

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И  
МОЛОДЕЖИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ  
"КРЫМСКАЯ ГИМНАЗИЯ-ИНТЕРНАТ ДЛЯ ОДАРЕННЫХ ДЕТЕЙ"  
РЕГИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ВЫЯВЛЕНИЯ И ПОДДЕРЖКИ ОДАРЕННЫХ  
ДЕТЕЙ В РЕСПУБЛИКЕ КРЫМ "ИМПУЛЬС"

**ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ КРОВИ  
ДЛЯ РАННЕ ДИАГНОСТИКИ ОСЛОЖНЕНИЙ  
У ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА**

Работу выполнила:

Кушицкая Мария  
ученица 9 класса  
Региональный центр выявления и  
поддержки одаренных детей  
в Республике Крым "Импульс"

Научный руководитель:

Лебедева Ольга Дмитриевна,  
доцент кафедры педиатрии  
Ордена Трудового Красного Знамени  
Медицинский институт  
имени С.И. Георгиевского

Симферополь

2024

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Основная часть	
1. Обзор литературы:	
1.1. Сахарный диабету детей в мире и в Республике Крым. Осложнения сахарного диабета .....	7
1.2. Характеристика липидного обмена. Роль печени в нарушении жирового обмена.....	8
1.3. Теория фрактального роста и применение ее в биологических средах.....	9
2. Материалы и методы исследования.....	11
2.1. Биохимический профиль группы исследования.....	12
2.2. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете. Группа сравнения.....	12
2.3. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете при патологии сахарный диабет 1 тип. Группа исследования - результаты собственных наблюдений.....	15
3. Обсуждение результатов.....	19
Выводы.....	22
Практические рекомендации.....	23
Список использованной литературы.....	23

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – Артериальное давление

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДЗ - диагноз

ЛП - липопротеиды

ЛПВП – липопротеиды высокой плотности

ЛПНП – липопротеиды низкой плотности

Нв- гемоглобин

НИИ РАМН – Научно-исследовательский институт Российской Академии  
Медицинских Наук

ОХС - общий холестерин

ТГ – триглицериды

РК - Республика Крым

РФ - Российская Федерация

СД – сахарный диабет

ССС - сердечно-сосудистая система

ХПН – хроническая почечная недостаточность

ХС - холестерин

ФЛ – фосфолипиды

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы.

Диабет входит в «тройку лидеров» - болезней, которые являются причиной смерти человека. Здравоохранение бьёт тревогу и призывает более внимательно относиться к своему состоянию здоровья с целью предупреждения заболевания, либо диагностирования его на ранних стадиях. По данным ВОЗ, сахарный диабет увеличивает смертность в 2 раза (в сравнении с уровнем смертности людей без СД). Ежегодно число заболевших СД увеличивается на 5-7%. По всему миру зарегистрировано около 200 млн. случаев. Согласно данным ВОЗ за 2020 год СД I типа страдает от 10 до 15 % всего населения Земли. По данным Госкомстата РФ в нашей стране 3,8% населения страдает только I типом сахарного диабета. В РК состоит на диспансерном учете более 2 % населения Республики, что составляет около 48 231 человек из них 494 составляют дети. В данную статистику не включен город Севастополь, так как отчетность была взята по субъекту РФ, в частности по Республике Крым. При сохранении текущего положения предполагается, что к 2030 году количество заболевших увеличится и будет составлять 20% населения Земли. По этой причине данная тема является актуальной и нуждается в исследовании с целью предотвращения осложнений СД [10].

Сахарный диабет – с греческого переводится как «сахар теряющий». Этот перевод отражает главный признак болезни – потерю сахара, который выводится с мочой, а, значит, придает ей сладкий вкус. Кстати, именно этот клинический признак использовал древний греческий врачеватель Гиппократ при диагностике сахарного диабета у людей - он просто пробовал эту биологическую жидкость на вкус!

Определение «сахарный диабет» введено Аретеусом Каппадокийским, греческим целителем, который жил в 200 году до н.э. Он писал о том, что диабет – загадочный недуг. Несмотря на то, что прошло немало времени, это изречение остается актуальным и в наши дни, поскольку причина появления данного заболевания и его дальнейших осложнений во многом остается неразгаданной.

СД предполагает наличие двух основных типов заболевания, которые серьезным образом отличаются друг от друга.

СД I типа болеет 10-15 % всего населения Земли, 3,8 % населения РФ и 2 % населения РК, что выражается в абсолютных цифрах - более 5,5 млн. человек жителей России и почти 40 тыс. жителей Республики Крым.

Если кратко охарактеризовать этот тип данной эндокринологической патологии, то можно выделить главное - в кровь не поступает инсулин, и развивается инсулиновая недостаточность. В этом случае необходимо сделать инъекцию инсулина, чтобы привести сахар в норму. При постановке диагноза «диабет I типа» человек всю жизнь нуждается во введении нужного количества инсулина в кровь. Необходимо также добавить, что, помимо ввода доз инсулинового вещества, диабетик с первым типом заболевания нуждается в

соблюдении жесткой диеты, поскольку в его рационе должны присутствовать лишь определенные ингредиенты пищи.

СД II типа более распространённая форма заболевания, которая отмечается у 85% всех страдающих болезнью в целом и характеризуется достаточным количеством выработки инсулина. В механизме развития этого типа диабета играет роль клетка, которая несет на себе рецепторы, не чувствительные к гормону инсулину, вследствие чего гормон клеткой не усваивается и уровень глюкозы остается на прежнем уровне [10].

Так как уровень выработки инсулина не страдает, то при СД II типа введение инсулина не показано. В данном случае показан прием, так называемых сахароснижающих препаратов, которые повышают чувствительность рецепторов клетки к инсулину.

Стоит сказать, что определенное время пациент может принимать исключительно таблетки, работать над диетой и своим здоровьем. Однако, если не следовать здоровому образу жизни, включая двигательную активность, питание и отказ от вредных привычек в конечном итоге II тип заболевания перейдет к I типу, требующему инъекции инсулина, значительно ухудшив качество жизни.

Законы метаболизма, в частности липидный обмен, зависят от метаболизма печени, на которую большое влияние имеет уровень глюкозы. Можно предположить, что гипергликемия, возникающая по причине снижения уровня инсулина служит причиной развития гиперхилистеринемии с явлениями дислипидемии, когда нарушается соотношение "хороший : плохой холестерин" [2].

Нарушение жирового обмена начинается исподволь, незаметно. Сначала «ничего не происходит», но печень на фоне постоянного повышения уровня глюкозы нарушает свой обмен и синтезирует «плохой холестерин». Даже при незначительном повышении его концентрации в сыворотке крови, начинает работать «закон хаоса», молекулы ХС высраиваются определенным порядком, формируя регулярность структуры – кристаллы. Данные изменения при диагностике обычными методами врач не диагностирует нарушение липидного обмена. Это предположительно можно увидеть особым методом при исследовании сыворотки крови под микроскопом [2?3].

Таким образом, нами сделано научное предположение, что чем выше уровень глюкозы, тем выше риск формирования липидных регулярных фаз (кристаллов) сыворотки крови, а, следовательно, их можно будет диагностировать при проведении поляризационной микроскопии.

#### **Цель исследования:**

Изучить изменения физико-химических свойств крови у больных детей сахарным диабетом I типа посредством проведения микроскопии сыворотки в поляризованном свете, проанализировать и сделать выводы о взаимосвязи уровня сахара и типа кристаллизации сыворотки крови, дать практические рекомендации.

### **Задачи исследования:**

1. Изучение основных теоретических понятий по теме работы: «сахарный диабет», «фрактал», «теория фрактального роста», «нарушения липидного обмена», «метаболические нарушения».

2. Освоение методики подготовки препарата сыворотки крови для микроскопии в поляризованном свете и ее проведение.

3. Выполнение экспериментальной части практической работы с целью выявления зависимости изменения микроскопической картины сыворотки крови в поляризованном свете и уровне сахара крови больного.

4. Проанализировать и выявить связь изменения микроскопической картины сыворотки крови в поляризованном свете в зависимости от уровня гликемии у больных детей сахарным диабетом.

5. Разработать рекомендации по применению метода поляризационной микроскопии сыворотки крови у больных детей с СД I типа.

### **Личный вклад соискателя:**

Автором осуществлен анализ литературы, результаты которого освещены в разделе «Обзор литературы» и свидетельствуют об актуальности научной работы, обоснованы цель и задачи исследования. Была проведена микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете (совместно с научным руководителем) с оценкой типа и качественной характеристикой кристаллов крови. Выполнен анализ полученных результатов, написаны разделы письменной работы, сформулированы основные положения, выводы и практические рекомендации, оформлена научная работа.

Объект исследования: сыворотка крови больных детей сахарным диабетом I типа в возрасте от 1 года до 18 лет, подготовленная специальным образом для микроскопии в поляризованном свете.

Место и сроки проведения экспериментальной части: работа проводилась на базе эндокринологического отделения ГБУЗ РК "Симферопольская городская детская клиническая больница" (заведующая отделением - к.м.н. Писаренко А.С.) и клинко-диагностической лаборатории ГБУЗ РК "Симферопольская городская детская клиническая больница" (заведующая лабораторией - Эбувова С.А.).

Микроскопия сыворотки крови не входит в федеральный стандарт и клинические федеральные рекомендации диагностики и лечения СД у детей. Но, принимая во внимание неинвазивность метода исследования, доступность проведения исследования по причине проведенного забора крови согласно стандартов диагностики и лечения СД у детей, а также клинический профиль медицинской организации, являющейся базой нашего научного исследования, выше сказанное позволило провести набор клинического материала для последующего исследования и анализа.

Набор материала проводился в период сентябрь-октябрь 2022 года с фиксацией исходных данных больных в журнале первичной документации. Исходные данные заносились в таблицу Excel 2003 (MicrosoftOffice).

Во всех случаях исследования у официальных представителей несовершеннолетнего (родитель/опекун) было получено информированное согласие на все медицинские манипуляции. Согласно международного этического кодекса врача, данные таблицы не имели фиксации фамилии и других личных данных и использовались при статобработке в обезличенном виде.

## **ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

### **1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

#### **1.1. Сахарный диабет у детей в мире и в РК. Осложнения сахарного диабета.**

СД представляет собой мировую проблему, которая с годами только растет. В мире этим заболеванием страдает 371 миллион человек, что составляет 7% от всего населения Земли. В России больные СД составляют 40% от всех больных хроническими заболеваниями. Согласно данным статистики в Крыму в РК состоит на диспансерном учете более 2 % населения Республики, что составляет около 48 231 человек из них 494 составляют дети. По данным мировой литературы продолжительность жизни человека с СД сокращается в среднем на 10-15 лет [10].

#### **Принципы лечения**

Подход к лечению СД у детей I и II типа основан на заместительной терапии. При этом типе диабета инсулин не вырабатывается, его вводят извне, поддерживая на должном уровне. Другим основополагающим принципом терапии является диета, причем у детей с СД – это основной принцип коррекции уровня сахара. Больным детям назначают низкокалорийную диету с ограничением простых углеводов и жиров животного происхождения. Питание ребенка должно быть дробным, с интервалом между приемами пищи не более 4 часов. Обязательным является рациональный режим дня, активные игры [10].

#### **Осложнения сахарного диабета у детей**

Течение СД у детей крайне лабильно и характеризуется склонностью к развитию опасных состояний, таких как, гипогликемия, кетоацидоз и кетоацидотическая кома.

Гипогликемия развивается вследствие резкого снижения сахара в крови, вызванного стрессом, чрезмерной физической нагрузкой, передозировкой инсулина, несоблюдением режима питания и т. д. Гипогликемической коме обычно предшествует вялость, слабость, потливость, головная боль, ощущение сильного голода, дрожь в конечностях. Если не принять меры к повышению сахара крови, у ребенка развиваются судороги, возбуждение, сменяющееся угнетением сознания. При гипогликемической коме температура тела и АД в норме, отсутствует запах ацетона изо рта, кожные покровы влажные, содержание глюкозы в крови

Диабетический кетоацидоз является предвестником грозного осложнения сахарного диабета у детей - кетоацидотической комы. Его возникновение

обусловлено усилением липолиза и кетогенеза с образованием избыточного количества кетоновых тел. У ребенка нарастает слабость, сонливость; снижается аппетит; присоединяются тошнота, рвота, одышка; появляется запах ацетона изо рта. При отсутствии адекватных лечебных мер кетоацидоз в течение нескольких дней может перерасти в кетоацидотическую кому. Данное состояние характеризуется полной утратой сознания, артериальной гипотонией, частым и слабым пульсом, неравномерным дыханием, анурией. Лабораторными критериями кетоацидотической комы при сахарном диабете у детей служат гипергликемия  $> 20$  ммоль/л, ацидоз, глюкозурия, ацетонурия [10].

Развитие сахарного диабета в детском возрасте является серьезным фактором возникновения ряда отдаленных осложнений: диабетической микроангиопатии, нефропатии, нейропатии, кардиомиопатии, ретинопатии, катаракты, раннего атеросклероза, ИБС, ХПН и др.

### **1.2. Характеристика липидного обмена. Роль печени в нарушении жирового обмена.**

Липиды - группа низкомолекулярных веществ, характеризующихся различной растворимостью в органических и неорганических средах. Основные липиды (жиры и жироподобные вещества) в крови человека - триглицериды, холестерин и фосфолипиды, которые образуются в печени, частично в тонкой кишке. Увеличение общих липидов в сыворотке крови носит название гиперлипидемии. В норме умеренная гиперлипидемия наблюдается после приема пищи, не превышая норму 4,5—7,0 г/л.

Холестерин - холестерин является основным липидом организма. ХС поступает в организм с пищей, но большая часть синтезируется в печени. ХС является компонентом клеточных мембран, предшественником стероидных гормонов и желчных кислот. Уровень ХС является важным показателем состояния липидного обмена.

Фосфолипиды - липиды, в которых содержатся жирные кислоты. Они есть во всех живых клетках. Содержатся в нервной ткани, участвуют в транспорте жиров, жирных кислот и холестерина. ФЛ очень важны для развития мозга человека и особенно ребенка.

Ориентировочную оценку состояния липидного обмена можно дать на основании определения в крови свободного общего ХС, более точную - по концентрации холестерина ЛПНП и ЛПВП.

Повышением содержания липидов в крови могут сопровождаться следующие заболевания: атеросклеротическое поражение сосудов, проявляющееся ишемической болезнью сердца, инсультами; ксантоматоз кожи, сухожилий - отложение холестерина под кожей и в суставах; боли в области живота [3].

У больных детей с СД нарушение липидного обмена развивается быстро и протекает в тяжелой форме, с поражением ССС, быстрым прогрессивным

появлением склеротических бляшек на стенках сосудов, что выражается развитием артериальной гипертензии.

Печень принимает непосредственное активное участие в обмене жиров. В печени происходит синтез ФЛ и нейтрального жира, она регулирует процессы образования, эстерификации, разложения и выделения ХС. ФЛ, холестерол, нейтральные жиры входят в структуру гепатоцитов. Таким образом, сохранение функции печени стоит первостепенной задачей при решении вопроса нормализации липидного обмена и профилактики развития осложнений при его нарушении.

Особенности нарушения липидного обмена - увеличение свободных жирных кислот, ТГ, ХС-ЛПНП, соотношения ХС-ЛПНП/ХС-ЛПВП и снижение ХСЛПВП (частично теряются с мочой при выраженной альбуминурии, которая сопровождает течение СД [3]).

Таким образом, из-за нарушения функции печени при СД у детей быстро развивается нарушение обмена липидов, что сказывается на их концентрации в крови. Повышение уровня концентрации липидов на ранних стадиях липидных нарушений позволяет только микроскопия крови в поляризованном свете, применяя законы формирования кристаллов в биологических жидкостях (сыворотка крови).

### **1.3. Теория фрактального роста и применение ее в биологических средах.**

Среди кристаллических структур биологической среды – кровь, являющаяся объектом нашего изучения, интерес представляют микрокристаллы, возникающие в биологических жидкостях.

Так, в процессе ранней диагностики нарушений жирового обмена у детей с СД, медиками анализируются микрокристаллы сыворотки крови.

В природном разнообразии кристаллов, образовавшихся в биологических средах – желчь, кровь, моча, лимфа - можно обнаружить структуры, похожие на фракталы. Так как для них уже наработаны модели формирования, возможно, удастся объяснить особенности роста биологической кристаллической фазы со степенью выраженности нарушений жирового обмена у детей с СД в сравнении со здоровыми детьми [1,7,8].

Закономерности появления регулярных фаз и регистрация недопустимых в сыворотке крови патологических жидкокристаллических структур объясняет теория фрактального роста. На поверхности растущего кристалла, возникает особый слой частиц, которые кристалл адсорбирует из питающей биологической среды – сыворотки крови. Частицы «ползают» по поверхности кристалла, пока не найдут своего места фиксации на растущих гранях. Благодаря идеально регулярному строению кристалл должен нарастать идеальными плоскими слоями – ритмично, слой за слоем [7,8,9].

Изучая структуру вещества, мы сталкиваемся с задачей исключительной сложности. Каждая микроскопическая частица мира содержит в себе гигантское количество атомов и молекул, зачастую объединенных в очень

сложные, неупорядоченные структуры, так называемое «пространство хаоса». Выход из этого хаоса подсказан самой природой в виде существования фрактальной теории, что мы и применяли в наших исследованиях.

Эксперимент подтверждает, что при повышении концентрации биологического раствора рост кристалла протекает быстрее, чем при низких насыщениях. Это объясняет, то, что рост идет беспрепятственно, пока на грани происходит достройка слоя и имеется ступенька, к которой легко пристраиваются другие частицы и образуется объемная регулярная текстура – кристалл [1,5,6].

Процесс роста кристалла в крови, как и в природе, может приводить к образованию структур, называемых *фракталами*.

Что же такое фрактал? При наблюдении таких объектов с возрастающим увеличением можно видеть, что они проявляют повторяющийся на разных уровнях рисунок. Таким образом, одна и та же структура наблюдается и повторяется в любом масштабе. Фрактальный объект может, например, выглядеть совершенно одинаково независимо от того, наблюдаем ли мы его в метровом или миллиметровом масштабе. Этим свойством обладают многие природные объекты, что и было показано в результате нашей работы [7,8,9].

Фракталы напоминают узоры из снежинок. Это сходство со снежинками объясняется их повторяющимся узором. Например, каждая часть фрактала состоит из пяти идентичных элементов меньшего размера. В свою очередь пять больших частей можно объединить в еще больший объект той же структуры и т. д. Каждое «поколение» содержит в себе отверстия, по масштабу соответствующие размерам данного поколения. На каждом уровне любая часть структуры с диаметром, втрое меньшим диаметра целого, выглядит точно так же, как и целое.

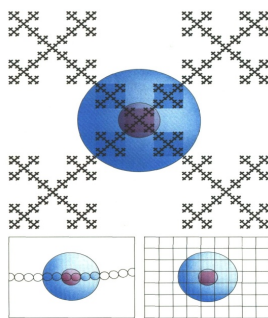


Рис.1.1. Рост фрактала по Мандельброту.

В случае измерения жидкого кристалла, оптически определяемого в препарате биологической среды (в нашем случае – сыворотка крови) в виде светящейся прямой линии в поле зрения, но на самом деле они представляют объемную линейную структуру. Наблюдается картина фрактального роста [9].

Методы исследования в поляризованном свете успешно применяют не только в минералогии, металлографии, геологии, стекольной промышленности, но с недавних пор и в медицине. Сыворотка крови как сложный многокомпонентный раствор имеет структуру, которая формируется в

результате межмолекулярного взаимодействия в концентраций и температур и проявляет свойства жидкого кристалла.

Жидкие кристаллы крови - это надмолекулярные частично упорядоченные системы, образованные длинными стержнеобразными молекулами в воде. В силу особенностей своего строения они имеют тенденцию объединяться в агрегаты - мицеллы или везикулы, состоящие из нескольких десятков и более молекул. В изотермических условиях при увеличении концентрации вещества количество мицелл (везикул) в растворе возрастает и может произойти образование жидкокристаллических состояний [4-6].

Структура жидких кристаллов морфологически проявляется в картине, наблюдаемой в поляризованном свете (результат взаимодействия частично упорядоченной среды и поляризованного оптического излучения). Способность сыворотки крови к формированию жидких кристаллов может быть описана с помощью следующих параметров: 1) структура кристалла; 2) количество кристаллов; 3) размеры кристаллов; 4) общая площадь оптически активных кристаллов; 5) время появления.

К классу “нормальные” оптически активные текстуры-кристаллы относятся: 1) точечные ярко светящиеся кристаллы; 2) жидкокристаллические линии - светящиеся неярким желтым светом короткие линии произвольной формы.

К группе “патологических” оптически активных кристаллов относятся: 1) дендриты - древовидные кристаллы многообразной формы и размеров, среди которых особо выделяем скелетные дендриты и тонкие дендриты, встречающиеся редко, но свидетельствующие о тяжелом патологическом процессе в организме; 2) игольчатые кристаллы; 3) ромбовидные и прямоугольные кристаллы; 4) линзовидные кристаллы.

К переходным оптически активным кристаллам относятся: 1) сферолиты - кристаллы округлой формы с характерным “крестом” на поверхности; 2) сферодендриты, которые встречаются в трех разновидностях в зависимости от размеров: мелкие, средние и крупные [1,2,6].

Чем более выражен патологический процесс, тем больше размер кристалла. Метод поляризационной микроскопии при увеличении  $\times 70$  и более позволяет определить наличие и сосчитать количество кристаллов в 5 полях зрения в сыворотке крови конкретного обследуемого ребенка с СД, что отражает его индивидуальную способность к структурированию липидов крови в кристаллы, которые и указывают на наличие у ребенка начальных стадий осложнения течения СД в виде нарушения жирового обмена.

## **2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Настоящая работа основана на результатах биохимических, и микроскопических (в поляризованном свете) методов исследования 10 детей в возрасте от 6 до 16 лет. В группу исследования вошли дети больные сахарным

диабетом со средним стажем заболевания от 1 недели до 9 лет и составило в среднем 4 года 6 месяцев. Группу исследования составили несовершеннолетние в равной гендерной принадлежности (50% девочек и мальчиков, по 5 человек в каждой гендерной группе). Все обследованные дети и подростки не имели других хронических заболеваний печени, которая могла бы повлиять на результаты исследования. Отсутствие патологии у обследованных детей устанавливалось на основании анамнестических данных, отсутствия жалоб и клинической картины, а также анализа медицинских карт детей, находящихся на стационарном лечении в детской больнице (ф№003\у). Все дети поступили на обследование в эндокринологическое отделение ГБУЗ РК «Симферопольская городская детская клиническая больница» города Симферополя (главный врач - Кривошей С.М., зав. отделением – к.м.н. Писаренко А.С.). Исследования проводились на следующих диагностических базах: биохимическое исследование крови на базе клинической лаборатории вышеуказанного лечебного учреждения (зав. лабораторией – Эбунова С.А.). Поляризационная микроскопия сыворотки крови проведена на базе кафедры педиатрии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского (зав. кафедрой - профессор Лагунова Н.В.). Для сохранения изображения и его последующего анализа применялась камера телефона Айфон. Техническая аппаратура и компьютерные программы сертифицированы и разрешены к применению на территории Российской Федерации.

Группу контроля составили 11 здоровых подростков указанной возрастной группы и сравнимой по гендерному составу. Группа контроля была сформирована и исследована в ранний период и была предоставлена научным руководителем.

### **2.1. Биохимический профиль группы исследования.**

В качестве характеристики липидного обмена у детей больных СД 1 типа исследованной группы нами были выбраны следующие показатели: сахар крови, гликированный гемоглобин, общий холестерин, ЛПНП. В зависимости от уровня нарушения количественного и качественного состава липидов крови могут быть выражены клинические и лабораторные проявления нарушений липидного обмена у больных детей с СД.

Наиболее эффективным методом на наш взгляд служит метод исследования сыворотки крови на предмет обнаружения патологических структур липидов микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете.

### **2.2. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете. Группа сравнения.**

Для биофизической оценки состояния сыворотки крови и оценки липидного обмена в работе применялся метод микроскопии в поляризованном свете.

Метод микроскопии в поляризованном свете позволяет проводить анализ образования кристаллов в биологической среде - крови. Появление

жидких кристаллов можно обнаружить, используя поляризационную микроскопию.

Способ подготовки микроскопического препарата представлен следующим образом: у пациента утром натощак забирается кровь из локтевой вены 5 мл, центрифугируется для получения сыворотки в течении 12 минут на скорости 1500 об/мин. Капля сыворотки крови помещается на предметное стекло, накрывается покровным стеклом и выдерживается в течение суток при комнатной температуре без доступа света. Препарат просматривается под микроскопом в поляризованном свете при скрещенных поляризаторах при увеличении  $\times 70$  и  $\times 150$ . Производится определение и подсчет среднего количества анализируемых светящихся кристаллов, видимых в 5 полях зрения.

Время выдержки соответствует окончанию стадий кристаллизации компонентов крови в интервале комнатных температур. Во всех исследованных препаратах мы определяли следующие особенности: наличие жидкокристаллической структуры кристалла, ее тип, наследование структуры предшествующей фазы (закон фрактального роста).

При микроскопии в прямом свете оптически активные текстуры – кристаллы видеть не представляется возможным из-за оптической общности со световой волной.

В данном разделе представлены результаты ранних исследований, предоставленные нам для сравнения в качестве группы контроля научным руководителем.



Рис.1. Микроскопии сыворотки крови в прямом свете на однородном оптически активном поле. **Вариант нормы.** Время экспозиции 24 часа,  $\times 56$ . Уровень общего холестерина 3,1 ммоль/л. Невозможность регистрации регулярных фаз.

#### *РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ*

В норме при микроскопии препаратов сыворотки крови в поляризованном свете на темном фоне хорошо видны единичные светящиеся линии (области жидкокристаллических фаз), указывающие на начало формирования светящейся структуры - жидкий кристалл. К ним относятся точечные ярко светящиеся текстуры и жидкокристаллические линии - светящиеся неярким желтым светом линии произвольной формы.

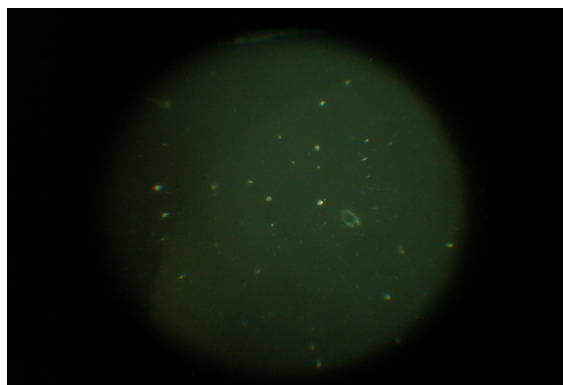


Рис.2. На данной микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете на однородном темном поле видны единичные светящиеся точечные структуры жидкокристаллической природы. **Вариант нормы.** Время экспозиции 24 часа, х56. Уровень общего холестерина 3,1 ммоль/л.  
*РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.*

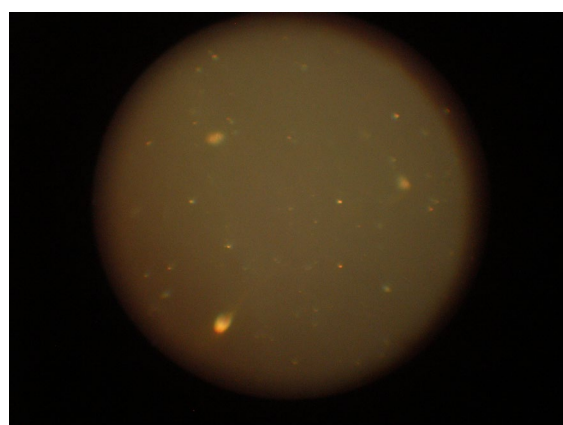


Рис.3. На данной микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете на однородном темном поле видны единичные светящиеся точечные структуры жидкокристаллической природы. **Вариант нормы.** Время экспозиции 24 часа, х56. Уровень общего холестерина 3,3 ммоль/л.  
*РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.*

К переходным оптически активным текстурам относятся: сферолиты - кристаллы округлой формы с характерным “крестом” на поверхности и сферодендриты, которые встречаются в трех разновидностях в зависимости от размеров: мелкие, средние и крупные. Чем более выражены метаболические нарушения, тем больше размер кристалла и тем больше количество образовавшихся светящихся кристаллов-точек.



*Рис.4.* На данной микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете на однородном темном поле видны единичные светящиеся линейные структуры жидкокристаллической природы. **Вариант нормы.** Время экспозиции 24 часа, х56. Уровень общего холестерина 4,6 ммоль/л.

*РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.*

Оптически активные текстуры на данных микроскопиях сыворотки крови (*Рис.1,2,3,4*) представляют собой единичные точечные и светящиеся линейные структуры жидкокристаллической природы, что относит их к классу «нормальные», допустимых к организации в сыворотки крови у здорового человека.

**2.3. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете при патологии СД 1 тип. Группа исследования - результаты собственных наблюдений.**

К группе «патологических» оптически активных структур, на основании проведенных нами клинических исследований, относятся: древовидные (разветвленные кристаллы) кристаллы многообразной формы и размеров, среди которых особо выделяем скелетные дендриты; игольчатые кристаллы; ромбовидные и прямоугольные кристаллы; линзовидные кристаллы.

Ниже нами представлены собственные наблюдения регистрации оптически активных регулярных фаз сыворотки крови у детей больных сахарным диабетом.



*Рис. 5. Больной Б. 15 лет. СД 1 тип, компенсированная форма. Стаж СД 3 года. глюкоза 3,10 ммоль\л. ОХ-2,98 ммоль\л Гликированный Нв-9,1%.*

Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация единичных множественных точечных и единичных жидкокристаллических полихромных линейных регулярных фаз. Увеличение X56.

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ.**



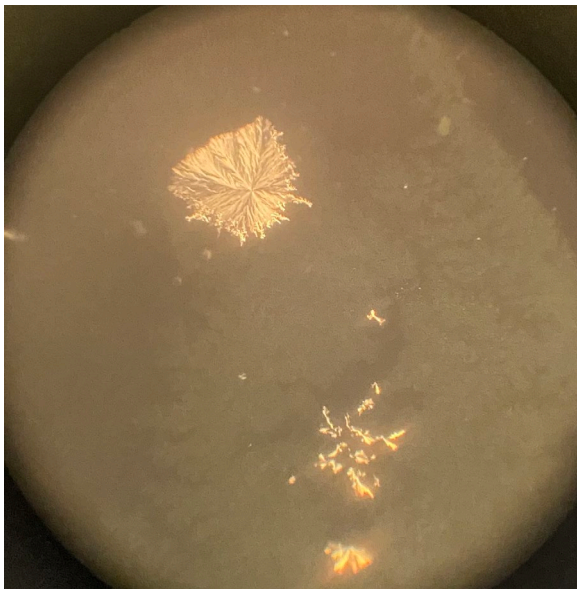
*Рис. 6. Больной Б. 6 лет. СД 1 тип, компенсированная форма. Стаж СД 2 года; глюкоза 6,03 ммоль\л. ОХ-4,16 ммоль\л Гликированный Нв-9,7%.*

Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация умеренного количества точечных регулярных фаз, единичные линейные кристаллы. Увеличение X56.

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ.**

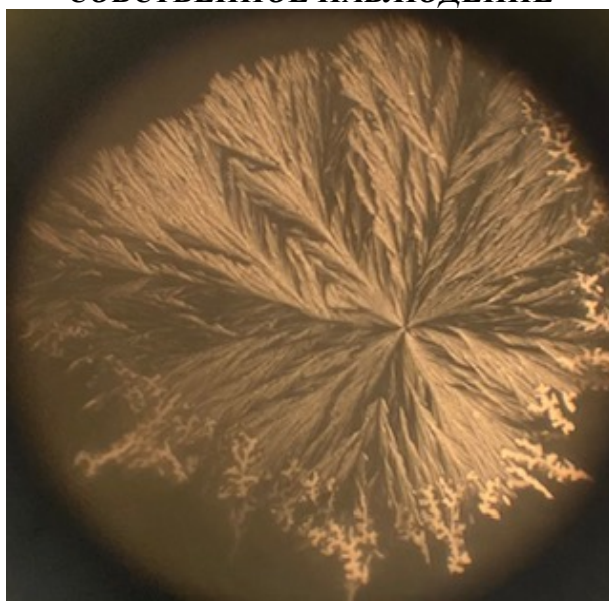
На представленных микроскопии (фото.№№5,6) сыворотки крови пациентов с СД 1 типа, у которых отмечается гликемия невысоких цифр, компенсированная форма течения СД, что подтверждается умеренно повышенным уровнем гликированного Нв (не выше 10%) нами обнаружены множественные точечные регулярные фазы (допустимые к образованию) и в небольшом количестве оптически-активные игольчатые жидкие линейные кристаллы, которые являются представителями группы переходных

«патологических» оптически активных структур. Цветовая неоднородность жидкого кристалла на *фото.№5* свидетельствует об объемности структуры и сложности ее строения, что и подтверждается «разноцветностью» биологической структуры.



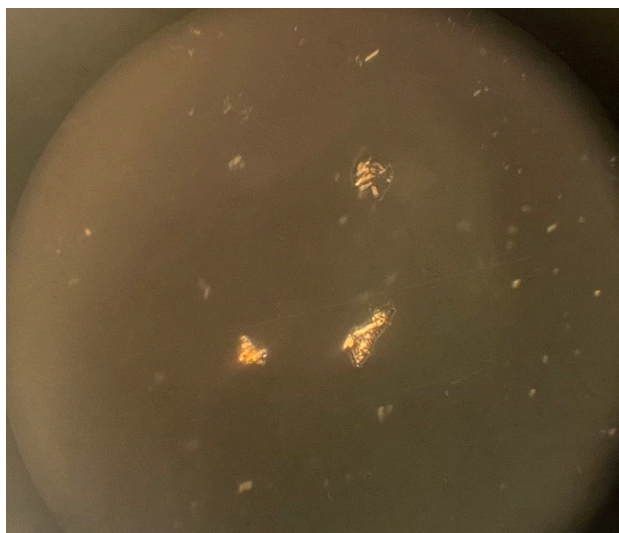
*Рис. 7. Больной С. 16 лет. СД, декомпенсированное течение. Стаж 9 лет. Глюкоза 14,2 ммоль\л. ОХ-7.05 ммоль\л Гликированный Нв-11.8%. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация множественных «патологических» сложноскристаллических фаз. Увеличение X56.*

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ**



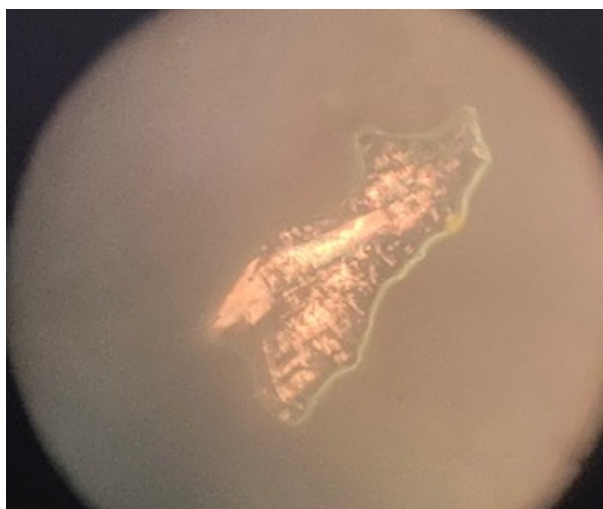
*Рис. 8. Больной С. 16 лет. СД, декомпенсированное течение. Стаж 9 лет. Глюкоза 14,2 ммоль\л. ОХ-7.05 ммоль\л Гликированный Нв-11.8%. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация «патологических» жидкокристаллических кристаллов в виде формирования сферолитов по типу "мальтийский крест". Увеличение X120.*

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ.**



*Рис. 9. Больной М. 10 лет. СД, состояние субкомпенсации. Стаж 2 лет. Глюкоза 15,08 ммоль\л. ОХ-4,34.05 ммоль\л Гликированный Нв-14,2%. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация «патологических» множественных линейных жидкокристаллических кристаллов на этапе формирования сферолитов (в будущем возможно формирование по типу "мальтийский крест"). Увеличение X56.*

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ**



*Рис. 9. Больной М. 10 лет. СД, состояние субкомпенсации. Стаж 2 лет. Глюкоза 15,08 ммоль\л. ОХ-4,34.05 ммоль\л Гликированный Нв-14,2%. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация «патологических» множественных линейных жидкокристаллических кристаллов на этапе формирования сферолитов (в будущем возможно формирование по типу "мальтийский крест"). Увеличение X120.*

**СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ**

На предоставленных *Рис.7,8,9* микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете больных детей с СД 1 типа с высоким уровнем гликемии, подтвержденным повышенным уровнем гликированного Нв (выше

10%) регистрируются множественные точечные регулярные фазы, а также множественные игольчатые, ветвистые, типа «сферолитов» жидкокристаллические кристаллы, которые являются представителями группы «патологических» оптически активных регулярных структур в виде формирования сферолитов по типу "мальтийский крест".

Регистрация подобных структур в препарате крови свидетельствует о нестабильности жидкой биологической среды (в данном случае - сыворотки крови, перенасыщенной компонентами ЛП), стремящихся к самоорганизации посредством процессов кристаллизации, следуя законам фрактального роста кристаллов в природе. Следует заметить, что подобные изменения при микроскопии были нами зарегистрированы на фоне нормального (*фото 5,6,9*) уровня показателей липидного профиля и при отсутствии клинических проявлений нарушения липидного обмена в обоих случаях.

### **3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

В предыдущих главах были представлены краткие сведения о результатах наших исследований, представленные в сравнении с группой контроля (результаты ранних исследований).

В последнее время медицинской наукой все больше внимания уделяется не только лечению нарушений обмена веществ (таких как СД и его осложнения), но и разрабатываются методы эффективной ранней диагностики на доклиническом этапе, позволяющих выявить тенденцию развития его осложнений на ранних стадиях доклинических проявлений уже в детском возрасте и разработка методики эффективной первичной профилактики. Особенно это становится актуальным при современном росте заболеваемости СД у детей и повышении частоты случаев регистрации его осложнений в виде развития сосудистых катастроф (инсульты и инфаркты). При анализе данных научной литературы, при обсуждении в личной беседе с детскими врачами-эндокринологами стало ясно, что осложнения в детском возрасте развиваются не так часто. Однако, клиническая и профессиональная заинтересованность врача заключается в прогнозировании течения СД во взрослом возрасте.

Применяя законы оптической физики, становится возможным проследить законы кристаллического роста сыворотки крови в зависимости от уровня гликемии, а, следовательно, наличия выраженности нарушений липидного обмена при СД у детей на доклиническом этапе их развития.

В результате анализа ПМД (ИБ-ф003\у) нами выяснено, что все обследованные дети и подростки не имели других хронических заболеваний печени, которые могли бы повлиять на результаты исследования. Отсутствие патологии у обследованных детей устанавливалось на основании анализа медицинских карт детей, находящихся на стационарном лечении в детской больнице (ф.№003\у).

Результаты липидного профиля представлены в *Таблице №1*.

## Результаты липидного профиля детей с СД 1 типа

	Сахар крови (ммоль\л)	Гликированный Нв (%)	ОХС (ммоль\л)	ЛПНП (ммоль\л)	ЛПНП (% от ОХС)
<b>Группа исследования</b>	10,07±6,20	11,70±3,40	5,01±2,04	2,96±1,30	53,60±7,40
<b>норма</b>	3,3-5,5	До 6	3.3-5.5		менее 50%

Нами было выявлено, что нормальный уровень глюкозы крови отмечался лишь у 2-х пациентов и составил 3,1 ммоль\л и 5,01 ммоль\л. Уровень гликированного Нв составил менее 10% (9,1 и 8,8% соответственно). Нами выявлено, что согласно данным ИБ стаж заболевания этих больных составил 3 и 8 лет соответственно и дети находятся на постоянной заместительной терапии инсулинами. Нормальный уровень гликемии является показателем достижения цели лечения - нормализация сахара крови. У остальных пациентов гликемический профиль в среднем превышал норму, что подтверждает диагноз СД, который подтверждается повышенным уровнем гликированного Нв у всех представителей группы (100%).

В результате анализа и статистического расчета данных первичной медицинской документации (ф003\у - история болезни стационарного больного) нами было выявлено, что в пределах нормы находились показатели липидного обмена согласно уровню ОХС у большинства больных (80 % - 8 человек). У 2-х пациентов уровень ОХС был представлен повышенными цифрами 6,68 и 7,05 ммоль\л, что составило 20% от всей группы. Нами замечено, что длительность заболеваний у этих больных составила 3 и 9 лет, что свидетельствует о том, что давность заболевания влияет на развитие нарушения липидного обмена при СД.

По нашим данным в результате проведения анализа липидного профиля, включающего в себя % содержание ЛПНП (так называемого "плохого" ХС) нами сделан вывод об абсолютном (100% - вся группа 10 человек) превалировании данного липида в структуре ОХС и составил в среднем более половины (средний показатель 53,6%). Данный липидный профиль может рассматриваться как риск развития липидных бляшек на стенках сосудов и является неблагоприятным фактором развития сосудистых катастроф в будущем.

Согласно научных данных нами была сформулирована гипотеза о разработке диагностических исследований о нарушениях липидного обмена на доклиническом этапе, когда жалобы отсутствуют и б\х профиль крови остается в норме, что позволило бы проводить профилактику развития сосудистых катастроф в будущем.

Для биофизической оценки состояния крови в работе применялся метод микроскопии в поляризованном свете, который проводился через 24 часа после приготовления препарата. Метод микроскопии в поляризованном свете позволяет проводить анализ регистрации формирования кристаллов сыворотки крови, которые формируются при повышении концентрации липидов. В результате исследований кристаллического состояния сыворотки крови предложен способ изучения фазового состава крови на раннем доклиническом этапе развития метаболических нарушений у детей с СД.

Ранее в исследованиях моих юных коллег (2013-2017 г.г.) определен тип кристаллизации крови в группе здоровых детей, и было выявлено, что при поляризационной микроскопии через 24 часа выдержки препарата определено формирование только единичных жидкокристаллических структур (точечные ярко светящиеся текстуры и жидкокристаллические линии, светящиеся линии произвольной формы), что совпадает с полученными данными других авторов.

При нарушении липидного обмена в группе детей с СД изменения затрагивают морфологию кристаллических фаз и их количество. В препарате появляется большое количество «патологических» жидкокристаллических оптически активных кристаллов (в виде дендритов - кристаллы многообразной формы и размеров и игольчатые кристаллы). В результате нашего исследования установлено влияние на изменение и появление «патологических» регулярных фаз уровня глюкозы: в группе детей (2 человека, что составило 20 % в группе исследования) с нормальным уровнем глюкозы крови (3,1 и 5,01 ммоль\л) нами были зарегистрированы единичные множественные точечные и единичные жидкокристаллические полихромные линейные регулярные фазы, которые рассматриваются как переходные от нормальных "физиологических" к "патологическим" жидким кристаллам.

У представителей остальной группы исследования из 8 человек (80%) отмечался повышенный уровень глюкозы (10,9 ммоль\л в среднем), диагноз Сд у которых был подтвержден повышенным средним уровнем гликированного Нв-11,07%.

При поляризационной микроскопии регистрировались множественные «патологические» жидкокристаллические кристаллы в виде формирования сферолитов по типу "мальтийский крест", что свидетельствует о нарушении физико-химических свойств крови. Данные нами рассмотрены как фактор риска агрегации таких жидкокристаллических структур на стенке сосудов с формированием атеросклеротической бляшки и нарушением кровоснабжения и развитие инсультов и инфарктов в будущем.

В результате работы нами была выявлена зависимость качества сформированных сложнокристаллических структур по типу "мальтийский крест" от стажа течения СД: на ранних этапах развития СД (в нашем исследовании до 1 месяца клинических проявлений) формируются единичные жидкокристаллические полихромные линейные регулярные фазы, которые рассматриваются как переходные кристаллы. При стаже заболевания более 4-х

лет (средний стаж в группе 4 года 2,5 месяца) формируются сложноскристаллические разветвленные кристаллы объединенные в группы с формированием структуры по типу "мальтийский крест".

Нами отмечено, что гендерная принадлежность не влияла на характер изменений структур крови и формирование регулярных структурных фаз при СД у детей.

## ВЫВОДЫ

В исследовательской работе в результате обследования 10 детей подростков в возрасте от 6 до 16 лет с сахарным диабетом, со средним стажем заболевания 4 года 6 месяцев без сопутствующей хронической патологии при нормальных и незначительно повышенных показателях уровня ОХ нами выявлены начальный этап развития нарушения липидного обмена, который можно рассматривать как фактор формирования атеросклероза в будущем и риск развития сосудистых катастроф (инсульт, инфаркт и др.) у представителей группы исследования.

1. У всех детей из обследованной группы (100%) в возрасте от 6 до 16 лет без сопутствующей хронической патологии печени не выявлены стойкие нарушения биохимические нарушения липидного профиля (ОХС и ЛПНП).
2. Нами выявлено, что в группе детей в возрасте от 6 до 16 лет страдающих сахарным диабетом без сопутствующей хронической патологии печени изменения физико-химических свойств крови затрагивают морфологию возникающих кристаллов (100% обследованных группы). В группе детей (2 ребенка, 20%) со стажем течения СД до 1 месяца с высоким уровнем гипергликемии ( $12,77 \pm 2,38$  ммоль/л) в препарате регистрируются единичные жидкокристаллические полихромные линейные регулярные фазы, которые рассматриваются как переходные кристаллы.
3. В результате нашей работы у 8 несовершеннолетних пациентов (80%) с более длительным стажем заболевания (4 года 2,5 месяца) и среднем уровнем гликемии ( $8,8 \pm 3,4$  ммоль/л) на фоне постоянной заместительной инсулинотерапии в препаратах крови в поляризованном свете зарегистрирован активный рост патологических кристаллов (в виде кристаллов округлой формы с характерным "крестом" на поверхности различных размеров по типу «мальтийский крест»).
4. В результате анализа полученных данных нами сделан вывод о ранних признаках развития метаболических нарушений и раннем этапе возможного развития атеросклероза как фона для манифестации сосудистых катастроф в будущем (инфаркты и инсульты).
5. Выведена прямая зависимость от уровня гликемии при СД у детей с поляризационной картиной микроскопии крови, выражающаяся в формировании патологических кристаллов в виде кристаллов округлой

формы с характерным “крестом” на поверхности различных размеров по типу «мальтийский крест» при длительном стаже заболевания.

6. Нами отмечено, что пол ребенка из группы исследования детей с СД 1 типа не влиял на характер изменений структур крови и формирование регулярных структурных фаз. **Данный вывод явился незапланированным и служит исследовательской находкой.**

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Для ранней диагностики развития осложнений СД у детей рекомендуется проведение исследования сыворотки крови посредством проведения поляризационной микроскопии с определением морфологии образовавшихся жидкокристаллических кристаллов в препарате и их характеристики.

### **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. А. с. 1209168 Украина, МКИ, Поляризационное оптическое исследование фазового состава желчи / Е.В. Кононенко, Е.В. Залецкий, В.М. Лисиенкт, Р.И. Минц. - № 1054; Бюл. № 52.
2. Ганиткевич Я.В. Исследование желчи: Биохимические и биофизические методы / Я.В. Ганиткевич, Я.И. Карбач. – К., 1985. – 129 с.
3. Горячковский А.М. Справочное пособие по клинической биохимии / А.М. Горячковский. – Одесса : ОКФА, 1994. – 415 с.
4. Грызунов В.В. Возможности применения теории надежности и фрактального анализа в медицинском прогнозировании / В.В. Грызунов // Клиническая медицина и патофизиология. – 1996. – № 1. – С. 61–64.
5. Загоруйко Г.Е. Проблемы и перспективы развития методов количественного анализа фрактальных биологических структур / Г.Е. Загоруйко, И.Г. Скидан // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – № 2. – С. 102–107.
6. Тимирбулатов Р.А. Фрактальные комплексы липопротеидов крови и их свойства при гипоксии и гипотермии / Р.А. Тимирбулатов // Вестник Санкт-Петербургской Государственной Медицинской Академии им. И.И. Мечникова. – 2004. – № 1. – С. 193–194.
7. <https://allatravesti.com/fraktaly-v-prirode-mir-vokrug-nas-chast-2>
8. [http://esate.ru/article/cg/dizayn/fraktalnaya\\_grafika/](http://esate.ru/article/cg/dizayn/fraktalnaya_grafika/)
9. <http://www.michurin.net/online-tools/mandelbrot.html>
10. [https://www.probl-endojournals.ru/jour/article/view/10927?locale=ru\\_RU](https://www.probl-endojournals.ru/jour/article/view/10927?locale=ru_RU)