

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2014
УДК 616.94-092.18:615.849.11

**АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ
У БОЛЬНЫХ С СЕПСИСОМ НА ФОНЕ ВКЛЮЧЕНИЯ
В КОМПЛЕКСНОЕ ЛЕЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**

Е.С. Владимирова, Н.В. Боровкова, А.М. Горбунов¹, Ю.В. Андреев, О.В. Бабаев

ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, г. Москва
Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, г. Москва (1)

В статье представлен опыт применения ЭМП низкой интенсивности в комплексном лечении больных сепсисом. В качестве носителя ЭМП использовали стандартные пластиковые карты с магнитной полосой NiCo, которую фиксировали на коже в проекции подвздошных артерий. В статье представлены результаты лечения 22 пациентов с критериями тяжелого сепсиса и полиорганной недостаточностью, которым на фоне комплексного лечения прикладывали носитель ЭМП. В качестве маркера для оценки воздействия ЭМП выбрали содержание лимфоцитов на разных стадиях апоптоза и концентрацию погибших лейкоцитов венозной крови. Исследование проводили до и через 1 час после наложения носителя ЭМП. Исследование апоптоза лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии. Наиболее выраженное влияние ЭМП низкой интенсивности отмечено на показатели апоптоза лимфоцитов венозной крови. Воздействие электромагнитного излучения низкой интенсивности в течение 1 часа приводило к выраженным разнонаправленным изменениям концентрации в венозной крови лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели. Выявить какую-либо закономерность изменения концентрации апоптотических лимфоцитов не удалось. Механизмы действия носителя ЭМП на организм и процессы апоптоза остаются не ясными и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: апоптоз, электромагнитное поле, проточная цитометрия, сепсис.

Инфекция и связанный с ней тяжелый сепсис являются причиной летальности, достигающей 55% [12, 18]. Системная воспалительная реакция и адекватный иммунный ответ позволяют бороться с патогенами [17], при этом результат во многом зависит от механизмов, которые участвуют в развитии лимфопении, а также факторов, активирующих механизмы апоптоза [3, 8]. В процессе развертывания иммунного ответа основная часть лимфоцитов и все эффектор-ные клетки после завершения своих функций гибнут, предотвращая появление в организме аутореактивных и злокачественных клонов. Доказано, что при сепсисе апоптоз определяет тяжесть течения [16, 19].

Неблагоприятные результаты лечения сепсиса и большие финансовые затраты заставляют искать новые факторы, определяющие тяжесть состояния и оценку эффективности проводимой терапии. Для эффективной терапии проводятся поиски новых физических методов воздействия на организм. Одним из методов физического воздействия являются слабые электромагнитные поля (ЭМП). В практической медицине широко применяются постоянное и переменное магнитные поля.

Наиболее выраженные биологические эффекты наблюдаются при воздействии низкоинтенсивными постоянными и пере-

менными ЭМП низких (1-1000 Гц), высоких (3-30 МГц), ультравысоких (300 МГц – 3 ГГц) и сверхвысоких (3-300 ГГц) частот. Поля с такими характеристиками применяются для лечения различных заболеваний. По данным авторов [2, 7] под действием непрерывных и импульсных ЭМП высоких и ультравысоких частот форменные элементы крови выстраиваются в цепочки, параллельно силовым линиям. Для каждого типа клеток имеется свой оптимальный диапазон частот, при котором наступает подобный эффект. При воздействии ЭМП на крупные молекулы (белки, липопротеиды) происходит их переориентация, может изменяться их внутренняя структура вплоть до разрушения молекулы. Улучшается растворимость веществ, повышается проницаемость мембран клеток. После действия электромагнитных излучений низкой и сверхнизкой интенсивности наблюдаются иммуномодулирующие эффекты [5, 6, 13] и восстановленные структуры плазмы крови [4, 10, 11].

Наибольший интерес представляют эффекты резонансного (избирательного) поглощения электромагнитного поля выбранных частотных диапазонов в различных органах и тканях организма [2, 10]. Этот эффект позволяет воздействовать определенными частотами на один орган или ткань, при этом не затрагивая другие органы.

Целью исследования явилось изучение апоптоза лимфоцитов венозной крови у больных сепсисом на фоне комплексного лечения, включающего низкочастотное электромагнитное излучение.

Материалы и методы

Обследованы 22 пациента (17 мужчин и 5 женщин) с критериями тяжелого сепсиса, и полиорганной недостаточностью, включая: тяжелую сочетанную травму (10), колото-резаные ранения, осложненные массивной кровопотерей (3), ожоги более 70% поверхности тела (3), распространенный фибринозно-гнойный перитонит (5) и гнойный медиастинит (1). Тяжесть состояния пациентов по шкале APACHE II составила 15,0 с прогнозируемой летальностью – 21,0 (15,6; 40,8). Средний бал органной дисфункции составил 5,0 (4,0;7,0). Погибли – 5 пациентов (22,7%).

Комплексное лечение больных с сепсисом включало санацию патологического очага (если это требовалось), проводилась продленная ИВЛ, антибактериальная и иммуномодулирующая терапия, нутритивная поддержка, экстракорпоральные методы гемокоррекции.

Для усиления лечебного эффекта комплексной терапии у больных на фоне раневого истощения, когда проводимая терапия не давала желаемого эффекта применяли низко интенсивные электромагнитные излучения, активацию носителя ЭМП проводили в переменном (1-30Гц) поле соленоида с индукцией 5мкТл. В качестве носителя ЭМП использовали стандартные пластиковые карты с магнитной полосой NiCo (ISO 7810 ID-1, ISO 7811), которую фиксировали на коже в проекции подвздошных артерий. В ряде случаев через 2-3 суток пациентам повторяли применение низко интенсивного электромагнитного излучения.

В качестве маркера для оценки воздействия ЭМП выбрали содержание лимфоцитов на разных стадиях апоптоза и концентрацию погибших лейкоцитов венозной крови. Исследование проводили до и через 1 час после наложения носителя ЭМП, также оценивали клинический эффект.

Исследование апоптоза лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии FC-500 (фирма Beckman Coulter). Количество лимфоцитов, готовых к апоптозу, оценивали по экспрессии Fas-рецептора с помощью моноклональных антител CD95. Относительное количество лимфоцитов венозной крови, на разных стадиях апоптоза, определяли с помощью набора Annexin V-FITC/7AAD Kit (фирма Beckman Coulter): Annexin V+/ 7AAD–, ранний апоптоз, Annexin V+/ 7AAD+, поздний апоптоз. Определение жизнеспособности лейкоцитов осуществляли на проточном цитометре с помощью витального ДНК-специфического красителя 0,005% раствора 7 амино-актиномицина D (7AAD). Для определения значений физиологической нормы обследованы 40 первичных доноров крови в возрасте от 20 до 45 лет.

Статистическую обработку материала проводили с помощью статистического пакета IBM SPSS Statistics 19 (IBM Inc., USA). Определяли средние величины (M), среднее квадратичное отклонение (σ). Для сравнения параметров использовали t -критерий Стьюдента. В качестве порогового уровня статистической значимости принято значение вероятности $p=0,05$.

Результаты и обсуждение

Использование носителей ЭПМ у больных с сепсисом сопровождалось снижением температурной реакции на $0,5-1,0^{\circ}\text{C}$, урежением пульса, а главное появлялась адекватная реакция на проводимое лечение, что способствовало благоприятному исходу.

На фоне развития сепсиса у обследованных больных отмечалась повышенная концентрация лейкоцитов венозной крови, которая составила $12,4 \pm 1,0 \cdot 10^9/\text{л}$. При этом выявлено повышенное содержание погибших лейкоцитов в венозной крови до $2,4 \pm 0,3\%$ и $0,289 \pm 0,034 \cdot 10^9/\text{л}$, тогда как у доноров крови их содержание составило $0,71 \pm 0,06\%$ и $0,041 \pm 0,006 \cdot 10^9/\text{л}$. Такая концентрация погибших клеток венозной крови соответствовала эндотоксикозу средней степени тяжести [1]. Также отмечено достоверное повышение концентрации лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности Fas-рецептор, $83,6 \pm 2,4\%$ (в норме $41,7 \pm 1,8\%$), вступающих в процесс апоптотической гибели до $9,3 \pm 0,9\%$ (норма $2,02 \pm 0,15\%$) и уже погибших в результате апоптоза до $0,22 \pm 0,02\%$ (норма $0,08 \pm 0,02\%$).

Программированная гибель лимфоцитов (апоптоз) при сепсисе является одним из ключевых патогенетических механизмов развития иммуносупрессии [20, 21]. Возникновение апоптоза при сепсисе было доказано в экспериментах на животных и наряду с другими факторами его считают ответственным за тяжесть течения заболевания [22]. При этом гибель клеток может быть обусловлена действием лигандов на рецепторы смерти. Эти рецепторы относятся к семейству фактора некроза опухоли (ФНО), одним из наиболее изученных ре-

цепторов является Fas-рецептор (APO1, CD95). Программируемая клеточная гибель так же может быть результатом неблагоприятных воздействий на клетку в виде стресса или дефицита необходимых факторов. Другой механизм гибели клетки при сепсисе – это смерть, индуцированная активацией клеток (AICD – activation induced cell death) – «активационный» апоптоз [9, 14], развивающийся в условиях избыточной активации лимфоцитов через T-клеточный рецептор. В активированных T-лимфоцитах под действием интерлейкина 2 и провоспалительных цитокинов запускается процесс апоптоза, индуцируемый, как правило, через Fas-рецептор [9, 15]. На покоящихся клетках этот рецептор не представлен, однако при активации клетки экспрессия Fas существенно возрастает [9; 14]. Об этом свидетельствует увеличение почти в 2 раза концентрации CD95-позитивных лимфоцитов, регистрируемое нами при обследовании септических больных (до $83,6 \pm 2,4\%$, при норме $41,7 \pm 1,8\%$).

Таким образом, повышение концентрации в крови больных с сепсисом лимфоцитов на разных стадиях апоптоза мы связываем с активацией иммунной системы в ответ на инфекционный агент и необходимостью элиминации из организма «отработавших» пулов клеток, что необходимо для поддержания гомеостаза клеточных популяций.

Результаты представлены в таблице 1. Как видно из таблицы, достоверного изменения параметров не выявлено, однако отмечена тенденция к снижению концентрации погибших лейкоцитов венозной крови пациентов, что служит косвенным признаком снижения степени тяжести эндогенной интоксикации. Также отмечали тенденцию к снижению концентрации лимфоцитов, вступающих в апоптоз (табл. 1).

Наиболее выраженное влияние ЭМП низкой интенсивности отмечено на показатели апоптоза лимфоцитов венозной крови. На рисунке 1 представлено отклонение, выраженное в процентах, от ис-

Таблица 1

Динамика показателей апоптоза у больных с сепсисом при воздействии ЭМП

Показатели	До воздействия ЭМП	Через 1 час после воздействия ЭМП
Количество лейкоцитов в венозной крови ($\times 10^9/\text{л}$)	12,4 \pm 1,0	12,4 \pm 1,1
CD95+ лимфоциты, %	83,6 \pm 2,4	83,8 \pm 2,4
Количество лимфоцитов в раннем апоптозе, %	9,3 \pm 0,9	8,1 \pm 1,0
Количество лимфоцитов в позднем апоптозе, %	0,22 \pm 0,02	0,20 \pm 0,02
Относительное количество погибших лейкоцитов, %	2,4 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2
Содержание погибших лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$)	0,289 \pm 0,034	0,239 \pm 0,025

ходного показателя концентрации лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза у обследованных пациентов через 1 час после наложения носителя ЭМП. Как видно из рисунка, низко интенсивное электромагнитное излучение в течение 1 часа приводило к выра-

женным разнонаправленным изменениям концентрации в венозной крови пострадавших лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели. Выявить какую-либо закономерность изменения концентрации апоптотических лимфоцитов не удалось.

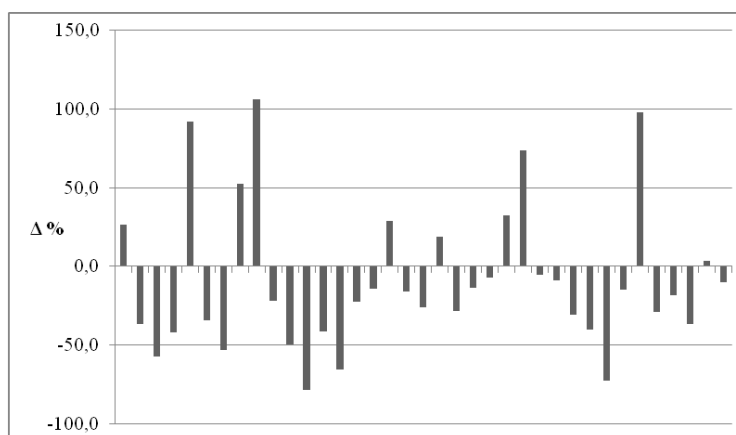


Рис. 1 Отклонение от исходных значений показателя концентрации лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза у септических пациентов под действием ЭМП

Концентрация лимфоцитов уже погибших в результате апоптоза в течение 1 часа при действии ЭМП также изменялась разнонаправлено. Более детальный анализ изменения концентрации лимфоцитов в позднем апоптозе показал, что исходно нормальные значения этого показателя не менялись. В тоже время при исходно повышенном уровне (0,31 \pm 0,01%) погибших в результате апоптоза клеток их концентрация снижалась до 0,24 \pm 0,01%.

Заключение

Эффективность использования носителей ЭМП низкой интенсивности в

комплексном лечении больных сепсисом уже за короткие сроки проявляется в наличии адекватной реакции организма на лечение, что подтверждается улучшением общего состояния, снижением гипертермии и тахикардии и сопровождается изменением концентрации лимфоцитов венозной крови на разных стадиях апоптоза. Однако, механизмы действия носителя ЭМП на организм и процессы апоптоза и/или элиминации апоптотических лимфоцитов из циркуляции остаются не ясными и требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Александрова И.В. [и др.] // Анестезиология и реаниматология. – 2008. – № 6. – С. 57-60.
2. Бецкий О.В. Миллиметровые волны и живые системы / О.В. Бецкий, В.В. Кислов, Н.Н. Лебедева. – М.: САЙНС-ПРЕСС, 2004.
3. Боровкова Н.В. [и др.] // Вестн. РАМН. – 2009. – №8. – С. 33-36.
4. Владимирова Е.С. Механизм воздействия магнитных полей сверхнизкой интенсивности для лечения больных с сепсисом / Е.С. Владимирова, Т.Г. Волошина, А. Горбунов // VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2-6 июля 2012 г.). – СПб., 2012.
5. Иммуномодулирующие эффекты физических факторов / М.И. Гринзайд [и др.]. – Пятигорск, 1996.
6. Земсков А.М., Земсков В.М., Золоедов В.И. // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2003. – №4. – С. 12-16.
7. Клиндер Г.Г. Сверхвысокие частоты: основы и применения техники СВЧ / Г.Г. Клиндер. – М.: Наука, 1969.
8. Мамучишвили Н.К. [и др.] // Воен.-мед.журн. – 1996. – Т. 317, №1. – С. 29-31.
9. Манько В.М. Ветеринарная иммунология. Фундаментальные основы / В.М. Манько, Д.А. Дервишов. – М.: Арговет, 2011.
10. Новиков В.В., Фесенко Е.Е. // Биофизика. – 2001. – Т. 46, № 2. – С. 235-241.
11. Новиков В.В. [и др.] // Биофизика. – 2007. – Т. 536, №2. – С. 372-375.
12. Савельев В.С. Сепсис в начале XXI века Классификация, клинико-диагностическая концепция и лечение. Патолого-анатомическая диагностика / В.С. Савельев, Б.Р. Гельфанд. – М.: Литер, 2006.
13. Улащик В.С. // Вопр. курортологии и леч. физкультуры. – 2000. – №6. – С. 3-8.
14. Череев А.Н., Ковальчук Л.В. // Клинич. лаб. диагностика. – 1997. – №7. – С. 31-35.
15. Черных Е.Р. [и др.] // Мед. иммунология. – 1999. – Т. 1, № 5. – С. 45-51.
16. Antonopoulou A. [et al.] // Clin.Exp.Immunol. – 2007. – Vol. 149, №1. – P. 103-108.
17. Chung C.S. The apoptotic response of the lymphoid immune system to trauma, shock and sepsis / C.S. Chung, I.H. Chaudry, A. Ayala // Yearbook Of Intensive Care and Emergency Medicine. – 2000. – P. 27-40.
18. Engel C. [et al.] // Intensive Care. Med. – Vol. 33, №4. – P. 606-618.
19. Giamarellos-Bourboulis [et al.] // Crit. Care. – 2006. – Vol. 10, №3. – P. 76.
20. Swan R. [et al.] // Surgery. – 2007. – Vol. 142, №2. – P. 253-261.
21. Vincent J.I. [et al.] // Crit. Care Med. – 2006. – Vol. 34, №2. – P. 344-353.
22. Weber S.U. [et al.] // Anaesthetist. – 2004. – Bd. 53, №1. – P. 59-65.

**VENOUS BLOOD LYMPHOCYTE APOPTOSIS
IN ELECTROMAGNETIC RADIATION TREATED PATIENTS WITH SEPSIS**

E.S. Vladimirova, N.V. Borovkova, A.M. Gorbunov, Y.V. Andreev, O.V. Babayev

This article presents the experience of low-intensity electromagnetic radiation application in the complex treatment of patients with sepsis. As a carrier of electromagnetic radiation used a standard plastic card with a magnetic stripe HiCo, which were fixed on the skin projection iliac arteries. The article presents the results of treatment of 22 patients with severe sepsis criteria and multi-organ failure, whose complex treatment included, applied electromagnetic radiation. Electromagnetic radiation efficiency was studied with apoptotic lymphocyte count and concentration of dead leukocytes of venous blood, using method of flow cytometry. The study was performed before and 1 hour after the imposition of electromagnetic radiation carrier. The most pronounced effect of low-intensity electromagnetic radiation indicators noted in lymphocyte apoptosis venous blood, but these changes lymphocytes apoptotic had prominent controversial direction. Mechanisms of electromagnetic fields action on the carrier body and apoptosis remain unclear and require further study.

Keywords: apoptosis, electromagnetic field, flow cytometry, sepsis.

Владимирова Е.С. – д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, отделение неотложной торакоабдоминальной хирургии, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
Тел.: 8(495)6804964.
E-mail: prizma06@yandex.ru.

Боровкова Н.В. – д-р мед. наук, зав. лабораторией трансплантации клеток и иммунотипирования, НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
Тел.: 8(495)6201204.

Горбунов А.М. – канд. физ.-матем. наук, Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН.
г. Москва, Ленинский проспект, д. 31, корп. 4.
E-mail: socolova@phychе.ac.ru.

Андреев Ю.В. – канд. мед. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории трансплантации клеток и иммунотипирования. НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.

Бабаев О.В. – канд. мед. наук, врач-реаниматолог, отделение общей реанимации. НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского.
г. Москва, Б. Сухаревская, д. 3.
Тел.: 8(495)6283671.