



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

ВЛИЯНИЕ ИМПУЛЬСНОГО НИЗКОЧАСТОТНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ПОЛЯ НА СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ

Иванова А.О., ^{1,2} Обрубов С.А., ¹ Румянцев С.А., ^{1,4} Свирчевский И.В., ^{1,3} Ключников С.О., ¹ Кузнецова Е.А., ¹ Демидова М.Ю., ^{1,2} Хан М.А., ³ Богинская О.А.

¹ ГОУ ВПО РГМУ им. Н. И. Пирогова Росздрава,

² ФГУ «Поликлиника № 4» Управления делами Президента РФ,

³ Детская городская клиническая больница №13 им. Н.Ф.Филатова, Москва, Россия,

⁴ ФГУ ФНКЦ ДГОИ Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

Введение

Состояние здоровья человека в значительной степени зависит от полноценности функционирования иммунной системы. Иммунная система обеспечивает нормальную работу и зрительного анализатора посредством сохранения антигенного постоянства микроструктур органа зрения и его функциональных компонентов [1].

У детей школьного возраста в 20,3% случаев встречается приобретенная близорукость различной величины. Из них в 92,6% случаев отмечена близорукость, сочетающаяся с разнообразной экстраокулярной патологией [2]. Имеются данные, указывающие, что у лиц с близорукостью в 58,5–70,0% случаев отмечены клинические признаки вторичного иммунодефицитного состояния, в 75% случаев выявлению близорукости предшествовало наличие заболеваний, ассоциированных с вторичным иммунодефицитным состоянием [1]. Перспективным направлением в лечении близорукости, сочетающейся с экстраокулярной патологией, являются использование импульсного низкочастотного электромагнитного поля, которое дает возможность одновременного полифакторного воздействия на различные системы организма [2, 3].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния импульсного низкочастотного электромагнитного поля (ИНЭМП), генерируемого аппаратом ИНФИТА, на показатели иммунной системы крови животных с экспериментальной хронической воспалительной патологией.

Материал и методы исследования.

Исследование проведено на 15 кроликах породы шиншилла. Животные были разделены на две группы: контрольную (5 кроликов) и опытную (5 кроликов с моделированным хроническим гломерулонефритом с вторичным тубулоинтерстициальным нефритом и 5 кроликов с моделированным хроническим тонзиллитом). Воздействие ИНЭМП, генерируемым аппаратом ИНФИТА, осуществляли на область головы опытной группы животных дистанционно, через излучатель, расположенный на расстоянии 20–30 см от глаз, и напряженностью поля в зоне воздействия 1–2 мВ/см², с экспозицией поля на одной частоте в течение 9 минут, при этом частота следования импульсов ежедневно изменялась. Кровь забиралась из ушной вены кроликов контрольной и опытной группы животных (у опытной группы двукратно – до воздействия и после 10-дневного курса воздействия).

Подсчет клеток крови производился при помощи автоматического анализатора клеток крови ABX Pentra 60 C+ в режиме автоматической аспирации с определением гистограммы распределения лейкоцитов по объему, а также дифференцировки лейкоцитов по 3 параметрам – лимфоциты, нейтрофилы, моноциты.

Количество субпопуляций лейкоцитов определяли по экспрессии мембранных маркеров (CD – clusters of differentiation) в реакции прямой иммунофлюоресценции с моноклональными антителами CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD56 «Becton Dickinson», США при помощи проточной цитометрии на приборе FACSCalibur «Becton Dickinson», США.

Для количественного определения концентрации интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-8 (ИЛ-8) и фактора некроза опухоли-α (ФНО-α) в сыворотке крови проводилась реакция ИФА «сэндвич» типа. В качестве ферментных меток использовали пероксидазу.

Статистический анализ данных проводился с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение.

У животных опытной группы отмечались низкие показатели содержания лейкоцитов в крови ($3,15 \pm 0,19 \times 10^9$ г/л) по сравнению с контрольной группой ($3,64 \pm 0,07 \times 10^9$ г/л, $p < 0,05$). Снижение их уровня свидетельствует о снижении иммунной реактивности организма животных на фоне хронического воспаления [4]. После воздействия ИНЭМП наблюдается тенденция к повышению уровня лейкоцитов ($3,28 \pm 0,15 \times 10^9$ г/л) и приближение к показателю контрольной группы ($p = 0,05$).

При анализе содержания отдельных клеточных типов лейкоцитов выявлено перераспределение клеток внутри пула лейкоцитов у животных с моделированной хронической патологией после воздействия импульсным низкочастотным электромагнитным полем. Наиболее выраженные изменения касались моноцитов и нейтрофилов.

Относительное содержание моноцитов в единице объема крови в опытной группе животных до воздействия снижено, по сравнению с данным показателем у контрольных животных ($7,7 \pm 0,7\%$), и составляет $3,5 \pm 0,7\%$ ($p < 0,05$). После воздействия ИНЭМП относительное содержание моноцитов в крови животных повышается до $6,1 \pm 0,9\%$ ($p < 0,05$). Отмечено также и повышение абсолютного содержания моноцитов крови опытной группы после воздействия ИНЭМП – от $0,11 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л до $0,20 \pm 0,04 \times 10^9$ г/л ($p < 0,05$), приближаясь к уровню контрольной группы животных ($0,28 \pm 0,03 \times 10^9$ г/л).

Относительное содержание нейтрофилов в единице объема крови в опытной группе до воздействия ИНЭМП повышено ($56,2 \pm 0,9\%$), по сравнению с контрольной группой, и снижается до $50,6 \pm 1,4\%$ ($p < 0,05$) после воздействия ИНЭМП. Абсолютное количество нейтрофилов крови опытной группы животных также уменьшился с $1,77 \pm 0,10 \times 10^9$ г/л до $1,66 \pm 0,12 \times 10^9$ г/л ($p < 0,05$) (показатель в контрольной группе $1,93 \pm 0,06 \times 10^9$ г/л).

Снижение уровня лимфоцитов, обеспечивающих клеточный и гуморальный иммунитет, в крови животных с хронической патологией ($1,19 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л) по сравнению с контрольной группой ($1,37 \pm 0,03 \times 10^9$ г/л, $p < 0,01$) указывает на снижение иммунной реактивности. После воздействия ИНЭМП уровень лимфоцитов повышается до $1,27 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л, $p < 0,01$. Относительное содержание лимфоцитов в пуле лейкоцитов изменяется незначительно, имея тенденцию к повышению в опытной группе животных после воздействия ИНЭМП (с $37,8 \pm 1,9\%$ до $38,7 \pm 1,4\%$, $p > 0,05$).

Выявлены и изменения содержания субпопуляций лимфоцитов у опытной группы животных после воздействия ИНЭМП. Так, уровень Т-лимфоцитов (CD3+ клеток) повысился с $0,72 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л до $0,80 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л ($p < 0,05$), имея тенденцию к приближению к уровню контрольной группы животных ($0,95 \pm 0,04 \times 10^9$ г/л, $p < 0,05$). После воздействия ИНЭМП в пуле лимфоцитов достоверно ($p < 0,05$) повышается относительное содержание в единице объема крови NK-клеток с $11,0 \pm 0,6$ до $12,6 \pm 0,5\%$, Т-лимфоцитов-хелперов с $35,0 \pm 0,6$ до $36,9 \pm 0,9\%$.

Отмечено изменение и абсолютного содержания клеток в крови животных. Так, у опытной группы животных абсолютное содержание NK-клеток повышается с $0,08 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л до $0,16 \pm 0,03 \times 10^9$ г/л, $p < 0,05$, приближаясь к уровню у контрольной группы ($0,15 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л). Абсолютное количество Т-лимфоцитов-хелперов (CD3+CD4+ клеток) повысился с $0,34 \pm 0,05 \times 10^9$ г/л до $0,47 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л ($p < 0,05$), также имея тенденцию к приближению к уровню контрольной группы животных, равному $0,57 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л.

Однако абсолютное содержание Т-лимфоцитов-киллеров/супрессоров (CD3+8+ клеток) статистически достоверно не изменилось. У опытной группы животных до воздействия ИНЭМП этот показатель равен $0,27 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л, а после воздействия – $0,32 \pm 0,01 \times 10^9$ г/л (у контрольных животных – $0,38 \pm 0,03 \times 10^9$ г/л).

От соотношения Т-лимфоцитов-хелперов и Т-лимфоцитов-киллеров/супрессоров зависит эффективность иммунного ответа. При анализе этого соотношения у опытной группы животных после воздействия выявлено его повышение с $1,26 \pm 0,15$ до $1,47 \pm 0,01$ и приближение к таковому у контрольной группы животных ($1,50 \pm 0,05$), то есть нормализация дисбаланса CD4+ и CD8+ клеток с повышением хелперной активности Т-лимфоцитов [4].

Абсолютное количество В-лимфоцитов (CD19+ клеток), субпопуляции лимфоцитов, вырабатывающей антитела, посредством которых обеспечивается гуморальный иммунитет, в крови опытной группы животных не изменяется, составляя до воздействия ИНЭМП $0,27 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л, а после воздействия – $0,26 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л, $p > 0,05$ (в контрольной группе животных – $0,28 \pm 0,02 \times 10^9$ г/л). Отсутствие изменения уровня В-лимфоцитов может быть

связано с тем, что гуморальный иммунный ответ (пролиферация В-клеток и дифференцировка с выработкой антител) представляет собой кульминацию ряда клеточных и молекулярных взаимодействий [4], поэтому при настоящем исследовании их уровень, возможно, «не успел» измениться.

ИНЭМП оказывает воздействие и на концентрацию цитокинов в сыворотке крови опытных животных. Отмечено снижение концентрации интерлейкина-1 (ИЛ-1), интерлейкина-8 (ИЛ-8) и фактора некроза опухоли- α (TNF- α , ФНО- α) и приближение этих показателей к уровню у контрольных животных ($p > 0,05$).

Так, концентрация ИЛ-1 (цитокина, обладающего выраженным воспалительным и пирогенным действием) [4] у опытных животных снижается с $701,00 \pm 13,28$ пг/мл до $500,00 \pm 35,80$ пг/мл, $p < 0,05$ (в контрольной группе показатель равен $511,80 \pm 15,36$ пг/мл). Концентрация ИЛ-8 (цитокина, являющимся медиатором острой фазы воспалительной реакции и способствующий миграции нейтрофилов в очаг воспаления) [4] снижается с $327,00 \pm 1,73$ пг/мл до $198,00 \pm 8,66$ пг/мл, $p < 0,05$ (в контрольной группе показатель равен $187,00 \pm 8,77$ пг/мл). Концентрация ФНО- α , также являющегося провоспалительным цитокином [4], снижается с $4,20 \pm 0,70$ пг/мл до $2,50 \pm 0,20$ пг/мл, $p < 0,05$, и приближается к уровню контрольной группы животных – $1,82 \pm 0,21$ пг/мл.

Напротив, концентрация интерлейкина-4 (ИЛ-4), обладающего противовоспалительной активностью [4], после воздействия ИНЭМП повышается с $21,50 \pm 0,29$ пг/мл до $23,50 \pm 0,87$ пг/мл, $p < 0,05$, и также приближается ($p > 0,05$) к уровню контрольных животных – $21,75 \pm 1,11$ пг/мл.

Таким образом, импульсное низкочастотное электромагнитное поле, генерируемое аппаратом ИНФИТА, вызывает перераспределение клеток внутри пула циркулирующих в крови лейкоцитов, оказывает воздействие на содержание отдельных субпопуляций лимфоцитов и концентрацию цитокинов в крови животных с моделированной хронической патологией. Повышение содержания лейкоцитов, лимфоцитов с возрастанием хелперной активности Т-лимфоцитов и моноцитов в крови животных с моделью хронического воспаления после курса воздействия ИНЭМП свидетельствует об иммуностимулирующем действии данного физического фактора. Снижение уровня нейтрофилов, концентрации провоспалительных цитокинов, а также повышение уровня натуральных киллеров и концентрации противовоспалительного цитокина указывает на противовоспалительный эффект ИНЭМП. Полученные данные позволяют рекомендовать к включению импульсного низкочастотного электромагнитного поля, генерируемого аппаратом ИНФИТА, в комплекс средств для лечения заболеваний, ассоциированных с иммунодефицитным состоянием.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров С.А. Клинико-функциональные и иммунопатогенетические механизмы формирования усиления рефракции: Автореф. дисс. на соискание уч. степени д.м.н. – М., 2009. – 46 с.
2. Демидова М. Ю. Близорукость, сочетающаяся с соединительно-тканной дисплазией у детей (обоснование и эффективность нового метода лечения): Автореф. дисс. на соискание уч. степени к.м.н. – М., 2009. – 27 с.
3. Беспалюк Ю.Г. «Экспериментально-клиническое обоснование применения импульсного низкочастотного электромагнитного поля при сочетанных заболеваниях, объединенных недифференцированной дисплазией соединительной ткани»: Автореф. дисс. на соискание уч. степени к.м.н. – М., 2009. – 27 с.
4. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. – М. ООО «Медицинское информационное агентство». – 2006. – 536 с.

РЕЗЮМЕ

Авторами статьи изучено влияние импульсного низкочастотного электромагнитного поля, генерируемого аппаратом ИНФИТА, на иммунные показатели крови животных с экспериментальной хронической воспалительной патологией. Полученные данные свидетельствуют об иммуностимулирующем и противовоспалительном действии данного физического фактора. Это позволяет рассматривать применение импульсного низкочастотного электромагнитного поля как эффективный метод лечения заболеваний, ассоциированных с иммунодефицитным состоянием.

Ключевые слова: импульсное низкочастотное электромагнитное поле, иммунодефицит, хроническая воспалительная патология.

ABSTRACT

The authors study influence of pulse low-frequency electromagnetic field, generated by INFITA apparatus, on immunological indices of animals with experimental chronic inflammatory pathology. The data show immunostimulating and antiinflammatory



effect of this physical factor. It allows to consider the application of pulse low-frequency electromagnetic field like an effective method of treatment of disease, associated with immunodeficiency.

Key words: pulse low-frequency electromagnetic field, immunodeficiency, chronic inflammatory pathology.

КОНТАКТЫ

Иванова Алевтина Олеговна. Адрес: г. Москва, 121151, Кутузовский проспект, д. 20. тел. (499) 243 24 72; e-mail: ivanova_alevtina@list.ru

Кузнецова Елена Андреевна. Адрес: г. Москва, 117513, Ленинский проспект, д. 117 e-mail: lenoshka@mail.ru

Демидова Мария Юрьевна. Адрес: г. Москва, 121151, Кутузовский проспект, д. 20. тел. (499) 243 24 72; e-mail: demidova_maria@list.ru

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ОБ ОСНОВНЫХ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФАКТОРАХ ТРОМБОФИЛИИ

УДК 616-01/09

**Литвинова М.М., Субботина Т.И., Маклыгина Ю.Ю.,
Жученко Н.А., Филиппова М.Г., Филиппова Т.В., Асанов А.Ю.**
ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Введение.

Современные требования к уровню медицинской и медико-профилактической помощи населению требуют нового понимания и в этой связи новых глубоких клинико-генетических исследований, связанных с молекулярно-генетическими основами этиологии и патогенеза многофакторных заболеваний (МФЗ), привносящих наибольший удельный вес в структуру инвалидизации и смертности населения промышленно развитых стран мира.

Среди МФЗ, приобретающих наибольшую медико-социальную значимость, патология гемостаза, в том числе и тромбофилия (повышенная склонность к гиперкоагуляции и тромбообразованию), занимает одно из ведущих мест. Тем не менее, несмотря на впечатляющие успехи в изучении проблем гемостаза, остается мало изученной роль тромбофилий в патогенезе, особенностях клинических проявлений, спектра возможных осложнений, успешности терапии и исходах многих заболеваний. Не выяснена роль конкретных форм тромбофилий в возникновении собственно тромбофилических состояний, неясно протективное значение некоторых генетических «тромбофилических» дефектов и их взаимодействие на уровне конечного фенотипа и т.д.

В России ежегодно регистрируется более 400 тысяч инсультов, из них 70–80% приходится на ишемический инсульт. От инфаркта миокарда из 100 тыс. человек в нашей стране ежегодно умирает 330 мужчин и 154 женщины. Острые тромбозы глубоких вен и тромбофлебиты поверхностных вен нижних конечностей встречаются у 10–20% населения, осложняя течение варикозной болезни в 30–50% случаев [1, 2]. Особое значение проблема тромбоза приобрела в акушерстве и гинекологии. Исследования последних лет показали, что наличие тромбофилии у женщины сопряжено с повышенным риском развития таких осложнений беременности, как привычное невынашивание, фетоплацентарная недостаточность, внутриутробная задержка развития плода, поздний токсикоз (гестоз) и др.

Таким образом, высокая частота тромбозов и их осложнений обуславливает актуальность рассматриваемой темы и побуждает все большее число врачей и ученых изучать причины и искать пути профилактики данного вида патологии.

Материалы и методы исследования.

Генетические факторы системы гемостаза. В норме система гемостаза служит для поддержания нормальных реологических свойств крови, предупреждения и остановки кровопотери организмом. В физиологических условиях прокоагуляционные и противосвертывающие процессы в системе уравновешены. В случае смещения

равновесия в работе гемостаза в ту или иную сторону может наблюдаться склонность к кровоточивости (гемофилия) или, наоборот, к повышенному тромбообразованию, т.е. к тромбофилии.

Таким образом, тромбофилия представляет собой нарушение гемостаза, при котором повышается активность свертывающей компоненты системы крови, что в свою очередь ведет к развитию тромбозов в кровеносных сосудах. Функционирование системы гемостаза осуществляется посредством каскада биохимических реакций, схема которых в общем виде отображена на рисунке 1.

В настоящее время идентифицированы многие гены и их аллельные варианты всех основных звеньев системы гемостаза, ассоциированных со склонностью к тромбозам. Все они могут быть подразделены на несколько категорий: 1) гены, кодирующие факторы свертывания; 2) гены, кодирующие естественные антикоагулянты организма; 3) гены, кодирующие различные рецепторы на поверхности тромбоцитов; 4) гены, кодирующие компоненты фибринолиза; 5) гены, ответственные за состояние сосудистой стенки.

В рамках настоящей статьи остановимся на двух категориях из вышеперечисленных, в которых рассмотрим наиболее значимые гены и мутации, влияющие на склонность человека к тромбофилии.

Гены, кодирующие факторы свертывания. На сегодняшний день выделяют 13 факторов свертывания, каждый из них кодируется определенным геном. Вместе с тем далеко не все из них связаны со склонностью к тромбофилии. В основном в этом ключе в литературе обсуждаются гены фибриногена (*FGA, FGB, FGG*), протромбина (*FII*), фактора Лейдена (*FV*), проконвертина (*FVII*) и фибринстабилизирующего фактора (*FXIIIa1*).

Наибольший интерес в отношении своего влияния на риск развития тромбофилии в этой группе представляют гены *F2* и *F5*.

Ген *F2* локализуется на 11-ой хромосоме (11p11-q12) и кодирует фактор коагуляции II – протромбин. По аналогии с другими генами, вовлеченными в работу системы гемостаза, в этом гене также описаны отдельные мутации, приводящие к гипо- и диспротромбинемии [3]. Однако наиболее значимой и обсуждаемой в литературе заменой ДНК в гене *F2* считается мутация G20210A. Мутация находится в 3' нетранслируемой области гена и за счет увеличения стабильности мРНК фактора 2 или повышения уровня его трансляции приводит к увеличению концентрации протромбина в плазме крови [4]. Частота аллеля 20210A в Европейской популяции составляет ~2%. Однако среди гетерозиготных носителей рискового аллеля уровень протромбина сильно варьирует, поэтому