

БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 613.98/612.67/.68

ИЗМЕНЕНИЕ СВОЙСТВ КЛЕТОК КРОВИ У ЛЮДЕЙ С ОСТРОЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В СТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ. СХОДСТВА И РАЗЛИЧИЯ С БИОЛОГИЧЕСКОЙ "МОДЕЛЬЮ" НА ЖИВОТНЫХ

Забиняков Н.А.¹, Довгий П.Г.¹, Полторацкий А.Н.², Азаров К.С.³

1. ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород, Россия, e-mail: nzabinyakov@gmail.com

2. ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, г. Санкт-Петербург Россия, e-mail: e-mail: nzabinyakov@gmail.com

3. «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург Россия, e-mail: nzabinyakov@gmail.com

Своевременное распознавание степени влияния гипоксического фактора на организм позволит повысить эффективность терапии, прогнозировать тяжесть заболевания и избежать неблагоприятных последствий для организма. Напрямую установить достоверное влияние гипоксии на организм человека в условиях медицинских учреждений представляется сложной задачей. Цель исследования - изучить возможность применения биологической «модели» для изучения структурно-функциональных свойств клеток крови у людей с пневмонией в старческом возрасте. В данной работе выдвинуто предположение, что экспериментальная «модель» острой гипоксии-гиперкапнии на животных может отражать сходные изменения некоторых параметров крови у людей в условиях острой недостаточности кислорода, которая возможна при острой пневмонии. Все измерения проведены с использованием высокочувствительных сканирующих микроскопов.

Ключевые слова: биологическая модель, сканирующая силовая микроскопия, модуль Юнга, пневмония.

ALTERATIONS OF BLOOD CELLS' PARAMETERES FROM PATIENTS OF SENILE AGE WITH ACUTE PNEUMONIA. SIMILARITIES AND DIFFERENCES BETWEEN PATIENTS AND ANIMAL BIOLOGICAL "MODEL"

Zabinyakov N.A.¹, Dovgiy P.G.¹, Poltoratskiy A.N.², Azarov K.S.³

¹. Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

². N.N. Petrov's Institute of Oncology, Saint Petersburg, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

³. St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia,
e-mail: nzabinyakov@gmail.com

Appropriate timely detection of the hypoxic influence on the body increases the therapy effectiveness, predicts the severity of the disease and helps to avoid harmful consequences for the body. It seems to be a difficult task to directly establish significant effect of hypoxia on the human body in hospitals. The purpose of the study - to explore the possibility of using biological "model" for the study of structural and functional properties of red blood cells in people with pneumonia in old age. In this paper, we suggested the experimental "model" of acute hypoxia in animals may reflect similar changes of blood parameters in patients with acute oxygen deficiency, which accompanies acute pneumonia. All measurements were taken using highly sensitive scanning microscopes.

Key words: biological model, scanning force microscopy, Young's modulus, pneumonia.

Введение. Изучение такого заболевания как внебольничная пневмония (далее пневмония) касается не только задач пульмонологии и физиологии [2], но и практически всех разделов клинической медицины [8]. Согласно ряду работ пневмония характеризуется высокой частотой летальных исходов среди населения во всем мире [14, 15, 16]. Особую опасность представляет пневмония для людей старческого возраста, которая может вызывать неблагоприятный эффект дефицита кислорода в клетках и тканях [6]. В медицинских учреждениях возможности для выявления степени влияния гипоксии на организм людей старческого возраста ограничены. Использование новых методов и "моделей" для изучения механизмов клеточных реакции при

гипоксии, позволит получить дополнительные диагностические и прогностические критерии оценки степени тяжести заболевания [7, 11]. В настоящей работе представлены результаты атомно-силовой микроскопии (АСМ), которая является высокочувствительным методом исследования клеток.

Результаты, полученные в исследовании клеток крови животных (биологическая модель), вероятно, отражают такую же тенденцию изменений значений структурно-функциональных параметров клеток крови человека, свидетельствующих о влиянии гипоксического стресс-фактора на организм. Важно отметить, что при пневмонии на изменение клеточных параметров пациентов оказывает влияние бактериальный фактор. Использование биологической «модели» позволит продемонстрировать влияние гипоксии, как основного фактора, на изменения характеристик эритроцитов крови людей.

Цель исследования - изучить возможность применения биологической «модели» для изучения структурно-функциональных свойств клеток крови у людей с пневмонией в старческом возрасте. Для решения цели были поставлены следующие задачи: 1) выявить изменения параметров клеток крови при воздействии гипоксии на организм животных; 2) определить изменения тех же параметров крови при пневмонии у людей старческого возраста и исключить влияние бактериологического фактора на параметры клеток крови у людей при пневмонии; 3) сравнить полученные данные в эксперименте на животных с данными, полученными при работе с кровью людей; 4) на основе разработанной «модели» определить прогностические критерии развития болезни.

Эксперименты были проведены на базе НИЛ «Физиология адаптационных процессов» НИУ «БелГУ» и пульмонологического отделения «Городской клинической больницы №1» города Белгорода. Вся работа была разделена на два крупных этапа: исследование на животных для выявления общих закономерностей изменения параметров клеток крови при экспериментальной гипоксии; исследование клеток крови людей старческого возраста с пневмонией.

Работа с кровью животных. Работа с животными проводилась в соответствии с принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, изложенным в директиве Европейского сообщества (86/609/2008) и «Этических правил проведения биомедицинских исследований» [12]. Объектом исследования были эритроциты и нейтрофилы периферической крови 48 беспородных лабораторных

самцов крысы серой (*Rattus norvegicus*). Крыс содержали в стандартных клетках в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 19-21°C и относительной влажности воздуха 30-70%. Животные получали стандартный пищевой рацион (ПК-120-1) и воду, в соответствии с ГОСТ «Вода питьевая» [1]. До начала эксперимента крыс содержали в течение 10 дней для адаптации при групповом (по пять особей) размещении в клетках, контролируя состояние путем визуального осмотра. По истечении срока адаптации формировали опытную, контрольную и интактную группы по 16 особей в каждой. Животных распределяли случайно, используя в качестве основного критерия массу тела так, чтобы различия по этому показателю между особями не превышали 10%. Состояние острой гипоксии моделировали путем помещения животных в замкнутый сосуд объемом 750 см³ на 25 минут. Крыс контрольной группы содержали 25 минут в вентилируемых банках в стандартных условиях окружающей среды. С целью исключения влияния стресса, гиподинамии на реакцию клеток крови в условиях кислородного голодания, была создана интактная группа крыс, которых не подвергали воздействию, содержали в клетках при нормальных условиях среды. Забор крови проводили путем декапитации предварительно наркотизированных животных (ингаляционный наркоз диэтиловым эфиром). В качестве антикоагулянта использовали гепарин в количестве 10 Ед/мл.

Работа с кровью людей. Изучали параметры клеток крови 7 пациентов с пневмонией в возрасте от 80 до 84 лет. Были поставлены следующие диагнозы: 1) внебольничная левосторонняя нижнедолевая пневмония, тяжелое течение; 2) внебольничная левосторонняя верхнедолевая пневмония, тяжелое течение; 3) внебольничная левосторонняя очаговая нижнедолевая пневмония средней степени тяжести; 4) внебольничная двусторонняя полисегментарная пневмония, тяжелое течение; 5) внебольничная правосторонняя верхнедолевая очаговая пневмония в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких, тяжелое течение; 6) внебольничная двусторонняя нижнедолевая пневмония, тяжелое течение; 7) внебольничная левосторонняя нижнедолевая пневмония средней степени тяжести. Контрольными были клетки крови 10 здоровых людей такого же возраста. Забор крови производился из вены в количестве 3 мл. Забор крови осуществлял квалифицированный медперсонал пульмонологического отделения МБУЗ «Городской клинической больницы №1» г. Белгорода у вновь поступивших людей с выраженными

признаками обострения заболевания. Интервал между поступлением больного и забором крови составлял не более 40 минут.

Материал и методы исследования. Методы разделения, пробоподготовки и сканирования форменных элементов животных и человека были идентичными. Разделение на лейкоциты и эритроциты осуществляли путем центрифугирования 10 мин при 1500 об/мин. Собирали слой лейкоцитов, в котором примесь эритроцитов разрушали 0,83% раствором хлорида аммония. Суспензии лейкоцитов и эритроцитов дважды отмывали изотоническим буферным раствором (раствор Дульбекко, pH=7,4). СОЭ измеряли по методу Вестергрена, pH крови измеряли лабораторным pH-метром «pH 827 lab» (Metrohm, Швейцария). Изучение структурно-функциональных свойств клеток крови осуществляли на атомно-силовом микроскопе «NTEGRA Vita» (NT-MDT, г. Зеленоград, Россия, конфигурация на базе инвертированного оптического микроскопа «Olympus IX-71», Япония). Сканирование проводили в полуконтактном режиме с использованием кантилеверов марки NSG, CSG (Nanoworld, USA), жесткость которых не превышала 0,5 Н/м. Препараты для сканирования готовили на чистых обезжиренных стеклянных подложках, которые помещали во влажную камеру, для сохранения нативных свойств клеток [9]. В каждой серии эксперимента в полуконтактном режиме сканировали по 30 нейтрофилов, и 50 эритроцитов согласно разработанному «Способу исследования нативных клеток крови» [9].

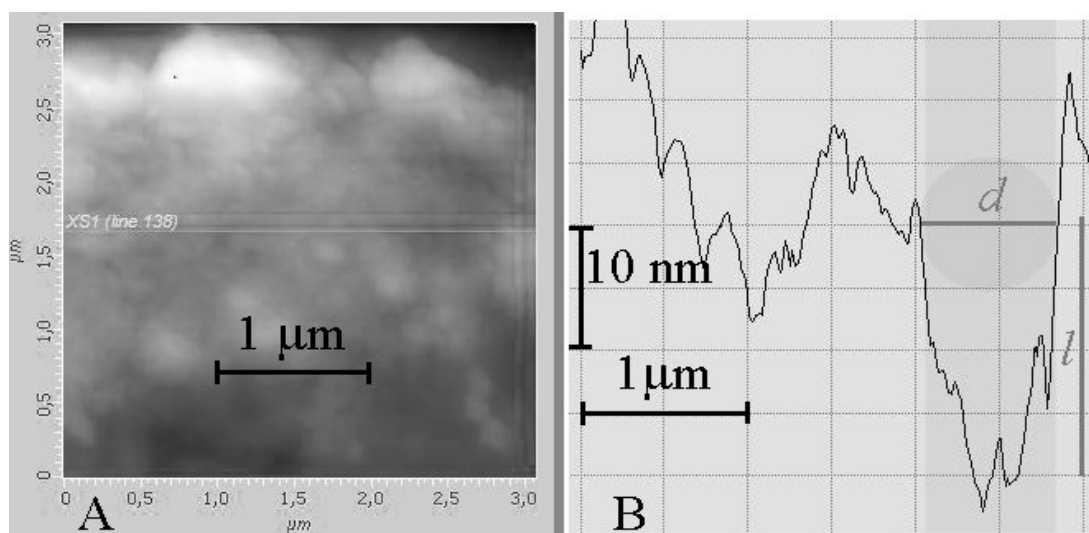


Рисунок 1. Область сканирования эритроцита 3x3 μm (A) и профиль сечения (B).

Затемненная область – зона углубления, d – диаметр, l – глубина.

Ультраструктуру изучали на участках клеточной поверхности площадью $3 \times 3 \mu\text{m}$ как показано (Рис. 1). Подсчитывали количество и размеры углублений. За углубления принимали воронкообразные понижения поверхности в верхней части клетки.

Упруго-эластические свойства (модуль Юнга, далее МЮ) поверхности клеток измеряли в режиме силовой спектроскопии, в основе которого лежит оценка степени деформации поверхности образца при взаимодействии его с зондом [5]. Регистрацию МЮ производили с использованием модифицированного кантилевера на основе полимерных микросфер, прикрепленных к типлессу серии CSG 11, согласно «Способу определения упругости клеток крови» [10].

Для исследования электрических свойств поверхности клеток крови работу проводили в режиме Кельвина с использованием зонда с токопроводящим титановым покрытием серии NSG03/TiN. Поверхностный потенциал (ПП) оценивали исходя из его градиентного распределения на СЗМ-скане. Для измерения ПП готовили мазки из эритроцитарной массы на специальной обезжиренной металлической подложке.

Для анализа полученных сканов использовали приложения «Nova»; «Gwyddion», распространяемое по GNU лицензии. Результаты экспериментальных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета анализа «Microsoft Excel 14», «Statistica 6.0». Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования их обсуждение. В результате исследования ультраструктуры поверхности эритроцитов опытной группы выявлено наличие углублений, в то время как особенностей в рельефе клеток контрольной и интактной групп не обнаружено. Данные ультраструктуры клеточной поверхности представлены (табл. 1, 2). Гипоксическое воздействие привело к увеличению диаметра углублений мембраны красных клеток крови крыс на 67% и 71% ($p < 0,05$), снижению их глубины на 37% и 40% ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контрольной и интактной группами (табл. 1.).

Среднее количество углублений на поверхности эритроцитов опытной группы увеличилось на 33% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем и на 38% ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой.

Таблица 1.

Количество и размер углублений на поверхности эритроцитов крыс

Параметр Группы	Углубления		
	кол-во	d, nm	l, nm
Интактная	1,6±0,4	0,6±0,1	6,2±1,2
Контрольная	2,1±0,4	0,7±0,1	5,9±1,3
Опытная	4,5±0,5* **	2,1±0,5* **	3,7±0,3* **

d – диаметр; l – глубина;

* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$;

** – достоверность различий по сравнению с интактной группой при $p < 0,05$.

МЮ и ПП клеток крови крыс представлен в Таблице 2.

Таблица 2.

Модуль Юнга эритроцитов и нейтрофилов ($\square Pa$) и потенциал поверхности эритроцитов (mV) интактной, контрольной и опытной групп животных

Параметр Группы	МЮ		ПП
	Эритроциты	Нейтрофилы	Эритроциты
Интактная	2,01±0,17	1,66±0,14	-14±3
Контрольная	1,95±0,14	1,65±0,16	-11±1
Опытная	2,57±0,22* **	1,72±0,21	-25±4* **

* – достоверность различий по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$;

** – достоверность различий по сравнению с интактной группой при $p < 0,05$.

МЮ эритроцитов опытной группы животных достоверно отличался от показателя в интактной и контрольной группе животных на 23% и 24% ($p < 0,05$) соответственно. Между интактной и контрольной группами не было отмечено достоверных различий. МЮ эритроцитов крови крыс, не подвергавшихся воздействию, составлял $1,96 \pm 0,16$ μPa ($M \pm m$). МЮ нейтрофилов во всех группах был равен $1,7 \pm 0,24$ μPa ($M \pm m$).

Минимальный заряд поверхности эритроцитов был отмечен в опытной группе животных и его достоверные различия от интактной и контрольной групп при $p < 0,05$ составляли 56% и 44% соответственно. Достоверных различий между МЮ интактной и контрольной группами не было.

Таким образом, стрессовое состояние и гиподинамия животных при пребывании в вентилируемом сосуде практически не отражается на изменениях параметров эритроцитов. Гипоксия оказывает влияние на структуру поверхности эритроцитов, а также на механические и электрические параметры клеточной поверхности, такие как МЮ и ПП. Установленные изменения рельефа эритроцитов в опытной группе, проявляющиеся в приобретении шероховатости, вероятно, является следствием нарушений в системе их антиоксидантной защиты в условиях кислородного голодания [19]. Воронкообразные углубления на поверхности эритроцитов представляют собой каналы-переносчики [2], не исключено, что изменение их размеров и увеличение количества свидетельствует о преобразовании метаболических процессов в клетки под действием острой гипоксии [2, 19]. Известно, что при сепсисе эритроциты приобретают гладкую сферическую форму [13, 17], эритроциты крыс экспериментальной, контрольной и интактной групп в наших исследованиях имели правильную двояковогнутую форму с видимыми углублениями.

При крупных очагах воспаления в организме существенно уменьшается жесткость клеточной мембраны нейтрофилов [18, 20]. Такое изменение связано с активацией нейтрофилов и необходимо для их последующей миграции в ткани из сосудов [18, 20]. В нашем эксперименте на крысах МЮ нейтрофилов не претерпевал изменений, что является аргументом в пользу отсутствия инфекционного влияния на организм опытной группы животных. Об отсутствии инфекционных заболеваний также свидетельствует СОЭ крыс, которая составляла в среднем $4 \pm 0,3$ мм/час. Не следует забывать, что при гипоксии рН крови уменьшается (ацидоз). Среднее значение

pH крови крыс, подвергшихся воздействию острой гипоксии, составляло $7,36 \pm 0,03$ ($M \pm m$), в контрольной группе – $7,41 \pm 0,02$ ($M \pm m$).

Предполагая, что изменения клеточных параметров крови человека при пневмонии сходны с вышеописанными «модельными» изменениями (или «моделью») в опытах на животных, имеет смысл говорить о влиянии на эритроциты человека гипоксического фактора как основного при пневмонии. Полученные с помощью СЗМ параметры клеток крови людей представлены (табл. 3.).

У всех людей отмечались признаки, типичные для инфекционного заболевания: лейкоцитарная формула была смещена влево, скорость оседания эритроцитов повышена и составляла 24 ± 2 mm/hr ($M \pm m$).

Таблица 3.

Клеточные параметры крови людей опытной и контрольной групп

Контроль			Опыт		
Углубления на поверхности эритроцитов					
кол-во	d, nm	l, nm	кол-во	d, nm	l, nm
1,4±0,3	0,5±0,1	6,2±2,0	2,2±0,7	0,5±0,1	6,7±1,8
Модуль Юнга, μPa ($M \pm m$)					
Эритроциты	Нейтрофилы		Эритроциты	Нейтрофилы	
1,87±0,34	1,01±0,12		2,75±0,46*	0,71±0,22*	
Потенциал поверхности эритроцитов, mV ($M \pm m$)					
-4±1			-9±3*		
pH крови ($M \pm m$)					
7,40±0,02			7,37±0,02		
СОЭ ($M \pm m$), mm/hr					
14,5±1,5			24±2*		

* - достоверность различий по сравнению с контрольной группой при $p < 0,05$

Тенденция изменения архитектоники поверхности эритроцитов у людей с пневмонией не позволяет судить о влиянии гипоксии на количество и размер

углублений. Вероятно, влияние оказывается как бактериальное, так и гипоксическое. Однако МЮ эритроцитов в опытной группе увеличился на 32% ($p < 0,05$), ПП – уменьшился на 56% ($p < 0,05$), а рН крови сместился в кислую сторону по сравнению с контрольной группой. Вероятно, инфекционное влияние отразилось на уменьшении на 30% ($p < 0,05$) МЮ нейтрофилов пациентов с пневмонией [18, 20]. В доступных нам литературных источниках не встречалось данных о бактериальном влиянии на МЮ и ПП эритроцитов человека. Анализ результатов, полученных в рамках первого и второго этапов исследований, показывает, что тенденция изменений значений МЮ и ПП эритроцитов в опытной группе людей повторяет такую же в опыте на животных.

Выводы. Показано, что гипоксия вызывает изменение ультраструктуры мембраны эритроцитов крыс. Количество углублений достоверно увеличилось от 1,6 до 4,5, также изменились их линейные размеры. Установлено, что воздействие острой гипоксии на крыс ведет к достоверному увеличению МЮ эритроцитов от 2,01 до 2,57 μPa , при этом ПП уменьшается от -11 до -25 mV. Предположительно подобные изменения механических и электрических свойств красных клеток крови возможно расценивать как критерий, указывающий на «гипоксическое» влияние.

Вероятно, на эритроциты крови людей с пневмонией оказывается смешанное влияние как бактериального, так и гипоксического факторов.

У людей с пневмонией в старческом возрасте достоверно увеличился МЮ эритроцитов от 1,87 до 2,75 μPa , а ПП уменьшился от -4 до -9 mV, что повторяет тенденцию «гипоксических» («модельных») изменений у животных.

Продемонстрированную биологическую «модель» гипоксии возможно использовать для диагностирования изменений функциональных свойств эритроцитов под действием гипоксии у людей с пневмонией. Увеличение вероятности благополучного исхода заболевания при использовании таких дополнительных инструментов диагностики выше, так как позволяет скорректировать тактику лечения, направляя ее не только на устранение основной патологии, но и на предотвращение возникновения сопровождающих осложнений, что особенно актуально в старческом возрасте.

Список литературы.

1. ГОСТ «Вода питьевая» 2874-82.
2. Грищенко В.И. Проблемы криобиологии / Ред. Института проблем криобиологии и криомедицины. - НАН Украины, 2002. – 164 с.
3. Забиняков Н.А. Особенности морфологии и механических изменений эритроцитов и нейтрофилов у больных разных возрастных групп с хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой / Н.А. Забиняков, К.И. Прощаев, П.Г. Довгий [и др.]. // Успехи геронтологии. – 2013. – Т. 25, №. 2. - С. 373 - 378.
4. Калиева К.Д. Обмен липидов, статус перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы на фоне острой гипоксии при введении ноотропов: экспериментальное исследование: Дис. докт. биол. наук. – Актобе. 2002. –417 с.
5. Лебедев Д.В. Измерение модуля Юнга биологических объектов в жидкой среде с помощью специального зонда атомно-силового микроскопа / Д.В. Лебедев, А.П. Чукланов, А.А. Бухареаев // Письма в ЖТФ. – 2009. – Т. 35, №. 8. – С. 54 - 61.
6. Панева М.А. Клинико-иммунологическая характеристика внебольничной пневмонии у больных пожилого и старческого возраста: Дис. канд. мед. наук. – Омск. 2009. - 133 с.
7. Попова И.Е. Изучение структурных свойств эритроцитов крови новорожденных при оксидативном стрессе, вызванном гипоксией: Дис. канд. биол. наук. – Воронеж. 2007. - 250 с.
8. Свистунов В.В. Современная характеристика крупозной пневмонии по материалам патологоанатомических вскрытий: Дис. канд. мед. наук. – С.-П.. 2010. – 120 с.
9. Федорова М.З. Способ исследования нативных клеток / М.З. Федорова, М.Ю. Скоркина, С.Д. Чернявских, Е.А. Сладкова, Н.А. Забиняков // Патент России № 2009125268/15 27.08.2010.
10. Скоркина М.Ю. Способ определения упругости клеток крови / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, Н.А. Забиняков, Е.А. Сладкова // Патент Росси № 2466401.2012 10.11.2012.

11. Шереметьев Ю.А. Морфо-физиологический анализ механизмов La^{3+} -индуцируемых агрегации и слияния эритроцитов: Дис. докт. биол. наук. – Н. Новгород, 2007. – 154 с.
12. Этическая экспертиза биомедицинских исследований: Практические рекомендации / [под редакцией Ю.Б. Белоусова]. - М.: Российское общество клинических исследователей, 2005.
13. Baskurt O.K. Red blood cell deformability in sepsis. American / O.K. Baskurt, D. Gelmont, H.J. Meiselman // Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. - 1998. - Vol. 57, № 2. - P. 421 -427.
14. Eisner M.D. Airway pressures and early barotraumas in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome / M.D. Eisner, B.T. Thompson, D. Schoenfeld [et all.]. // Am. J. Respir. Crit. Care Medicine. - 2002. - № 165. - P. 978 - 982.
15. Esteban A. Prospective randomized trial comparing PCV and VCV in ARDS / A. Esteban // Chest. - 2000. - № 117. - P. 1690 - 1696.
16. Mang H. Cardiorespiratory effects of volume- and pressure-controlled ventilation at various I:E ratios in an acute lung injury model / H. Mang, R.M. Kacmarek, R. Ritz [et all.]. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 1995. - № 151. - P. 731 - 736.
17. Piagnerelli M. Neuraminidase alters red blood cells in sepsis / M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, A. Rapotec [et all.]. // Critical Care Medicine. - 2009. - Vol. 37, № 4. - P. 1244 - 1250.
18. Pick R. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation / R. Pick, D. Brechtefeld, B. Walzog // Molecular Immunology. – 2013. – Vol. 55, № 1. – P. 70 - 75.
19. Sato Y. Characterization of the anion transport channel protein in human erythrocytes. Induced circular dichroism of inhibitors bound to the anion transport channel. (republished) / Y. Sato, T. Chiba, Y. Suzuki // Biochim Biophys Acta. - 2006. - Vol. 856, № 1. - P. 11 - 18.
20. Wagner J.G., Roth R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature / J.G. Wagner, R.A. Roth // Pharmacological Review. – 2000. – Vol. 52, № 3. P. 349 - 374.

References.

1. GOST «Voda pitievaya» (Drinking Water).
2. Grishhenko V.I. *Problemy kriobiologii* [Problems of cryobiology]. Ukraine, 2002. 164 p.
3. Zabinyakov N.A., Prashchayeu K.I., Dovgiy P.G., Poltorackiy A.N., Ryzhak G.A. *Uspehi gerontologii*. 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 373 - 378.
4. Kalieva K.D. Obmen lipidov, status perekisnogo okislenija lipidov i antioksidantnoj sistemy na fone ostroj gipoksii pri vvedenii nootropov: jeksperimental'noe issledovanie: *Dis. dokt. med. nauk*. Aktobe. 2002. 417 p.
5. Lebedev D.V., Chuklanov A.P., Buhareaev A.A. *Pis'ma v ZhTF*. 2009, Vol. 35, no. 8, pp. 54 - 61.
6. Paneva M.A. Kliniko-immunologicheskaja harakteristika vnebol'nichnoj pnevmonii u bol'nyh pozhilogo i starcheskogo vozrasta: *Dis. kand. med. nauk*. Omsk. 2009. 133 p.
7. Popova I.E. Izuchenie strukturnyh svojstv jeritrocitov krovi novorozhdennyh pri oksidativnom stresse, vyzvannom gipoksiej: *Dis. kand. biol. nauk*. Voronezh. 2007. 250 p.
8. Svistunov V.V. Sovremennaja harakteristika krupoznoj pnevmonii po materialam patologoanatomicheskikh vskrytij: *Dis. kand. med. nauk*. Saint-Petersburg. 2010. 120 p.
9. Fedorova M.Z., Skorkina M.Ju., Chernjavskih S.D., Sladkova E.A., Zabinyakov N.A. *Patent Rossii* 24664001 27.08.2010.
10. Skorkina M.Ju., Fedorova M.Z., Zabinyakov N.A., Sladkova E.A. *Patent Rossii* 2466401 10.11.2012.
11. Sheremet'ev Ju.A. Morfo-fiziologicheskij analiz mehanizmov La³⁺-induciruemyh agregacii i slijanija jeritrocitov: *Dis. kand. med. nauk*. N. Novgorod. 2007. 154 p.
12. Belousova Ju.B. *Jeticheskaja jekspertiza biomedicinskih issledovanij. Prakticheskie rekomendacii* [Ethical Review of Biomedical Research: Best Practices]. Moscow, 2005.
13. Baskurt O.K., Gelmont D., Meiselman H.J. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1998, Vol. 57, no. 2, pp. 421 - 427.
14. Eisner M.D., Thompson B.T., Schoenfeld D. [et all.]. *Am. J. Respir. Crit. Care Medicine*. 2002, Vol. 165, P. 978 - 982.
15. Esteban A. *Chest*. 2000, no. 117, pp. 1690 - 1696.
16. Mang H., Kacmarek R.M., Ritz R. [et all.]. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1995, no. 151, pp. 731 - 736.

17. Piagnerelli M., Boudjeltia K.Z., Rapotec A. [et all.]. *Critical Care Medicine*. 2009, Vol. 37, no. 4, pp. 1244 - 1250.
18. Pick R., Brechtefeld D., Walzog B. *Molecular Immunology*. 2013, Vol. 55, no. 1, pp. 70 - 75.
19. Sato Y., Chiba T., Suzuki Y. *Biochim Biophys Acta*. 2006, Vol. 856, no. 1, pp. 11 - 18.
20. Wagner J.G., Roth R.A. *Pharmacological Review*. 2000, Vol. 52, no.3, pp. 349 - 374.