

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И МОЛОДЕЖИ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ РЕСПУБЛИКИ КРЫМ
«КРЫМСКАЯ ГИМНАЗИЯ-ИНТЕРНАТ ДЛЯ ОДАРЕННЫХ ДЕТЕЙ»

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
им. Б. В. Всесвятского (с международным участием)**

Номинация «Человек и его здоровье»

**ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ
СЫВОРОТКИ КРОВИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ
ПРОВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНОТЕРАПИИ У ДЕТЕЙ С ВПЕРВЫЕ
ВЫЯВЛЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА**

Работу выполнила:

Солошенко Вероника Александровна,
учащаяся 11 класса ГБОУ Республики Крым
«Крымская гимназия-интернат для одаренных
детей»

Научные руководители:

Лебедева Ольга Дмитриевна, доцент
кафедры педиатрии «Медицинский институт
имени С.И. Георгиевского (структурное
подразделение) Крымского федерального
университета имени В.И. Вернадского»;

Старчикова Светлана Алексеевна, учитель
биологии, педагог дополнительного
образования Государственного бюджетного
общеобразовательного учреждения Республики
Крым «Крымская гимназия-интернат для
одаренных детей».

Симферополь - 2025

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
Основная часть	
1. Обзор литературы:	
1.1. Сахарный диабету детей в мире и в Республике Крым. Осложнения сахарного диабета	6
1.2. Характеристика липидного обмена. Роль печени в нарушении жирового обмена.....	7
1.3. Теория фрактального роста и применение ее в биологических средах.....	8
2. Материалы и методы исследования.....	12
2.1. Биохимический профиль группы исследования до начала терапии инсулином.....	12
2.2. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете. Группа сравнения.....	13
2.3. Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете в группе детей с впервые выявленным СД 1 типа до лечения инсулином.....	15
2.4. Биохимический профиль детей группы исследования на фоне инсулинотерапии.....	14
2.5. Динамика микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете в группе детей с впервые выявленным СД 1 типа на фоне инсулинотерапии.....	18
3. Обсуждение результатов.....	19
Выводы.....	22
Практические рекомендации.....	23
Список использованной литературы.....	23

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – Артериальное давление
ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения
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 В 2023 году состоит на диспансерном учете более 2 % населения Республики, что составляет около 48 231 человек из них 494 составляют дети. Из статистических данных исключены больные СД города Севастополь, как иного федерального субъекта страны и отчетность была взята исключительно по одному 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]. По данным Крымстата в РК 0,22% детского населения состоят на диспансерном учете в связи с диагностикой СД I типа, что составляет 815 детей. Все дети находятся на замещающей инсулинотерапии.

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 1 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 гиперхолестеринемии 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 выстраиваются 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 сыворотки крови у детей с впервые выявленным сахарным диабетом I типа посредством проведения микроскопии сыворотки в поляризованном свете, проанализировать и сделать выводы о влиянии инсулитотерапии на кристаллизацию 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 (индивидуальное) 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 уровнем 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 11 до 15 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 - кмн Писаренко А.С.) и

клинико-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 2024 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.

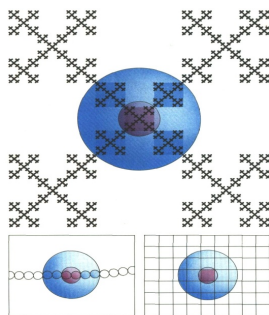


Рис.1.1. Рост фрактала по Мандельброту.

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

Настоящее исследование является продолжением большого научного поиска результатов применения неинвазивных физических методов исследования, а именно поляризационной микроскопии в детской эндокринологии, как подраздела практической педиатрии. Ранние исследования моих коллег под руководством научного руководителя были посвящены диагностике ранних осложнений течения СД 1 типа у детей. Научный поиск продолжается...

Данная работа основана на результатах биохимических, и микроскопических (в поляризованном свете) методов исследования 8 детей в возрасте от 11 до 15 лет (средний возраст в группе исследования составил 11 лет 10 мес.). С целью чистоты исследования мы не стали образовывать разновозрастную группу исследования. Основным критерием группы исследования являлось первичность манифестации СД у детей в группе пубертата.

В настоящую группу исследования вошли дети с впервые диагностированным сахарным диабетом (без стажа заболевания). Группу исследования составили несовершеннолетние в равной гендерной принадлежности (50% девочек и мальчиков, по 4 человека 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 (зав. отделением – кмн Писаренко А.С.). Исследования проводились на следующих диагностических базах: биохимическое исследования крови на базе клинической лаборатории вышеуказанного лечебного учреждения (зав. лабораторией – Эбувова С.А.). Поляризация микроскопия сыворотки крови проведена на базе кафедры педиатрии Медицинского института имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского (зав.кафедрой - профессор, дмн 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 до начала терапии инсулином.

В качестве характеристики липидного обмена у детей больных СД 1 типа исследованной группы нами были выбраны следующие показатели: сахар крови, гликированный гемоглобин, общий холестерин, ЛПВП, 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 впервые установленным диагнозом СД. Показатели углеводного и липидного обмена при поступлении в стационар отображены в *Таблице 1.*

Таблица 1.

Биохимические показатели углеводного и липидного обмена в группе исследования (n-8) ДО лечения

	Глюкоза крови мМоль\л	Гликированный Нв %	ОХ г\л	ЛПНП г\л	ЛПВП г\л
Девочки (n-4)	12,85 ▲▲▲	12,9 ▲▲▲	5,77 ▲	3,22 ▲▲	1,68 ▼
Мальчики (n-4)	18,85 ▲▲▲	10,0 ▲▲	3,86	2,20 ▲▲	1,43 ▼
Группа исследования (n-8)	15,85 ▲▲▲	14,45 ▲▲	4,80	2,71 ▲▲	1,55 ▼

Из *Таблицы №1* видно, что по нашим данным во всей группе были повышены такие показатели углеводного обмена, как уровень гликемии и гликированный Нв, что и отражает заболевания СД. Нами было выявлено, что в группе девочек уровень гликированного Нв был значительно выше аналогичных показателей группы

мальчиков. А группа мальчиков отличалась повышенным в сравнении с девочками уровнем глюкозы.

Липидный обмен в группе исследования отличался нарушением соотношения ЛПНП\ЛПВП (так называемый «плохой\»хороший» холестерин) в сторону повышения ЛПНП. Именно этот факт дислипидемии является причиной образования сложнокристаллических регулярных фаз сыворотки крови по причине перенасыщения ее данной формой липидов. В последствие, откладываясь на стенке сосудов, они формируют сосудистый тромб, приводя к инсультам и инфарктам.

Нами было выявлено, что наиболее выраженные дислипидемические нарушения обнаружены в группе девочек, что отражает общую тенденцию к развитию сосудистых катастроф в большей степени частоты у женщин.

Отдельно надо отметить тот факт, что общий уровень ОХ в группе исследования не выходил за пределы допустимых значений. Однако, клинически значимым для формирования регулярных фаз кристаллов имеет место нарушение правильного соотношения ЛПНП \ ЛПВП.

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.

С целью подготовки препарата мы применяли зарекомендовавший стандартизированный и ранее применяемый нами способ. Способ подготовки микроскопического препарата представлен следующим образом: у пациента утром натощак забирается кровь из локтевой вены 5 мл, центрифугируется для получения сыворотки в течении 40 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 x70 и x150. 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, х56. Уровень общего холестерина 3,1 ммоль/л.
РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ. Невозможность регистрации регулярных фаз.

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.

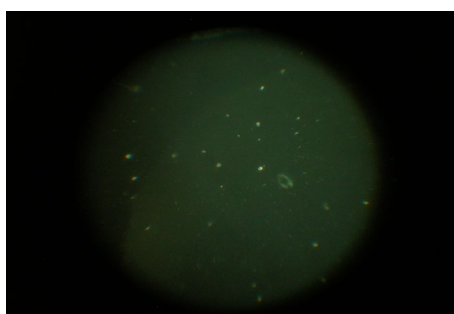


Рис.2. На данной микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете на однородном темном поле видны единичные светящиеся точечные структуры жидкокристаллической природы.
Вариант нормы. Время экспозиции 24 часа, х56. Уровень общего холестерина 3,1 ммоль/л.
РАННЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.

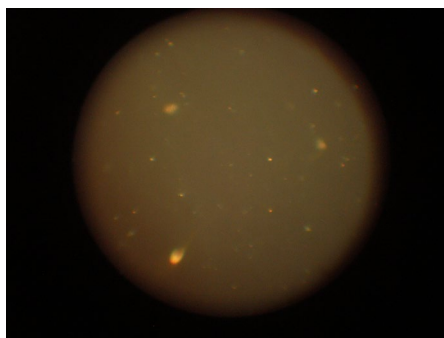


Рис.3. На данной микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете на однородном темном поле видны единичные светящиеся точечные структуры жидкокристаллической природы. Вариант нормы. Время экспозиции 24 часа, х56. Уровень общего холестерина 3,3 ммоль/л.

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 в группе детей с впервые выявленным СД 1 типа до лечения.

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. Особо выделяются сложные разветвленные фракталы,

сформировавшиеся по типу «мальтийский крест» - характеризуются фрактальным ростом от центра.

Ниже нами представлены собственные наблюдения регистрации оптически активных регулярных фаз сыворотки крови у детей с впервые выявленным СД 1 типа при поступлении в состоянии гипергликемии.



Фото 5. Больной П. 11 лет 11 мес. СД 1 тип, впервые выявленный, ДО начала инсулинотерапии: глюкоза 10,8 ммоль\л. ОХ-6,36 ммоль\л ЛПНП-56,1%
Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация множественных «патологических» сложноскристаллических фаз.
Увеличение X56. **СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ.**

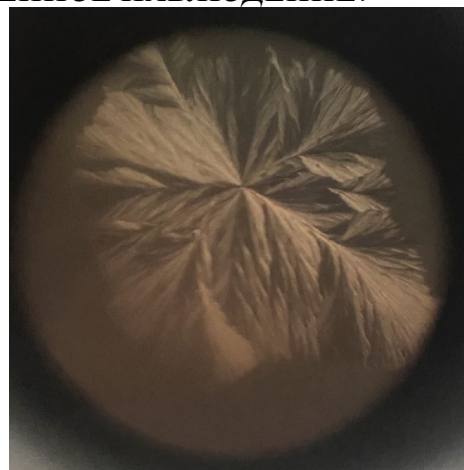
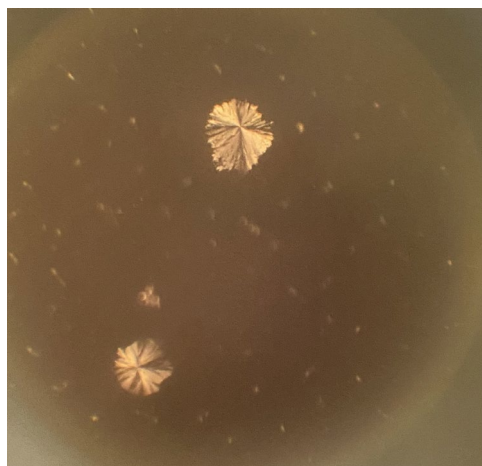


Фото 6. Больной Д. 14 лет 1 мес. СД 1 тип, впервые выявленный, ДО начала инсулинотерапии: глюкоза 14,5 ммоль\л. ОХ-3,71 ммоль\л ЛПНП-60,2%
Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация множественных «патологических» сложноскристаллических фаз.
Увеличение X56 и X280. **СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ.**

На *Фото 5, 6* представленной микроскопии сыворотки крови пациентов с впервые выявленным СД 1 типа, у которого отмечается высокая гипергликемия до начала лечения, подтвержденная высоким уровнем гликированного Нв нами обнаружены множественные регулярные фазы, образовавшиеся по типу "мальтийский крест" и представляющие собой жидкокристаллическую структуру, образовавшуюся вследствие перенасыщения сыворотки крови липидами низкой плотности при нормальном уровне ОХ.. Данный тип кристаллов является

представителем группы «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. Причиной образования данных структур является перенасыщенность липидами низкой плотности сыворотки крови вследствие нарушения метаболической функции печени и образования липидов из-за высокого уровня глюкозы крови. Таким образом, по уровню гликемии можно судить о риске тромбообразования.

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 уровня ОХ и при отсутствии клинических проявлений нарушения липидного обмена в обоих случаях.

2.4. Биохимический профиль группы исследования на фоне инсулинотерапии.

Единственным методом лечения СД 1 типа является заместительная инсулинотерапия. Инсулин компенсирует недостаток гормона инсулина в организме, снижая уровень глюкозы, которая перестает негативно влиять на клетки печени, которые начинают синтезировать «хороший» холестерин – ЛПВП. В силу своих физико-химических свойств высокомолекулярный липид не формирует регулярные фазы, на него не распространяются законы фрактального роста, в организме не формируются кристаллы липидов, что не грозит тромбообразованием

Динамика показателей углеводного и липидного обмена отображены в *Таблице 2.*

Таблица №2.

Биохимические показатели углеводного и липидного обмена в группе исследования (n-8) на фоне инсулинотерапии

	Глюкоза крови мМоль/л	Гликированный Нв %	ОХ	ЛПНП	ЛПВП
Девочки (n-4)	7,17 ▼▼	12,9 =	3,0 ▼	2,06 ▼	3,30 ▲
Мальчики (n-4)	7,16 ▼▼	10,0 =	4,01 ▼	2,4 ▼	5,0 ▲
Группа исследования (n-8)	7,16 ▼▼	14,45 =	3,50 ▼	2,23 ▼	4,15 ▲

Из *Таблицы №2* видно, что на фоне заместительной гормонотерапии (введение инсулина) во всей группе резко снизился уровень глюкозы крови сравнимо во всех гендерных группах, что повлекло нормализацию липидобразующей функции печени, выразившейся в нормализации соотношения ЛПНП/ЛПВП (так называемый

«плохой»\»хороший» холестерин) в сторону повышения ЛПВП и убедительного снижения липидов низкой плотности. Нормализация липидного профиля нами отмечена соизмеримо в одинаковой степени, как у мальчиков, так и у девочек.

Положительное влияние инсулинотерапии на липидный профиль при нормальном уровне ОХ подтверждается изменением микроскопической картины сыворотки крови в поляризованном свете.

2.5. Динамика микроскопии сыворотки крови в поляризованном свете в группе детей с впервые выявленным СД 1 типа на фоне инсулинотерапии.



Фото 5А. Больной П. 11 лет 11 мес. СД 1 тип, впервые выявленный, инсулинотерапия: глюкоза 8,8 ммоль/л. ОХ-5,39 ммоль/л ЛПНП-44,3%

Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация множественных линейных жидкокристаллических кристаллов и единичных сложнокристаллических фаз меньшего размера.

Увеличение X56. **СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ**

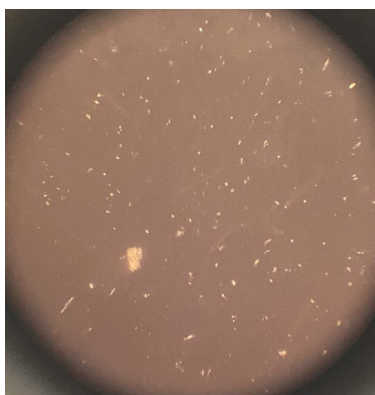


Рис. 6А. Больной Д. 14 лет 1 мес. СД 1 тип, впервые выявленный, инсулинотерапия: глюкоза 5,4 ммоль/л. ОХ-4,57ммоль/л ЛПНП-49,1%

Микроскопия сыворотки крови в поляризованном свете, время экспозиции препарата 24 часа. Регистрация множественных линейных жидкокристаллических кристаллов и единичных сложнокристаллических фаз меньшего размера.

Увеличение X56. **СОБСТВЕННОЕ НАБЛЮДЕНИЕ**

На фото 5А, 6А представлена микроскопическая поляризационная картина сыворотки крови больных с фото 5 и 6 на фоне лечения в виде убедительного снижения гликемического профиля (8,8 и 5,4 ммоль/л), снижения % ЛПНП (44,3 % и 49,2%) вследствие лечения - проведение замещающей инсулинотерапии. В динамике микроскопическая картина в поляризованном свете изменилась в сторону

регистрации допустимых множественных точечных и линейных жидкокристаллических структур и единичных сложнокристаллических фаз меньшего размера. Данная динамика свидетельствует о нормализации липидного обмена на фоне нормализации глюкозы крови и липидного профиля в сторону насыщения липидами низкой плотности.

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 доказанной эффективности назначения инсулинозамещающей терапии СД 1 типа у детей. Особенно это становится актуальным при современном росте заболеваемости СД у детей и повышении частоты случаев регистрации его осложнений в виде развития сосудистых катастроф во взрослом возрасте (инсульты и инфаркты).

Применяя законы оптической физики, становится возможным проследить законы кристаллического роста сыворотки крови в зависимости от уровня гликемии, влияющей на липидный профиль пациента а, следовательно, провести оценку эффективности назначенной инсулинотерапии и выстроить прогноз течения заболевания на долгие года.

В результате анализа ПМД (История Болезни-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 №3*.

Таблице №3.

Результаты липидного профиля детей с СД 1 типа до и во время инсулинотерапии

	Сахар крови (ммоль\л)		Гликированный Нв (%)	ОХС (ммоль\л)		ЛПНП (ммоль\л)		ЛПНП (% от ОХС)	
	до	Во время лечение		до	Во время лечение	до	Во время лечение	до	Во время лечение
Группа исследования	15,85 ▲▲▲ ▲	7,16 ▼▼	14,45 =	4,80	3,50 ▼	2,71	2,23 ▼	56,5 ▲▲	46,5 ▼▼ на 10,0%
норма	3,3-5,5		До 6	3.3-5.5		0,8-1,4		менее 25%	

Нами было выявлено, что уровень глюкозы крови и гликированного Нв на стадии манифестации заболевания у всех больных группы исследования были значительно повышены (соответственно 15,85 ммоль\л и 14,45%), что характерно для СД 1 типа у детей и взрослых. После назначения патогенетической инсулинотерапии нами выявлено, что уровень глюкозы и Гликированного Нв значительно снизился, но не достиг уровня нормы.

Липидный профиль в виде уровня ОХ не выходил за пределы нормальных значений, однако нами было выявлено нарушение соотношения ЛПНП\ЛПВП в сторону повышения ЛПНП относительно нормального процента его содержания – не более 25% от ОХ. Именно этот факт перенасыщения сыворотки крови ЛПНП и явился причиной формирования регулярных фаз в силу законов фрактального роста кристаллов. Данный липидный профиль может рассматриваться как риск развития липидных бляшек на стенках сосудов и является неблагоприятным фактором развития сосудистых катастроф в будущем.

Нами было отмечено, что в одном случае (пациент Д., 14 лет 1 месяц) на фоне проведения инсулинотерапии уровень изначального ОХ вырос на 0,86 г\л, но так и остался в пределах нормальных значений. Однако, соотношение ЛПНП к ОХ резко снизилось с 60,2% до 49,1%, что является благоприятным показателем эффективности проведения инсулинотерапии.

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 до и после инсулинотерапии предложен способ изучения фазового состава крови как критерий оценки эффективности инсулинотерапии в регуляции липидного обмена на раннем доклиническом этапе развития метаболических нарушений у детей с СД 1 типа.

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 профиля в группе детей с СД 1 типа при нормальном уровне ОХ на этапе манифестации заболевания 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 уровня гликемии на изменение физико-химических свойств крови и появление «патологических» регулярных фаз на этапе манифестации СД 1 типа у детей (уровень глюкозы крови 18,85 ммоль/л). При снижении глюкозы крови под воздействием инсулинотерапии нами были зарегистрированы изменения физико-химических свойств сыворотки крови в виде регистрации уменьшения количества и размеров сложных ветвистых регулярных фаз, регистрации единичных множественных точечных и единичных жидкокристаллических линейных регулярных фаз, которые рассматриваются как переходные от "патологических" регулярных фаз к "физиологическим" жидким кристаллам.

При поляризационной микроскопии сыворотки крови больных детей СД 1 типа до лечения регистрировались множественные «патологические» сложные разветвленные 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 случае развития стойкой гипергликемии.

В результате работы нами была выявлена зависимость качества сформированных сложнокристаллических структур по типу "мальтийский крест" от уровня гликемии: на раннем этапе развития СД 1 типа у детей (в нашем исследовании до 1 месяца клинических проявлений) формируются множественные сложнокристаллические разветвленные кристаллы объединенные в группы с формированием структуры по типу "мальтийский крест". После начала инсулинотерапии и снижения уровня глюкозы почти в 2 раза поляризованная микроскопия сыворотки крови изменилась в сторону регистрации меньшего количества и уменьшение размера сложных структур жидкокристаллической природы с регистрацией допустимых точечных и линейных регулярных фаз, что свидетельствует о нормализации физико-химических свойств крови у детей и является оценкой эффективности инсулинотерапии.

Нами отмечено, что гендерная принадлежность не влияла на характер изменений структур крови и формирование регулярных структурных фаз при СД у детей как до, так и после начала инсулинотерапии.

ВЫВОДЫ

В исследовательской работе в результате обследования 8 детей подростков в возрасте от 11 до 15 лет с впервые выявленным сахарным диабетом 1 типа без сопутствующей хронической патологии при нормальных показателях уровня ОХ нами выявлено изменение физико-химических свойств сыворотки крови в зависимости от нормализации уровня гликемии на фоне заместительной инсулинотерапии, что может служить оценкой эффективности ее назначения.

1. У всех детей из обследованной группы (100%) в возрасте от 11 до 15 лет с впервые выявленным СД 1 типа без сопутствующей хронической патологии печени биохимические нарушения затрагивали лишь изменение соотношения ЛПНП/ЛПВП в сторону повышения % содержания ЛПНП более 25% при нормальных значениях ОХ-4,1 ммоль\л.
2. Нами выявлено, что в группе исследования детей больных СД 1 типа в возрасте от 11 до 15 лет без сопутствующей хронической патологии печени изменения физико-химических свойств крови затрагивают морфологию возникающих путем фрактального роста кристаллов (100% обследованных группы). В группе детей на этапе манифестации СД 1 типа и высоким уровнем гликемии 15,58 ммоль\л в препарате регистрируются множественные сложные разветвленные жидкокристаллические полихромные регулярные фазы, сформировавшиеся по типу "мальтийский крест".
3. В результате работы нами выявлено следующее: в группе детей с СД 1 типа на фоне проводимой инсулинотерапии уровень гликемии снизился до 7,16 ммоль\л, доля ЛПНП снизилось с 51,5% до 34,5% в группе от общего содержания ОХ. в препарате регистрируются множественные сложные разветвленные жидкокристаллические полихромные регулярные фазы, сформировавшиеся по типу "мальтийский крест".
4. В группе исследования на этапе проведения инсулинотерапии и снижение уровня гликемии до 7,16 ммоль\л в препарате регистрируются множественные точечные регулярные фазы, единичные полихромные жидкокристаллические структуры, что является признаком нормализации физико-химических свойств сыворотки крови следствии нормализации концентрации ЛПНП и липидного обмена.
5. 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).
6. Выведена прямая зависимость применения инсулинотерапии у детей с СД 1 типа 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» и нормализации морфологической структуры в результате терапии.

7. 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 служит исследовательской находкой и подтверждает результаты прошлых изысканий моих юных коллег.**

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в результате представленной научной работы данные позволяют применять поляризационную микроскопию сыворотки крови у детей с СД 1 типа как физико-химический критерий оценки эффективности назначенной инсулинотерапии посредством проведения поляризационной микроскопии с определением количества и морфологии образовавшихся жидкокристаллических структур в препарате и их характеристик.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. с. 1209168 Украина, МКИ, Поляризационное оптическое исследование фазового состава желчи / Е.В. Кононенко, Е.В. Залецкий, В.М. Лисиенко, 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/
9. <http://www.michurin.net/online-tools/mandelbrot.html>
10. https://www.probl-endojournals.ru/jour/article/view/10927?locale=ru_RU