают показатели про- и антиоксидантного баланса крови (Некимоğlu et al., 2017; Osipova et al., 2016; Toral et al., 2019; Кашкалда, Сухова, 2019). Генерация активных форм кислорода (АФК), процессы свободнорадикального окисления (СРО) различных субстратов и антиоксидантной защиты оказывают разностороннее влияние на клеточный и тканевой метаболизм любых живых организмов и являются его неотъемлемой частью (Проскурнина, 2018; Parthasarathi, Lipowsky, 1999; Huang, Li, 2020). Также известно, что перекисное окисление липидов и белков клеточных и неклеточных компонентов крови оказывает значительное влияние на ее реологию и гемостаз (Sengoz et al., 2020; Бакунович, Буланова, Лобанок, 2017). Однако характер таковых взаимосвязей на различных этапах онтогенеза недостаточно изучен. Данные взаимосвязи имеют место в различных режимах функционирования организма, в том числе в условиях патологии.

Для любого патологического состояния организма (в частности, воспалительного процесса) свойственны расстройства микроциркуляции, выражающиеся в усилении агрегации эритроцитов, ухудшении их деформируемости и дезагрегации, а также изменения сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза (Zotova, Chereshev, Gusev, 2016; Угольник, Атаманенко, Тимошкова, 2019; Guven, Hilty, Ince, 2020; Aleman et al., 2014; Delannoy et al., 2015; Подзолков с соавт., 2018; Комарова с соавт., 2021). Кроме того, это состояние сопровождается сдвигами локального кровотока и окислительного метаболизма крови и тканей (Sies, 2020; Романенко, Соловьева, 2021). Вышеперечисленные особенности характерны в том числе для воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и частично определяют механизмы их развития (Alkim et al., 2015; Maharshak et al., 2009; Тюльтева с соавт., 2020; Akman et al., 2012; Кручинина с соавт., 2021; Cehreli et al., 2015; Coremans, Strubbe, Peeters, 2021). Можно предполагать, что при данной патологии возраст способен выступать в качестве значимого фактора выраженности сдвигов гомеостаза, однако этот вопрос до настоящего времени не изучен.

Цель исследования – изучить возрастные особенности взаимосвязи функциональных свойств клеток крови и ее окислительного метаболизма в норме и при воспалительных заболеваниях кишечника.

Задачи исследования:

1. Изучить реологические и гемостазиологические свойства крови у здоровых людей различного возраста.
2. Описать возрастные особенности протекания свободнорадикальных процессов и состояния антиоксидантной системы плазмы крови и эритроцитов.
3. Выявить взаимосвязь функциональных свойств клеток крови с про- и антиоксидантной активностью ее компонентов в онтогенезе человека.

4. Исследовать особенности гемостаза, реологии крови и окислительного метаболизма в различные периоды онтогенеза у лиц, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника, а также установить возраст-ассоциированную трансформацию взаимосвязи изучаемых параметров.

5. Изучить влияние гипербарической оксигенации на функциональные свойства клеток крови, состояние ее про- и антиоксидантной системы и их сопряжение в условиях патологии.

Научная новизна

Впервые интегративно изучены возрастные особенности показателей гемореологии, тромбоцитарного и плазменного гемостаза, качественных и количественных характеристик эритроцитов и тромбоцитов, а также интенсивность свободнорадикальных процессов и антиоксидантная активность плазмы крови и эритроцитов в онтогенезе человека. Показано, что увеличение хронологического возраста здоровых людей сопровождается усилением некоторых функциональных свойств клеток крови, в частности, их поток-индуцированной агрегации и активации тромбоцитов, интенсификации свободнорадикальных процессов на фоне постепенного становления антиоксидантного потенциала крови. При этом выявлены значительные межвозрастные отличия изучаемых свойств крови. У здоровых людей отмечены возрастные особенности сопряжения реологических свойств крови с показателями ее про- и антиоксидантной активности. Выявлено, что число взаимосвязей различных свойств крови прогрессивно нарастает с увеличением возраста, причем их количество максимально у взрослых людей, что свидетельствует о постепенном становлении данного сопряжения в онтогенезе.

Установлено, что для людей с воспалительными заболеваниями кишечника характерны нарушения реологических свойств крови, изменения функций тромбоцитов и гемостаза, сопряженные со сдвигами окислительного метаболизма, по сравнению с показателями соответствующих возрастных групп практически здоровых людей. Впервые показаны возрастные особенности указанных сдвигов, включающие модификацию функциональных свойств клеток крови и свободнорадикальных процессов при данной патологии. Выявлено, что для лиц с воспалительными заболеваниями кишечника старше 7 лет характерна взаимосвязь показателей окислительного метаболизма крови как с параметрами реологии, так и с показателями системы гемостаза. Применение гипербарической оксигенации способствует частичному восстановлению физиологического гомеостаза крови при воспалительных заболеваниях кишечника.

Научно-практическая значимость

Результаты, полученные в ходе выполнения данной работы, способствуют развитию представлений о свойствах и функционировании клеток крови (эритроцитов и тромбоцитов), определяющих работу системы ее микроциркуляции в целом и на разных возрастных этапах развития организма в частности. Результаты исследования дополняют представления о возраст-ассоциированных изменениях окислительного метаболизма крови (плазмы и эритроцитов) и могут служить нормативами для дальнейших изысканий в данной области. Определен характер взаимосвязей реологических, гемостазиологических свойств крови с ее про- и антиоксидантными параметрами в онтогенезе человека.

Исследование динамики изменения функциональных свойств клеток крови и ее окислительного метаболизма при ВЗК, а также изучение их взаимосвязей и взаимозависимостей способствует более глубокому пониманию особенностей патологического (воспалительного) процесса в онтогенезе и позволяет предложить способы нормализации выявленных нарушений.

Также полученные данные могут быть использованы при преподавании соответствующих разделов нормальной и патологической физиологии в ВУЗах.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Рост и развитие практически здоровых людей характеризуются постепенным сопряжением функциональных и метаболических свойств клеток крови. Также в процессе онтогенеза отмечены взаимосвязи некоторых гематологических показателей между собой.

2. У здоровых людей старше 7 лет формируются взаимосвязи, определяющие сопряжение функциональных свойств клеток крови (в частности, гемореологии) и

показателей про- и антиоксидантного метаболизма плазмы и эритроцитов. Кроме того, существуют корреляционные взаимосвязи между функциональными свойствами крови и ее гематологическими параметрами.

3. Для пациентов с ВЗК (по сравнению с аналогичными возрастными группами здоровых людей) характерны значительные нарушения реологических и гемостазиологических свойств крови, а также развитие окислительного стресса. Выявлено значительное повышение количества корреляционных взаимосвязей между исследуемыми свойствами крови при ВЗК. Гипербарическая оксигенация способствует значительной нормализации некоторых изучаемых параметров крови у данной категории пациентов.

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 1.5.5 – физиология человека и животных согласно п. 2. Анализ механизмов нервной и гуморальной регуляции, генетических, молекулярных, биохимических процессов, определяющих динамику и взаимодействие физиологических функций; п. 3. Исследование закономерностей функционирования основных систем организма (нервной, иммунной, сенсорной, двигательной, крови, кровообращения, лимфообращения, дыхания, выделения, пищеварения, размножения, внутренней секреции и др.); п. 5. Исследование динамики физиологических процессов на всех стадиях развития организма; п. 6. Изучение механизмов функционирования клеток, тканей, органов, принципов их системной организации и п. 11. Изучение молекулярной и интегративной организации физиологических функций.

Личный вклад автора

Соискатель лично принимал участие во всех этапах работы: анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке и обобщении полученных данных, подготовке публикаций, представлении результатов работы на различных конференциях.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на Symposium 213 «Tailored Therapies for IBD: A Look into the Future» (Милан, 2018), XII международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология: от фундаментальных исследований в клиническую практику» и XIV международной научной конференции «Микроциркуляция и гемореология» (Ярославль, 2019, 2023), VII Всероссийской с международным участием школе-конференции по физиологии и патологии кровообращения (Москва, 2020), Российском Форуме по тромбозу и гемостазу совместно с 10-й (юбилейной) и 11-ой конференцией по клинической гемостазиологии и гемореологии (Москва, 2020, 2022), 74-й, 75-й, 77-й Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2021, 2022, 2024), XXIX Virtual, XXX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (Филадельфия, 2021, Лондон, 2022), XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Озон, активные формы кислорода, оксид азота, водород и высокоинтенсивные физические факторы в биологии и медицине» (Нижний Новгород, 2021), Двадцать седьмой и Двадцать восьмой Объединенной Российской Гастроэнтерологической Неделе (Москва, 2021, 2022), Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Фундаментальные исследования в педиатрии» (Санкт-Петербург, 2021), IV Всероссийской научной конференции с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение» (Астрахань, 2021), Всероссийской научной конференции – XV Ежегодной научной сессии аспирантов и молодых ученых (Вологда, 2021), международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины и высшего медицинского образования» (Бишкек, 2021), VIII Республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения молодых учёных в медицине – 2021» (Гродно, 2021), Международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее» (Курск, 2022), VIII Всероссийской научной конференции молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (Нижний Новгород, 2022), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022), Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 150-летию Михайловской клинической больницы баронета Я.В.

Виллие, совместно с III-й Конференцией «Гемореология, гемостаз, сосудистая биология» (Санкт-Петербург, 2023), X Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека» (Иваново, 2024), Российском Форуме по тромбозу и гемостазу (Москва, 2024).

По материалам диссертации опубликованы 33 научные работы, в том числе 15 – в изданиях, рекомендованных ВАК для опубликования материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук (из них 13 – в изданиях, индексируемых международными базами цитирования Web of Science и Scopus), 15 – в иных изданиях и материалах конференций различного уровня, получено 3 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 185 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследований, результаты, их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Библиографический указатель включает 458 источников: 151 отечественный и 307 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 51 рисунком и 8 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали кровь практически здоровых людей обоих полов следующих возрастных групп: 30 человек – 5-6 лет, 34 человека – 7-11 лет, 32 человека – 12-17 лет (юноши – 14 человек, девушки – 18 человек), 36 человек – 18-25 лет. У людей с ВЗК (болезнь Крона, неспецифический язвенный колит) были сформированы аналогичные возрастные группы: 17 человек – 5-6 лет, 34 человека – 7-11 лет, 67 человек – 12-17 лет (юноши – 29 человек, девушки – 38 человек), 31 человек – 18-25 лет. Лица с ВЗК находились на стационарном лечении в Университетской клинике ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России (зав. отделением – д.м.н., доцент Э.Н. Федулова). Получение образцов крови пациентов проводили при их госпитализации в стадии обострения. В комплекс лечения группы больных с ВЗК (n=27) была включена терапия гипербарической оксигенацией (ГБО), проводившейся в одноместной воздушно-кислородной барокамере «БароОкс 1.0». Курс составлял 5-8 ежедневных сеансов в режиме 1,3 АТА в течение 40 мин. Получение образцов крови этой группы больных проводили перед началом курса и после его окончания. На проведение исследования было получено разрешение Локального этического комитета ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. От практически здоровых людей и пациентов (либо их законных представителей) получено информированное согласие на участие в исследовании.

Предварительная обработка крови

Забор крови для проведения исследования осуществляли утром, натощак, путем венепункции локтевой вены в вакуумные пробирки, содержащие 3,8% цитрат натрия (соотношение 9:1), КЗЭДТА (для исследования активации тромбоцитов, определения их числа, индексов клеток крови, СОЭ, записи тромбоэластограммы) и активатор свертывания крови (для получения сыворотки). Затем путем центрифугирования отделяли плазму, обогащенную тромбоцитами, бестромбоцитарную плазму и эритроцитарную массу. Для исследования активации тромбоцитов, их спонтанной и индуцированной агрегации концентрацию клеток в обогащенной тромбоцитами плазме стандартизовали до $200-250 \times 10^9/\text{л}$. Для изучения агрегации эритроцитов стабилизированную цитратом натрия бестромбоцитарную плазму (или раствор декстрана) и эритроцитарную массу смешивали в соотношении 2:1. Для определения содержания МДА, восстановленного глутатиона, активности каталазы, а также агрегации под влиянием декстрана и состояния цитоскелета мембран эритроциты промывали в физиологическом растворе.

Методы изучения реологических свойств крови и мембранных свойств эритроцитов

Деформируемость эритроцитов определяли в искусственном сдвиговом потоке с помощью ригидометра (А.с. № 1363065, А.с. № 1377111). Общее количество деформированных (вытянутых) эритроцитов (% деформируемости) и коэффициенты их деформируемости ($\text{КД } 1 = \frac{A}{B}$; $\text{КД } 2 = \frac{A-B}{A+B}$, где А – длина эритроцита, В – ширина эритроцита) были определены с помощью специальной программы (патент № 2719221).

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию и дезагрегацию эритроцитов исследовали с помощью реоскопа, сконструированного по принципу Н. Schmid-Schönbein et al. (1973) в модификации Г.Я. Левина с соавт. (патент № 2278381). При оценке процессов агрегации и дезагрегации эритроцитов использовали следующие показатели: степень агрегации (максимальная амплитуда агрегатограммы M_a , мм), скорость агрегации (амплитуда агрегатограммы через 40 с после начала процесса агрегации A_{40} , мм), $t_{1/2}$ (время, за которое достигается половина M_a , с), степень дезагрегации D_5 , D_{10} , D_{15} , D_{20} (отношение в % амплитуды дезагрегации к M_a при скоростях сдвига 5, 10, 15 и 20 с^{-1}). Морфологию агрегатов эритроцитов в аутологичной плазме изучали с помощью светового микроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Германия), оснащенного мегапиксельной камерой цветного изображения (Sheremet'ev Yu.A., Popovicheva A.N., Levin G.Ya., 2014). В поле зрения микроскопа определяли наличие агрегатов эритроцитов в виде «монетных столбиков» и формирование «глыбчатых» (патологических) структур агрегатов.

Исследование мембранных свойств эритроцитов проводили на клетках, трижды промытых в физиологическом растворе. Определяли состояние цитоскелета и декстран-индуцированную агрегацию эритроцитов. Состояние цитоскелета эритроцитов изучали с помощью метода термоиндукции. Его принцип основан на том, что спектрин (основной белок цитоскелета эритроцитов) при прогревании клеток в диапазоне 49-49,5°C начинает денатурировать (Brandts J.F., et al., 1977), в результате чего появляется популяция сферических клеток. Увеличение количества сфероцитов свидетельствует о снижении стабильности цитоскелета эритроцитов. Суспензию отмытых эритроцитов в трис-НСI буфере (рН 7,4) помещали на водяную баню TW-2 (Elmi, Латвия) и прогревали при 49°C в течение 8 мин. После этого эритроциты фиксировали в 0,25% растворе глутарового альдегида (Acros Organics, США), приготовленного на фосфатном буфере (рН 7,4), и в поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество сфероцитов на 100 клеток (в %). Состояние мембран эритроцитов определяли по изменению агрегации клеток под влиянием 2% раствора декстрана 70 (Sigma, США), изучаемой с использованием реоскопа. При оценке процесса декстран-индуцированной агрегации эритроцитов использовали следующие показатели: степень агрегации (максимальная амплитуда агрегатограммы M_a , мм), скорость агрегации (амплитуда агрегатограммы через 40 с после начала процесса агрегации A_{40} , мм), $t_{1/2}$ (время, за которое достигается половина M_a , с).

Методы изучения показателей тромбоцитарного и плазменного гемостаза

Спонтанную (поток-индуцированную) агрегацию тромбоцитов определяли в искусственном сдвиговом потоке с помощью реоскопа. Для этого использовали плазму крови, стабилизированной цитратом натрия и стандартизованную по количеству тромбоцитов, помещали в камеру устройства, в которой создавали поток со скоростью сдвига 40 с^{-1} . Производили дискретную микрофотосъемку процесса агрегации с интервалом в 20 с после начала агрегации в течение 400 с. Степень и скорость агрегации определяли по количеству агрегатов (усл.ед.) через 400 с и 160 с соответственно после начала процесса с помощью специальной программы (Шагалова П.А. с соавт., 2020). Определение активации тромбоцитов в искусственном сдвиговом потоке проводили аналогично вышеописанной методике. Для этого использовали плазму крови, стабилизированной КЗЭДТА, также стандартизованную по количеству тромбоцитов (патент № 2416796). Определение в этих условиях агрегации тромбоцитов дает возможность судить о присутствии на их мембранах рецепторов в высокоаффинном (наличие активации тромбоцитов) или низкоаффинном (отсутствие активации тромбоцитов) состояниях. При наличии агрегации тромбоцитов оценивали ее степень по количеству агрегатов (усл.ед.) через 400 с после начала процесса агрегации. Индуцированную АДФ (2×10^{-5} М, AppliChem, Германия) агрегацию тромбоцитов в плазме крови, стабилизированной цитратом натрия и стандартизованной по количеству клеток, изучали турбидиметрическим методом G.V. Vorn (1962) на лазерном анализаторе 230LA-2 (НПФ «Биола», Россия) согласно инструкции. Процесс АДФ-индуцированной агрегации оценивали по ее степени (максимальная амплитуда агрегатограммы M_a , % светопропускания) и скорости (амплитуда агрегатограммы через 35 с и 50 с после добавления индуктора A_{45} и A_{60} соответственно, % светопропускания).

Содержание РФМК (10^{-2} г/л) в бестромбоцитарной плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, определяли ортофенантролиновым методом согласно инструкции к набору реагентов «РФМК-тест» (НПО «РЕНАМ», Россия). Исследование активности ФВ (в %) в бестромбоцитарной плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, проводили путем определения его способности вызывать агглютинацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристомицина на лазерном анализаторе 230LA-2 согласно инструкции к набору реагентов «Виллебранд-тест» (НПО «РЕНАМ», Россия). Интегральную оценку состояния системы гемостаза крови, стабилизированной цитратом натрия, проводили на тромбоэластографе TEG 5000 (Haemoscope, США) согласно инструкции. Анализировали показатели R (мин), K (мин), α (градусы) полученной тромбоэластограммы. Для аналогичного исследования также использовали кровь, содержащую КЗЭДТА.

Методы определения маркеров окислительного метаболизма крови

Содержание МДА (нмоль/мл) в бестромбоцитарной плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, и в эритроцитах, однократно промытых в физиологическом растворе оценивали по реакции с тиобарбитуровой кислотой («Ленреактив», Россия) (А.с. № 1807410). Концентрацию ИМА (ед.опт.пл.) в бестромбоцитарной плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, определяли по колориметрическому методу D. Bar-Or, E. Lau, J.V. Winkler (2000).

Методы определения показателей антиоксидантной системы крови

Концентрацию SH-групп (μ M) в бестромбоцитарной плазме крови, стабилизированной цитратом натрия, определяли по M.L. Hu (1994). Активность каталазы (ед.акт./г Нв) в гемолизате эритроцитов, дважды промытых в физиологическом растворе, определяли по методу Y. Aeble (1952). Содержание восстановленного глутатиона GSH (мкмоль/г Нв) в гемолизате эритроцитов, трижды промытых в физиологическом растворе, определяли по методу E. Beutler (1990).

Гематологические исследования

Значение СОЭ определяли по методу Вестергрена, уровень СРБ в сыворотке крови – иммунотурбидиметрическим методом на биохимическом анализаторе Indiko (Thermo Fisher Scientific, США), концентрацию фибриногена – по методу Клауса на автоматическом коагулометрическом анализаторе ACL ELITE Pro (Instrumentation Laboratory Company, США). На гематологическом анализаторе Hematology analyzer ABX Pentra 60 (HORIBA Medical, Франция) кондуктометрическим методом определяли число тромбоцитов, индексы эритроцитов и тромбоцитов.

Статистическая обработка результатов

Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm \sigma$). Количественные показатели прошли проверку на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка (пакет программ «Statistica 6.0»). Результаты исследования обработаны с применением методов параметрической статистики. Для множественных сравнений применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с использованием критерия Габриэля. Для оценки различий между двумя выборками применяли критерий Стьюдента. Для изучения взаимосвязей между изучаемыми параметрами применяли корреляционный анализ (метод Спирмена). Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и $p < 0,001$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гемореологические и гемостазиологические характеристики крови у практически здоровых людей

Показано, что имеет место возраст-ассоциированное увеличение степени и скорости процесса спонтанной (поток-индуцированной) агрегации эритроцитов (рис. 1). Степень агрегации эритроцитов только с 12 до 17 лет превышает аналогичный показатель у лиц младшего возраста (5-6 лет; $p < 0,05$). Наименьшая скорость процесса агрегации отмечена у лиц до 12 лет. Также нами показана тенденция к снижению $t_{1/2}$ процесса спонтанной агрегации эритроцитов. Дезагрегация эритроцитов при этом изменяется разнонаправленно (рис. 2). Тенденция к усилению процесса агрегации эритроцитов, подобная поток-индуцированной, определяется и при ее индуцировании декстраном (рис. 1).

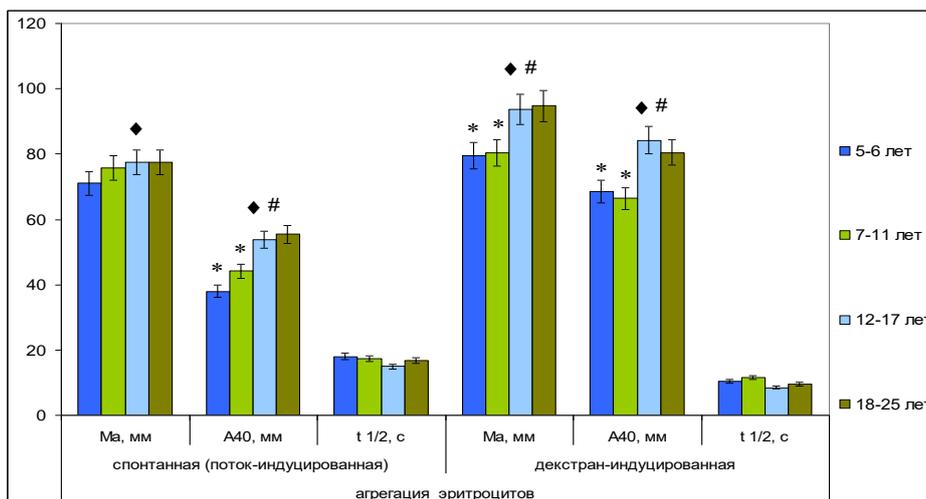


Рис. 1. Агрегация эритроцитов у людей различных возрастных групп
 здесь и далее: ● $p < 0,05$ – сравнение показателей людей 7-11 лет с показателями лиц 5-6 лет;
 # $p < 0,05$ – сравнение показателей людей 12-17 лет с показателями лиц 7-11 лет;
 ♦ $p < 0,05$ – сравнение показателей людей 12-17 лет с показателями лиц 5-6 лет, критерий Габриэля;
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ – сравнение со взрослыми людьми (18-25 лет), критерий Стьюдента

Деформируемость эритроцитов – важнейший показатель реологии крови – в процессе роста и развития имела тенденцию к снижению (рис. 3). При этом во всех сформированных возрастных группах по сравнению со взрослыми людьми отмечено статистически значимое увеличение коэффициента деформируемости эритроцитов КД 1 ($p < 0,05$), но его самое низкое значение выявлено в 12-17 лет. Снижение КД 2 отмечено на уровне тенденции ($p < 0,1$). Эритроциты детей всех изучаемых возрастных групп характеризуются выраженным нарушением стабильного состояния цитоскелета. Это проявлялось в значительном увеличении (в 1,5 раза и более; $p < 0,05$) количества сфероцитов по сравнению со взрослыми людьми (рис. 3).

Кроме того, значимые для агрегации и деформируемости характеристики эритроцитов также исследованы с помощью клинического анализа крови. Параметр MCV эритроцитов в процессе роста и развития достоверно возрастает ($p < 0,05$). У детей до 7 лет RDW значительно выше, чем у взрослых. Снижение MCH отмечалось у лиц до 12 лет, а в 12-17 лет этот показатель не отличался от аналогичной величины у взрослых. Достоверных отличий MCHC от показателя людей 18-25 лет не выявлено. Таким образом, в процессе онтогенеза происходят значительные изменения гемореологических свойств и мембранных свойств эритроцитов.

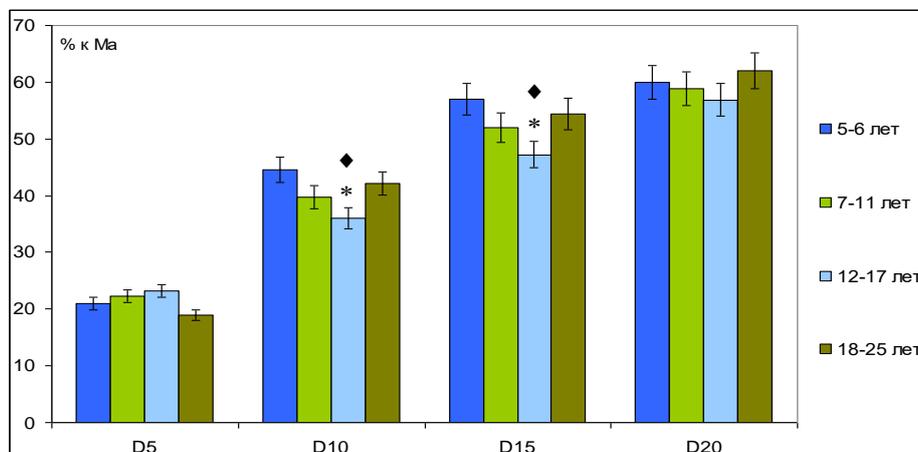


Рис. 2. Дезагрегация эритроцитов у людей различных возрастных групп

Также онтогенез сопровождается трендом к усилению функциональных свойств тромбоцитов – их активации и агрегации. Наименьшая степень активации тромбоцитов,

изучаемой в условиях искусственного сдвигового потока, показана в возрасте до 12 лет, ее самый низкий показатель отмечен в 5-6 лет (снижение на 35%; $p < 0,001$), а в 12-17 лет различий относительно взрослых людей не выявлено. Аналогичные результаты получены при изучении агрегации тромбоцитов, также индуцированной сдвиговым потоком (рис. 4). Подобным образом изменяется агрегация тромбоцитов, индуцированная АДФ.

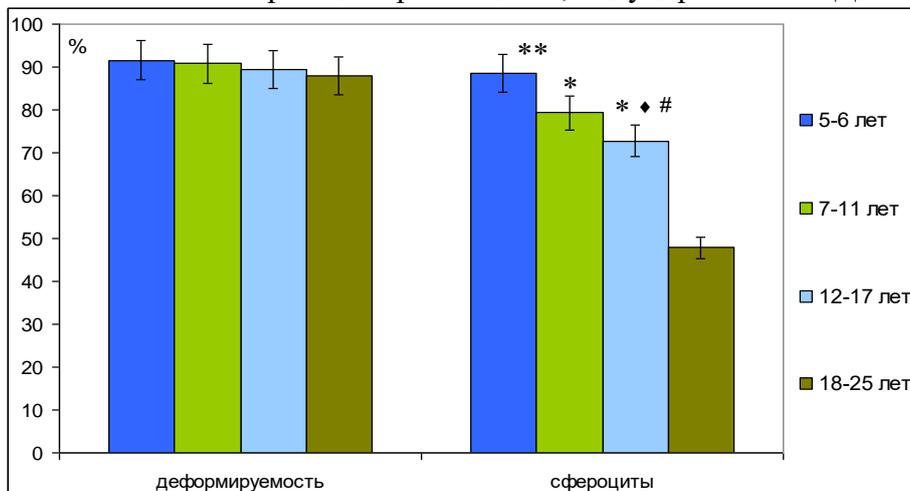


Рис. 3. Деформируемость и термоиндукция эритроцитов у людей различных возрастных групп

Усиление функциональной активности тромбоцитов сопровождается сходным изменением активности ФВ, играющего важную роль во взаимосвязанных процессах адгезии тромбоцитов и их активации. Только в 12-17 лет процент активности ФВ превышал аналогичный показатель у детей 5-6 лет, однако по сравнению со взрослыми данный показатель у представителей всех возрастных групп оказался сниженным (на 25%; $p < 0,05$). Также у лиц младше 18 лет отмечается снижение числа тромбоцитов, увеличение MPV, тенденция к увеличению PDW.

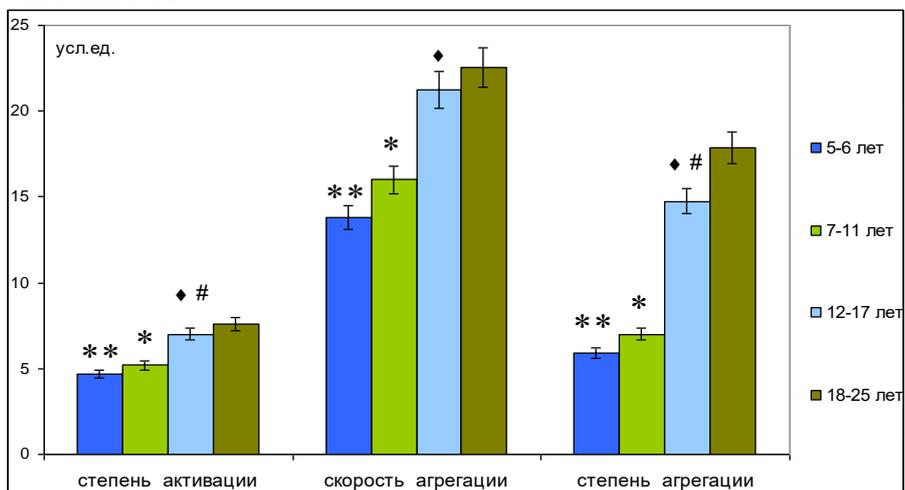


Рис. 4. Активация и агрегация тромбоцитов (индуцирование сдвиговым потоком) у людей различных возрастных групп

Активированные и агрегирующие тромбоциты способствуют гиперкоагуляции. Об ускорении свертывания крови здоровых людей 5-6 лет и 7-11 лет свидетельствуют снижение параметра R и уменьшение показателя K тромбоэластограммы более чем на 20% и 15%, а также увеличение показателя α (рис. 5). Маркером тромбоинемии и гиперкоагуляции является повышение концентрации РФМК в плазме крови. Однако было выявлено значительное (более чем в 2 раза; $p < 0,05$) снижение концентрации РФМК детей различного возраста по сравнению со взрослыми людьми, причем достоверное увеличение их содержания отмечено в 7-11 лет по сравнению с младшим возрастом. Уровень фибриногена (основного кофактора процесса агрегации клеток и белка свертывания крови) у людей всех изучаемых возрастных

групп не превышал референсных значений (2-4 г/л), однако в младшем возрасте его значение было ниже, чем в старшей возрастной группе (12-17 лет; $p < 0,05$). При этом у последних концентрация данного белка уже соответствовала уровню взрослых, что отражает его возрастное становление.

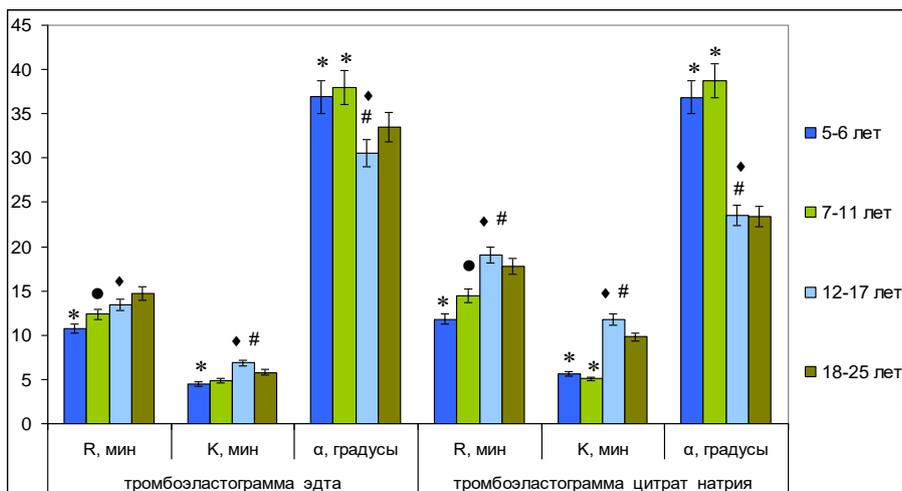


Рис. 5. Тромбоэластограмма крови у людей различных возрастных групп

Таким образом, в процессе роста и развития происходят значительные изменения функциональной активности сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза. Нарушения микроциркуляции крови, определяемые гемореологическими и гемостазиологическими свойствами, способствуют изменению ее окислительного метаболизма и антиоксидантной активности.

Окислительный метаболизм и антиоксидантная активность крови у практически здоровых людей

Уровень МДА в плазме крови практически здоровых людей с увеличением их возраста существенно не изменяется, а в эритроцитах его наименьшая концентрация отмечена в возрасте 5-6 лет и в 7-11 лет (снижение на 40% и 20% соответственно; $p < 0,05$) (рис. 6). Содержание ИМА плазмы крови с увеличением возраста демонстрировало тенденцию к возрастанию. Его наименьшая концентрация выявлена в 5-6 лет, а наибольшая отмечается в 12-17 лет (рис. 7).

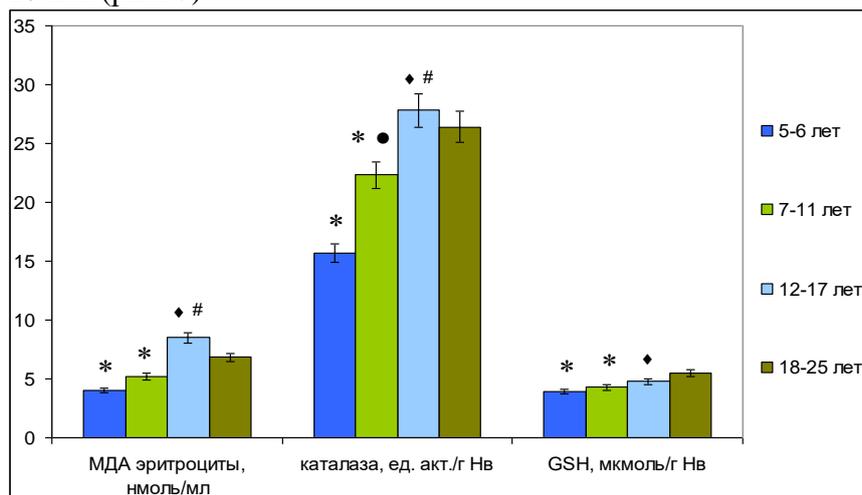


Рис. 6. Уровень МДА в эритроцитах и их антиоксидантная активность у людей различных возрастных групп

Не менее значимо изменялись и показатели антиоксидантной системы крови. Активность каталазы в эритроцитах с возрастом увеличивалась, ее наименьшие показатели отмечены в 5-6 лет и в 7-11 лет (снижение на 40% и 15% соответственно; $p < 0,05$) (рис. 6). Концентрация внутриэритроцитарного глутатиона с возрастом имела тенденцию к

увеличению, однако его значения в 12-17 лет достоверно превышали этот показатель у лиц младшего возраста ($p < 0,05$; рис. 6). Тенденция, выявленная при изучении содержания глутатиона в эритроцитах, четко сопрягается с возрастной динамикой уровня SH-групп в плазме крови практически здоровых людей.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что трансформация состояния про- и антиоксидантных систем крови в онтогенезе практически здоровых людей включает постепенную активацию свободнорадикальных процессов в плазме крови и эритроцитах, компенсируемую стимуляцией антиоксидантного потенциала биожидкости.

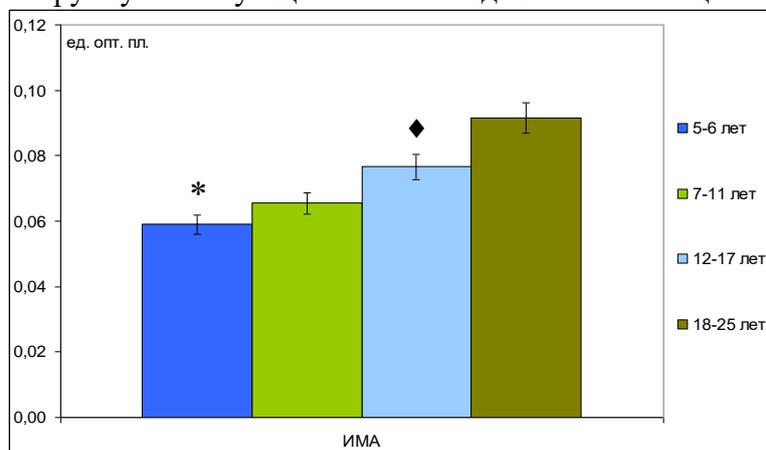


Рис. 7. Уровень ИМА плазмы крови у людей различных возрастных групп

Оценка сопряжения гемостазиологических, гемореологических и метаболических параметров крови у практически здоровых людей

Для выявления взаимосвязей между показателями гемореологии, гемостаза, про- и антиоксидантного метаболизма крови, а также ее гематологическими параметрами у практически здоровых людей нами был проведен корреляционный анализ в возрастных группах 5-6 лет, от 7 до 17 лет включительно и в 18-25 лет. У лиц в возрасте 5-6 лет была выявлена единичная прямая корреляционная взаимосвязь – между числом тромбоцитов и уровнем СОЭ ($r = 0,50$) (рис. 8). У людей 7-17 лет выявлено 11 корреляций, четыре из которых отражают взаимосвязи показателей реологии крови и ее окислительного метаболизма, а семь – показателей гемостаза и реологии крови с гематологическими параметрами ее анализа (рис. 9).

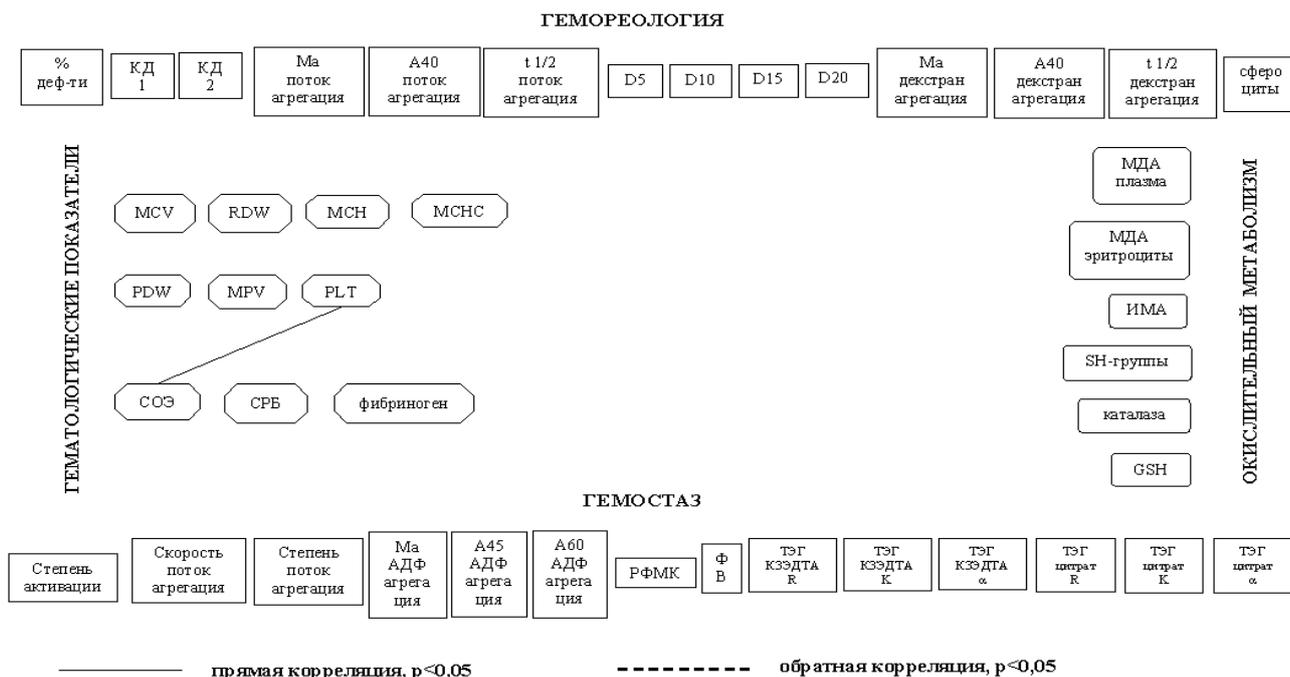


Рис. 8. Корреляционные связи у практически здоровых людей в возрасте 5-6 лет

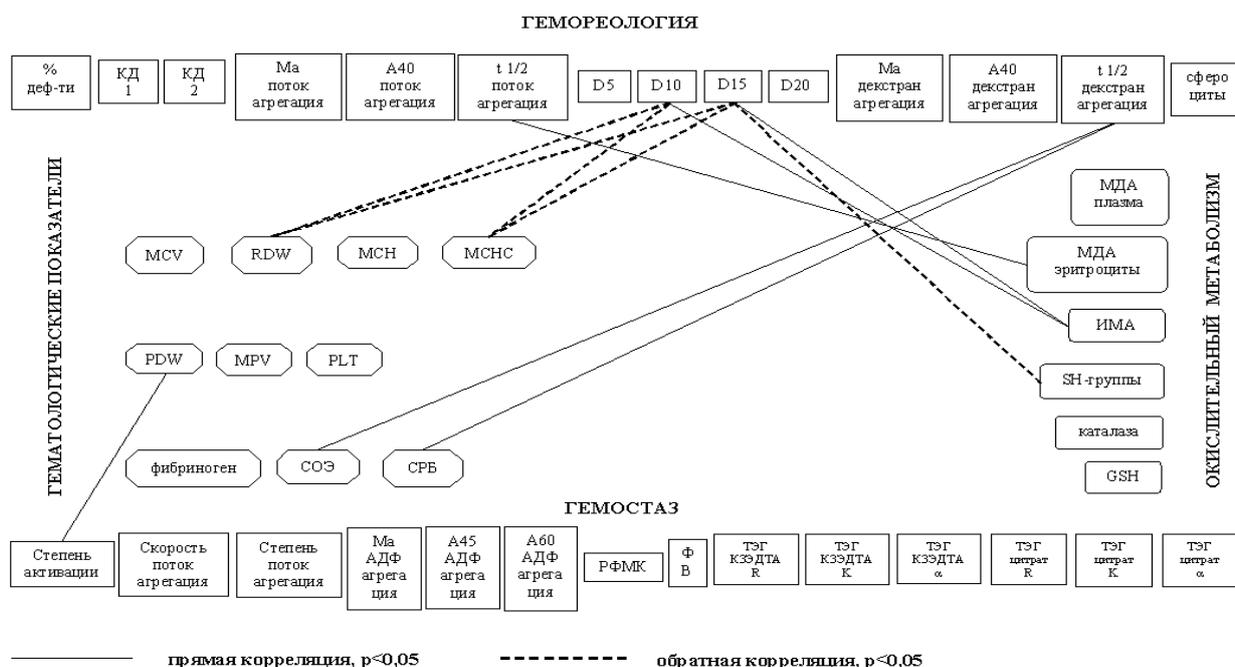


Рис. 9. Корреляционные связи у практически здоровых людей в возрасте 7-17 лет

Значительно большее количество корреляционных связей выявлено у взрослых людей (рис. 10). Так, четыре из них отражают взаимосвязи показателей реологии крови и ее окислительного метаболизма, три – между показателями гемостаза, семь – показателей гемостаза и реологии крови с гематологическими параметрами ее анализа. Также выявлены две взаимосвязи между гематологическими показателями крови.

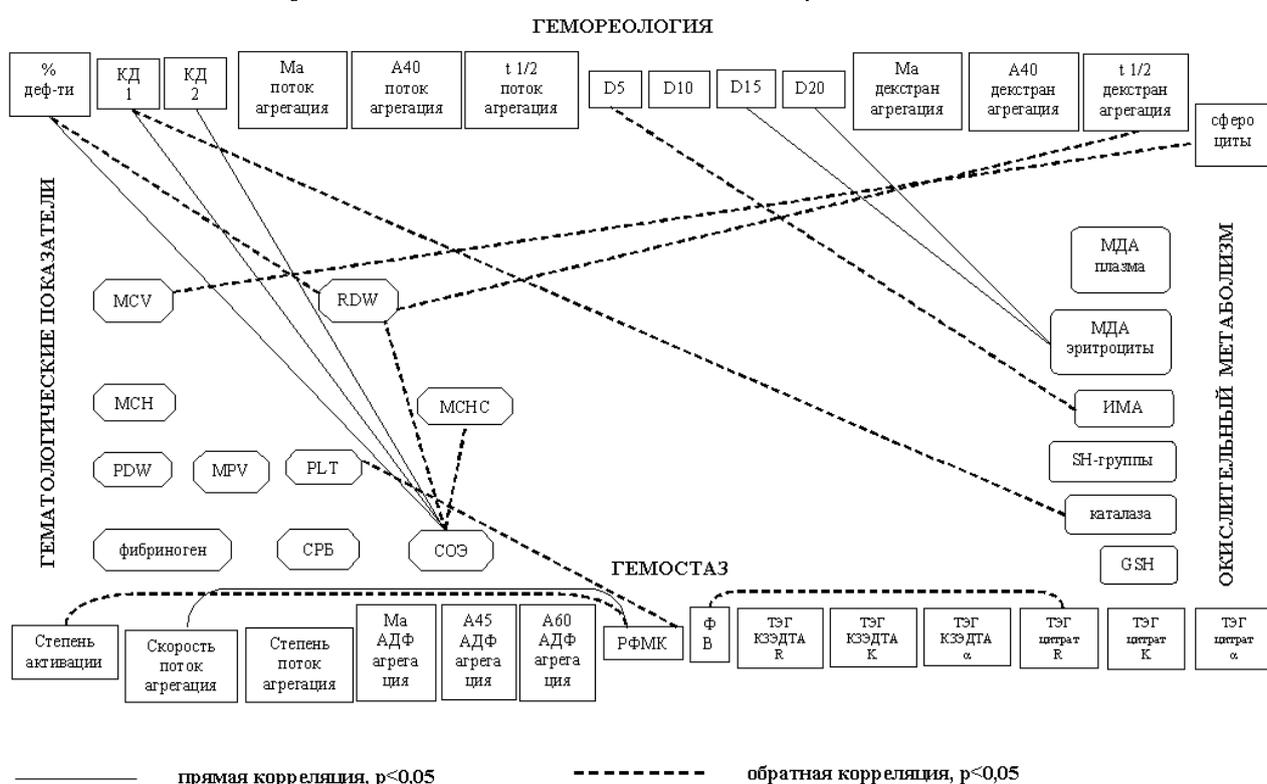


Рис. 10. Корреляционные связи у практически здоровых людей в возрасте 18-25 лет

Таким образом, процесс роста и развития характеризуется постепенным формированием и усложнением связей между изучаемыми свойствами крови. Это доказывается наличием многочисленных, значимых, разнохарактерных корреляционных взаимосвязей между реологическими, про- и антиоксидантными свойствами крови у

практически здоровых людей в возрасте от 7 лет и старше. Предполагаемый механизм сопряжения гемостазиологических, гемореологических свойств крови человека с параметрами ее окислительного метаболизма представлен на рис. 11.

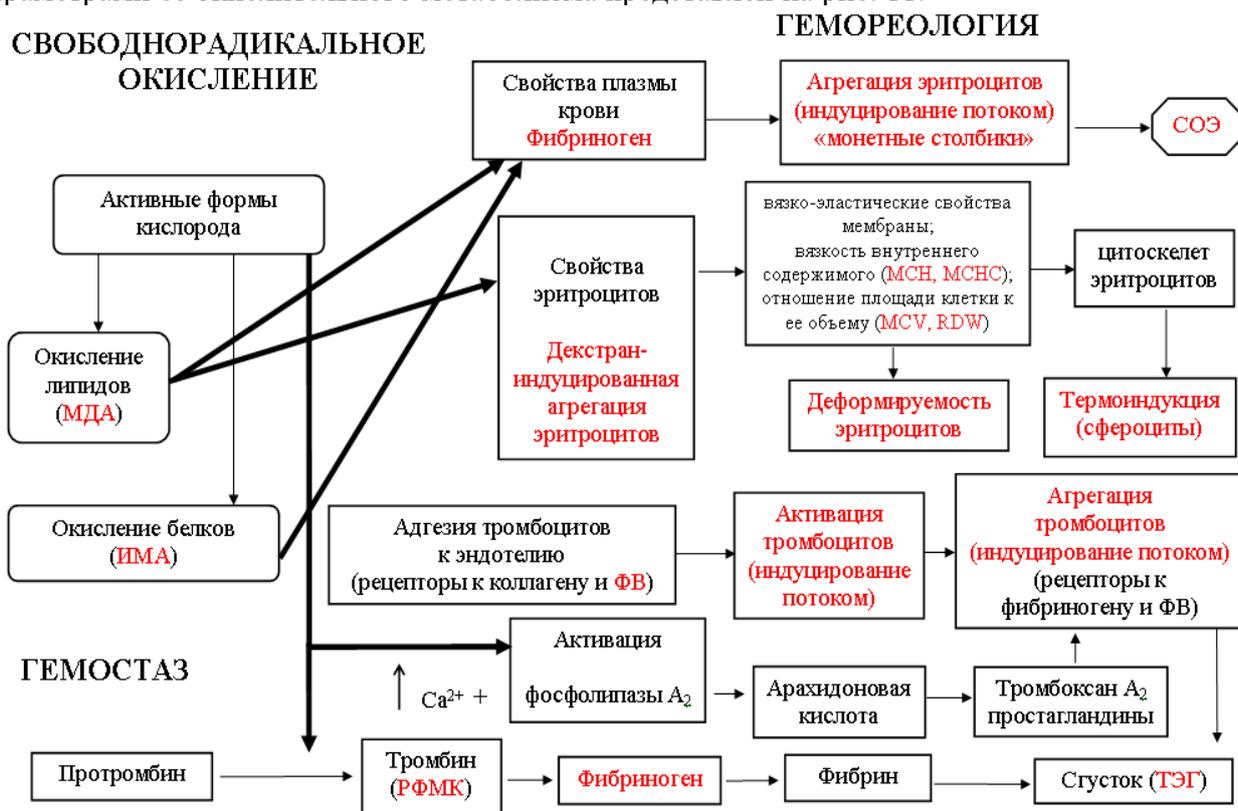


Рис. 11. Потенциальный механизм гомеостазирования системы крови по параметрам гемостаза, гемореологии и окислительного метаболизма (примечание: красным цветом обозначены анализируемые параметры)

Гемореологические и гемостазиологические свойства крови у пациентов с ВЗК

Увеличение хронологического возраста у пациентов с ВЗК характеризуется однонаправленным изменением процесса спонтанной (поток-индуцированной) агрегации эритроцитов: степень и скорость процесса имеют тенденцию к снижению (рис. 12). У пациентов до 17 лет включительно происходит значительное (в среднем в 1,3 раза; $p < 0,05$) возрастание степени процесса агрегации по сравнению с практически здоровыми людьми. У лиц 18-25 лет увеличение степени агрегации отмечалось на высоком уровне статистической значимости ($p < 0,001$). Скорость спонтанной агрегации эритроцитов пациентов всех возрастных групп характеризовалась статистически высокозначимым возрастанием ($p < 0,001$). Также у пациентов с ВЗК было выявлено снижение (более чем на 15%) показателя $t_{1/2}$ процесса агрегации и отмечены межвозрастные отличия ее параметров.

Неблагоприятным для процессов микроциркуляции является факт значительного снижения дезагрегации эритроцитов на низкой скорости сдвига – на 45% при ВЗК в 7-11 лет. Это свидетельствует о возможности распространения агрегации эритроцитов в более крупных сосудах, чем капилляры и малые венулы. Увеличение прочности эритроцитарных агрегатов (в 1,2 раза) выявлено и у пациентов самой младшей возрастной группы при 10 c^{-1} , а ее существенное ($p < 0,001$) снижение отмечено на высокой скорости сдвига (20 c^{-1}) у лиц с 7 до 11 лет включительно (по сравнению со здоровыми людьми). Аналогичные разнонаправленные изменения прочности агрегатов отмечены и по сравнению с показателями самой младшей возрастной группы пациентов (5-6 лет).

Значительно изменяется при ВЗК и характер агрегации эритроцитов – наряду с «монетными столбиками» появляются «глыбчатые» (патологические) структуры агрегатов. В отличие от спонтанной (поток-индуцированной) агрегации эритроцитов, их декстран-индуцированная агрегация снижается – до 20% практически во всех сформированных

возрастных группах по сравнению со здоровыми лицами соответствующего возраста и взрослыми людьми (рис. 12).

Нами установлено, что у лиц всех возрастных групп, имеющих ВЗК, значительно снижаются общее количество деформируемых в искусственном сдвиговом потоке эритроцитов (в среднем на 30% соответственно возрасту практически здоровых людей) и коэффициенты их деформируемости (рис. 13). Максимальные значения этих показателей характерны для 12-17 лет и превышают аналогичные у самого младшего возраста в 1,2 и более раз. Значительное изменение стабильности цитоскелета эритроцитов людей с ВЗК отмечено только в 5-6 лет (рис. 13).

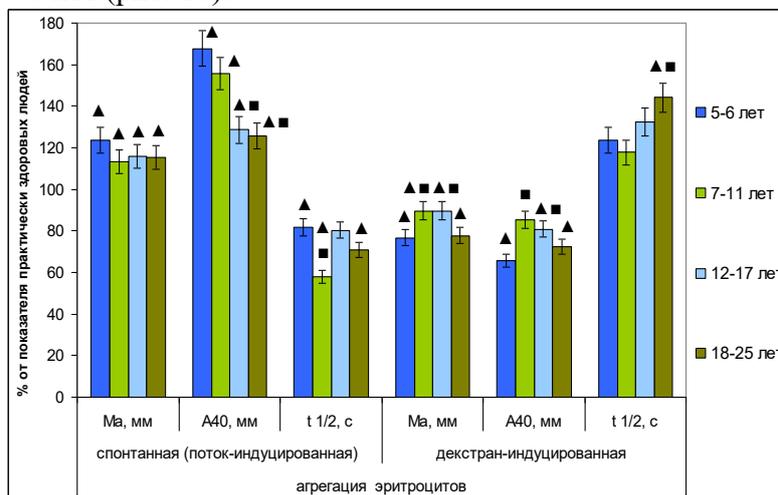


Рис. 12. Агрегация эритроцитов у пациентов с ВЗК

здесь и далее: ▲ $p < 0,05$ – сравнение с практически здоровыми людьми соответствующей возрастной группы; ■ $p < 0,05$ – сравнение с показателями пациентов 5-6 лет, критерий Стьюдента

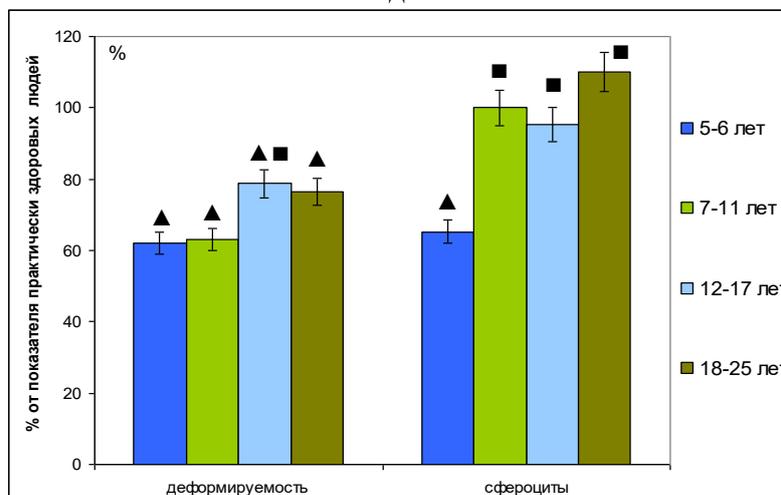


Рис. 13. Деформируемость и термоиндукция эритроцитов у пациентов с ВЗК

Практически для всех групп пациентов с ВЗК характерно увеличение RDW, а в 12-17 лет отмечено достоверное снижение MCV по сравнению со здоровыми людьми. Наиболее неблагоприятным для микроциркуляции является ассоциация снижения деформируемости эритроцитов с повышением RDW и снижением MCV (Patel K.V., et al., 2013). Достоверных отличий MCH и MCHC эритроцитов от значений у практически здоровых людей не выявлено.

Таким образом, процесс роста и развития людей с ВЗК сопровождается выраженными нарушениями реологических свойств крови (усилением агрегации эритроцитов, снижением их дезагрегации, значительным ухудшением деформируемости) и мембранных свойств эритроцитов.

В условиях развития воспаления при ВЗК тромбоциты находятся в высокоактивированном состоянии, что определяется повышенной экспрессией различных антигенов тромбоцитарной мембраны у взрослых пациентов и детей (Matowicka-Karna J., 2016; Ашкинази В.И. с соавт., 2015). В нашем исследовании активация тромбоцитов, определяемая в условиях искусственного сдвигового потока по количеству образующихся агрегатов при стабилизации крови КЗЭДТА, у пациентов всех изучаемых возрастов резко превышает (более чем в 2 раза; $p < 0,001$) соответствующие значения здоровых людей (рис. 14). Максимальное значение степени активации тромбоцитов выявлено у пациентов самого младшего возраста – в 5-6 лет. Аналогично характеризуется и процесс агрегации тромбоцитов (рис. 14). Однако хроническое воспаление вызывает снижение тромбоцитарной агрегации, индуцированной АДФ.

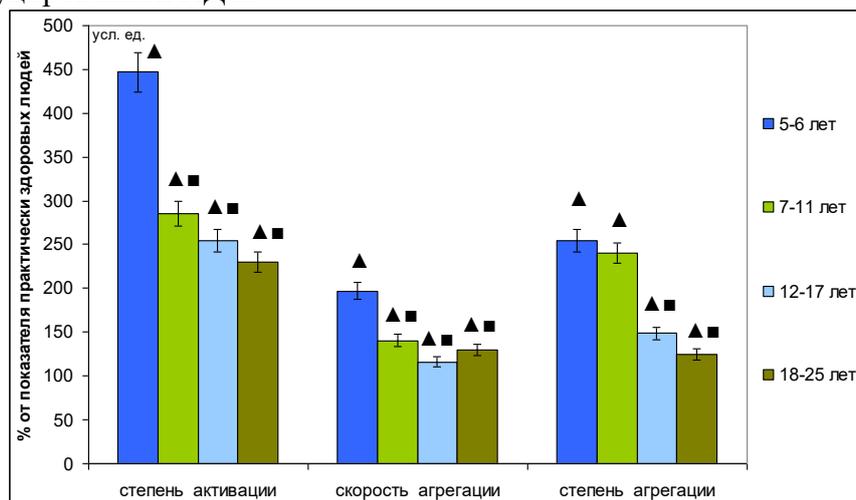


Рис. 14. Активация и агрегация тромбоцитов (индуцирование сдвиговым потоком) у пациентов с ВЗК

Помимо изменений тромбоцитарного гемостаза при ВЗК, отмечены и нарушения его плазменного звена. В нашем исследовании активность ФВ достоверно снижается у пациентов 5-6 лет и в 18-25 лет, а в 7-17 лет возрастает в 2 раза по сравнению с самым младшим возрастом. Во всех возрастных группах пациентов с ВЗК отмечено значительное (более чем в 4,5 раза; $p < 0,001$) повышение содержания РФМК, свидетельствующих об усилении генерации тромбина (Saibeni S., et al., 2010; Bernhard H., et al., 2011). Также у пациентов в возрасте 7-11 лет отмечено достоверное (в 1,5 раза) увеличение уровня РФМК по сравнению с людьми младшей возрастной группы. Определение уровня фибриногена в онтогенезе пациентов с ВЗК выявило его разнонаправленное изменение, но возрастание в 5-6 лет в 1,18 раза и в 7-11 лет в 1,25 раза по сравнению с соответствующими возрастными группами здоровых людей. Число тромбоцитов у лиц с изучаемой патологией в возрасте до 17 лет включительно превышает значения здоровых людей в среднем в 1,3 раза и более; PDW при этом значительно снижается ($p < 0,05$). Достоверное разнонаправленное изменение MPV при ВЗК наблюдается после 12 лет.

Образование активированных гиперагрегируемых тромбоцитов имеет решающее значение для процесса формирования тромба и усиления тромбогенного потенциала у взрослых больных с ВЗК и пациентов детского возраста (Лищинская А.А. с соавт., 2019; McKie K., et al., 2019). В нашем исследовании при стабилизации крови цитратом натрия о ее гиперкоагуляции свидетельствовало достоверное увеличение угла α и тенденции к уменьшению параметров R и K в возрасте 12-17 лет и 18-25 лет по сравнению с практически здоровыми людьми. При стабилизации крови КЗЭДТА увеличение угла α отмечено не только в 12-25 лет, но и в более раннем возрасте – в 7-11 лет по сравнению с практически здоровыми людьми.

Таким образом, у лиц с ВЗК выявлены возраст-зависимые изменения качественных, количественных и функциональных свойств тромбоцитов, а также выраженная гиперкоагуляция, что, наряду с нарушениями гемореологии, способствует развитию ишемии и гипоксии.

Возрастные особенности окислительного метаболизма и сдвигов антиоксидантной системы крови у пациентов с ВЗК

Важным патогенетическим фактором ВЗК является окислительный стресс (ОС), проявляющийся как дисбаланс между накоплением АФК и нейтрализующими их антиоксидантами (Bourgonje A.R., et al., 2020). Развитие ОС подтверждается и в нашем исследовании. У пациентов от 7 до 17 лет включительно наблюдается значительное возрастание уровня МДА в плазме крови, превышающее аналогичные показатели здоровых лиц в 1,5 раза и более ($p < 0,05$). Увеличение концентрации МДА плазмы крови взрослых пациентов отмечено при уровне значимости $p < 0,001$. Минимальное значение уровня плазменного МДА определено у пациентов самого младшего возраста – в 5-6 лет. Концентрация уровня МДА в эритроцитах пациентов до 11 лет включительно превышала значения практически здоровых людей в 2,2 раза, а у лиц 18-25 лет – в 1,4 раза ($p < 0,05$). Минимальное значение концентрации МДА эритроцитов выявлено у пациентов 12-17 лет (рис. 15).

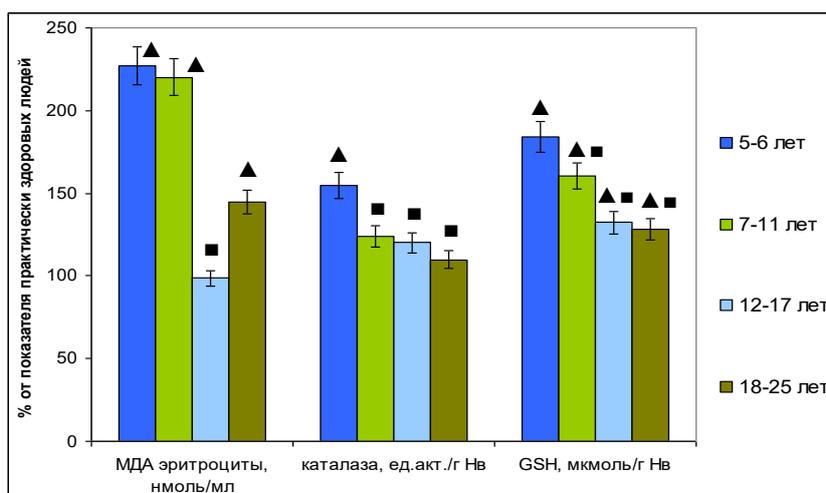


Рис. 15. Уровень МДА в эритроцитах и их антиоксидантная активность у пациентов с ВЗК

Состояние ишемии, гипоксии и развитие окислительного стресса при ВЗК также характеризуются повышением концентрации ИМА в сыворотке крови (Kaplan M., et al., 2016; Guntas G., et al., 2017). Во всех изучаемых возрастных группах пациентов отмечалось значительное возрастание уровня ИМА плазмы крови. Так, его концентрация у пациентов до 11 лет включительно резко превышала значения практически здоровых людей соответствующего возраста – в 6,8 раза ($p < 0,001$), а в остальных возрастных группах – в 3,5 раза и более ($p < 0,05$). Максимальное содержание ИМА плазмы крови характерно для пациентов самого младшего возраста – 5-6 лет.

Прогрессированию интестинального воспаления способствуют и сдвиги состояния антиоксидантной защиты организма (Moura F.A., et al., 2015; Dudzińska E., et al., 2018). В нашем исследовании на уровне тенденции отмечается снижение активности каталазы эритроцитов пациентов при увеличении их возраста, а по сравнению с показателями здоровых детей ее достоверное увеличение (в 1,5 раза) показано только в 5-6 лет (рис. 15). Концентрация восстановленного глутатиона GSH у пациентов превышала значения здоровых людей до 1,8 раза ($p < 0,05$), причем у взрослых – при $p < 0,001$ (рис 15). Уровень SH-групп плазмы крови людей с ВЗК до 17 лет включительно достоверно превышал значения здоровых лиц соответствующего возраста, а пациенты 18-25 лет характеризовались снижением их количества на 13% ($p < 0,05$). Минимальное значение уровня SH-групп плазмы крови пациентов определено в их самого младшем возрасте – в 5-6 лет. Таким образом, хроническое воспаление способствует формированию выраженных сдвигов окислительного метаболизма крови практически в каждой изучаемой возрастной группе.

Корреляционные связи изучаемых параметров крови у пациентов с ВЗК

В отличие от практически здоровых людей, у пациентов с хроническим воспалением в возрасте 5-6 лет выявлены пять корреляционных взаимосвязей между реологическими свойствами крови и ее гематологическими параметрами (рис. 16).

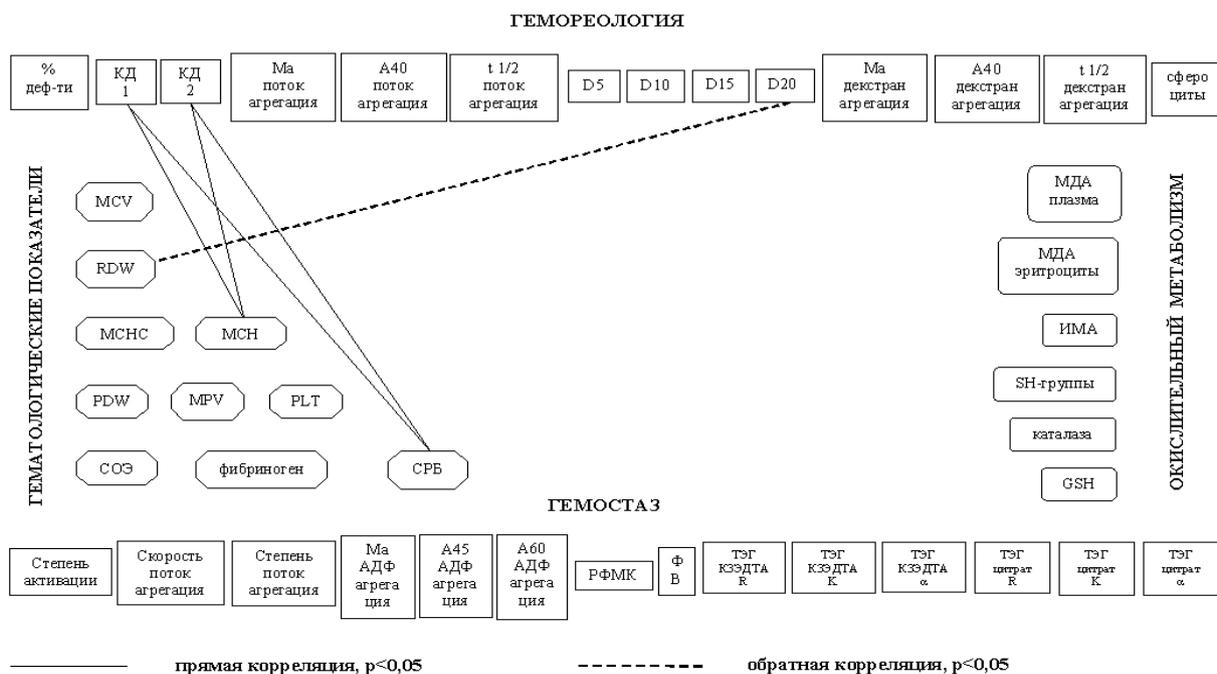


Рис. 16. Корреляционные связи у пациентов с ВЗК в возрасте 5-6 лет

У пациентов с ВЗК в возрасте 7-17 лет выявлена 41 корреляция, описывающая взаимосвязи различных свойств крови. Так, четыре из них отражают взаимосвязи показателей реологии крови и ее окислительного метаболизма, пять – показателей гемостаза и окислительного метаболизма крови, еще пять – между показателями гемостаза, четыре – показателей гемостаза с гематологическими свойствами крови, четырнадцать – показателей реологии крови с ее гематологическими показателями, две – окислительного метаболизма крови с гематологическими параметрами ее анализа. Также выявлены семь взаимосвязей между гематологическими характеристиками (рис. 17).

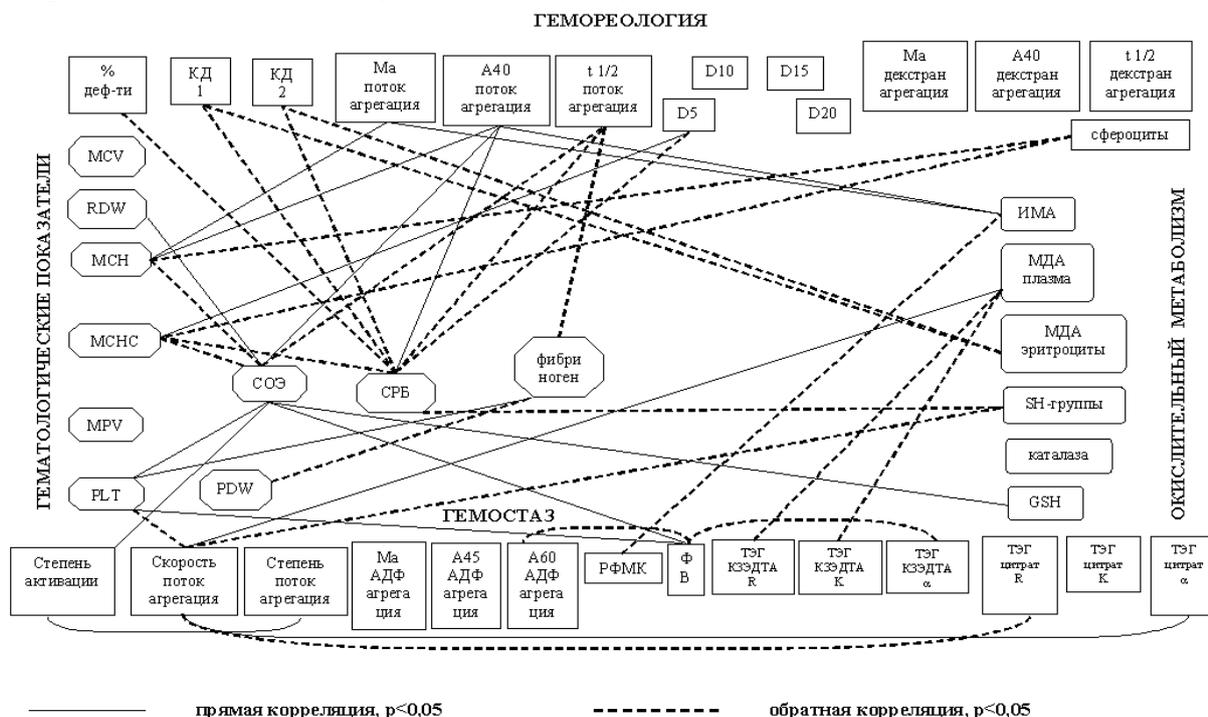


Рис. 17. Корреляционные связи у пациентов с ВЗК в возрасте 7-17 лет

Не менее многочисленны взаимосвязи между исследуемыми свойствами крови у взрослых пациентов. Так, одна из них характеризует взаимосвязь показателей реологии

крови и ее окислительного метаболизма, еще одна – показателей гемостаза и окислительного метаболизма крови, семь – показателей гемостаза с гематологическими параметрами анализа крови, тринадцать – характеристик реологии крови с последними, три – окислительного метаболизма крови с ее гематологическими параметрами. Корреляционные взаимосвязи между показателями гемостаза крови отсутствуют. Также отмечена одна корреляция между показателями окислительного метаболизма крови и еще одна – между ее гематологическими параметрами (рис. 18).

Таким образом, у пациентов с ВЗК выявлены корреляции, характеризующие взаимосвязь реологических и гемостазиологических свойств крови с показателями про- и антиоксидантных свойств ее компонентов. Важно подчеркнуть, что структура корреляционных графов при изучаемой патологии существенно отличается от таковой у здоровых людей в сторону повышения количества выявленных взаимосвязей.

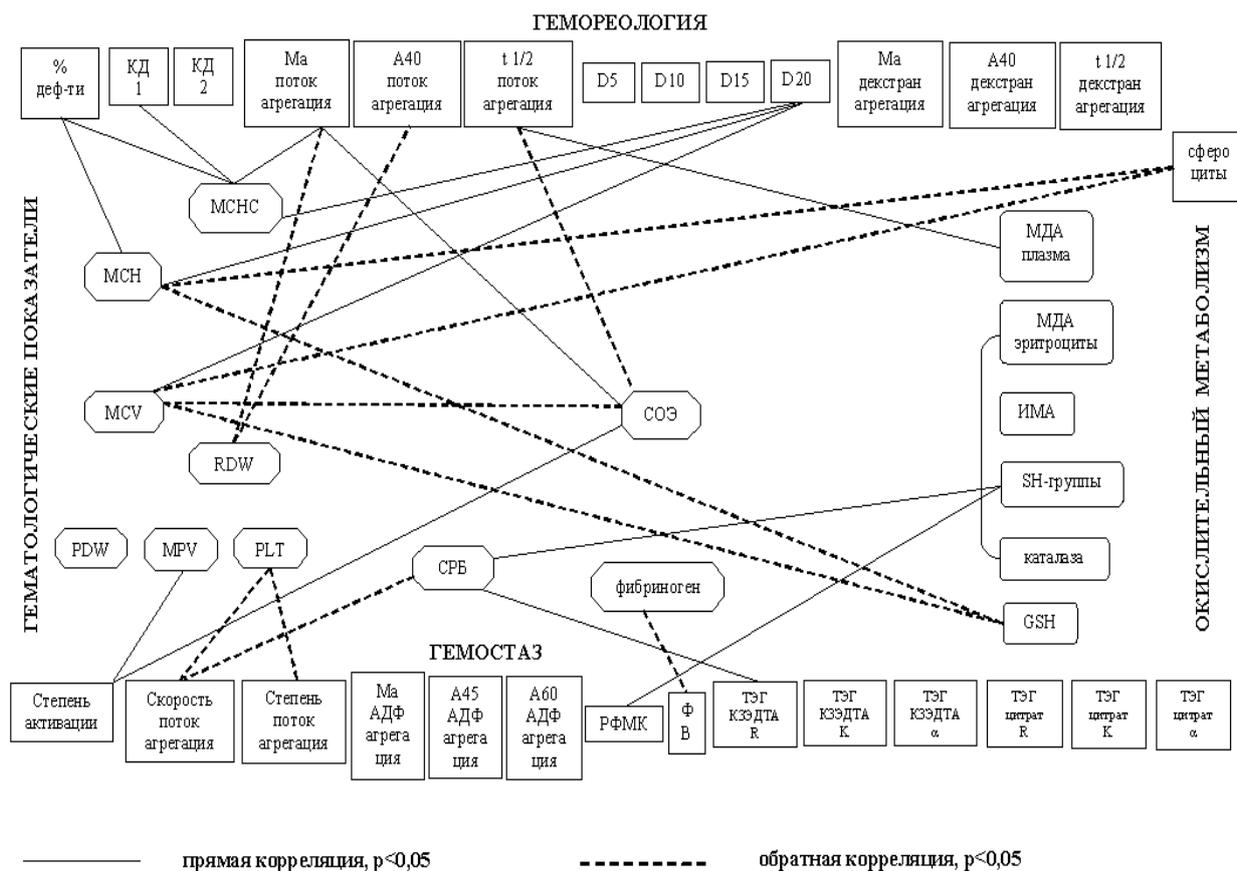


Рис. 18. Корреляционные связи у пациентов с ВЗК в возрасте 18-25 лет

Влияние гипербарической оксигенации на функциональные свойства крови и ее окислительный статус у пациентов с ВЗК

В нашем исследовании показано, что гипербарическая оксигенация (ГБО) способствует нормализации реологических свойств крови в условиях хронического воспаления. Так, отмечается достоверное снижение (до значений у здоровых людей) степени и скорости спонтанной агрегации эритроцитов. Значение $t_{1/2}$ после курса ГБО остается сниженным. Кроме того, практически на всех скоростях сдвига отмечается тенденция к снижению прочности их агрегатов (табл. 1). Одновременно с этим отмечалось значительное снижение образования «глыбчатых» структур агрегатов, однако плотная упаковка эритроцитов в агрегатах сохранялась.

Курс ГБО, проведенный у пациентов, приводит к улучшению деформируемости эритроцитов (табл. 1). Состояние цитоскелета эритроцитов остается существенно нарушенным после ГБО. Однако при этом отмечается тенденция к снижению количества сфероцитов по сравнению с данными до проведения курса. Состояние мембран эритроцитов пациентов, изучаемое методом декстран-индуцированной агрегации этих клеток крови, также не улучшается после курса ГБО (табл. 2). Данный вариант лечения приводил к

увеличению среднего объема эритроцитов MCV ($p < 0,05$), при этом RDW оставалась повышенной. Уровень MCHC у пациентов с ВЗК до и после курса ГБО существенно превышал показатель практически здоровых людей. Одновременно с этим ГБО не влияла на значение MCH.

Под влиянием ГБО отмечается значительное улучшение функциональных свойств тромбоцитов. Так, после курса ГБО снижается активация тромбоцитов (на 40%; $p < 0,05$), отмечены тенденция к снижению скорости поток-индуцированной агрегации до значений здоровых людей и значительное уменьшение ее степени. Однако скорость АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов после ГБО возрастала (табл. 3). После окончания курса ГБО количество тромбоцитов у пациентов с ВЗК оставалось повышенным, MPV достоверно увеличивался, PDW при этом практически не изменялась. При применении ГБО обнаружена тенденция к снижению концентрации РФМК и активности ФВ в плазме крови, а содержание фибриногена не изменялось. Изучение влияния ГБО на параметры тромбоэластограммы крови пациентов, стабилизированной цитратом натрия, выявило значительное увеличение угла α , однако показатель R, отражающий процесс инициализации свертывания крови, имел тенденцию к возрастанию. Стабилизация крови КЗЭДТА, напротив, приводила к большей выраженности состояния гиперкоагуляции крови после окончания курса (отмечены снижение R, уменьшение K и возрастание α , $p < 0,05$).

Таблица 1

Реологические свойства крови у пациентов с ВЗК после курса ГБО

Показатели	Практически здоровые люди	Пациенты с ВЗК	
		До ГБО	После ГБО
Ma поток агрегация, мм	75,64±1,34	84,70±1,76 *	73,92±2,54 ●
A ₄₀ поток агрегация, мм	52,51±1,70	64,93±1,80 *	52,27±2,10 ●
t _{1/2} поток агрегация, с	16,80±1,04	10,77±0,71 *	11,65±0,89 *
D ₅ , %	20,23±1,68	12,79±2,53 *	17,31±2,30
D ₁₀ , %	43,56±2,00	38,13±1,99	39,40±2,21
D ₁₅ , %	54,84±2,22	52,33±1,54	53,66±2,22
D ₂₀ , %	61,74±1,85	60,49±1,81	58,86±1,99
общая деформируемость, %	90,49±1,06	66,32±2,57 **	80,98±2,13 * ●●
КД 1	2,77±0,06	2,10±0,06 **	2,45±0,08 * ●●
КД 2	0,43±0,01	0,30±0,01 **	0,37±0,01 * ●

здесь и далее: * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ – сравнение с показателями практически здоровых людей; ● $p < 0,05$, ●● $p < 0,001$ – сравнение со значениями до проведения ГБО, критерий Стьюдента

Таблица 2

Мембранные свойства эритроцитов у пациентов с ВЗК после курса ГБО

Показатели	Практически здоровые люди	Пациенты с ВЗК	
		До ГБО	После ГБО
Ma декстран агрегация, мм	85,22±1,85	83,93±3,43	78,81±3,01 ●
A ₄₀ декстран агрегация, мм	76,14±1,59	69,70±3,38	64,19±2,93 *
t _{1/2} декстран агрегация, с	9,50±0,27	11,56±0,72 *	12,54±0,93 *
количество сфероцитов, %	50,65±6,70	78,88±5,24 *	71,41±6,94 *

Применение ГБО в терапии ВЗК способствует значительному снижению проявлений окислительного стресса и интенсификации антиоксидантной защиты. После курса ГБО концентрация МДА в плазме крови пациентов снижалась на 20% ($p < 0,05$), а в эритроцитах отмечалась лишь тенденция к ее уменьшению. Несмотря на то, что после проведения ГБО содержание ИМА у лиц с ВЗК значительно превышало показатели практически здоровых людей, при этом выявлялась тенденция к его снижению относительно состояния до процедуры (табл. 4).

Таблица 3

Показатели тромбоцитарного гемостаза у пациентов с ВЗК после курса ГБО

Показатели	Практически здоровые люди	Пациенты с ВЗК	
		До ГБО	После ГБО
Степень активация, усл.ед.	6,13±0,70	21,60±3,16 **	12,27±2,13 ** ●
Степень поток агрегация, усл.ед.	15,28±1,09	18,96±1,33 *	13,72±1,40 ●
Скорость поток агрегация, усл.ед.	20,03±0,96	24,63±1,34 *	20,85±1,92
Ma АДФ агрегация, % светопр.	62,62±1,66	57,62±2,89	60,10±1,93
A ₄₅ АДФ агрегация, % светопр.	9,45±0,83	5,05±0,65 *	6,24±1,34 *
A ₆₀ АДФ агрегация, % светопр.	19,42±1,09	12,19±1,42 *	16,64±1,27 * ●

Таким образом, применение ГБО способствует значительной коррекции гемореологических и гемостазиологических свойств крови у пациентов с ВЗК, а также снижению проявлений окислительного стресса и интенсификации антиоксидантной защиты.

Таблица 4

Влияние ГБО на окислительный метаболизм и антиоксидантную активность крови у пациентов с ВЗК

Показатели	Практически здоровые люди	Пациенты с ВЗК	
		До ГБО	После ГБО
МДА плазма, нмоль/мл	1,02±0,05	1,45±0,08 **	1,14±0,08 ●
ИМА, ед.опт.пл.	0,0861±0,01	0,3470±0,04 **	0,3283±0,03 **
МДА эритроциты, нмоль/мл	5,65±0,34	8,40±0,60 *	7,40±0,47 *
SH-группы, μM	286,46±12,05	298,06±14,11	314,86±11,56
каталаза, ед.акт./г Нв	25,73±0,93	28,64±1,40	32,38±2,60 *
GSH, мкмоль/г Нв	5,18±0,20	6,41±0,35 *	7,95±0,59 * ●

Нами также проведено исследование корреляционных взаимосвязей изучаемых свойств крови пациентов после применения ГБО. Так, три из них отражают взаимосвязи показателей реологии крови и ее окислительного метаболизма, еще три – показателей гемостаза и окислительного метаболизма крови, две – между показателями гемостаза, девять – между показателями реологии крови и ее гематологическими параметрами (рис. 19). Подводя итог, следует заключить, что гипербарическая оксигенация способствует снижению

степени сопряженности изучаемых показателей, что указывает на повышение адаптивных резервов у пациентов с ВЗК.

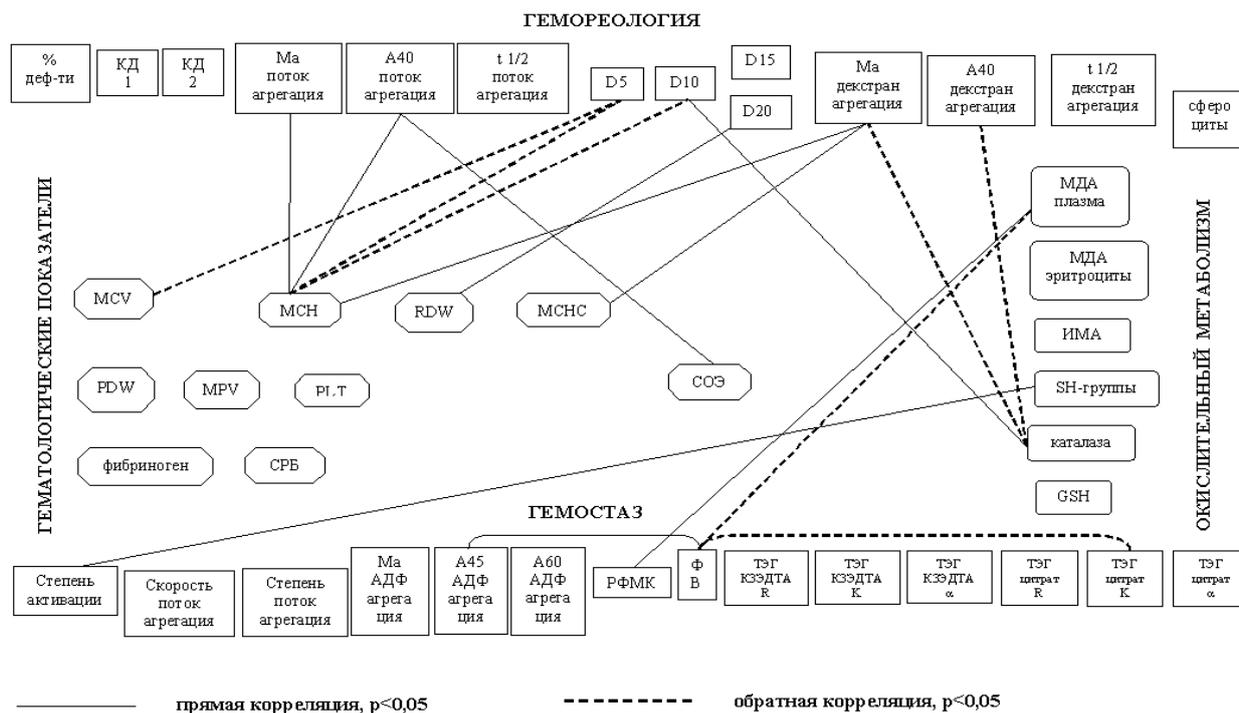


Рис. 19. Корреляционные связи у пациентов с ВЗК после курса ГБО

ВЫВОДЫ

1. В процессе онтогенеза человека имеет место модификация реологических свойств крови (усиление агрегации эритроцитов, снижение их деформируемости), функциональных характеристик тромбоцитов (активации, поток- и АДФ-индуцированной агрегации), а также плазменного гемостаза (активности фактора Виллебранда, концентрации фибриногена и растворимых фибрин-мономерных комплексов). Особенности гомеостаза крови при ВЗК являются трансформация состояния эритроцитов (значительное усиление агрегации, выраженные сдвиги их мембранных свойств, деформируемости и дезагрегации) и тромбоцитов (увеличение поток-индуцированной активации и агрегации, повышенная концентрация РФМК и сдвиги коагуляционного потенциала крови).

2. У практически здоровых людей с возрастом наблюдается интенсификация свободнорадикальных процессов (увеличение концентрации ишемия-модифицированного альбумина, малонового диальдегида), компенсируемая пропорциональным нарастанием антиоксидантного потенциала крови (активности каталазы, концентрации глутатиона и SH-групп). При ВЗК фиксировали превалирующий (относительно физиологического гомеостаза) уровень свободнорадикального окисления при недостаточной активности ферментных и неферментных компонентов антиоксидантной системы крови.

3. Процесс роста и развития практически здоровых людей характеризуется постепенным формированием и усложнением сопряжения функциональных свойств клеток крови и показателей ее окислительного метаболизма. В возрасте 7-17 лет отмечены корреляционные связи показателей про- и антиоксидантных систем плазмы крови и эритроцитов с параметрами спонтанной (поток-индуцированной) агрегации и дезагрегации этих клеток крови, а у взрослых людей – и с показателями деформируемости. Также во всех изучаемых возрастных группах отмечены взаимосвязи некоторых гематологических показателей между собой.

4. У пациентов с ВЗК старше 7 лет выявлены корреляции, определяющие взаимосвязь показателей про- и антиоксидантной системы крови не только с ее реологическими, но и гемостазиологическими свойствами. Установлено повышение количества таковых взаимосвязей у пациентов с ВЗК. Также у пациентов всех возрастных групп отмечено

значительное число корреляций, характеризующих как воспаление, так и иные взаимосвязи свойств крови.

5. Применение гипербарической оксигенации у лиц с ВЗК оказывает положительное влияние на гемореологические и гемостазиологические свойства форменных элементов крови (снижение спонтанной агрегации эритроцитов, увеличение их деформируемости, уменьшение поток-индуцированной активации и агрегации тромбоцитов), а также баланс про- и антиоксидантных систем (уменьшение плазменной концентрации МДА, активация ферментных и неферментных антиоксидантов). Кроме того, изучаемое воздействие способствует снижению степени сопряженности изучаемых показателей.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, индексируемых международными базами цитирования

Web of Science и Scopus:

1. Изучение взаимосвязи между изменением формы и агрегацией эритроцитов человека / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, М.Н. Егорихина, Г.Я. Левин // Биофизика. – 2013. – Т. 58, Вып. 2. – С. 264-268.
2. Лизофосфатидная кислота и агрегация эритроцитов человека / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, Г.Я. Левин // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 1. – С. 84-88.
3. Влияние аденозина на форму, морфологию агрегатов и агрегационную способность эритроцитов, истощенных по АТФ / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, М.М. Рогозин, Г.Я. Левин // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 3. – С. 488-491.
4. Агрегация метаболически истощенных эритроцитов человека / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, М.М. Рогозин, Г.Я. Левин // Цитология. – 2016. – Т. 58, № 1. – С. 30-34.
5. Роль нарушений реологических свойств эритроцитов в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника у детей / Г.Я. Левин, **А.Н. Поповичева**, Л.Н. Соснина, О.В. Федорова, Ю.А. Шереметьев // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2017. – № 4. – С. 45-52.
6. Исследование морфо-физиологических свойств эритроцитов у детей с болезнью Крона / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, Г.Я. Левин, Э.Н. Федулова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 1. – С. 50-55.
7. Изучение механизма FeCl₃-индуцированной агрегации эритроцитов человека / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, Г.Я. Левин // Биофизика. – 2018. – Т. 63, Вып. 4. – С. 716-721.
8. Измерение деформируемости эритроцитов на основе автоматизированной обработки изображений / Г.Я. Левин, П.А. Шагалова, Э.С. Соколова, **А.Н. Поповичева** // Медицинская техника. – 2020. – № 4. – С. 16-19.
9. Functional properties of platelet in children with irritable bowel disease / **A. Popovicheva**, A. Martusevich, E. Fedulova // Archiv Euromedica. – 2021. – Vol. 11, № 2. – P. 80-81.
10. Влияние гипербарической оксигенации на состояние окислительного стресса и антиоксидантной системы крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / А.К. Мартусевич, **А.Н. Поповичева**, Л.Н. Соснина, Е.А. Галова, Э.Н. Федулова, И.А. Нещеткина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 1. – С. 45-49.
11. Влияние гипербарической оксигенации на состояние реологии крови и гемостаза у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **А.Н. Поповичева**, А.К. Мартусевич, Л.Н. Соснина, Е.А. Галова, Э.Н. Федулова, И.А. Нещеткина, М.С. Вагин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2022. – № 6. – С. 83-89.
12. Специфика окислительного стресса и антиоксидантной системы у детей с болезнью Крона и язвенным колитом / Э.Н. Федулова, М.С. Вагин, А.К. Мартусевич, **А.Н. Поповичева**, А.И. Хавкин // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2023. – № 6. – С. 140-145.
13. Онтогенетические особенности интеграции гемореологии и окислительного метаболизма крови / **А.Н. Поповичева**, А.К. Мартусевич // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2023. – № 4. – С. 59-67.

Статьи в изданиях, включенных в список ВАК РФ:

14. Влияние хранения крови на лантан-индуцированную агрегацию эритроцитов / **А.Н. Поповичева** // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2014. – № 4. – С. 188-192.

15. Влияние гипербарической оксигенации на состояние клеток крови у детей с воспалительными заболеваниями кишечника / **А.Н. Поповичева**, А.К. Мартусевич, И.А. Нещёткина, Э.Н. Федулова, В.И. Загреков // Российский педиатрический журнал. – 2021. – Т. 24, № 6. – С. 389-394.

Патенты на изобретение:

1. Патент РФ на изобретение №2464563. Способ выделения микровезикул эритроцитов / Ю.А. Шереметьев, Г.Я. Левин, **А.Н. Поповичева**, М.Н. Егорихина. Опубл. 20.10.2012, бюл. №29.

2. Патент РФ на изобретение №2452958. Способ оценки агрегационной способности эритроцитов / Ю.А. Шереметьев, Г.Я. Левин, **А.Н. Поповичева**. Опубл. 10.06.2012, бюл. №16.

3. Патент РФ на изобретение №2684642. Способ определения высвобождения аденозинтрифосфорной кислоты из эритроцитов *in vitro* / Ю.А. Шереметьев, **А.Н. Поповичева**, Г.Я. Левин. Опубл. 11.04.2019, бюл. №11.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

СРО – свободнорадикальное окисление

ОС – окислительный стресс

МДА – малоновый диальдегид

ИМА – ишемия-модифицированный альбумин

АДФ – аденозиндифосфат

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

ФВ – фактор Виллебранда

MCV – mean cell volume, средний объем эритроцита

RDW – red cell distribution width, ширина распределения эритроцитов по объему

MCH – mean cell hemoglobin, среднее содержание гемоглобина в эритроците

MCHC – mean cell hemoglobin concentration, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах

MPV – mean platelet volume, средний объем тромбоцита

PDW – platelet distribution width, ширина распределения тромбоцитов по объему

СОЭ – скорость оседания эритроцитов

СРБ – С-реактивный белок

КД – коэффициент деформируемости

КЗЭДТА – трикальево-этилендиаминтетрауксусной кислоты, ЭДТА

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ГБО – гипербарическая оксигенация

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – д.б.н., доценту А.К. Мартусевичу за внимательное отношение к работе и всестороннюю помощь. За наставничество автор особо благодарит своего первого научного руководителя – д.м.н., профессора, заслуженного деятеля науки РФ Г.Я. Левина. Отдельно автор благодарит коллектив 1-го педиатрического отделения с медицинской реабилитацией Института педиатрии Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России и его заведующего д.м.н., доцента Э.Н. Федулову за постоянное участие и предоставление материала для работы. Автор глубоко признателен сотрудникам отделения гипербарической оксигенации Университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Автор также выражает безмерную благодарность своей семье за понимание, неоценимую помощь, поддержку на всех этапах работы.