

## АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

**Н.В. Боровкова**, доктор медицинских наук, **И.В. Александрова**, доктор медицинских наук,  
**В.В. Валетова**, кандидат медицинских наук, **Е.Н. Кобзева**, кандидат медицинских наук

*НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва*

**E-mail:** Borovkovanv@yandex.ru

*С целью оценки содержания апоптотических лимфоцитов венозной крови в норме и при патологии обследованы 40 первичных доноров, 14 пострадавших с закрытой травмой живота, осложнившейся острой кровопотерей не менее 30% объема циркулирующей крови, и 49 пациентов с сепсисом. Относительное количество лимфоцитов крови на ранних и поздних стадиях апоптоза определяли с помощью Annexin V-FITC/7AAD Kit (Beckman Coulter). Выявлено, что физиологический уровень лимфоцитов венозной крови, вступающих в апоптоз, составляет  $2,74 \pm 0,23\%$ , лимфоцитов, погибших в результате апоптоза, —  $0,08 \pm 0,01\%$ . Массивная кровопотеря у пострадавших приводит к увеличению концентрации лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, что обусловлено гипоксией. У пациентов с сепсисом отмечается усиление апоптоза лимфоцитов, что коррелирует с тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале APACHE II, а содержание клеток, уже погибших в результате апоптоза, — с исходом заболевания. Определение концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови у пострадавших с массивной кровопотерей и у больных с сепсисом может быть использовано для прогноза течения и исхода заболевания.*

**Ключевые слова:** апоптоз лимфоцитов, сепсис, массивная кровопотеря

### **BLOOD LYMPHOCYTE APOPTOSIS IN NORM AND PATHOLOGY**

*N.V. Borovkova, I.V. Aleksandrova, V.V. Valetova, E.N. Kobzeva*

*Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow*

*With the purpose to determine the content of apoptotic lymphocytes of venous blood in norm and pathology there were examined 40 primary donors of blood, 14 patients with closed abdominal trauma complicated by acute blood loss of at least 30% of circulating blood volume and 49 patients with severe sepsis. The relative amount of lymphocytes in the early and late stages of apoptosis was determined with the use of Annexin V-FITC/7AAD Kit (company Beckman Coulter). It is revealed, that a physiological level of lymphocytes of venous blood, entering in apoptosis, accounts for  $2,74 \pm 0,23\%$ , lymphocytes, died as a result of apoptosis —  $0,08 \pm 0,01\%$ . Massive blood loss in victims leads to an increase in the concentration of lymphocytes entering into the process of apoptotic death that is caused by hypoxia.*

*In patients with sepsis there is noted an enhancement of lymphocyte apoptosis, which correlates with the severity of the condition of the patients, assessed on a scale of APACHE II, and the content of the cells have already died as a result of apoptosis — with the outcome of the disease. Determination of the concentration of apoptotic lymphocytes in the venous blood in patients with massive blood loss and in patients with sepsis can be used for predicting the course and outcome of the disease.*

**Key words:** blood lymphocyte apoptosis, sepsis, massive blood loss

### **ВВЕДЕНИЕ**

Под апоптозом понимают активный программируемый процесс, приводящий к элиминации клеток из организма [1, 3–5]. Выделяют 3 фазы апоптоза: начальную, эффекторную и фазу деградации [3, 5]. В начальную фазу клетка получает сигнал, запускающий процесс, в эффекторную — активируются механизмы апоптоза, но процесс остается обратимым. В фазу деградации изменения необратимы, и клетка подвергается дезинтеграции. Продолжительность апоптоза занимает от 12 до 24 ч [2, 3, 5].

В наиболее яркой и массовой форме апоптоз реализуется в процессе развития лимфоцитов. Покоящиеся зрелые лимфоциты апоптозу не подвержены. Однако они становятся чувствительными к индук-

ции апоптоза после активации. По этому механизму гибнут основная часть лимфоцитов в процессе развертывания иммунного ответа и все эффекторные клетки после завершения выполнения своих функций. Таким образом, в иммунной системе апоптоз играет важную роль. В период становления и развития клеток апоптоз служит регулятором численности клеточных популяций и фактором их селекции. С помощью апоптоза осуществляется контроль интенсивности иммунного ответа и элиминации уже «отработавших» эффекторных клеток. Апоптоз лимфоцитов также служит основным регуляторным механизмом, препятствующим появлению в организме аутореактивных и злокачественных клонов [5].

В то же время появляется все больше работ, посвященных участию апоптоза иммунокомпетент-

ных клеток в развитии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР) и сепсиса [6, 7, 10, 11, 14]. Возникновение апоптоза при сепсисе было доказано в экспериментах на животных; наряду с другими факторами его считают ответственным за тяжесть течения заболевания [6, 10, 11, 14]. Одним из механизмов, запускающих апоптоз лимфоцитов у септических больных, является действие глюкокортикоидов, концентрация которых увеличивается вследствие стресса. Кроме того, выявлено, что апоптотические клетки индуцируют выработку противовоспалительных цитокинов, что приводит к снижению ответа на патоген, т.е. индуцирует анергию. Несмотря на то, что в настоящее время исследованию апоптоза у больных уделяется много внимания, данные о содержании апоптотических лимфоцитов в циркулирующей крови больных с хирургическими заболеваниями и с хирургическим сепсисом мало численны.

Цель настоящего исследования – оценить содержание апоптотических лимфоцитов венозной крови доноров, пациентов с закрытой травмой живота, осложненной кровопотерей и сепсисом.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование апоптоза проведено в нескольких группах. Обследованы 40 первичных доноров крови в возрасте от 20 до 45 лет до и после кроводачи, а также 14 пострадавших (12 мужчин и 2 женщины; средний возраст  $37 \pm 4,6$  года) с закрытой травмой живота, осложнившейся острой кровопотерей на догоспитальном этапе (не менее 30% объема циркулирующей крови). Суммарная кровопотеря составила  $2643 \pm 290$  мл на 1 больного, тяжесть травмы по ISS – от 17 до 35 баллов. Пациенты оперированы в экстренном порядке. Анестезия была стандартной (кетамин, фентанил, нимбекс в рекомендованных дозировках), больным проводили искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) с высокими фракциями кислорода (0,8–1,0). Интраоперационная инфузионно-трансфузионная терапия включала коллоидные и кристаллоидные среды, свежезамороженную плазму, донорские эритроциты и клеточный компонент аутокрови, получаемый с помощью интраоперационной аппаратной реинфузии на непрерывной аутотрансфузионной системе CATS (Fresenius). Тканевый метаболизм во время операции в динамике оценивали по газам и показателям кислотно-основного состояния артериальной и смешанной венозной крови, уровню лактата, гликемии, содержанию калия и натрия в плазме крови. Исследование апоптоза проводили при поступлении в операционную, на момент хирургической остановки кровотечения и в конце операции. Общая продолжительность послеоперационного наблюдения пострадавших составила  $28 \pm 6$  койко-дней.

Течение основного заболевания у 49 пациентов

(38 мужчин и 11 женщин в возрасте от 25 до 64 лет) осложнилось развитием сепсиса: в связи с тяжелой сочетанной травмой (у 15), перитонитом (13), тяжелым острым панкреатитом (8), острым гнойным медиастинитом (10), другими причинами (3). Наличие сепсиса и выраженность ССВР определяли на основании критериев ACCP/SCCM [8]. Тяжесть состояния больных оценивали по шкале APACHE II [12], тяжесть органной недостаточности – по шкале SOFA [15]. Комплекс лечебных мероприятий больных сепсисом включал хирургическую санацию очага инфекции. В послеоперационном периоде проводили продленную ИВЛ, деэскалационную антибактериальную терапию, нутритивную поддержку, иммуномодулирующую терапию, применяли экстракорпоральные методы гемокоррекции. Средняя длительность пребывания больных в стационаре составила  $63,7 \pm 42,5$  сут. Из 49 больных умерли 13. Основной причиной смерти были септический шок и полиорганная недостаточность. Исследование апоптоза проводили в момент постановки диагноза «сепсис» и затем через 3 и 7 сут.

Относительное количество апоптотических лимфоцитов крови определяли с помощью Annexin V-FITC/7AAD Kit (фирма Beckman Coulter). На ранней стадии апоптоза целостность клеточной мембраны сохраняется, однако происходит перестройка ее фосфолипидных компонентов, и на поверхности клетки появляется фосфатидилсерин. Аннексин V способен связываться фосфотидилсерином в присутствии кальция. Одновременное окрашивание клеток витальным ДНК-специфичным красителем 7-аминоактиномицина D (7AAD) позволяло дифференцировать клетки на ранних стадиях апоптоза (Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>, ранний апоптоз) от клеток, уже погибших в результате апоптоза (Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>, поздний апоптоз) [9, 13].

Статистическую обработку материала проводили с помощью статистического пакета IBM SPSS Statistics 19 (IBM Inc., USA). Определяли среднюю величину ( $M$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\delta$ ) и стандартную ошибку средней величины ( $m$ ). С помощью тестов Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка выявлено, что распределение количественных признаков не отличалось от нормального, поэтому показатели представлены в виде  $M \pm m$ . При сравнении количественных признаков использовали коэффициент Стьюдента. Корреляционные связи между показателями оценивали с помощью критерия Пирсона. Качественные признаки также оценивали с помощью критерия  $\chi^2$  (приведены значения критерия, его двусторонняя значимость). Вычисляли относительный риск смерти (OR), для чего применяли регрессионную модель Кокса с пропорциональными рисками. В качестве порогового уровня статистической значимости принято значение вероятности  $p=0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Относительное содержание апоптотических лимфоцитов (Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>-</sup>) у 40 доноров варьировало в широком диапазоне: от 0,6 до 9,2%. Распределение доноров по содержанию в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза представлено на рис. 1. Кривая распределения доноров имела 2 пика. У 34 (83%) доноров количество лимфоцитов, вступающих в апоптоз, регистрировалось в пределах 0,6–5,5% (в среднем – 2,74±0,23%), у 7 (17%) обследованных оно было повышено и варьировало от 6,4 до 9,2% (в среднем 8,17±0,35%). Феномен апоптоза является результатом действия различных факторов: неспецифических (температура, свободные радикалы, гипоксия, УФ-излучение) и специфических (глюкокортикоиды и др.). Полагаем, повышенное содержание апоптотических лимфоцитов у 17% доноров обусловлено эмоциональным стрессом на предстоящую кроводачу или воздействием других факторов, индуцирующих апоптоз. Таким образом, за физиологический уровень в венозной крови лимфоцитов, вступающих в апоптоз, мы приняли 2,74±0,23% клеток. У 7 доноров выявлено повышенное содержание апоптотических лимфоцитов, и у 3 человек – пониженное.

Для оценки влияния кроводачи на уровень апоптотических лимфоцитов в венозной крови обследованы 13 доноров крови. Выявлено, что у 5 из них содержание лимфоцитов, вступающих в апоптоз, увеличивалось с 2,8 до 4,5% клеток, тогда как у 7 доноров повышенное до кроводачи относительное количество апоптотических лимфоцитов (6,2%) понизилось после нее до 3,8%. Таким образом, при физиологическом уровне апоптоза лимфоцитов даже незначительная потеря крови (не более 450 мл) при кроводаче в 38 % случаев сопровождается их активацией и увеличением доли апоптотических клеток. Напротив, лимфоциты на ранних стадиях апоптоза могут эффективно элиминироваться из организма во время кроводачи при изначально повышенном их содержании в крови.

Содержание уже погибших лимфоцитов (Annexin V<sup>+</sup>/7AAD<sup>+</sup>) в венозной крови доноров было незначительным и варьировало от 0,01 до 0,12%, (в среднем 0,08±0,01%). Кроводача не вызывала каких-либо изменений в содержании лимфоцитов, находящихся на поздних стадиях апоптоза.

Массивная кровопотеря у пострадавших также сопровождалась увеличением содержания апоптотических лимфоцитов. При поступлении у всех пациентов имелись убедительные гемодинамические признаки гиповолемии: частота сердечных сокращений (ЧСС) 106±2,7 в мин, среднее АД 75±1,3 мм рт.ст., центральное венозное давление (ЦВД) 0,5±0,09 мм рт.ст., а также анемии средней тяжести (содержание гемоглобина – Hb 84±8,7 г/л, гематокрит – Ht 25,9±2,72%). Снижение транспорта кис-

лорода при поступлении сопровождалось венозной гипоксемией – P<sub>v</sub>O<sub>2</sub> был ниже референтных значений и составлял 41,9±4,24 мм рт.ст. Повышались уровень лактата (до 4,18±0,94 ммоль/л) и гликемия (до 9,13±0,97 ммоль/л). Концентрация лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, на момент поступления превышала нормальные значения и составила 6,87±1,24% (норма – 2,74±0,23%). Среднее содержание лимфоцитов, уже погибших в результате апоптоза, соответствовало значениям физиологической нормы. Установлено, что у пострадавших с массивной острой кровопотерей высокое содержание лимфоцитов, находящихся в позднем апоптозе, коррелирует (r=0,812; p=0,008) с длительностью пребывания в стационаре.

На момент остановки кровотечения активная инфузионная терапия и начало компенсации утраченных эритроцитов сопровождалась стабилизацией показателей гемодинамики, уровня Hb (91±5,8 г/л) и Ht (27,6±1,67%), однако существенного улучшения показателей тканевого метаболизма не произошло. Сохранялась венозная гипоксемия (P<sub>v</sub>O<sub>2</sub> 44,3±3,23 мм рт.ст.), гипергликемия (8,83±0,55 ммоль/л) и гиперлактатемия (4,63±1,17 ммоль/л). К моменту остановки кровотечения концентрация лимфоцитов на стадии раннего апоптоза составляла 7,33±0,81%. Усиленный апоптоз иммунокомпетентных клеток можно связать со стресс-реакцией (повышением уровня эндогенных глюкокортикоидов и(или) их введением). Неспецифическим индуктором апоптоза у пострадавших с массивной острой кровопотерей могла служить гипоксия вследствие указанной кровопотери. Это подтверждает достоверная обратная корреляция содержания в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апопто-

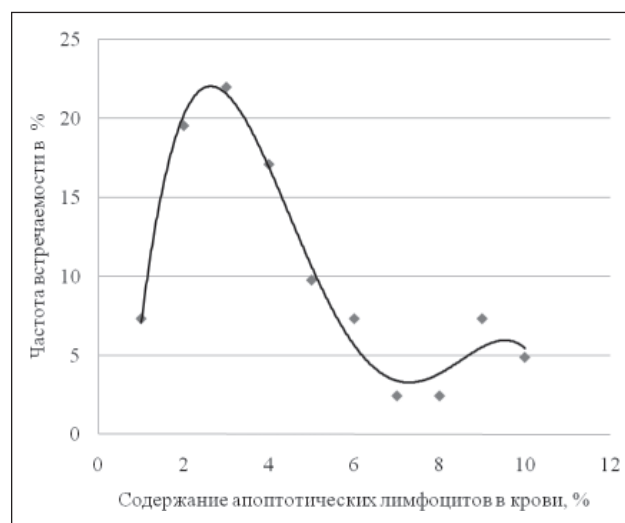


Рис. 1. Распределение доноров крови в зависимости от содержания в венозной крови лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели

за с уровнем Hb ( $r=-0,65$ ;  $p=0,016$ ) и Ht ( $r=-0,67$ ;  $p=0,014$ ).

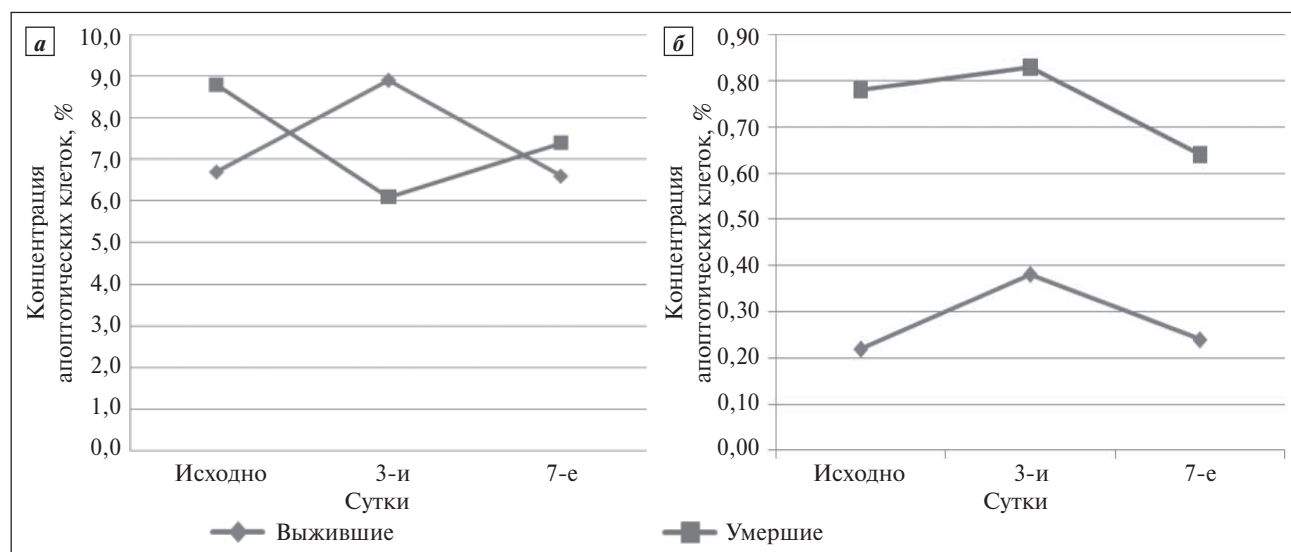
Всего за время операции было введено  $5610 \pm 161$  мл на 1 больного инфузионных и трансфузионных сред. Своевременная хирургическая остановка кровотечения и адекватное интраоперационное восполнение гиповолемии способствовали стабилизации гемодинамики у большинства пациентов. Отмечена тенденция к повышению  $PvO_2$  до  $47,2 \pm 5,1$  мм рт.ст., дальнейшему росту гликемии ( $10,99 \pm 1,74$  ммоль/л) и содержания лактата ( $4,8 \pm 0,96$  ммоль/л). Таким образом, несмотря на проводимую терапию, компенсацию утраченных эритроцитов и восстановление нормоволемии у большинства больных, к концу операции сохранялись биохимические маркеры тканевой ишемии. Содержание лимфоцитов в раннем и позднем апоптозе в этот период было повышенным и составляло соответственно  $11,05 \pm 3,76$  и  $0,65 \pm 0,14\%$ . При этом в раннем послеоперационном периоде высокую концентрацию иммунокомпетентных клеток на ранних стадиях апоптоза можно рассматривать как физиологическую реакцию на травматический шок и кровопотерю. Так, при высокой концентрации апоптотических лимфоцитов (от 15 до 30%) у 3 пациентов длительность пребывания в стационаре составила в среднем 12,3 дня, тогда как при уровне апоптоза от 2,5 до 3,5% лимфоцитов у 3 больных она возросла до 29 дней за счет развития гнойно-септических осложнений.

Таким образом, у пострадавших с массивной кровопотерей на фоне развития гипоксемии усиливается апоптоз лимфоцитов венозной крови, что можно рассматривать как физиологическую реакцию на травматический шок и кровопотерю. При этом концентрацию лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза

мы предлагаем использовать в качестве прогностического критерия неблагоприятного течения послеоперационного периода.

Известно, что одним из ведущих патогенетических механизмов, способствующих дефициту лимфоцитов у больных с сепсисом, является апоптотическая гибель клеток [1, 7, 10, 11]. Обследованы 49 пациентов, у которых на основании критериев ACCP/SCCM диагностирован сепсис. Тяжесть состояния пациентов по шкале APACHE II составила  $21,1 \pm 4,8$  балла; тяжесть органной дисфункции по шкале SOFA –  $8,6 \pm 4,2$  балла, выраженность ССВР –  $3,2 \pm 0,4$  балла, что свидетельствовало о наличии у больных полиорганной дисфункции и выраженного системного воспаления.

На момент постановки диагноза сепсиса содержание в венозной крови лимфоцитов, на ранних стадиях апоптоза, возрастало до  $7,41 \pm 0,67\%$  (норма  $2,74 \pm 0,23\%$ ). При этом выявлена корреляционная зависимость ( $r=0,396$ ;  $p=0,023$ ) между содержанием лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза и тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале APACHE II. Концентрация апоптотических лимфоцитов в венозной крови у выживших пациентов была несколько ниже ( $6,7 \pm 0,7\%$ ), чем у умерших ( $8,8 \pm 1,3\%$ ). Проведенный анализ с построением регрессионной модели Кокса позволил установить, что при увеличении концентрации лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза в венозной крови больных с сепсисом риск смерти достоверно возрастал ( $OR=1,33$ ). На момент постановки диагноза сепсиса в венозной крови больных концентрация лимфоцитов, уже погибших в результате апоптоза, также возрастала и составляла  $0,58 \pm 0,15\%$ . У выживших пациентов этот показатель варьировал от 0,03 до 1,14% (в среднем  $0,22 \pm 0,06$ ), а у умерших –



**Рис. 2.** Динамика показателей концентрации лимфоцитов, на ранних (а) и поздних (б) стадиях апоптоза в венозной крови больных с сепсисом

от 0,2 до 3,52% (в среднем  $0,78 \pm 0,25\%$ ; рис 2, б). Выявлена корреляция между концентрацией погибших лимфоцитов в крови и исходом заболевания ( $r=0,311$ ;  $p=0,024$ ).

Через 3 сут на фоне проводимого лечения у выживших пациентов отмечалось увеличение содержания в крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза до  $8,9 \pm 0,9\%$ . У умерших пациентов, наоборот, оно имело тенденцию к снижению до  $6,1 \pm 1,0\%$  (рис. 2, а). Концентрация лимфоцитов на поздних стадиях апоптоза существенных изменений не претерпевала (рис. 2, б). К 7-м суткам наблюдения содержание апоптотических лимфоцитов в венозной крови выживших пациентов возвращалось к исходным значениям.

Одним из потенциальных механизмов апоптоза лимфоцитов у больных с сепсисом является активация клеток бактериальными агентами в условиях, при которых не может быть реализован полный активационный сигнал [4, 5]. Усиленный апоптоз лимфоцитов также может быть обусловлен неспецифическими факторами, такими, как температура, бактериальные токсины, гипоксия, оксиданты, свободные радикалы и др. При этом развитие апоптоза или некроза клеток зависит от интенсивности их воздействия. В настоящем исследовании отмечено, что у больных с сепсисом возрастает не только количество клеток, вступающих в процесс апоптотической гибели, но и значительно увеличивается содержание уже погибших лимфоцитов.

Таким образом, сочетанное действие неспецифических (температура, бактериальные токсины и др.) и специфических (недостаток ростовых факторов, повышение концентрации ряда цитокинов и др.)

индукторов апоптоза приводит к увеличению концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови пациентов с сепсисом.

Повышение содержания лимфоцитов на разных стадиях апоптоза отражает степень тяжести состояния, оцениваемого по шкале APACHE II, и служит предвестником неблагоприятного исхода заболевания.

## ВЫВОДЫ

1. Физиологический уровень лимфоцитов венозной крови, вступающих в апоптоз, составляет  $2,74 \pm 0,23\%$ , лимфоцитов, погибших в результате апоптоза, –  $0,08 \pm 0,01\%$ .

2. Массивная кровопотеря ( $2643 \pm 290$  мл) у пострадавших приводит к увеличению концентрации лимфоцитов, вступающих в процесс апоптотической гибели, до  $6,87 \pm 1,24\%$ , что обусловлено гипоксией. Выявлена корреляция между содержанием в венозной крови лимфоцитов на ранних стадиях апоптоза и уровнем Hb ( $r=-0,65$ ;  $p=0,016$ ) и Ht ( $r=-0,67$ ;  $p=0,014$ ).

3. У пациентов с сепсисом отмечается усиление апоптоза лимфоцитов, при этом концентрация клеток на ранних стадиях апоптоза возрастает до  $7,41 \pm 0,67\%$  и коррелирует ( $r=0,396$ ;  $p=0,023$ ) с тяжестью состояния больных, оцениваемого по шкале APACHE II, а содержание клеток, уже погибших в результате апоптоза, – с исходом заболевания.

4. Определение концентрации апоптотических лимфоцитов в венозной крови у пострадавших с массивной кровопотерей и у больных с сепсисом может быть использовано для прогноза течения и исхода заболевания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И. Апоптоз при патологических процессах в органах пищеварения // Клиническая медицина. – 2000; 78 (1): 5–10.
2. Боровкова Н.В., Хватов В.Б., Александрова И.В. и др. Апоптоз мононуклеаров и содержание погибших лейкоцитов в венозной крови больных с сепсисом // Вестн. РАМН. – 2009; 8: 33–6.
3. Князькин И.В. Апоптоз в онкоурологии. – СПб: Наука, 2007. – 240 с.
4. Пальцев М.А. Молекулярная медицина и прогресс фундаментальных наук // Вестн. РАН. – 2002; 72 (1): 13–21.
5. Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.
6. Antonopoulou A., Raffogiannis M., Giamairellos-Bourboulis E. et al. Early apoptosis of blood monocytes is a determinant of survival in experimental sepsis by multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* // Clin. Exp. Immunol. – 2007; 149 (1): 103–8.
7. Bommhardt U., Chang K.C., Swanson P.E. et al. Akt decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis // J. Immunol. – 2004; 172 (12): 583–91.
8. Bone R., Sibbald W., Sprung C. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure // Chest. – 1992; 101 (6): 1481–3.
9. Darzynkiewicz Z. et al. Methods for analysis of apoptosis by flow cytometry // Manual of Clinical Laboratory Immunology, B. Deetrick Eds. N. Roes et al. – ASM PRESS, Washington. – 1997. – P. 334–45.
10. Giamairellos-Bourboulis E., Routsis C., Plachouras D. et al. Early apoptosis of blood monocytes in the septic host: is it a mechanism of protection in the event of septic shock? // Crit. Care. – 2006; 10 (3): 76.
11. Hotchkiss R., Tinsley K., Karl I. Role of apoptotic cell death in sepsis // Scand J. Infect Dis. – 2003; 35 (9): 585–92.
12. Knaus W., Draper E., Wagner D. Zimmerman APACHE II: a severity of disease classification system // Crit. Care Med. – 1985; 13 (10): 818–29.
13. Lecoeur H., Leudu E., Prevost M. et al. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods // J. of Immunological Methods. – 1997; 209 (2): 111–23.
14. Papathanassoglou E., Moynihan J., Ackerman M. Does programmed cell death (apoptosis) play role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework // Crit. Care Med. – 2000; 28 (2): 537–49.
15. Vincent J., Moreno R., Takala J. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine // Intensive Care Med. – 1996; 22 (7): 707–10.