

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
Кафедра анатомии и физиологии человека и животных

РЕКОМЕНДОВАНО К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Заведующий кафедрой
к.б.н., доцент
_____ А.В. Елифанов
_____ 20__ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистерская диссертация

ОЦЕНКА РЕОЛОГИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА С
АНЕМИЯМИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

06.04.01 Биология
Магистерская программа «Биотехнология»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной формы обучения
Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент
Рецензент
доктор биол. наук,
профессор, ТГМУ

Подпись

Нагорнова Полина Валерьевна

Подпись

Елифанов Андрей Васильевич

Подпись

Ральченко Ирина Викторовна

Тюмень
2021

АННОТАЦИЯ

с. 72, рис. 15, табл. 1, библи. 75.

В данной работе изучены реологические свойства крови здоровых и больных пациентов с анемиями различного типа. Показано, что у пациентов с тем или иным типом анемии деформируемость эритроцитов значительно снижалась по сравнению с контрольными показателями, что указывало на изменение реологических свойств самого эритроцита.

Проведен флуоресцентный спектральный анализ крови пациентов с анемией различного генеза и его интеграция в реологические характеристики. Показано, что у людей с анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра.

Наиболее низкие показатели реологических характеристик крови были отмечены у пациентов с гемолитической анемией, обусловленной дефектами клеточной мембраны эритроцитов.

Ключевые слова: анемия, деформабильность, флуоресценция, эритроциты, реологические свойства.

This thesis provides the research results of blood's rheological characteristics among the healthy patients and the patients with different types of anemia. As it turned out, during the research the deformation of erythrocytes of the patients with a particular type of anemia was significantly decreasing comparing to the benchmarks, which indicates the changing of erythrocytes rheological parameters.

Also, this thesis provides the results of the fluorescent spectroscopic blood test of people with different types of anemia and its integration with blood's rheological characteristics. As the result it was shown that among the patients with anemia the maximum of fluorescence intensity shifts to the shorter wave spectrum area.

The lowest values of rheological characteristics were noted among the patients with hemolytic anemia, caused by defective erythrocyte cellular membranes.

Key words: anemia, deformability, fluorescence, erythrocytes, rheological characteristics.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Анатомические и физиологические характеристики крови.....	10
1.1.1 Органические и неорганические компоненты крови.....	11
1.1.2 Структура мембран эритроцитов.....	13
1.1.3 Реологические характеристики эритроцитов.....	16
1.2 Деформабильность эритроцитов.....	19
1.2.1 Методы исследования упругих свойств мембран эритроцитов.....	19
1.2.2 Факторы, влияющие на деформабильность эритроцитов.....	21
1.3 Понятие флуоресценции.....	22
1.3.1 Флуорофоры.....	24
1.3.2 Молекулярный механизм флуоресценции.....	26
1.3.3 Флуоресценция крови.....	29
1.4 Анемии. Патогенетическая классификация анемий.....	30
1.5 Железодефицитная анемия.....	32
1.5.1 Физиологическая роль железа в организме.....	32
1.5.2 Классификация ДЖ и ЖДА.....	35
1.5.3 Клиника ЖДА.....	36
1.6 Анемия хронического заболевания.....	37
1.6.1 Причины возникновения анемии при хронических заболеваниях.....	38
1.6.2 Диагностика и методы лечения.....	40
1.7 Гемолитическая анемия.....	41

1.7.1 Симптоматика и причины возникновения гемолитической анемии	42
1.7.2 Механизмы гемолиза.....	44
1.7.3 Диагностика и методы лечения.....	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1 Материалы исследования.....	48
2.2 Методы исследования.....	49
2.2.1 Лазерная дифрактометрия эритроцитов.....	50
2.2.2 Спектрофлуориметрический анализ.....	53
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	56
ВЫВОДЫ.....	65
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	66

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АС – анемический синдром
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АХЗ – анемия хронического заболевания
- ГА – гемолитическая анемия
- ДЖ – дефицит железа
- ЖДА – железодефицитная анемия
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- КОС – кислотно-основное состояние
- ОКА – общая концентрация альбумина
- ПФП – пентозофосфатный путь
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- ФСА – флуоресцентный спектральный анализ
- ЭКА – эффективная концентрация альбумина
- ЭДМ – электрический дипольный момент
- ФЗ – флуоресцентный зонд
- ФЗС – фотосенсибилизатор
- ФЦ – флуоресцеин
- нм – нанометры
- GFP – зеленый флуоресцирующий белок
- Hb – гемоглобин
- NADH – никотинамид аденин динуклеотид

ВВЕДЕНИЕ

Анемия – это состояние, характеризующееся снижением концентрации гемоглобина и, в большинстве случаев, количества эритроцитов и гематокрита в единице объема крови, что в свою очередь приводит к снижению снабжения тканей кислородом.

Анемии – разнообразны по своему генезу и часто имеют смешанный патогенез. В большинстве случаев анемия – не самостоятельная нозологическая форма, а проявление основного заболевания [Стуклов, Альпидовский, Огурцов, с. 8-10].

Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ) в 1993 - 2005 г.г. проведено глобальное исследование, показавшее, что 24,8% всех жителей Земного шара страдает разными формами анемии – это около 1,8 миллиарда человек. Чаще всего анемия встречается у детей дошкольного возраста (47% от общей популяции), беременных женщин (41,8%) и небеременных женщин детородного возраста (30,2%).

В России процент детей дошкольного возраста с признаками анемии (Hb <110 г/л) составляет по данным ВОЗ 26,5%; беременных женщин - 20,8%, небеременных женщин детородного возраста - 19,8% [Всемирная Организация Здравоохранения, сайт].

По причине дефицита железа развивается около 70% всех анемий. Из-за небольшого количества этого микроэлемента молекулы гемоглобина больше не образуются. В результате кровь начинает нести гораздо меньше кислорода. Дефицит железа в других тканях приводит к проблемам с кожей, волосами, сердцем и пищеварением. Железодефицитная анемия находится на первом месте по частоте встречаемости всех анемий и составляет 37%.

Анемия, вызванная хроническим заболеванием, в равной степени поражает мужчин и женщин. Люди любого возраста, страдающие хроническим воспалительным заболеванием, могут потенциально заболеть. Точная частота анемии при хроническом заболевании неизвестна, и некоторые

исследователи полагают, что о ней не сообщают или часто не распознают. Анемия при хронических заболеваниях считается второй по частоте причиной анемии в мире после железодефицитной анемии [Стуклов, Альпидовский, Огурцов, с. 117-119].

Гемолитическая анемия, вызванная ускоренным разрушением эритроцитов, негативно влияет на состав крови, поэтому опасна для всего организма. Признаки патологии могут проявиться в любом возрасте, и в итоге страдают как взрослые, так и дети. Гемолитическая анемия составляет 5% всех существующих анемий, что имеет множество возможных последствий, начиная от общих симптомов и заканчивая опасными для жизни системными эффектами [Сараева, с. 62].

Эритроциты являются самым многочисленным типом клеток крови. Особая способность эритроцитов к упругой деформации позволяет им выполнять свою основную функцию - доставку необходимых веществ для жизнедеятельности организма в целом, включая капиллярную сосудистую систему, диаметр которой значительно меньше диаметра эритроцитов. Деформационная способность эритроцитов обусловлена упругими свойствами мембраны этих клеток и наличием особой белковой структуры, которая образует внутреннюю сторону мембраны и называется цитоскелетом [Белкин, с. 89].

Деформабильность эритроцитов зависит от воздействия различных факторов и ряда патологий. В нашей работе данными факторами выступают анемии различного генеза.

Важным моментом при проведении исследований деформабильности эритроцитов является объективная оценка этого показателя. Метод, который позволяет провести оперативную и информативную оценку упругой деформации эритроцитов основан на лазерной дифрактометрии.

Однако до настоящего времени мало изучены вопросы, связанные с влиянием анемии на вязкоэластические свойства мембран эритроцитов человека [Сторожок, с. 115-116].

Исходя из вышеизложенного, цель нашей работы – изучить изменения реологических детерминант крови у пациентов с анемиями различного генеза.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Исследовать деформабильность эритроцитов пациентов с анемиями различного генеза (железодефицитная анемия, анемия хронического заболевания и гемолитическая анемия), методом лазерной дифрактометрии.
- 2) Выявить изменения в структуре эритроцитов у пациентов с анемиями различного генеза, влияющие на деформабильность.
- 3) Сравнить полученные показатели крови пациентов с анемией между собой, а также с показателями крови здоровых людей.
- 4) Оценить различия в флуоресцеин-зависимой флуоресценции цельной крови больных с анемией.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Анатомические и физиологические характеристики крови

Кровь представляет собой жидкую и подвижную соединительную ткань организма, которая состоит из двух основных частей: жидкости - плазмы и клеточной суспензии - форменных элементов, которые включают в себя: эритроциты, лейкоциты и тромбоциты [Гайворонский, Ничипорук, Гайворонский, с. 235]. У взрослого человека клетки крови составляют примерно 40-48%, а плазма - 52-60%. Это соотношение называется гематокритом (от греч. *Haima* - кровь, *kritos* - показатель) [Воробьева, Сафьянникова, Губарь, с. 238].

Общее количество крови в организме взрослого человека обычно составляет 6-8% от массы тела, то есть около 5-6 л. (При средней массе тела 60-70 кг.) В то же время у женщин содержится около 3,5-4,5 л крови, а у детей и спортсменов объем крови в 1,5-2,0 раза больше. На килограмм веса человека приходится 60 мл крови для женщин и 70 мл крови для мужчин [Солодков, Сологуб, с. 324].

У людей в условиях физиологического покоя не вся кровь циркулирует по сердечно-сосудистой системе. Часть его находится в так называемых хранилищах крови - венолах и венах печени, селезенки, легких и кожи. Скорость кровотока в этих органах значительно снижается [Швырев, с. 189].

Наличие в крови форменных элементов, особенно эритроцитов, белков и липопротеинов, обуславливает ее вязкость. Если вязкость воды принять за 1, то вязкость цельной крови здорового человека составит около 4,5 (3,5-5,4), а плазмы - около 2,2 (1,9-2,6). Удельный вес (или относительная плотность) крови зависит главным образом от количества эритроцитов и содержания белка в плазме [Агаджанян, Смирнов, с. 367]. У здорового взрослого человека относительная плотность цельной крови составляет 1,050-1,060 кг/л, масса эритроцитов - 1,080-1,090 кг/л, плазмы крови - 1,029-1,034 кг/л. У женщин это немного меньше, чем у мужчин. Нормальная скорость также зависит от возраста [Лысов, Сапин, с. 56].

1.1.1 Органические и неорганические компоненты крови

Плазменные белки благодаря своей способности добавлять воду создают онкотическое давление, а электролиты и другие молекулы создают коллоидно-осмотическое давление крови, которое вытягивает воду из тканей. Благодаря значительной молекулярной массе (от 70 до 1300 кДа) белки придают крови определенную вязкость, которая замедляет скорость кровотока через сосуды, а ионизация аминокислотных остатков в полипептидных цепях дает белкам определенные буферные свойства, необходимые для поддержания оптимального КОС уровень [Авива, Сэбин, с. 43-47]. Кроме того, каждый белок выполняет важную специальную функцию: альбумин (53% всех белков) обеспечивает транспорт веществ; глобулины (40%) - транспорт липидов, железа, меди, оксидазную и иммунную активность; фибриноген (5%) - свертывание крови; ферритин - это транспорт железа, необходимый для синтеза гемоглобина и цитохрома; церулоплазмин - транспорт меди; эритропоэтин - активация кроветворения; альфа-амилаза - расщепление углеводов; 12 белков системы комплемента - иммунная активность [Блинов, Калюжный, с. 58].

Содержание белка является показателем здоровья, оно уменьшается при длительном голодании, когда собственные жировые запасы истощаются. Содержание фибриногена увеличивается во время беременности, поскольку этот белок необходим для свертывания крови во время родов. Повышение уровня некоторых разновидностей (изоферментов) лактатдегидрогеназы, обычно обнаруживаемой в мышечных клетках, служит врачу сигналом повреждения сердечной мышцы, например, во время сердечного приступа [Федюкович, с. 246].

В организме взрослого человека происходит постоянное обновление белков крови: около 17 г альбумина и 5 г глобулинов разрушаются и повторно синтезируются в день. Половина альбумина обновляется через 10-15 дней, а глобулин - через 5 дней. Процессы ускоряются в несколько раз благодаря усилению распада белка - в состоянии эмоционального и физического

напряжения, во время борьбы организма с инфекциями, во время беременности. В растущем организме биосинтез белков превышает их расщепление; это называется положительным балансом азота. К старости азотный баланс меняет знак [Щербаков, с. 301-305].

В середине 20-го века благодаря работам нобелевского лауреата Линуса Полинга и других ученых была сформирована идея молекулярных заболеваний. Толчком к этому послужило открытие механизма развития серповидно-клеточной анемии, которая возникает при замене только одного аминокислотного остатка в молекуле гемоглобина [Блинов, Калюжный, с. 73].

Таким образом, в молекуле альбумина, когда один или несколько аминокислотных остатков изменяются, появляются свойства, которые можно использовать для оценки наличия злокачественных опухолей [Влияние жирных кислот..., с.302]. В настоящее время получены указания на наличие конформационных изменений в альбумине человека при ряде заболеваний и взаимосвязь этих изменений с развитием заболевания [Gorobets, с. 232].

Альбумин является наиболее важным белком в плазме крови. Он поддерживает осмотическое давление плазмы, является транспортным белком и депо для большего количества неполярных молекул и лекарств, а также служит эндогенным источником аминокислот. Нормальное содержание альбумина в крови: до 14 лет - 38-54 г/л, 14-60 лет - 35-50 г/л, старше 60 лет - 34-48 г/л. Эти показатели являются стандартными и успешно применяются в клинической диагностике [Рыжов, Иванова, Воробьев, с. 86].

Имеющиеся дополнительные органические вещества в плазме крови представлены питательными веществами (глюкоза, аминокислоты, липиды), биологически активными веществами (витамины, гормоны, цитокины), продуктами промежуточного обмена (молочная и пировиноградная кислоты), конечными продуктами метаболизма белков и нуклеиновых кислот. (мочевина, мочевая кислота, креатинин, билирубин, аммиак) [Блинов, Калюжный, с. 58].

Неорганические вещества плазмы крови составляют около 1,2% и представлены минеральными солями (катионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , анионы Cl^- , HPO_4^{2-} , HCO_3^-), а также микроэлементами (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , J^- , F^-), которые связаны на 90% или более с органическим веществом плазмы. Минеральные соли влияют на все важные функции, участвуют в процессе свертывания, создают осмотическое давление крови, поддерживают рН. В данном значении наряду с белками минеральные соли можно считать многофункциональными компонентами плазмы, к которым могут также относиться растворимые в плазме молекулы газа O_2 и CO_2 [Щербаков, с. 290].

Осмотическое давление крови зависит от растворенных в ней солей. Около 60% этого давления создается NaCl . Осмотическое давление крови, лимфы и тканевой жидкости примерно одинаково (приблизительно 290-300 Вт/л или 7,6 атм) и характеризуется постоянством. Поддержание постоянства осмотического давления играет очень важную роль в жизни клеток [Блинов, Калюжный, с. 60].

1.1.1 Структура мембран эритроцитов

Основными компонентами плазматической мембраны эритроцитов являются липиды и белки. Согласно модели Singer, Nicolson, мембрана основана на липидном бислое, в который погружены белки. Некоторые белки более или менее встроены в толщину мембраны, и их называют интегральными. Такие белки сохраняются в бислое благодаря гидрофобным взаимодействиям с углеводородными цепями молекул липидов. Для выделения этих белков из мембраны требуется предварительное разрушение бислоя, например, с использованием моющих средств. Периферические белки удерживаются на поверхности мембраны нековалентными липидными связями. И белки удаляются из мембраны в относительно мягких условиях (например, путем экстракции в растворах с низкой ионной силой) [Болдырева, Кяйвярайнен, Илюха, с. 91].

Интегральные белки мембраны эритроцитов представляют собой: гликофорин А (транспортирующий анион), белок полосы 3 и Na, K-зависимую АТФазу.

Периферическими белками мембраны эритроцитов являются спектрин, актин (белок полосы 5), анкирин, белки полос 4.1, 4.2, 4.9, которые расположены на внутренней цитоплазматической поверхности мембраны эритроцитов [Wada, Nakanishi, с. 380].

Белки составляют 60% от общего сухого веса мембраны эритроцитов. Электрофорез белков мембран эритроцитов в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия позволяет выявить до 15 полос мембранных белков.

Полосы 1,2 соответствуют двум медленно диффундирующим белкам (α и β -субъединицам) спектрина [Lubbers, Mohler, с. 122].

Спектрин представляет собой длинную фибриллярную молекулу, расположенную на внутренней (цитоплазматической) стороне мембраны. Его масса составляет приблизительно 30% от массы мембранных белков. Этот белок представляет собой гетеродимерную α -цепь и β -цепь с молекулярной массой 260 кДа и 225 кДа, которые уложены антипараллельно и имеют форму извилистого шнура длиной около 100 нм [Zhu, Asaro, с. 232].

В эритроцитах спектрин связывается с цитоплазматическим доменом интегрального белка полосы 3. Спектрин, связанный с актиновыми филаментами, играет важную роль в поддержании двояковогнутой формы эритроцитов и может влиять на функционирование мембранных белков [Smith, Wan, Fowler, с. 381].

Было выявлено несколько типов сиалогликопротеинов, называемых гликофоринами (А, В, С, D).

Гликофорин - гликопротеины, цельные белки, в структуре которых имеется 3 области.

Гликофорин А: внешняя область (N-концевой остаток) гликопротеина связана с 16 олигосахаридными остатками. Олигосахариды по большей части

состоят из N-ацетилгалактозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Присутствие сиаловой кислоты определяет большой отрицательный заряд на внешней поверхности эритроцитов, что вызывает отталкивание эритроцитов друг от друга, кроме того, N-концевой участок гликофорина содержит антигены группы крови и вирусные рецепторы. С-концевой остаток гликофорина взаимодействует с 4,1-полосным белком. Средняя гидрофобная область связана с остатками жирных кислот мембранных молекул фосфатида [Боровская, с. 334-338].

Молекула гликофорина В не имеет цитоплазматического домена.

Белок полосы 3, или «анионный канал», обеспечивает пассивный обмен ионов Cl^- и HCO_3^- между цитоплазмой эритроцита и плазмой крови во время газообмена [Wada, Nakanishi, с. 381].

В отличие от гликофорина полипептидная цепь этого белка несколько раз пронизывает бислой. Участок полипептидной цепи, находящийся снаружи, связывает небольшое количество углеводов [Graffmuller, с. 64]. Цитоплазматический домен, взаимодействующий с белками, которые выстилают внутренний монослой мембраны (с молекулами спектрина за счет спектрин-связывающего белка анкирина), закрепляет белок в мембране.

Мембрана эритроцитов содержит в небольшом количестве Na^+ , K^+ -АТФазу, которая поддерживает гомеостаз эритроцитов [Martinez-Vieyra, Rodriguez-Varela, Cerecedo, с. 6424].

Липиды мембран эритроцитов

Мембраны эритроцитов содержат полярные и нейтральные липиды. В качестве полярных выступают фосфолипиды, а нейтральных - холестерин. Содержание холестерина в мембранах эритроцитов животных составляет 22-29%. Фосфолипиды составляют 60% от общего количества мембранных липидов, что составляет 27% от сухого веса мембраны. В мембранах эритроцитов были идентифицированы 2 типа фосфолипидов - фосфоглицериды и сфинголипиды. Фосфоглицериды представлены

фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсеринем, фосфатидилинозитолом. Из сфинголипидов выявлено присутствие сфингомиелина [Smith, Wan, Fowler, с. 382-384]. Каждый тип фосфолипидов может содержать разные остатки жирных кислот, различающиеся числом атомов углеводов и двойными связями. Каждая двойная связь вызывает изгиб углеводородного хвоста, что усложняет гидрофобные взаимодействия между ними, что определяет микровязкость мембраны: чем больше ненасыщенных жирных кислот в мембранах, тем больше жидкости в мембране и тем выше ее проницаемость для веществ. Кроме того, длина и странность атомов углеводородных хвостов во многом определяют текучесть мембран [Боровская, с. 339-342].

Фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин преобладают во внутреннем слое, а фосфатидилхолин и сфингомиелин - во внешнем слое липидного бислоя. Следовательно, молекулы различных типов фосфолипидов распределены асимметрично относительно внутренней и внешней поверхностей липидной матрицы. Молекулы холестерина локализованы между молекулами фосфолипидов, как во внутреннем, так и во внешних слоях мембраны. В твердой кристаллической фазе это приводит к увеличению микровязкости мембран, тогда как в жидкокристаллической фазе мембрана становится более жесткой, поскольку холестерин, заполняя пустоты в мембране, снижает подвижность цепей жирных кислот [Grafmuller, с. 71-74].

1.1.1 Реологические характеристики эритроцитов

Реология крови (от греческого слова rheos – поток, текучесть) – свойство крови, определяющее ее текучесть, как совокупность функционального состояния форменных элементов и плазмы. Правильная перфузия тканей может происходить только тогда, когда реологические свойства крови находятся в определенных пределах. Изменения этих свойств играют важную роль в процессах заболевания [Белкин, с.108].

Вязкость крови определяется вязкостью плазмы, гематокритом (объемная доля эритроцитов, составляющих 99,9% клеточных элементов) и механическими свойствами эритроцитов. Красные клетки крови имеют уникальные механические свойства, которые могут быть изучены в соответствии с условиями деформабильности эритроцитов и агрегационной способности. Благодаря этим свойствам, кровь ведет себя как неньютоновская жидкость [Белкин, с.109-111].

Таким образом, вязкость крови зависит от скорости сдвига. Кровь становится менее вязкой при высоких скоростях сдвига, подобных тем, которые возникают при усилении скорости кровотока, например, во время физических упражнений или при пике систолы. Следовательно, кровь разжижается в сдвиговом потоке. И наоборот, вязкость крови увеличивается, когда скорость сдвига снижается при увеличении диаметра сосуда или при низком потоке, например, в диастолу. Вязкость крови также увеличивается с увеличением агрегации эритроцитов [Болдырева, Кяйвярайнен, Илюха, с. 59-63].

Вязкость крови является мерой сопротивления крови течению. Она также может быть описана как плотность и липкость крови. Это биофизическое свойство делает данный показатель критическим фактором, определяющим трение крови о стенки сосуда, скорость венозного возврата, работу, необходимую для того, чтобы сердце качало кровь, и количество кислорода, транспортируемого в ткани и органы [Артюхов, с. 123].

Основными факторами, определяющими вязкость крови являются: гематокрит, деформабильность и агрегационная способность эритроцитов и вязкость плазмы. Вязкость плазмы определяется содержанием воды и макромолекулярных компонентов, в качестве которых выступают разные типы белков и их концентрация в плазме [Справочник Биофизики России, сайт].

Тем не менее, гематокрит оказывает наиболее сильное влияние на вязкость цельной крови. Увеличение гематокрита на одну единицу может

вызвать увеличение вязкости крови до 4%. Эти отношения становятся все более чувствительными с увеличением гематокрита [Антонов, Черныш, Козлова, с. 346]. Когда гематокрит повышается до 60 или 70%, что часто происходит при полицитемии, вязкость крови может стать в 10 раз выше, чем у воды, и ее скорость прохождения через кровеносные сосуды значительно замедляется из-за повышенного сопротивления потоку. Это приведет к снижению доставки кислорода. К другим факторам, влияющим на вязкость крови, относится температура, повышение которой приводит к снижению вязкости. Это особенно важно при переохлаждении, где увеличение вязкости крови вызывает проблемы с кровообращением [Maeda, Nakajima, Izumida, с. 396].

Эритроциты занимают около половины объема крови и обладают эластичными свойствами. Это упругое свойство является основным фактором, влияющим на вязкоупругое поведение крови. Большой объемный процент эритроцитов на нормальном уровне гематокрита оставляет мало места для движения и деформации клетки без взаимодействия с соседней клеткой. Расчеты показали, что максимальный объемный процент эритроцитов без деформации составляет 58%, что находится в диапазоне обычно встречающихся уровней. Для кровотока существенное взаимодействие между клетками будет играть ключевую роль по причине ограниченного пространства между эритроцитами. Данное взаимодействие, а также склонность клеток к агрегации, являются основными факторами, влияющими на вязкоупругое поведение крови [Maeda, Nakajima, Izumida, с. 397-401].

Другими факторами, влияющими на вязкоупругие свойства крови, являются вязкость плазмы, состав плазмы, температура и скорость потока или скорость сдвига. Вместе эти факторы делают кровь человека вязкоупругой, неньютоновской и тиксотропной [Боровская, с. 339-342].

Когда эритроциты находятся в состоянии покоя или при очень малых скоростях сдвига, они имеют тенденцию агрегировать и складываться вместе

энергетически выгодным образом. Притяжение объясняется наличием заряженных групп на поверхности клеток и наличием фибриногена и глобулинов. Эта агрегированная конфигурация представляет собой расположение ячеек с наименьшим количеством деформации. При очень низких скоростях сдвига в вязкоупругих свойствах крови преобладает агрегация, а деформируемость клеток относительно незначительна. По мере увеличения скорости сдвига размер агрегатов начинает уменьшаться. При дальнейшем увеличении скорости сдвига клетки будут перестраиваться и ориентироваться, обеспечивая каналы для прохождения плазмы и скольжения клеток. Влияние агрегационных свойств на вязкоупругость уменьшается, а влияние деформируемости эритроцитов начинает увеличиваться [Graffmuller, с. 84-91].

По мере того, как скорость сдвига становится больше, эритроциты будут растягиваться или деформироваться и выравниваться с потоком. Образуются клеточные слои, разделенные плазмой, и поток теперь приписывается слоям клеток, скользящим по слоям плазмы. Клеточный слой обеспечивает более легкое течение крови и, следовательно, снижает вязкость и эластичность [Maeda, Nakajima, Izumida, с. 402-404].

1.2. Деформабильность эритроцитов

1.2.1. Методы изучения упругих свойств мембран эритроцитов

Деформабильность эритроцитов – это уникальная способность эритроцитов обратимо изменять форму при заданном уровне приложенного стресса без гемолиза (разрыва). Это крайне важное свойство, потому что эритроциты должны значительно изменять свою форму под воздействием механических сил в потоке жидкости или при прохождении через микроциркуляторное русло. Степень и геометрия этого изменения формы могут зависеть от механических свойств эритроцитов, величины приложенных сил и ориентации эритроцитов с приложенными силами [Белкин, с. 90].

Деформабильность является внутренним свойством клеток эритроцитов, определяемым геометрическими и структурными свойствами клеточной мембраны, хотя, как и во многих измеримых свойствах, условия окружающей среды также могут быть существенными факторами при любом измерении. Никакие другие клетки организмов млекопитающих не обладают деформабильностью, сравнимой с эритроцитами; кроме того, эритроциты других живых организмов не деформируются до степени, сравнимой с эритроцитами млекопитающих. Эритроциты человека со своей организацией имеют особую структуру – цитоскелет (актин и спектрин, связанные вместе анкирином), который увеличивает устойчивость эритроцитов.

Деформабильность эритроцитов оценивается на основе типа дифракционной картины с использованием специального индекса деформабильности – Id [Белкин, с. 91].

Для изучения способности эритроцитов к деформации используют различные экспериментальные методы:

1. Способ аспирации эритроцитов в микропипетку, имеющую внутренний диаметр $\approx 2,8-3$ мкм;
 2. Метод центрифугирования - способность эритроцитов к деформации оценивается по изменению их размеров под действием центробежных сил;
 3. Метод фильтрации - определение скорости эритроцитов через бумажные, нитроцеллюлозные или поликарбонатные фильтры с фиксированными размерами пор (≈ 3 мкм);
1. Реоскопия - измеряется под микроскопом размер красных кровяных телец, деформированных потоком жидкости;
 2. Эктацитометрия - этот метод основан на дифракции гелий-неоновых лазерных лучей на тонком слое эритроцитов, деформированных потоком вязкой жидкости, что приводит к изменению дифракционной картины, которая используется для оценки деформируемости эритроцитов [Белкин, с.109-111].

Деформабильность эритроцитов является измеримым свойством, и были исследованы различные способы его измерения, причем каждое из них имеет результаты и значимость, которые в высокой степени специфичны для данного используемого подхода [Maeda, Nakajima, Izumida, 404].

Эктацитометрия, основанная на лазерном дифракционном анализе, является наиболее предпочтительным (и довольно прямым) методом измерения деформабильности. Другим прямым показателем является оптический пинцет, который нацелен на отдельные клетки [Артюхов, с. 192].

Фактически деформабильность можно измерить косвенно, например, по тому, какая сила давления и сколько времени требуется клеткам, чтобы пройти через поры фильтра (т.е. фильтруемость или фильтрацию) или перфузировать через капилляры (перфузия, *in vitro* или в естественных условиях), имея меньшие диаметры, чем клетки. Некоторые методы на деформабильность эритроцитов могут быть более физиологически значимыми. Например, перфузия более чувствительна к относительно небольшим изменениям деформабильности (по сравнению с фильтруемостью), что делает ее более предпочтительной для оценки деформабильности эритроцитов в тех случаях, когда микроциркуляторные проявления представляют особый интерес. Кроме того, некоторые методы могут отслеживать, как изменяется сам процесс деформабильности при изменении условий [Белкин, с.110-113].

В связи с невозможностью учета условий экспериментов и низкой повторяемостью результатов, в данной работе был выбран метод лазерной дифрактометрии (или эктацитометрии), так как данный метод отличается высокой точностью измерений, является наиболее простым в техническом отношении и исключает влияние внешних факторов.

1.2.2. Факторы, влияющие на деформабильность эритроцитов

Изменение формы эритроцитов под действием приложенных сил (т.е. сдвиговых сил в кровотоке) является обратимым, а двояковогнутая дискоидная форма, которая является нормальной для эритроцитов

большинства млекопитающих, сохраняется после устранения деформирующих сил. Другими словами, эритроциты ведут себя как упругие тела, в то же время как также сопротивляются изменению формы под действием деформирующих сил [Самойлов, с. 367].

Вязкоупругое поведение эритроцитов определяется следующими тремя свойствами:

1. Геометрия эритроцитов. Ее обуславливает двояковогнутая дискоидная форма, обеспечивая большую площадь поверхности, позволяя таким образом изменять форму без увеличения размеров клетки. Этот тип изменения формы требует значительно меньших усилий, чем те, которые требуются для изменения формы с расширением площади поверхности.
2. Цитоплазматическая вязкость, которую отражает цитоплазматическая концентрация гемоглобина в эритроцитах.
3. Вязкоупругие свойства мембраны эритроцитов, в основном, определяющиеся цитоскелетом эритроцитов [Белкин, с. 109].

1.3. Понятие флуоресценции

Процессы жизнедеятельности, как теперь стало известно, практически всегда сопровождаются очень слабым излучением, которое иногда называют сверхслабым свечением или собственным излучением клеток и тканей [Рубин, с. 206].

Если молекула находится в возбужденном состоянии, она может перейти в основное состояние путем спонтанного или вынужденного испускания кванта света. Для вынужденного испускания необходимо наличие внешнего электромагнитного поля, действующего на молекулу. Таким образом, можно подойти к понятию о флуоресценции [Векшин, 16-18].

Флуоресценция-выделение излучения, обычно света, из вещества, атомы которого получили избыточное количество энергии при бомбардировке частицами, как правило, ультрафиолетового излучения электронов. Типичное

время жизни такого возбужденного состояния составляет 10^{-11} - 10^{-6} с. Флюоресценция прекращается при отсутствии источника энергии, что говорит о необходимости возбуждающего излучения для проведения достоверных исследований [Векшин, 16-24].

В ходе данной работы была налажена и внедрена техника флуоресцентного анализа, включающая в себя совокупность методов качественного и количественного определения вещества, основанного на его флуоресценции. Качественный анализ осуществляют по цвету флуоресцентного излучения, количественный- по интенсивности последнего. При соответствующих условиях можно обнаружить наличие ничтожных количеств вещества [Белкин, с112].

Впервые флуоресценцию соединений хинина наблюдал Джорж Стокс в 1852г. В его честь был названо важное физическое понятие – Стоксов сдвиг. Это явление, характеризующее разницу длин волн максимумов спектров поглощения и испускания флуоресценции. В методе ФСА Стоксов сдвиг выступает одним из важнейших законов, на основе которого проводится интерпретация получаемых результатов с учетом разницы длин волн различных спектров флуоресцирующего объекта [Рубин, с. 204].

Общая схема внутримолекулярных процессов, происходящих после оптического возбуждения молекул, отражает схема Яблонского. Вероятность безызлучательных процессов зависит также от взаимодействия возбужденных молекул с окружением [Векшин, с. 26].

Все процессы возбуждения можно охарактеризовать константами скоростей соответствующих процессов – K , $K_{ик}$ и т.д.

Длительность пребывания молекул в возбужденном состоянии определяется естественным (радиационным) τ_0 и реальным τ_1 временем жизни энергетического уровня.

Реальное время жизни τ определяется вероятностью всех процессов, уменьшающих заселенность возбужденного состояния, т.е.

$$\tau = \frac{1}{K_{фл} + K_{ск} + K_{ик}}, \quad \tau_0 = \frac{1}{K_{фл}}.$$

Важнейшей характеристикой флуоресценции является ее выход - величина, определяющая долю переходов с испусканием по отношению ко всем процессам, уменьшающим заселенность возбужденного состояния. Различают квантовый выход γ – отношение числа фотонов $N_{ис}$, испускаемых единицей объема вещества в единицу времени, к числу поглощенных фотонов:

$$\gamma = \frac{N_{ис}}{N_{погл}},$$

и энергетический выход Γ – отношение испускаемой энергии $U_{ис}$ и поглощенной U :

$$\Gamma = \frac{U_{ис}}{U_{погл}}.$$

Эти величины связаны соотношением:

$$\Gamma = \frac{\nu_{фл}}{\nu_{возб}},$$

где $\nu_{фл}$ – средняя частота, центр тяжести полосы испускания, $\nu_{возб}$ – частота возбуждающего излучения [Sun, Su, Lv, с. 978-982].

1.3.1. Флуорофоры

В настоящее время в процессе лабораторного исследования флуоресценции цельной крови все большую роль приобретают флуоресцентные протеины и зонды (ФЗ). Флуоресцентные протеины уже много лет используются в различных научных исследованиях – от маркирования и отслеживания молекул до тестирования качественных показателей окружающей среды. До последнего времени такие протеины обнаруживались только у медуз и кораллов. Так, был получен из тканей медузы зеленый флуоресцентный белок (green fluorescence protein-GFP). За

изучение GFP в 2008 году была присуждена Нобелевская премия по химии. В настоящий момент ген данного белка используют в качестве светящейся метки в клеточной молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков [Векшин, с. 32].

Флуоресцентные зонды широко используются в биофизических исследованиях, однако до последнего времени еще не нашли массового применения в практической медицине в форме новых диагностических методов. Это открывает принципиально иные возможности в описании характера заболевания по сравнению с биохимическими или гематологическими методами. Разработаны три метода, которые уже применяются в клинике или находятся в стадии клинических испытаний:

1. Метод для определения объема гидрофобных липидов в плазме крови как факторов риска развития атеросклероза.

2. Метод чувствительный к свойствам связывающих центров альбумина в плазме крови. Показано, что конформация центров может изменяться при целом ряде заболеваний. В частности, онкопатологиям различной этиологии.

3. Метод реагирует на трансмембранные поля клеток крови, которые чрезвычайно чувствительны к аллергическим заболеваниям и в ряде других случаев [Sun, Su, Lv, с. 978-980].

Собственной флуоресценцией обладают далеко не все молекулярные системы. Хорошо флуоресцируют полиненасыщенные, конденсированные, а также, разумеется, ароматические и полиароматические соединения, в особенности гетероатомные или с электрон-донорными заместителями в кольце. Значительно в меньшей степени флуоресценция свойственна природным соединениям. К флуоресцирующим природным соединениям можно отнести природные красители, некоторые аминокислоты (триптофан и тирозин) и содержащие их белки, кофакторы (NADH), витамины (рибофлавин) [Векшин, 28].

Для исследования процессов молекулярной динамики в исследуемую систему следует либо ввести ФЗ, либо в один из компонентов исследуемой системы необходимо ввести флуоресцентную метку, или краситель. В данной работе использован краситель флуоресцеин (рис.1). Он представляет из себя жёлтые кристаллы, плохо растворимые в воде, лучше - в спирте и водных щелочах, температура плавления 314-316 С (с разложением). В водных растворах существует в виде смеси (1:1) бензоидной и хиноидной форм и обладает сильной жёлто-зелёной флуоресценцией. Получают ФЦ конденсацией фталевого ангидрида с резорцином:

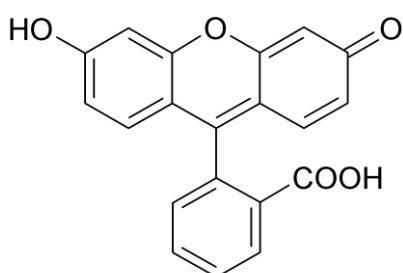


Рис.1. Структурная организация молекулы флуоресцеина.

Значения квантового выхода флуоресценции для разных веществ сильно отличается. Для флуоресцеина $\Phi_{\text{фл}}=0,9$, для белков – варьирует в пределах 0,01-0,03. Флуоресцирующие соединения удается с высокой чувствительностью (до 10^{-10} г в пробе) обнаруживать в сложных смесях нефлуоресцирующих соединений. По флуоресценции удается обнаруживать следовые количества наркотических веществ, концентрацию антигенов и антител в крови [Пермяков, 34].

1.3.2. Молекулярный механизм флуоресценции

В молекулярной спектроскопии, поглощение и испускание света хорошо демонстрирует диаграмма энергетических уровней, предложенная Яблонским. Схема Яблонского представляет собой диаграмму, которая иллюстрирует электронные состояния в молекуле и переходы между ними.

Электронные состояния располагаются по энергии по вертикали и горизонтально по кратности спинов. Безызлучательные

переходы обозначены волнистыми стрелками, а излучательные переходы - прямыми. Основные колебательные состояния каждого электронного состояния обозначены жирными линиями, более высокие колебательные состояния - более тонкими линиями [35,36].

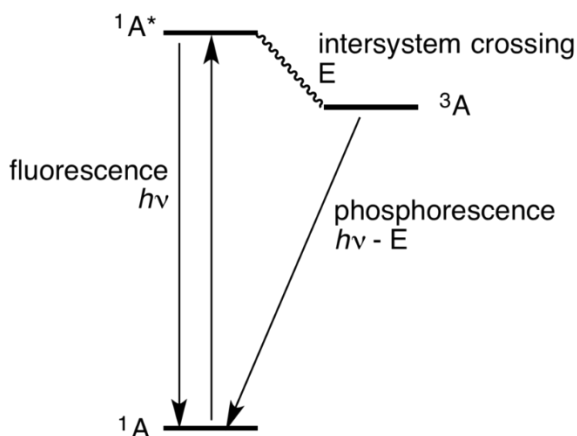


Рис. 2. Диаграмма Яблонского, показывающая возбуждение молекулы. А в ее синглетно-возбужденное состояние ($1A^*$) с последующим межсистемным переходом в триплетное состояние ($3A$), которое посредством фосфоресценции релаксирует до основного состояния.

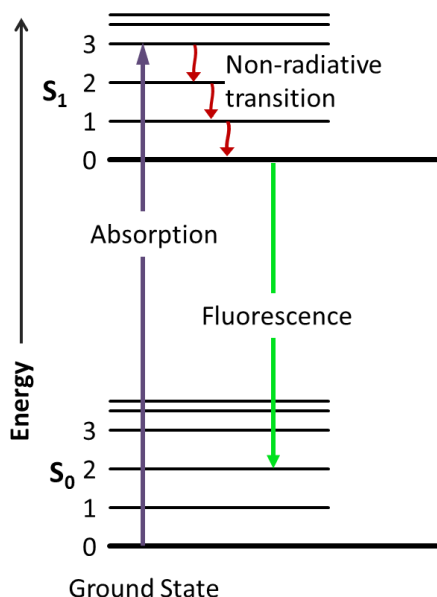


Рис.3. Диаграмма Яблонского, включающая колебательные уровни для поглощения, безызлучательного распада и флуоресценции.

Радиационные переходы предполагают поглощение фотона, если переход происходит на более высокий энергетический уровень. Или же испускание фотона, для перехода на более низкий уровень. Безызлучательные переходы идут через несколько различных механизмов, все они по-разному обозначены на диаграмме [Векшин, с. 36-46].

Релаксация возбужденного состояния до его самого низкого вибрационного уровня называется вибрационной релаксацией. Этот процесс включает в себя рассеивание энергии от молекулы к ее окружению, и, таким образом, это не может происходить для изолированных молекул.

Вторым типом безызлучательного перехода является внутреннее преобразование (IC), которое происходит, когда колебательное состояние электронно-возбужденного состояния может соединяться с колебательным состоянием нижнего электронного состояния.

Третий тип межсистемный переход (ISC); это переход в состояние с другой кратностью спина. В молекулах с большой спин-орбитальной связью межсистемное скрещивание гораздо важнее, чем в молекулах, которые проявляют только малую спин-орбитальную связь. ISC может сопровождаться фосфоресценцией [Колесникова, Даренская, Колесников, с. 18-20].

Теперь сформулируем основные принципы молекулярной флуоресценции.

1. Из-за внутренней конверсии и в соответствии с правилом Каша положение спектра флуоресценции не зависит от длины волны возбуждения.

2. Спектр флуоресценции смещен в длинноволновую сторону относительно полосы поглощения S_0-S_1 (правило Стокса) и является приблизительно зеркальным отражением этой полосы.

3. Количество квантов, излучаемых за единицу времени, пропорционально количеству квантов, поглощенных за единицу времени, и квантовому выходу флуоресценции [Sun, Su, Lv, с. 983].

Так что все молекулы. Независимо от энергии поглощенного кванта они находятся в одном и том же низшем возбужденном состоянии, в котором молекула может находиться в интервале 10^{-9} – 10^{-8} с. Дальнейшие способы расходования энергии возбуждения могут быть разными:

- Часть молекулы отдает энергию окружающим частицам, нагревая тело. Это соответствует безызлучательному переходу в основное состояние.

- Другая часть излучает кванты флуоресценции, переходя на некоторый колебательный уровень основного состояния [Пермяков, с. 36].

1.3.3 Флуоресценция крови

Сыворотка крови является одним из основных объектов анализа в диагностике различных заболеваний. В связи с этим большой интерес представляют методы экспресс-анализа его состояния [Попова, 23].

Известно, что гемоглобин обладает высокой оптической плотностью, то есть он является светофильтром в видимой области спектра. Кроме того, гемоглобин является классическим гасителем флуоресценции. Механизм этого явления заключается в том, что энергия электронного возбуждения ряда веществ индуктивно передается гему, который действует как «ловушка». Таким образом, гемоглобин приводит к безызлучательному переходу возбужденных молекул в исходное невозбужденное состояние с обменом энергии электронного возбуждения на энергию тепловых колебаний [Колесникова, Даренская, Колесников, с. 21-23].

В некоторых источниках литературы было описано свечение цельной крови в видимой области спектра. Это свечение было неравномерным во времени, проявлялось в форме лица и имело два максимума. Первый максимум в спектральной области 460–512 нм наблюдался через 6–18 мин исследования, второй максимум во всем диапазоне видимой части спектра появился через 27–42 мин после взятия крови у человека и помещения это в измерительной кювете. Интенсивность и длительность свечения варьировали

в зависимости от пола, возраста и характера заболевания и, в частности, у больных раком были различными [Hirshburg, Ravikumar, с. 323].

Помимо прочего, было обнаружено сверхслабое свечение плазмы крови в видимой области спектра (300-620 нм). Биохемилюминесценция сыворотки крови наблюдалась только в присутствии кислорода и исчезала в атмосфере азота. При изучении интенсивности свечения отдельных компонентов сыворотки крови было установлено, что свечение сыворотки и плазмы крови определяется в основном липидами [Neuroz, Ciurli, с. 437].

1.4 Анемии. Патогенетическая классификация анемий

Анемия (синоним – малокровие) — это патологический клинико-гематологический синдром, сопровождающийся снижением общего количества эритроцитов (красных клеток крови) или гемоглобина в циркулирующей крови, и характеризующийся снижением способности крови переносить кислород [Шулутко, с. 567].

При медленном развитии анемии, симптомы часто расплывчаты и могут сопровождаться чувством усталости, слабости, одышкой и как следствие низкой работоспособностью. Если анемия развивается быстро, то помимо прочих симптомов могут включаться следующие: спутанность сознания, головокружение, потерю сознания и усиление жажды. При долговременном наличии анемии человек становится заметно бледным. Дополнительные симптомы могут возникать в зависимости от основной причины возникновения синдрома, так как саму анемию непосредственно относят к одному из симптомов различных патологических состояний организма. Необходимо различать гидремию (например, псевдоанемия беременных) и собственно анемию — при гидремии количество форменных элементов крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) и гемоглобина остаётся неизменным, но увеличивается объём плазмы крови [Смирнова, с. 14-16].

Анемия может быть вызвана рядом патологий и заболеваний, которые могут быть связаны с первичным поражением кровеносной системы, или от

него не зависеть. Как показывает клиническая практика во многих источниках литературы принята следующая классификация:

- Анемии, сопутствующие острые и хронические кровопотери. Причины кровопотери включают травмы и желудочно-кишечное кровотечение.
- Анемии, вызванные нарушением образования эритроцитов, которые включают: дефицит железа, дефицит витамина В12, апластические, анемии хронических заболеваний и ряд новообразований костного мозга.
- Анемии, возникающие вследствие повышенного разрушения эритроцитов или гемолитические анемии. В данной ситуации причинами повышенного разрушения эритроцитов могут выступать: генетические заболевания, такие как серповидноклеточная анемия, инфекционные заболевания, как малярия, и некоторые аутоиммунные заболевания [Nairz, Theurl, Weiss, Wolf, с. 411-413].

Анемии также можно классифицировать по размеру эритроцитов и количеству гемоглобина в каждой клетке:

- Микроцитарная гипохромная анемия – клетки маленькие, с низким содержанием гемоглобина (ЖДА, талассемия, сидеробластная анемия);
- Нормоцитарная нормохромная анемия – клетки нормального размера и показатель гемоглобина в пределах нормы (Анемия хронических заболеваний, анемия, вызванная почечной недостаточностью или инфильтрацией в головном мозге, миелодиспластический синдром, острая геморрагическая анемия, гемолитическая анемия);
- Макроцитарная гиперхромная анемия – клетки большого размера с увеличенным содержанием гемоглобина (Мегалобластная В-12- или фолиеводефицитная анемия, немегалобластная анемия, вызванная заболеваниями печени, геморрагическая анемия) [Ларина, 44-46].

Критериями ВОЗ для диагностики анемий считаются:

- у мужчин - число эритроцитов $<4,0$ млн/мкл, Hb <130 г/л, Ht $<39\%$;
- у женщин - число эритроцитов $<3,8$ млн/мкл, Hb <120 г/л, Ht $<36\%$;
- у беременных женщин Hb <110 г/л, Ht $<33\%$ [Всемирная Организация

Здравоохранения, сайт].

Анемия - наиболее распространенное заболевание крови, которым страдает около трети населения мира. Железодефицитная анемия поражает почти 1 миллиард человек. В 2013 году анемия, вызванная дефицитом железа, стала причиной около 183 000 смертей - по сравнению с 213 000 смертей в 1990 году. Анемия чаще встречается у женщин, чем у мужчин, во время беременности, а также у детей и пожилых людей [Ларина, 45].

Снижение уровня заболевания анемией является одной из шести глобальных целей ВОЗ в области питания на 2025 год и связанных с питанием глобальных целей по НИЗ на 2025 год, одобренных Всемирной ассамблеей здравоохранения в 2012 и 2013 годах. Усилия по достижению глобальных целей способствуют достижению целей в области устойчивого развития [Всемирная Организация Здравоохранения, сайт].

1.5 Железодефицитная анемия

1.5.1 Физиологическая роль железа в организме

Хорошо известно, что недостаток или чрезмерное воздействие различных элементов оказывает заметное влияние на здоровье человека. Эффект элемента определяется несколькими характеристиками, в том числе поглощением, обменом веществ и степенью взаимодействия с физиологическими процессами [Бокарев, Немчинов, Кондратьева, с. 12].

Железо является важным элементом почти для всех живых организмов, так как оно участвует в самых разнообразных метаболических процессах, включая транспорт кислорода, синтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и транспорт электронов. Однако, поскольку железо может образовывать свободные радикалы, его концентрация в тканях организма

должна строго регулироваться, поскольку в чрезмерных количествах это может привести к повреждению тканей [Алексеев, с. 32-38].

Нарушения метаболизма железа являются одними из наиболее распространенных заболеваний человека и охватывают широкий спектр заболеваний с различными клиническими проявлениями, начиная от анемии до перегрузки железом, и, возможно, нейродегенеративных заболеваний.

Дефицит железа встречается почти у половины населения мира. Не менее 4% женщин репродуктивного возраста, 20–30% беременных женщин (30–50% в конце беременности) и 1–2% мужчин имеют выраженный дефицит железа (АЖ). Среди всех анемий от 70 до 90% составляют анемии, вызванные GI. По данным ВОЗ, железодефицитная анемия (ЖДА) занимает ведущее место среди 38 самых распространенных заболеваний человека. В России оно зарегистрировано у 6-30% населения, у беременных до 80%. В последнее время эти цифры не имеют тенденцию к снижению, а в некоторых областях даже регистрируют их рост [Андреичев, Балеева, с. 60-62].

Железо доставляется в ткани циркулирующим трансферрином, транспортером, который улавливает железо, выделяемое в плазму главным образом из кишечных энтероцитов или ретикулоэндотелиальных макрофагов. Связывание нагруженного железом трансферрина с рецептором трансферрина на клеточной поверхности (TfR) 1 приводит к эндоцитозу и поглощению металлического груза. Интернализованное железо транспортируется в митохондрии для синтеза кластеров гема или железо-сера, которые являются неотъемлемыми частями нескольких металлопротеинов, а избыток железа накапливается и детоксифицируется в цитозольном ферритине.

Поскольку железо требуется для ряда разнообразных клеточных функций, для поддержания гомеостаза железа необходим постоянный баланс между поглощением, транспортировкой, хранением и использованием железа. Поскольку в организме отсутствует определенный механизм для активного

выведения железа, железо баланс в основном регулируется в точке поглощения [Верткин, 210-220].

Пищевое железо встречается в двух формах: гемовое и негемовое. Основными источниками гемового железа являются гемоглобин и миоглобин, потребляемые мясом, птицей и рыбой, тогда как негеминоное железо получают из злаков, бобовых, бобовых, фруктов и овощей. Гемовое железо обладает высокой биодоступностью (15% -35%), и диетические факторы мало влияют на его усвоение, тогда как негемовое железо значительно ниже (2% - 20%) и сильно зависит от присутствия других пищевых компонентов. Наоборот, количество негемового железа в рационе во много раз превышает количество гемового железа в большинстве блюд. Таким образом, несмотря на более низкую биодоступность, негемовое железо, как правило, вносит больший вклад в питание железом, чем гемовое железо. Основными ингибиторами всасывания железа являются фитиновая кислота, полифенолы, кальций и пептиды из частично переваренных белков. Усилители — это аскорбиновая кислота и мышечная ткань, которые могут восстанавливать трехвалентное железо до двухвалентного железа и связывать его в растворимых комплексах, которые доступны для поглощения [Андреичев, Балеева, с. 62-66].

Средний взрослый человек хранит около 1-3 г железа в своем теле. Точный баланс между потреблением пищи и ее потерей поддерживает этот баланс. Приблизительно 1 мг железа теряется каждый день из-за отслоения клеток с поверхности кожи и слизистой оболочки, включая слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта.

Потребление железа с пищей необходимо, чтобы восполнить потерю железа в стуле и моче, а также через кожу. Эти базальные потери составляют приблизительно 0,9 мг железа для взрослого мужчины и 0,8 мг для взрослой женщины [Окороков, с. 278].

1.5.2 Классификация анемий

Умеренная степень железодефицитной анемии затрагивает приблизительно 610 миллионов человек во всем мире или 8,8% населения. Это немного чаще встречается у женщин (9,9%), чем мужчин (7,8%). До 15% детей в возрасте 1-3 лет страдают железодефицитной анемией. Легкая железодефицитная анемия поражает еще 375 миллионов человек [Всемирная Организация Здравоохранения, сайт].

Распространенность дефицита железа в качестве причины анемии варьируется между странами; в группах, в которых анемия наиболее распространена, включая детей младшего возраста и подгруппу небеременных женщин, дефицит железа составляет долю случаев анемии в этих группах (25% и 37% соответственно). Дефицит железа часто встречается у беременных женщин [Верткин, 209].

Хотя этиология ЖДА является многогранной, она обычно возникает, когда потребность организма в железе не удовлетворяется всасыванием железа, независимо от причины. Люди с ЖДА имеют недостаточное потребление, нарушение всасывания или транспорта, физиологические потери, связанные с хронологическим или репродуктивным возрастом, или хроническую кровопотерю, вторичную по отношению к заболеванию [Окороков, с. 304].

У взрослых ЖДА может привести к широкому спектру неблагоприятных результатов, включая снижение работоспособности или физической нагрузки, нарушение терморегуляции, иммунную дисфункцию, нарушения желудочно-кишечного тракта и нейрокогнитивные нарушения. Кроме того, ЖДА, сопутствующая хроническому заболеванию почек или застойной сердечной недостаточности, может ухудшить исход обоих состояний [Демидова, с. 12-16].

Стадии ДЖ и тяжесть ЖДА:

1. Прелатентная (легкая): Нв от 90 до 120 г / л;
2. Скрытая (умеренная): Нв от 70 до 89 г / л;
3. ЖДА (тяжелая): Нв менее 70 г / л.

Предварительный и латентный ДЖ не имеют четких клинических очертаний и, как правило, являются случайным обнаружением во время скринингового обследования. Стадия 1 - преддефицитный дефицит: потери железа превышают его потребление, происходит постепенное истощение запасов, абсорбция увеличивается, компенсируется; Стадия 2 - ЖД латентная: истощение железа, начинает страдать эритропоэз; Стадия 3 - анемия [Окороков, с. 298-305].

1.5.3 Клиника ЖДА

Дефицит железа без анемии является диагностической проблемой, так как он может оставаться нераспознанным в течение более длительного периода, и, кроме того, нет четко определенных диагностических критериев. Подозрение должно возникать, если у пациента с нормальным полным анализом крови присутствуют симптомы железодефицитной анемии, главным образом, вместе с низкой концентрацией ферритина и особенно, когда история болезни подтверждает дефицит железа [Алексеев, с. 215].

Ферритин (<30 мкг/л) является наиболее чувствительным и специфическим показателем дефицита железа, хотя необходимо учитывать его недостатки. Однако концентрация ферритина может быть близка к норме, в то время как окрашивание железом образца аспирации костного мозга не содержит железа. Кроме того, при определении состояния железа важно полагаться не только на результаты одного теста, но и на всю картину. Железо терапия должна контролироваться при повторных определениях ферритины с целевой концентрацией ферритины > 100 мкг/л и проводила до тех пор, пока симптомы были решены. Когда лечение железом прекращено, следует определить уровень ферритина в сыворотке, чтобы уровень оставался

стабильным. Железо должно быть восстановлено, если концентрация ферритина падает и симптомы появляются снова [Андреичев, Балеева, с. 60-66].

Железодефицитная анемия (гемоглобин ≤ 130 г/л у мужчин и ≤ 120 г/л у женщин) является поздним проявлением дефицита железа, которые являются обычными медицинскими состояниями в повседневной клинической практике. Около 10–20% женщин, страдающих менструацией, имеют дефицит железа, а 3–5% из них страдают выраженной анемией. Дефицит железа (анемия) часто может протекать бессимптомно и не диагностироваться в течение длительного периода времени. Кровь часто берут для полного анализа крови, и, если присутствует микроцитарная / гипохромная анемия, может возникнуть подозрение на дефицит железа. Концентрация ферритина в сыворотке (отрезан <30 мг/л) является наиболее чувствительным и специфичным тест, используемый для идентификации дефицита железа. Однако в клинических лабораториях, нижний предел диапазона задания часто устанавливаются на 10-20 мг/л. Это может привести к путанице, поскольку роль ферритина в выявлении дефицита железа не является однозначной. Затем к ферриту можно добавить определение насыщения трансферрина, растворимого рецептора трансферрина (sTfr) и соотношения между sTfr и логарифмом ферритина, а также гепсидина [Воробьев, 28-36].

1.6 Анемия хронического заболевания

Анемия хронического заболевания, также называемая анемией воспаления, представляет собой состояние, которое может быть связано с множеством различных основных патологий, включая хронические заболевания, такие как рак, определенные инфекции, а также аутоиммунные и воспалительные заболевания, такие как ревматоидный артрит или волчанка. Анемия сопровождается низким уровнем циркулирующих в крови эритроцитов или гемоглобина и характеризуется нарушением транспорта кислорода. Анемия при хроническом заболевании обычно бывает легкой или

средней степени тяжести. В легких случаях анемия может не сопровождаться какими-либо симптомами или может вызывать усталость, бледность кожи и головокружение, одышка, учащенное сердцебиение, раздражительность, боль в груди и другие симптомы. Эти симптомы могут возникать у любого человека, имеющего сопоставимую степень анемии. В большинстве случаев симптомы, связанные с основным заболеванием, обычно преобладают над симптомами легкой или умеренной степени анемии. В редких случаях анемия при хроническом заболевании может быть тяжелой и вызвать более серьезные осложнения. Основные механизмы, вызывающие анемию при хронических заболеваниях, сложны и до конца не изучены [Atkinson, Warady, с. 227-230].

1.6.1 Причины возникновения анемии при хронических заболеваниях

Точные причины анемии при хроническом заболевании могут изменяться и одновременно их может быть несколько. К анемии по всей видимости приводит сокращение нормального количества эритроцитов. Кроме того, может быть нарушена выработка красных кровяных телец (эритропоэз) или эритропоэтина (гормона, стимулирующего выработку красных кровяных телец). Точная причина анемии при хроническом заболевании может зависеть от основного состояния. Например, раковые клетки могут выделять определенные вещества, которые повреждают или разрушают незрелые эритроциты. В некоторых случаях раковые клетки или инфекционное заболевание могут проникать в костный мозг, мягкий губчатый материал, обнаруживаемый в длинных костях, где и образуются клетки крови [Surzhikova, Klochkova-Abelians, с. 62-65].

Исследователи также узнали, что люди с анемией или хроническим заболеванием также имеют дисбаланс в распределении железа в организме и в результате не могут эффективно использовать железо для создания новых клеток крови, несмотря на наличие достаточного или повышенного уровня железа, которое хранится в тканях. Железо — это важный минерал, который

содержится во всех клетках тела и необходим для правильного функционирования и роста организма. Данный минерал содержится во многих продуктах питания, включая красное мясо, птицу, яйца и овощи. Уровни железа в организме должны оставаться в определенном диапазоне, иначе они могут вызвать анемию (из-за низкого функционального уровня железа) или повреждение пораженных органов (из-за аномально высокого уровня железа в определенных тканях) [Кулеш, Бегаева, с.183-187].

Железо необходимо для производства гемоглобина - части эритроцитов, переносящих кислород. Ключевой находкой при анемии при хроническом заболевании является повышенное поглощение и удержание железа в определенных клетках, что приводит к снижению количества функционального железа, доступного для производства гемоглобина. Недостаток функционального железа препятствует развитию гемоглобина, что, в свою очередь, снижает количество кислорода, доставляемого по всему телу, то есть возникает анемия [Poggiali, с. 12-17].

Исследователи полагают, что иммунная система, которая остается постоянно активной у людей с хроническими заболеваниями вырабатывает вещества, влияющие на выработку, хранение и транспортировку железа в организме. Клетки иммунной системы производят цитокины, специализированные белки, которые стимулируют или подавляют функцию других клеток иммунной системы [Ganz, Nemeth, с. 36].

Гепсидин, гормон, вырабатываемый в печени, который помогает регулировать метаболизм и транспорт железа в организме, играет важную роль в развитии анемии при хронических заболеваниях. По некоторым исследованиям выяснилось, что специфический цитокин, известный как интерлейкин-6 (ИЛ-6), в большинстве случаев стимулирует выработку гепсидина, хотя гепсидин также может вырабатываться в ответ на воспаление такими путями, которые не связаны с ИЛ-6 [Сахин, с. 86]. Избыток гепсидина приводит к тому, что в клетках задерживается слишком много железа, что снижает его количество, доступного для производства гемоглобина, что в

свою очередь приводит к анемии. Большинство исследователей считают, что гепсидин является ключевым фактором, влияющим на развитие анемии хронического заболевания [Глушко, с. 52].

1.6.2 Диагностика и методы лечения

Диагноз анемии при хроническом заболевании ставится на основании выявления характерных симптомов, подробного анамнеза пациента, тщательной клинической оценки и различных специализированных тестов. Такие тесты могут измерять уровни определенных веществ в организме, включая уровни гемоглобина, уровни железа в сыворотке, общую железосвязывающую способность, общее количество эритроцитов и нормальный или повышенный уровень ферритина в крови [Хасанова, Ахмедзянова, с. 270]. Ферритин — это белок, который связывается с железом и используется в качестве индикатора запасов железа в плазме крови. Другой тест, который может быть проведен, измеряет насыщение трансферрина. Трансферрин — это белок, который участвует в транспортировке железа из кишечника в кровотоки. Были разработаны методы, позволяющие надежно измерить гепсидин в плазме, но в настоящее время они не доступны и не одобрены для использования в диагностике анемии при хронических заболеваниях [Дубов, с. 84].

Стандартные методы лечения

Лечение анемии хронического заболевания направлено на лечение основного заболевания. Если лечение основного заболевания оказывается успешным, анемия обычно проходит или полностью проходит без прямого лечения [Дубов, с. 86].

Попытки лечить анемию путем коррекции дисбаланса железа в организме с помощью таких методов лечения, как пероральные добавки железа или витамины, обычно оказываются неэффективными. Фактически, такие усилия могут иметь негативное влияние на общее состояние здоровья. Например, добавки железа вызывают споры, потому что при некоторых

заболеваниях, таких как рак, железо используется для роста и распространения, а при некоторых инфекциях железо используется в качестве питания. Необходимы дополнительные исследования, чтобы понять сложные механизмы, которые в конечном итоге приводят к анемии хронического заболевания, и какую роль, если таковая имеется, играют традиционные методы лечения анемии и дисбаланса железа в лечении больных [Steinmetz, с. 493-500].

Исследовательские методы лечения

В редких случаях, связанных с тяжелой анемией, может потребоваться переливание крови или лечение препаратами, стимулирующими выработку эритропоэтина (гормона, стимулирующего выработку красных кровяных телец). Тем не менее, согласно некоторым исследованиям, люди, принимающие эти методы лечения, добились худших результатов, чем люди, которые их не принимают. Необходимы дополнительные исследования для определения долгосрочной безопасности и эффективности таких методов лечения людей с анемией, вызванной хроническим заболеванием [Steinmetz, с. 493-502].

1.7 Гемолитическая анемия

Гемолитическая анемия — это форма анемии, вызванная гемолизом, аномальным распадом эритроцитов либо в кровеносных сосудах (внутрисосудистый гемолиз), либо в других частях человеческого тела (внесосудистый). Гемолиз чаще всего происходит в селезенке, но также может происходить в ретикулоэндотелиальной системе или механически (повреждение протезного клапана). Гемолитическая анемия составляет 5% всех существующих анемий, что имеет множество возможных последствий, начиная от общих симптомов и заканчивая опасными для жизни системными эффектами [Нуриддинова, Жумабаев, с. 117-119].

Гемолитическая анемия может быть наследственной или приобретенной, а также внутрисосудистой или внесосудистой. Каждый тип

может быть вызван различными заболеваниями, состояниями или факторами. При наследственной гемолитической анемии причинами могут являться серповидноклеточная анемия и талассемия. При данных заболеваниях производятся атипичные эритроциты, которые живут гораздо меньше нормальных эритроцитов. При приобретенной гемолитической анемии организм производит нормальные эритроциты, но позже они разрушаются.

Некоторые виды приобретенной гемолитической анемии являются временными и проходят в течение нескольких месяцев. Другие типы могут стать пожизненными (хроническими). Лечение зависит от типа и причины гемолитической анемии [Чеснокова, Невважай, Моррисон, Бизенкова, с. 167-170].

1.7.1 Симптоматика и причины возникновения гемолитической анемии

Симптомы гемолитической анемии схожи с другими формами анемий. Общие признаки и симптомы включают: усталость, бледность, одышку и тахикардию. Основное отличие гемолитической анемии заключается в том, что разрушение эритроцитов приводит к появлению определенных симптомов, связанных с гемолизом, такие как озноб, темная моча и увеличенная селезенка. Некоторые аспекты истории болезни могут указывать на причину гемолиза, например, прием лекарственных средств, побочные эффекты от лекарственных веществ, аутоиммунные заболевания, реакции переливания крови, наличие протеза сердечного клапана, или другие патологии [Чеснокова, Невважай, Моррисон, Бизенкова, с. 170-171].

Хронический гемолиз приводит к повышенной экскреции билирубина в желчные пути, что, в свою очередь, влияет на образование камней в желчном пузыре. По этой же причине происходит непрерывное высвобождение свободного гемоглобина, что ведет к развитию легочной гипертензии (повышенному давлению в малом круге кровообращения); это, в свою очередь, обуславливает обмороки, боли в груди и прогрессирующую одышку. Легочная гипертензия в конечном итоге влечет за собой сердечную

недостаточность правого желудочка, симптомами которой являются периферический отек (накопление жидкости в коже ног) и асцит (накопление жидкости в брюшной полости) [Николаева, с. 35-36].

Причины развития гемолитической анемии могут быть классифицированы в соответствии с локализацией гемолиза, то есть являться внутренними в тех случаях, когда причина связана с самими эритроцитами, либо внешними, когда по отношению к эритроцитам доминируют наружные факторы. Внутренние факторы могут включать проблемы с эритроцитарными белками или окислительным стрессом, тогда как внешние причины включают иммунную атаку и микрососудистые ангиопатии (эритроциты механически повреждаются в кровотоке) [Николаева, с. 37-40].

Внутренние причины

Наследственная гемолитическая анемия может быть обусловлена:

- Дефекты продукции мембран эритроцитов (как при наследственном сфероцитозе и наследственном эллиптоцитозе).
- Нарушения выработки гемоглобина (как при талассемии, серповидноклеточной анемии и врожденной дизэритропоэтической анемии).
- Дефектный метаболизм эритроцитов (как при дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и дефиците пируваткиназы) [Рыбас, с. 36-40].

Внешние причины

Приобретенная гемолитическая анемия может быть вызвана иммуноопосредованными причинами, лекарственными препаратами и другими различными факторами.

- Иммуно-опосредованные причины могут включать транзиторные факторы, как при инфекции *Mycoplasma pneumoniae* (болезнь холодного агглютинина или холодная гемагглютинация), или постоянные факторы, как при аутоиммунных заболеваниях, например, аутоиммунная гемолитическая анемия (сама по себе более распространенная при таких заболеваниях, как системная красная

волчанка, ревматоидный артрит, лимфома Ходжкина и хронический лимфолейкоз).

- Приобретенная гемолитическая анемия также встречается при ожогах и в результате некоторых инфекций (например, малярии).
- Пароксизмальная ночная гемоглобинурия, иногда называемая синдромом Маркиафавы-Микели, является редким, приобретенным, потенциально опасным для жизни заболеванием крови, характеризующимся внутрисосудистой гемолитической анемией, индуцированной комплементом.
- Отравление свинцом в результате воздействия окружающей среды, арсином или стибинном вызывает неиммунную гемолитическую анемию [Sharapova, с. 449-452.].

1.7.2 Механизмы гемолиза

При гемолитической анемии существует два основных механизма гемолиза: внутрисосудистые и внесосудистые.

Внутрисосудистый гемолиз происходит в основном внутри сосудистой сети. В результате содержимое эритроцитов попадает в общий кровоток, что приводит к гемоглобинемии и увеличивает риск последующей гипербилирубинемии [Кривошеина, с. 64].

Внутрисосудистый гемолиз может происходить, когда эритроциты становятся мишенью для аутоантител, что приводит к фиксации комплемента, или в результате повреждения паразитами, такими как *Babesia* [Игамбердиева, Расулов, с. 156].

Внесосудистый гемолиз может происходить в печени, селезенке, костном мозге и лимфатических узлах. В этом случае небольшое количество гемоглобина попадает в плазму крови. Макрофаги ретикулоэндотелиальной системы в этих органах поглощают и разрушают структурно-дефектные эритроциты или те клетки, к которым прикреплены антитела, и высвобождают неконъюгированный билирубин в циркулирующую плазму крови. Обычно

селезенка разрушает слегка аномальные эритроциты или те, которые покрыты антителами типа IgG, в то время как сильно аномальные эритроциты или те, которые покрыты антителами типа IgM, разрушаются в кровотоке или в печени.

Если внесосудистый гемолиз обширен, гемосидерин может откладываться в селезенке, костном мозге, почках, печени и других органах, что приводит к гемосидерозу.

У здорового человека эритроцит живет от 90 до 120 дней и около 1% эритроцитов человека в норме разрушается каждый день. Селезенка (часть ретикуло-эндотелиальной системы) является основным органом, в котором разрушаются старые и поврежденные эритроциты. У здоровых людей распад и удаление эритроцитов из кровотока сопровождается образованием новых эритроцитов в костном мозге [Стародубцева, 235-240].

В условиях, когда скорость разрушения эритроцитов увеличивается, организм компенсирует распад сначала за счет производства большего количества эритроцитов; однако разрушение может превышать скорость их образования в организме, и по этой причине развивается анемия. Билирубин, продукт распада гемоглобина, накапливается в крови, вызывая желтуху.

В целом гемолитическая анемия возникает как модификация жизненного цикла эритроцитов. То есть вместо того, чтобы в конце срока службы утилизироваться в обычном режиме, эритроциты распадаются таким образом, что свободные железосодержащие молекулы попадают в кровь [Dantu, Pusuluri, Ukey, с. 46-50].

При полном отсутствии митохондрий эритроциты полагаются на пентозофосфатный путь (ПФП) для получения материалов, необходимых для уменьшения окислительного повреждения. Любые ограничения (ПФП) могут привести к большей восприимчивости к окислительному повреждению и короткому или ненормальному жизненному циклу. Если клетка не в состоянии сигнализировать ретикулоэндотелиальным фагоцитам путем экстернализации

фосфатидилсерина, она, вероятно, будет лизироваться неконтролируемым образом.

Отличительной особенностью внутрисосудистого гемолиза является выброс содержимого эритроцитов в кровотоки. Метаболизм и выведение продуктов, в основном железосодержащих соединений, способных наносить ущерб в результате реакций Фентона, является одним из важнейших факторов. Свободный гемоглобин может связываться с гаптоглобином, и комплекс выводится из кровотока; таким образом, снижение гаптоглобина может подтвердить диагноз гемолитической анемии. В качестве альтернативы гемоглобин может окислять и высвобождать гемовую группу, которая способна связываться либо с альбумином, либо с гемопексином. В конечном итоге, гем превращается в билирубин и удаляется с калом и мочой. Гемоглобин может выводиться непосредственно почками, что приводит к быстрому выведению свободного гемоглобина, но вызывает постоянную потерю нагруженных гемосидерином почечных канальцевых клеток в течение многих дней [Fontaine, с. 152-154].

1.7.3 Диагностика и методы лечения

Диагноз гемолитической анемии можно заподозрить на основании совокупности симптомов и в значительной мере по степени увеличения доли незрелых эритроцитов (ретикулоцитов) и снижения уровня гаптоглобина, белка, который связывает свободный гемоглобин. Исследование мазка периферической крови и некоторые другие лабораторные исследования могут способствовать постановке диагноза. Симптомы гемолитической анемии включают показатели, которые могут возникать при всех видах анемии, а также специфические последствия гемолиза. При всех типах анемии могут возникать утомляемость, одышка, снижение трудоспособности и в тяжелых случаях бледность кожных покровов. Симптомы, конкретно связанные с гемолизом, включают желтуху и темную мочу из-за наличия гемоглобина (гемоглобинурия). Ограничение утренней гемоглобинурии может указывать

на пароксизмальную ночную гемоглобинурию. Прямое исследование мазка периферической крови под микроскопом может выявить фрагменты эритроцитов, называемые шистоцитами, эритроцитами, которые выглядят как сферы (сфероциты) и / или эритроциты, в которых отсутствуют мелкие частички (клетки укуса). [Barcellini, Giannotta, Fattizzo, с. 585-587]. Повышенное количество вновь образованных эритроцитов (ретикулоцитов) также может быть признаком компенсации анемии костным мозгом. Лабораторные исследования, обычно используемые для исследования гемолитической анемии, включают анализы крови на продукты распада эритроцитов, билирубин и лактатдегидрогеназу, тест на свободный гемоглобин, связывающий белок гаптоглобин, и прямой тест Кумбса для оценки связывания антител с эритроцитами, предполагающий аутоиммунную гемолитическую анемию [Богословская, с.7-8].

Окончательная терапия зависит от причины и степени тяжести гемолитической анемии:

- Симптоматическое лечение может быть проведено путем переливания крови, если есть выраженная анемия. Положительный тест Кумбса является относительным противопоказанием для переливания крови пациенту. При холодной гемолитической анемии преимущество имеет переливание подогретой крови.
- При тяжелой иммунной гемолитической анемии иногда необходима стероидная терапия.
- В случаях резистентности к стероидам можно рассмотреть возможность применения ритуксимаба или добавления иммунодепрессанта (азатиоприн, циклофосфамид).
- Ассоциация метилпреднизолона и внутривенного иммуноглобулина может контролировать гемолиз в острых тяжелых случаях.
- Иногда спленэктомия может быть полезна там, где преобладает внесосудистый гемолиз или наследственный сфероцитоз (т.е. большая часть эритроцитов разрушается в селезенке) [Zanella, Barcellini, с. 1549-1552].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

Забор крови проводился на базе «КБ «РЖД-Медицина» Тюмень» в период с марта по май 2019-2021 года, в весенний период. Далее образцы были доставлены в течение часа на кафедру анатомии и физиологии человека и животных Института биологии для дальнейшей оценки уровня деформируемости эритроцитов и спектрофлуориметрического анализа. Обследовано 116 человек обоего пола (47 мужчин и 69 женщин) в возрасте от 20 до 55 лет. Из них: 30 человек были здоровы, 30 с железодефицитной анемией, 30 с анемией хронического заболевания и 26 с гемолитической анемией (6 из них с холодовой гемагглютинацией).

Забор крови производился натощак с целью уменьшения количества артефактов в спектрах флуоресценции. Также стоит отметить, что кровь пациентов из больницы была доставлена менее чем за два часа на базу биологического факультета, поэтому полученные данные не искажаются из-за необратимых процессов свертывания крови. Кровь должна храниться не более 2 часов. При более длительном хранении происходит снижение функционирования клеток и их последующей гибели.

Техника взятия венозной крови стандартная: положите небольшую подушку под локоть пациента. Рука в нижней трети плеча перетягивается ремнем и просит пациента сжать кулак. Затем кожу в области прокола вены (на локтевом сгибе) обрабатывают спиртом и выполняют прокол. Количество крови, необходимое для анализа, собирается с помощью шприца или, опуская руку пациента, просто вытягивает кровь через иглу в пробирку. Затем жгут удаляется, игла удаляется из вены, и пациента просят согнуть руку в локте, предварительно поместив вместо прокола ватный тампон, смоченный в спирте.

Люди, относящиеся к категории «здоровые», также были набраны из числа доставленных образцов. Точность диагноза и общее состояние

пациентов с анемиями, и здоровых людей были подтверждены сотрудниками РЖД-больницы (биохимические показатели всех исследованных образцов и изучение истории болезни каждого пациента).

Для проведения сравнительного анализа полученных данных все пациенты были разделены на 4 группы:

- 1) Первую группу составили пациенты с ЖДА;
- 2) Вторую группу пациенты с АХЗ;
- 3) Третью группу составили пациенты с ГА;
- 4) И последняя четвертая группа — это контроль, то есть люди с нормальным анализом крови.

Исследование проводилось следующим образом: 100 мкл цельной крови помещали в 3 мл 20% раствора фиколла-400. Далее эту суспензию помещали с помощью катетера в зазор между вращающейся и неподвижной пластинами ($t = 36,6^{\circ} \text{C}$). Изменяя скорость вращения нижней пластины, мы, основываясь на законе вязкого трения Ньютона, моделировали различные условия деформирования, возникающие в зазоре между плитами. Эритроциты под действием деформирующего эффекта вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении лазерного луча через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде.

Дифракционная картина отражает форму диффузоров, подвешенных в вязкой среде, и форма зависит от степени напряжения деформирующего эффекта.

2.2. Методы исследования

В данной работе использовано 2 метода исследования крови больных железодефицитной анемией и контрольной группой здоровых людей:

- I. Лазерная дифрактометрия эритроцитов;
- II. Спектрофлуорометрия цельной крови.

2.2.1. Лазерная дифрактометрия эритроцитов

Способность эритроцитов к деформируемости определяется внутренней вязкостью, вязкоупругими свойствами мембраны и отношением объема клетки к ее площади. Чем больше отношение площади поверхности эритроцита к его объему, тем более выражены его деформируемые свойства. Эритроциты модифицированной формы характеризуются повышенной устойчивостью к деформируемости.

Другим определяющим фактором деформируемости эритроцитов являются вязкопластические свойства мембраны. Эластичные свойства мембраны определяют ее устойчивость к деформируемости, а вязкостные свойства характеризуют устойчивость эритроцитов к деформируемости. Вязкоупругие свойства мембраны определяются, прежде всего, состоянием мембранного скелета и его взаимодействием с другими структурными элементами клетки [Артюхов, с. 148].

При прохождении эритроцитов через микроциркуляторный кровоток им приходится преодолевать деформирующий эффект, возникающий в результате взаимодействия со стенками кровеносных сосудов и друг с другом. Наличие градиентов скорости также оказывает деформирующее действие на эритроциты. Свойство эритроцита как гиперэластичного твердого тела объясняет возможность успешного преодоления этих эффектов при прохождении через микроциркуляторное русло. Примером ситуации, когда эритроцит находится в сдвиговом потоке, является ячейка Куэтта (рис. 3) с суспензией эритроцитов, подвешенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами, подвешенной в вязкой среде с фиксированной вязкостью (20 сантипуаз) [Maeda, Nakajima, Izumida, с. 395-405].

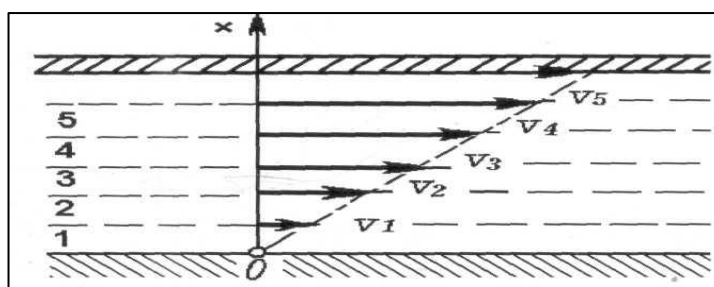


Рис. 4. Ячейка Куэтта с помещенной между подвижной и неподвижной прозрачными пластинами суспензии эритроцитов.

Эритроциты под действием деформирующего эффекта вытягиваются, о чем можно судить, анализируя дифракционную картину, полученную при прохождении лазерного луча через суспензию эритроцитов, взвешенных в вязкой среде. Дифракционная картина имеет вид системы concentric rings. Расстояние между кольцами связано со средним диаметром красных кровяных клеток, которые характеризуют эту популяцию. Эта зависимость обратно пропорциональна: чем меньше измеренный диаметр эритроцитов, тем больше диаметр дифракционного кольца. Дифракционная картина отражает форму диффузоров, подвешенных в вязкой среде, а форма, в свою очередь, зависит от степени напряжения деформирующего эффекта (рис.4.). Количество эритроцитов не влияет на формирование дифракционной картины.

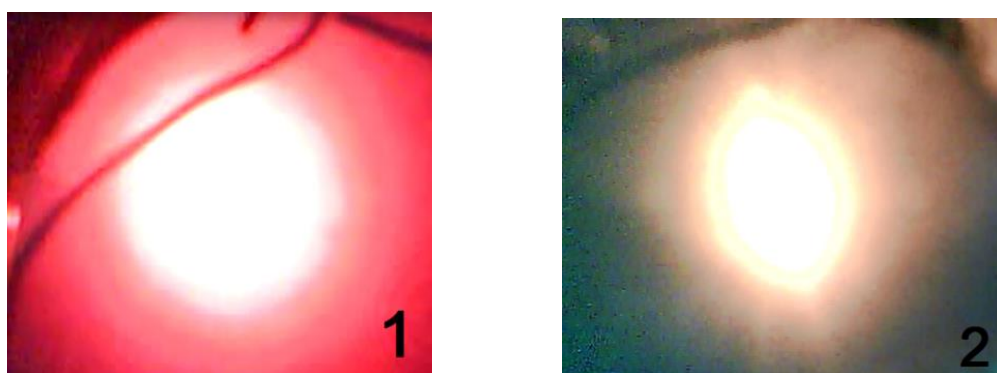


Рис. 5. Реальное изображение дифракционной картины, получаемое при прохождении луча лазера через слой эритроцитов и выводимое на монитор для программного анализа: 1-дифракционная картина от покоящихся

эритроцитов; 2-дифракционная картина от эритроцитов, находящихся в сдвиговом потоке.

Описание установки.

В данной работе способность эритроцитов к деформации оценивается при помощи устройства для оценки деформабильность эритроцитов (Рис.5).

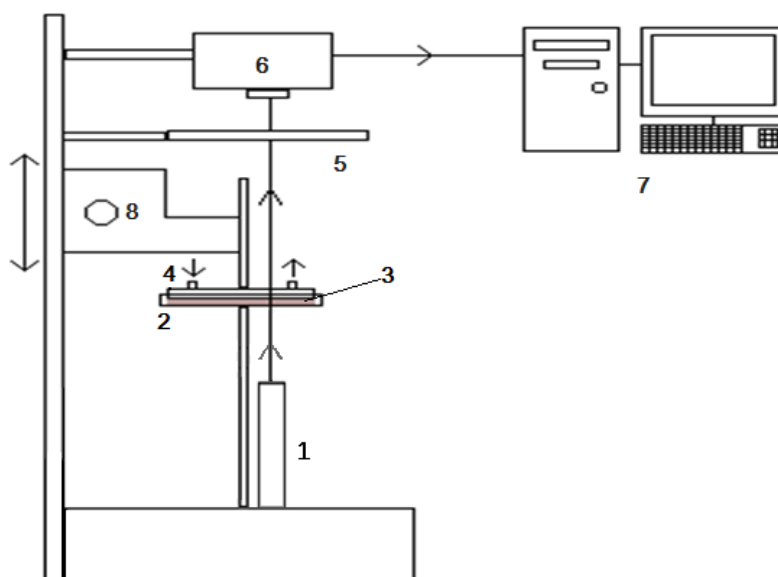


Рис.6. Блок-схема устройства для оценки деформабильности эритроцитов (патент РФ №2236009): 1. Полупроводниковый, аналогичный гелий-неоновому ($\lambda \approx 632,8$ нм) лазер; 2. Термостабилизированная стационарная чашка Петри; 3. Проба крови; 4. Термостабилизированная вращающаяся чашка Петри; 5. Экран; 6. Видеокамера; 7. Компьютер; 8. Винт регулировки размера зазора.

Диаметр эритроцита примерно в 2 раза больше просвета капилляра. Из-за этого прохождение эритроцита через микроциркуляторное русло возможно только путем изменения его объемной конфигурации. Расчеты показывают, что если бы эритроцит не был способен к деформации, то кровь с 65% Ht превратилась бы в плотное однородное образование, и в периферических частях кровеносной системы произошла бы полная остановка кровотока. Однако благодаря способности эритроцитов изменять свою форму и

адаптироваться к условиям внешней среды, кровообращение не прекращается даже при Ht 95 -100%.

Тонкой теории механизма деформации эритроцитов нет. По-видимому, этот механизм основан на общих принципах переноса золя в гель. Предполагается, что деформация эритроцитов является энергетически зависимым процессом. Возможно, в этом принимает активное участие гемоглобин. Известно, что содержание гемоглобина в эритроците снижается при некоторых наследственных заболеваниях крови (серповидноклеточная анемия), после операций в условиях искусственного кровообращения. В то же время меняется форма эритроцитов и их пластичность. Наблюдается повышенная вязкость крови, которая не соответствует низкому гематокриту.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Одним из показателей (или детерминант) реологических свойств является способность эритроцитов к упругой деформации, что позволяет им выполнять свою основную функцию - доставку необходимых веществ для жизнедеятельности организма в целом, включая сосудистую систему капилляров, диаметр которых значительно меньше диаметра самих эритроцитов. Эта способность эритроцитов называется деформируемостью.

Деформируемость обусловлена упругими свойствами мембран этих клеток и наличием специальной белковой структуры, которая выравнивает внутреннюю сторону мембраны.

Сам процесс упругой деформации осуществляется за счет силы сдвиговых напряжений со стороны смещающихся слоев плазмы крови. После прекращения воздействия деформирующей силы эритроциты восстанавливают свои прежние размеры и форму. Таким образом, они обладают свойствами твердого упругого тела.

Кроме того, деформируемость эритроцитов определяется внутренней вязкостью, вязкоупругими свойствами мембраны и отношением объема ячейки к ее площади. Упругие свойства мембраны определяют ее устойчивость к необратимой деформации, а вязкостные свойства характеризуют сопротивление скорости деформации.

Скорость изменения деформируемости эритроцитов является одной из наиболее лабильных характеристик крови, которая чувствительно реагирует на изменения практически любого метаболического процесса в эритроцитах и во всем организме.

Также деформируемость эритроцитов зависит от воздействия различных факторов и ряда патологий. В нашей работе данными факторами являются анемии разных типов.

Важным моментом при проведении исследований деформируемости эритроцитов является объективная оценка этого показателя. Метод, позволяющий оперативно и информативно оценить обратимую

деформируемость эритроцитов, основан на лазерной дифрактометрии. Этот метод максимально приближен к ситуации *in vivo*.

Как показали результаты нашего исследования, у пациентов с тем или иным типом анемии деформируемость эритроцитов значительно снижалась по сравнению с контрольными показателями, что указывало на изменение реологических свойств самого эритроцита.

Индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига (порядка 15 Н/м²) для пациентов с железodefицитной анемией (ЖДА) составляет $0,16 \pm 0,02$

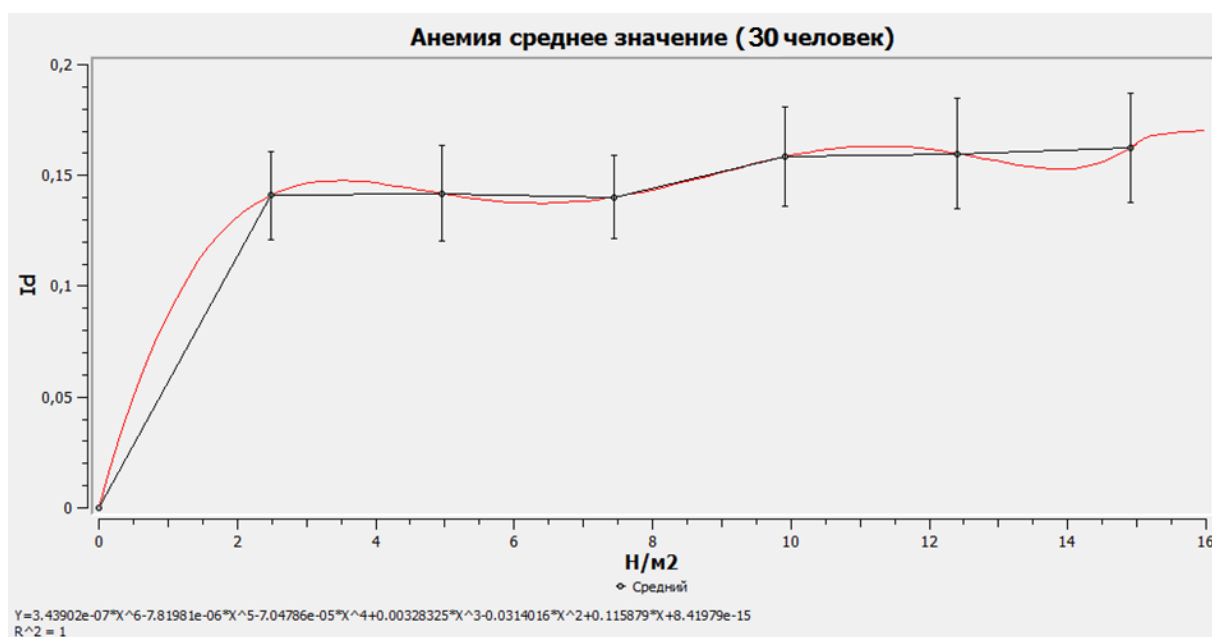


Рис.7. Изменение индекса деформабильности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с железodefицитной анемией

Для пациентов с анемией хронического заболевания (АХЗ) индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига (порядка 15 Н/м²) составляет $0,14 \pm 0,02$

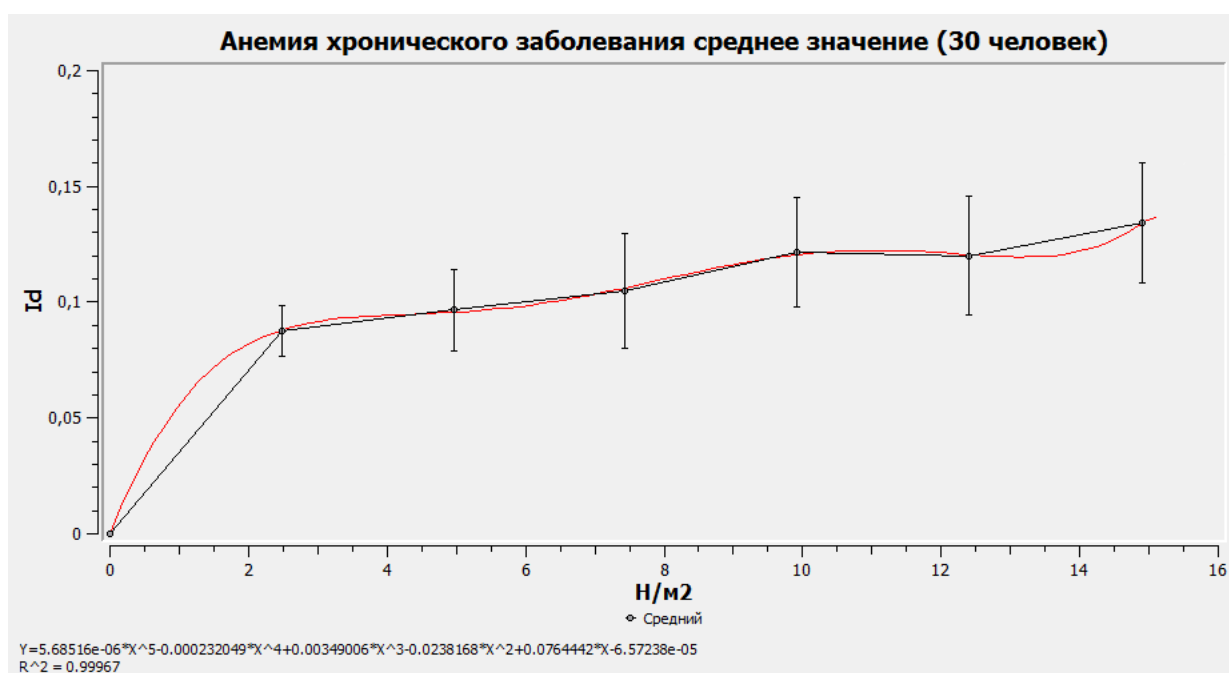


Рис.8. Изменение индекса деформабильности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с анемией хронического заболевания

Для пациентов с гемолитической анемией, обусловленной дефектами клеточной мембраны эритроцитов, индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига (порядка 15 Н/м²) составляет 0.12±0,02

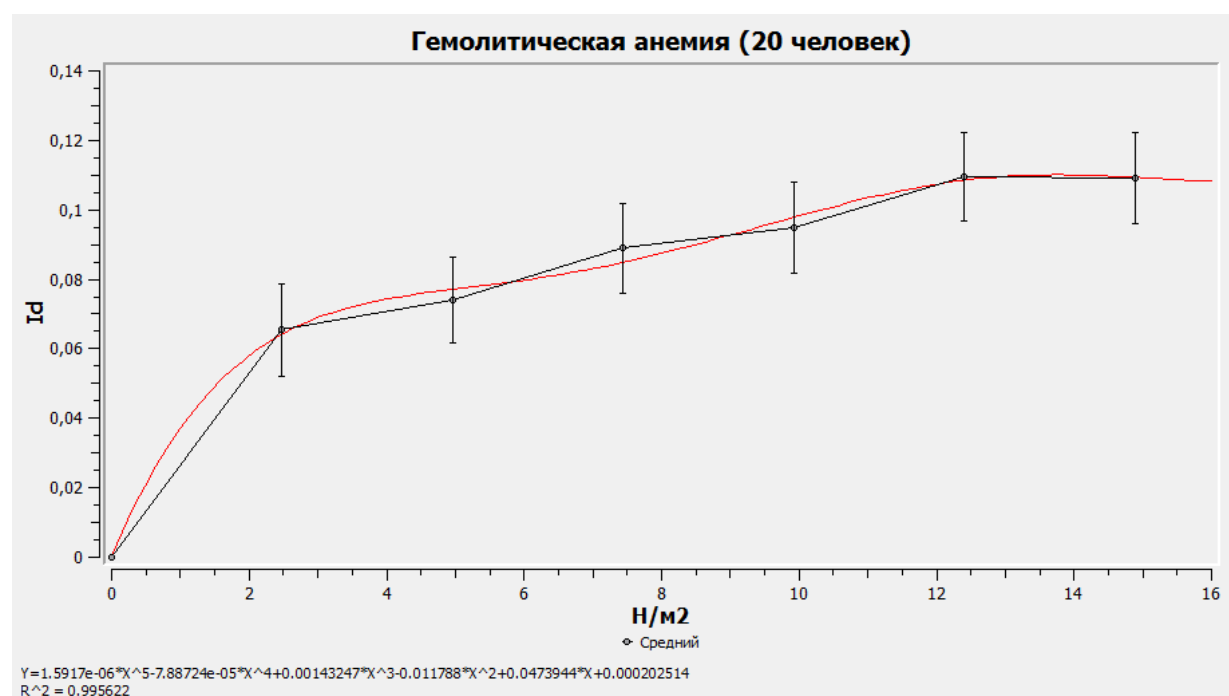


Рис.9. Изменение индекса деформабильности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с гемолитической анемией

Помимо пациентов с гемолитической анемией мы произвели анализ крови 6 пациентов с холодовой гемагглютининовой болезнью. Индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига для данных пациентов составил $0,19 \pm 0,02$.

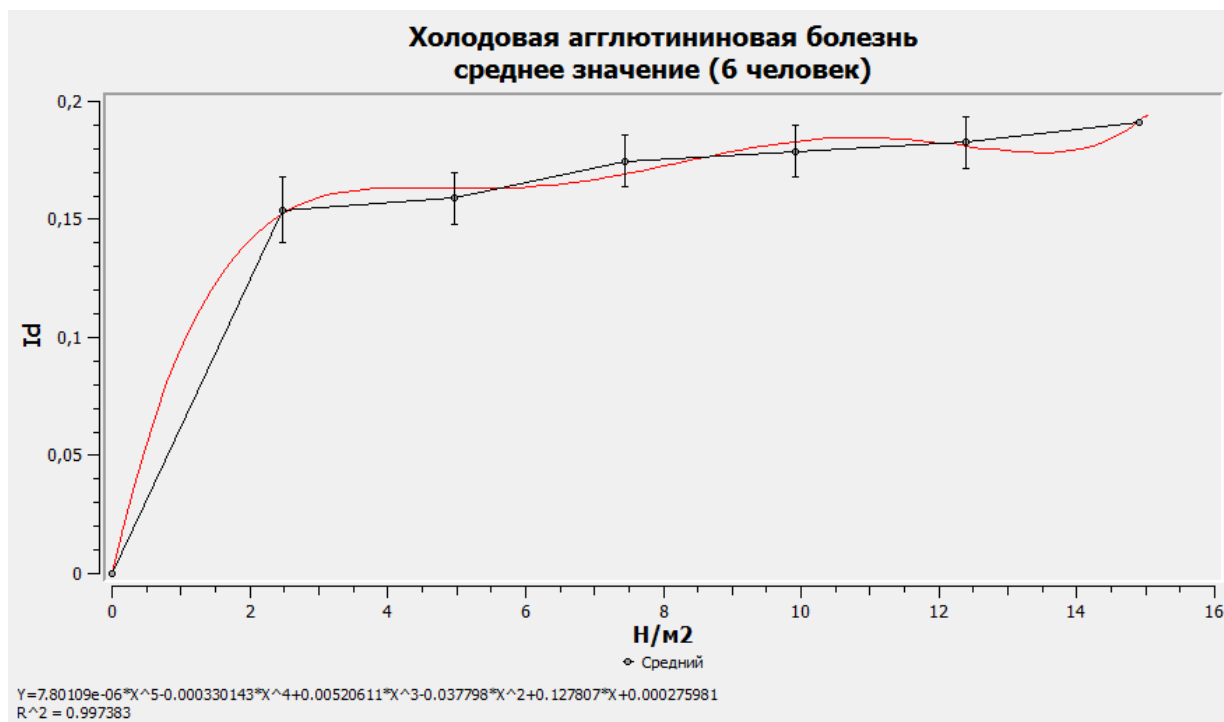


Рис.10. Изменение индекса деформабильности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для пациентов с холодовой гемагглютининовой болезнью

В норме индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига для здоровых людей составляет $0,27 \pm 0,02$

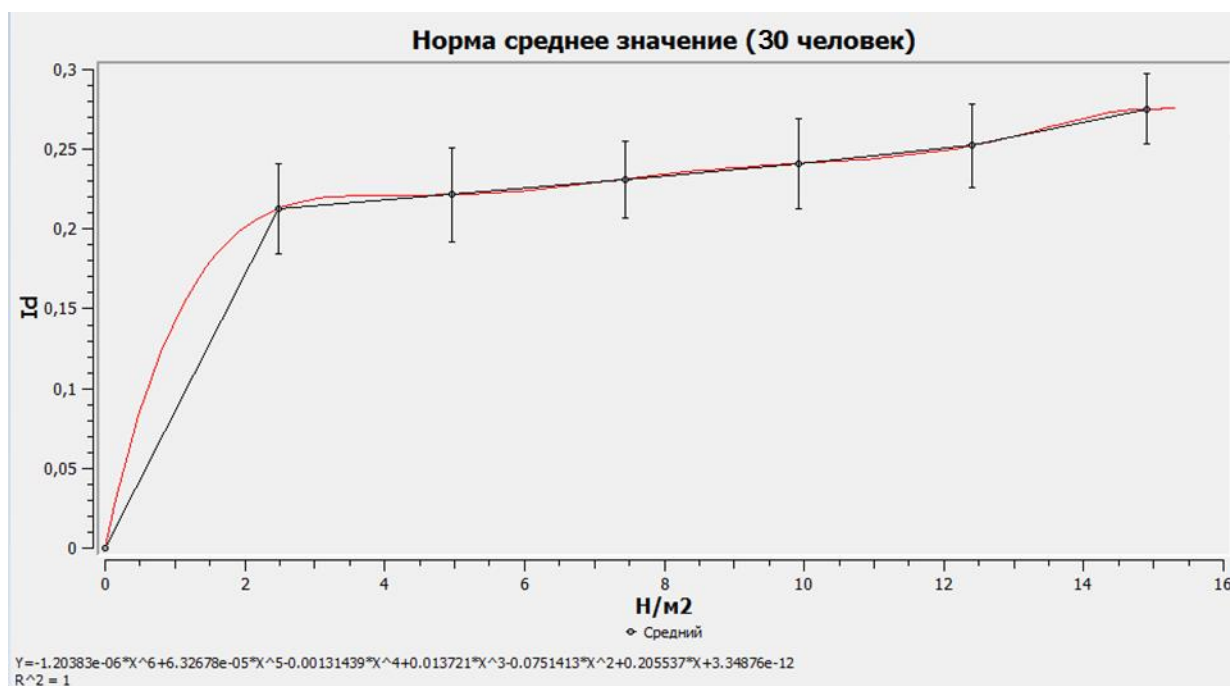


Рис.11. Изменение индекса деформабильности эритроцитов в зависимости от усилия сдвига для здоровых людей

Как показали результаты нашего исследования, у больных с анемиями различного типа деформабильность эритроцитов достоверно снижалась по сравнению с контрольными показателями, что свидетельствовало об изменении микрореологии самого эритроцита. Деформабильность эритроцитов – величина, обратная текучести, свидетельствующая о потере эритроцитами способности менять форму при прохождении через капилляры микроциркуляторного русла. Для обеспечения газотранспортной функции эритроциты должны свободно преодолевать капиллярное пространство.

Способность эритроцитов противостоять такому воздействию, т.е. есть реологические свойства клеток, заложены в особенностях структурной организации мембраны. Снижение уровня деформабильности эритроцитов у пациентов с ЖДА является следствием снижения гематокрита.

Гематокрит отражает не только количество эритроцитов, но и их размер. Если размер эритроцитов уменьшается (как при железодефицитной анемии, т.к. происходит нарушение созревания эритроцитов в красном костном мозге),

гематокрит тоже будет снижаться. Следовательно, снижается вязкость самой крови, от которой напрямую зависит показатель деформабильности эритроцитов.

АХЗ имеет сложный многокомпонентный генез, в основе которого лежат нарушения обмена железа, повреждение пролиферации и дифференцировки клеток эритропоэза, уменьшение синтеза и биологической активности эритропоэтина.

Отмечено, что у пациентов с гемолитической анемией происходит максимальное снижение уровня деформабильности эритроцитов. Минимальные отклонения от показателей контроля выявлены у пациентов с холодовой агглютининовой болезнью.

Снижение уровня деформабильности эритроцитов у пациентов с ГА объясняется диспропорциональным уменьшением поверхности клеточной мембраны эритроцитов и количества внутриклеточного содержимого с учетом утраты белков, связанных с клеточной мембраной. Уменьшение клеточной поверхности эритроцитов сопровождается нарушением их пластичности, которая необходима для прохождения микроциркуляторного русла селезенки, что в свою очередь, приводит к внутриселезеночному гемолизу.

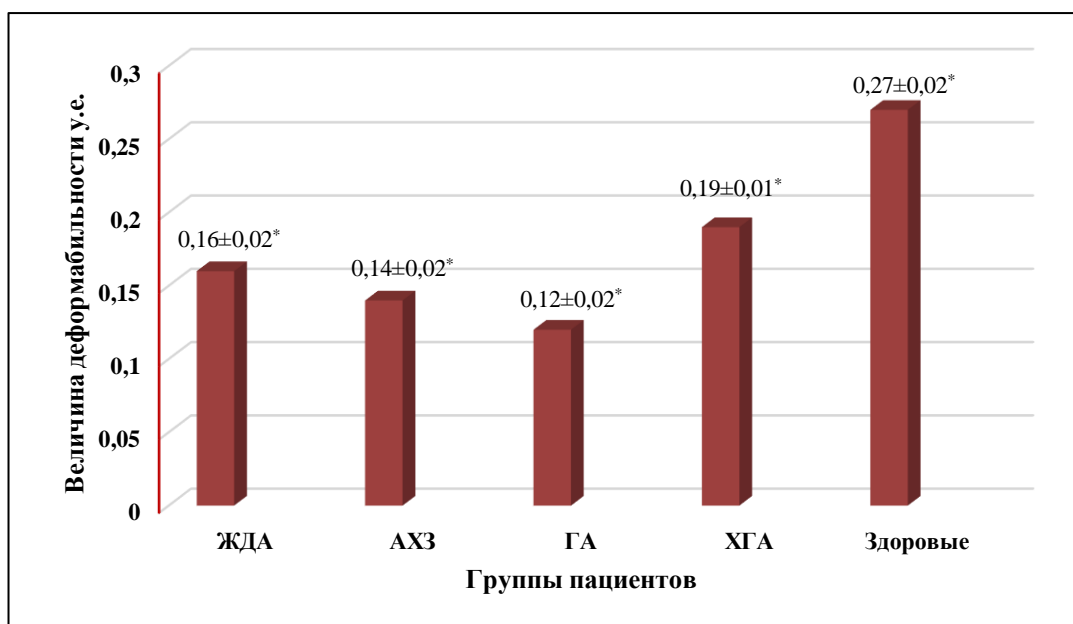


Рис.12. Сравнение среднего значения уровня деформильности эритроцитов у пациентов различных клинических групп.

Примечание: * - различие по сравнению со значениями параметра крови здоровых людей статистически достоверно на уровне $P < 0,05$

Дополнительно мы измерили интенсивность свечения цельной крови в реакции флуоресцеин-зависимой флуоресценции. Диапазон излучения для больных ЖДА находился в пределах от 493 до 525 нм. Для здоровых людей был характерен диапазон от 573 до 585 нм.

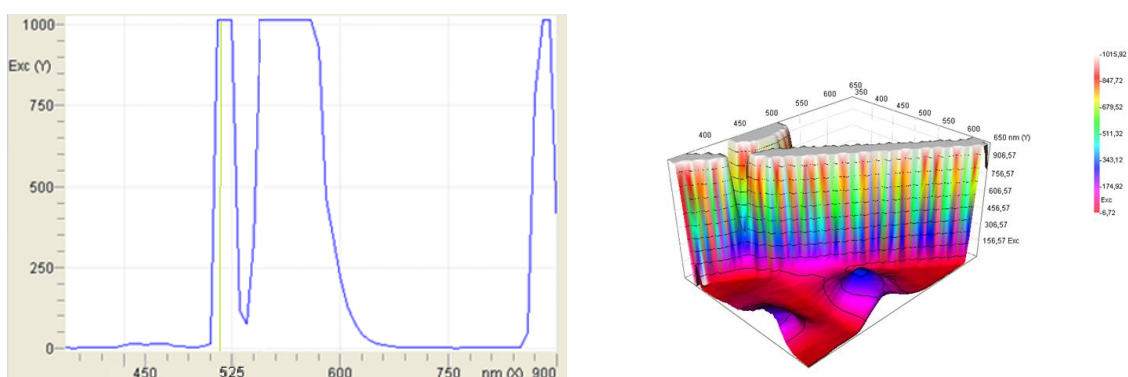


Рис.13. Значения возрастания интенсивности свечения индуцированной флуоресцеин-зависимой флуоресценции цельной крови пациентов с железодефицитной анемией (ЖДА)

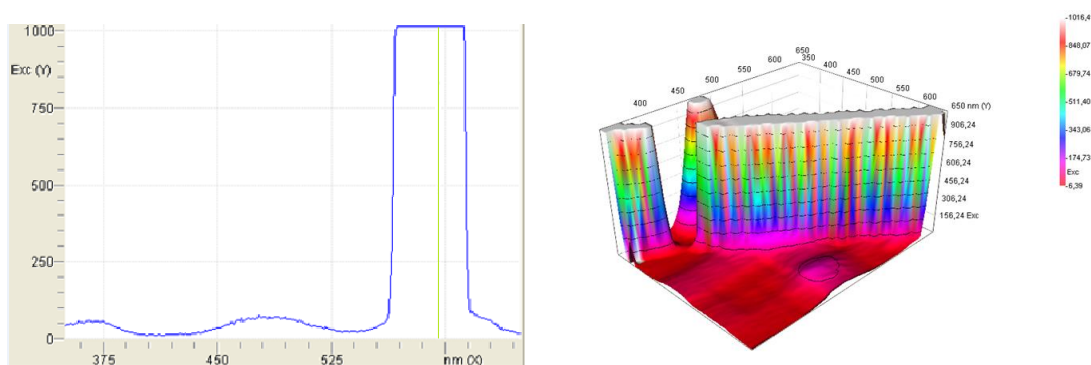


Рис.14. Значения возрастания интенсивности свечения индуцированной флуоресцеин-зависимой флуоресценции цельной крови здоровых людей

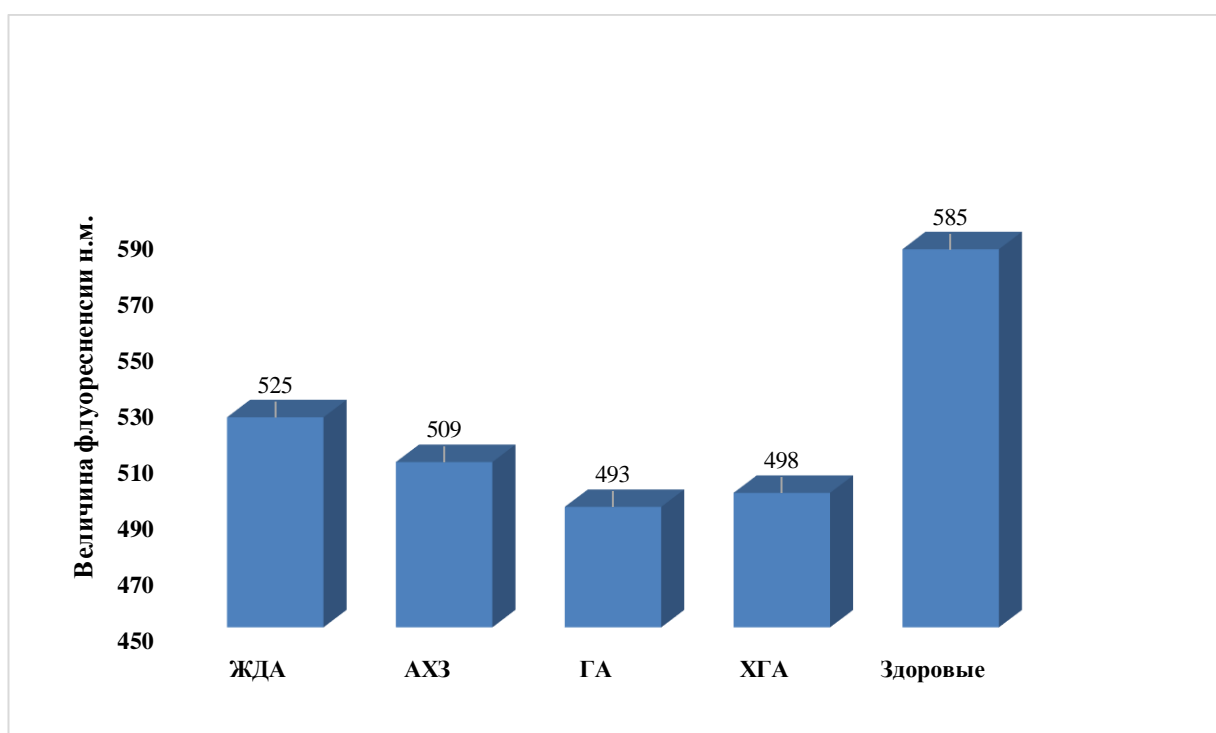


Рис.15. Максимальные значения диапазонов спектропоглощения для пациентов различных клинических групп

Минимальный диапазон величины спектропоглощения выявлен у пациентов с гемолитической анемией, который составил от 451 до 493 нм.

Таблица 1.

Сравнительные параметры деформабильности и флуоресценции
цельной крови больных ЖДА и здоровых людей

Группа	Индекс деформабильности эритроцитов на максимальном усилии сдвига	Уровень флуоресцеин-зависимой флуоресценции, нм
Здоровые люди (n=30)	0,27±0,02*	573 – 585
Пациенты с ЖДА (n=30)	0,16±0,02*	493 – 525
Пациенты с АХЗ (n=30)	0,14±0,02*	497 – 509
Пациенты с ГА (n=20)	0,12±0,02*	451 – 493
Пациенты с ХГА (n=6)	0,19±0,01*	453 – 498

Примечание: * - различие по сравнению со значениями параметра крови здоровых людей статистически достоверно на уровне $P < 0,05$

В дальнейшем методы лазерной дифрактометрии и флуоресцентной спектроскопии эритроцитов будут использоваться для более глубокого изучения реологических свойств крови, которые отражают функциональное состояние организма в целом. Это позволит расширить и оптимизировать процесс исследования.

Также эти методы могут способствовать более правильной оценке изменчивости реологических характеристик при различных патологиях, более оптимально влиять на формирование количественных характеристик реологических свойств и в то же время служить источником новых знаний о морфофункциональном состоянии эритрона.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена прямая зависимость в изменениях реологических показателей крови у пациентов с анемией. Деформабильность эритроцитов (на максимальном усилии сдвига $\approx 15 \text{ Н/м}^2$) у всех пациентов с анемиями того или иного типа достоверно снизилась.
2. Самый минимальный показатель деформабильности эритроцитов был выявлен у пациентов с гемолитической анемией и составил $0,12 \pm 0,02$ в сравнении с контрольной группой $0,27 \pm 0,02$. Однако, у пациентов с холодовой гемаглютининовой болезнью индекс деформабильности эритроцитов составил $0,19 \pm 0,01^*$, что также ниже нормы, но гораздо выше, чем у пациентов с другими типами анемий.
3. Выявлены изменения в мембранной структуре эритроцитов у пациентов с анемиями различного генезе, влияющие на их деформабильность. Наиболее низкие показатели во всех опытах наблюдались у пациентов с гемолитической анемией. Это может быть связано с диспропорциональным уменьшением поверхности клеточной мембраны эритроцитов и количества внутриклеточного содержимого с учетом утраты белков, связанных с клеточной мембраной.
4. В крови больных с анемией максимум интенсивности флуоресценции смещается в более коротковолновую область спектра в диапазон от 493 до 525 нм, в сравнении с 573 – 585 нм для здоровых людей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стуклов Н.И., Альпидовский В.К., Огурцов П.П. Анемии. Клиника, диагностика и лечение. Москва: Мир, 2013. 264 с.
2. Всемирная Организация Здравоохранения: официальный сайт. Москва. URL: <https://www.who.int/ru> (дата обращения: 04.04.21).
3. Изменение реологических показателей крови при некоторых онкопатологиях / А.В. Белкин [и др.] // Национальная ассоциация ученых. 2015. №9. С. 89-91.
4. Сараева Н.О. Гематология. Иркутск: ИГМУ, 2015. 244 с.
5. Сторожок С. А. Завершение процессов самосборки белкового цитоскелета определяет момент выхода ретикулоцитов из костного мозга в кровь. // Тезисы докл. 2-го междунар.симп / Рязань: Патология эритрона и метаболизм железа, 1995. С. 115-116.
6. Гайворонский И.В., Ничипорук Г.И., Гайворонский А.И. Анатомия и физиология человека. Москва: ИЦ Академия, 2013. 496 с.
7. Воробьева Е.А., Сафьянникова Е.Б., Губарь А.В. Анатомия и физиология. Москва: Альянс, 2015. 432 с.
8. Солодков А.С., Сологуб Е.Б. Физиология человека. Общая. Спортивная. Возрастная. Москва: Сов. спорт, 2012. 620 с.
9. Швырев А.А. Анатомия и физиология человека с основами общей патологии. Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. 411 с.
10. Агаджанян Н.А., Смирнов В.М. Нормальная физиология. Москва: МИА, 2012. 576 с.
11. Лысов П.К., Сапин М.Р. Анатомия (с основами спортивной морфологии) Москва: Академия, 2010. 256 с.
12. Авива П., Сэбин К. Наглядная медицинская статистика: пер. с англ. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 168 с.
13. Блинов В.А., Калюжный И.И. Основы клинической биохимии человека и животных. Саратов: Наука, 2011. 248 с.

14. Федюкович Н.И. Анатомия и физиология человека. Ростов-на-Дону: Феникс, 2013. 501 с.
15. Щербаков В.Г. Биохимия. Санкт-Петербург: ГИОРД, 2009. 472 с.
16. Влияние жирных кислот на связывающие центры альбумина сыворотки крови человека / Г.Е. Добрецов [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2012. №3. С. 300-309.
17. Modification of human serum albumin under induced oxidation / M.G. Gorobets [et al.] // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2017. №1. P. 231-235.
18. Связывающая способность альбумина сыворотки крови при хирургическом лечении больных туберкулезом органов дыхания / А.М. Рыжов, Д.А. Иванова, А.А. Воробьев // Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2016. №1. С. 84-91.
19. Болдырева А.А., Кяйвярйнен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология. Петрозаводск: Кар НЦ РАН, 2006. 186с.
20. Band 3 deficiency as a cause of hereditary spherocytosis / H. Wada, H Nakanishi // Rinsho Ketsueki. 2015. №4. P. 380-383.
21. Defining new mechanistic roles for α II spectrin in cardiac function / E.R. Lubbers, P.J. Mohler // J Biol Chem. 2019. №2. P.121-124.
22. Spectrin folding versus unfolding reactions and RBC membrane stiffness / Q. Zhu, R.J. Asaro // J Biol Chem. 2009. №9. P. 229–245.
23. Myosin IIА interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability / A.S. Smith, J. Wan, V.M. Fowler // Proc Natl Acad Sci USA. 2018. №5. P. 377-385.
24. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологиях разного генеза / М.К. Боровская [и др.] // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 3. С. 334-354.
25. Multiscale (RE)modeling of lipid bilayer membranes / A. Grafmuller // Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly. 2019. №3. P. 39-104.
26. Alterations to plasma membrane lipid contents affect the biophysical properties of erythrocytes from individuals with hypertension / V. Martinez-

- Vieyra, M. Rodriguez-Varela, D. Cerecedo // *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2019. №5. P. 6424-6432.
27. Флуоресцентный спектральный анализ крови женщин, больных раком молочной железы, и его интеграция в реологические характеристики крови / А.В. Белкин // *Вестник Тюменского государственного университета, экология и природопользование.* 2014. №6. С. 108-113.
28. Артюхов В.Г. *Биофизика.* Москва: Академический проект, 2009. 294 с.
29. Справочник Биофизики России официальный сайт. Москва. URL: <http://www.library.biophys.msu.ru> (дата обращения: 15.04.19).
30. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Козлова Е.К. *Физика и биофизика.* Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 472 с.
31. Decreased deformability of red cells in refractory anemia and the abnormality of the membraneskeleton / N. Maeda, T. Nakajima, Y. Izumida // *Biorheology.* 2014. №3. P. 395-405.
32. Самойлов В.О. *Медицинская биофизика.* Санкт-Петербург: СпецЛит, 2013. 591 с.
33. Рубин А.Б. *Биофизика.* Москва: Московский университет, 2013. 464 с.
34. Векшин Н.Л. *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров.* Москва: Фотон век, 2014. 188 с.
35. Advances in chemiluminescence and electrogenerated chemiluminescence based on silicon nanomaterials / M. Sun, Y. Su, Y. Ly // *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence.* 2020. №7. P. 978-988.
36. Пермяков Е. А. *Метод собственной люминесценции белка.* – Москва: Наука, 2003. 189 с.
37. Свободнорадикальное окисление: взгляд патофизиолога / Л.И. Колесникова, М.А. Даренская, С.И. Колесников // *Бюллетень сибирской медицины.* 2017. №16. С. 16-29.
38. Попова И.Е. *Изучение структурных свойств эритроцитов крови новорожденных при оксидативном стрессе, вызванном гипоксией:*

- специальность: 03.00.02 Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук
Воронеж, 2007. 250 с.
39. Molecular basis for optical clearing of collagenous tissues / J.M. Hirshburg, K.M. Ravikumar // J Biomed Opt. 2010. №7. P. 320-337.
 40. Intrinsic fluorescence of intrinsically disordered proteins / P. Neyroz, S. Ciurli // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2012. №8. P. 435-440.
 41. Шулутко Б.И., Макаренко С.В. Стандарты диагностики и лечения внутренних болезней. Санкт-Петербург: Элби-СПб, 2009. 704 с.
 42. Анемии: дифференциально-диагностические аспекты / Л.А. Смирнова // Медицинские новости. 2013. №2. С. 14-19.
 43. Iron deficiency anemia coexists with cancer related anemia and adversely impacts quality of life / M. Nairz, I. Theurl, G. Weiss, D. Wolf // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2016. №13. P. 411-423.
 44. Анемия в практике врача-терапевта: новый взгляд на старую проблему / В.Н. Ларина // Русский медицинский журнал. 2019. №12. С. 44-50.
 45. Всемирная Организация Здравоохранения: официальный сайт. Москва. URL: <https://www.who.int/ru> (дата обращения: 14.05.21).
 46. Бокарев И.Н., Немчинов Е.Н., Кондратьева Т.Б. Анемический синдром. Москва: Практическая медицина, 2009. 128 с.
 47. Алексеев Н. А. Анемии. Москва: Наука, 2009. 512 с.
 48. Железодефицитные состояния и железодефицитная анемия / Н.А. Андреичев, Л.В. Балеева // Вестник современной клинической медицины. 2009. №3. С. 60-66.
 49. Верткин А.Л. Анемия. Руководство для практических врачей. Москва: Эксмо, 2014. 510 с.
 50. Огороков А.Н. Диагностика болезней внутренних органов. Диагностика болезней системы крови. Москва: Мед. Лит, 2010. 512 с.
 51. Демидова А.В. Анемии. Москва: МЕДпрессинформ, 2016. 64 с.
 52. Воробьев П.А. Анемический синдром в клинической практике. Москва: Ньюдиамед, 2010. 168 с.

53. Anemia in chronic kidney disease / M.A. Atkinson, B.A. Warady // *Pediatric Nephrology*. 2018. №2. P. 227-238.
54. Soluble transferrin receptors in the differential diagnosis of hypochromic anemia / G.S. Surzhikova, S.A. Klochkova-Abeliants // *Polytrauma*. 2013. №3. P. 62-65.
55. Анемия хронических заболеваний / П.А. Кулеш, А.А. Бегаева // *Евразийское научное объединение*. 2019. №11-3. С. 183-187.
56. Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases / E. Poggiali [et al.] // *Eur J Intern Med*. 2014. №25. P. 12-17.
57. Hcpidin and iron homeostasis / T. Ganz, E. Nemeth // *Biochim Biophys Acta*. 2012. №9. P. 34-43.
58. Патогенетические особенности развития анемии хронических заболеваний у больных со злокачественными новообразованиями и ревматической патологией / В.Т. Сахин [и др.] // *Онкогематология*. 2020. №4. С. 82-90.
59. Роль гепсидина в развитии анемии у больных ревматоидным артритом / Е.А. Глушко [и др.] // *Научно-практическая ревматология*. 2012. №3. С. 52.
60. Особенности формирования анемии хронических заболеваний у пациентов с артропатиями / А.Ф. Хасанова, Э.Э. Ахмедзянова // *Материалы 52-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых*. 2018. №2. С. 270.
61. Современные представления о патогенезе и диагностике анемии хронических заболеваний / В.С. Дубов [и др.] // *Научный альманах*. 2018. №12-2. С. 82-87.
62. Perspective observational study of anaemia management in cancer patients – results from the German Cancer Anaemia Registry / T.A. Steinmetz [et al.] // *Eur J Cancer Care*. 2011. №4. P. 493-502.

63. Аутоиммунные гемолитические анемии: механизмы развития / У.Н. Нуриддинова, А. Жумабаев // Журнал теоретической и клинической медицины. 2016. №4. С. 117-119.
64. Приобретенные гемолитические анемии. Этиология и патогенез, гематологическая характеристика / Н.П. Чеснокова, Т.А. Невважай, В.В. Моррисон, М.Н. Бизенкова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. №6. С. 167-171.
65. Причины возникновения и методы обнаружения гемолитической анемии, вызванной лекарственными препаратами / Л.Л. Николаева [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. 2014. №2. С. 35-40.
66. Аутоиммунная гемолитическая анемия: клиническая лекция / А.В. Рыбас // Вестник молодого ученого. 2016. №4. С. 36-40.
67. Hemolytic anemia and lymphadenopathy / S.O. Sharapova // Pediatric immunology: a case-based collection with MCQS. 2019. P. 449-452.
68. Семейный случай наследственной гемолитической анемии вследствие носительства аномального нестабильного гемоглобина с низкой аффинностью к кислороду (Hb Cheverly) / Е.Л. Кривошеина [и др.] // Вопросы гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2019. №3. С. 62-69.
69. Иммуностимулирующие и гемостимулирующие свойства растительных средств при экспериментальной гемолитической анемии / П.К. Игамбердиева, Ф.Х. Расулов // Medicus. 2016. №9. С. 155-159.
70. Физико-механические образы поверхности эритроцитов при наследственных гемолитических анемиях / М.Н. Стародубцева [и др.] // Методологические аспекты сканирующей зондовой микроскопии. 2018. №9. С. 235-240.
71. Drug induced hemolytic anemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in malaria / P. Dantu, S. Pusuluri, U.U. Ukey // International Journal of Basic and Applied Medical Sciences. 2013. №3. P. 46-50.

72. Role of complement in patients with autoimmune hemolytic anemia and platelet transfusion refractoriness / M.J. Fontaine // *Transfusion Clinique et Biologique*. 2019. №3. P. 152-154.
73. Autoimmune hemolytic anemia in adults: primary risk factors and diagnostic procedures / W. Barcellini, J. Giannotta, B. Fattizzo // *Expert Review of Hematology*. 2020. №6. P. 585-597.
74. Применение наночастиц железа в профилактике экспериментальной гемолитической анемии / О.А. Богословская [и др.] // *Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке*. 2014. №3. С. 7-8.
75. Treatment of autoimmune hemolytic anemias / A. Zanella, W. Barcellini // *Haematologica*. 2014. №9. P. 1547-1554.