

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЧ- ИЗЛУЧЕНИЯ

Терехов И.В., Аржников В.В., Кондратьев А.С.

Обнинский институт атомной энергетики

Госпиталь МСЧ ГУВД по Саратовской области

Саратовский военный госпиталь.

В статье обсуждается влияние СВЧ-излучения плотностью потока мощности 100 пВт/см^2 на состояние внутриклеточных механизмов трансдукции. Показано, что кратковременное облучение сопровождается ростом содержания белка p21 на 47%, NF-κB 12,5%, iκB на 22%, фосфорилированной формы p38 MAPK на 18,2%, BCL-2 на 11,2%, цАМФ на 16,8%. Отмечено повышение продукции ИЛ-23 на 14% (0,001) и ИЛ-28A на 17,6% ($p=0,031$), выявлена тенденция к повышению ИЛ-22.

Ключевые слова: СВЧ, цитокины, внутриклеточная трансдукция.

Электромагнитные излучения (ЭМИ) характеризуются многочисленными биологическими эффектами и широко используются в физиотерапии. Биологические эффекты ЭМИ сверхвысоких частот (СВЧ) высокой мощности хорошо исследованы и в большинстве своем они сводятся к рефлекторным влияниям, связанным с локальным нагревом тканей, обусловленным поглощением части энергии излучения молекулами воды.

В отличие от последних, биологические эффекты ЭМИ при мощности излучения значительно ниже тепловой ($\sim 10^{-10}$ Вт) исследованы слабо. При этом предполагается, что при таких уровнях мощности имеет место резонансное поглощение излучения молекулами воды с последующей его передачей биологически активным молекулам с соответствующим изменением их активности [1, 4, 5].

В связи с высокой распространенностью электромагнитных полей в природе, а так же недостаточной изученностью молекулярных механизмов формирования эффектов СВЧ-излучения, необходимо целенаправленное исследование данного вопроса, как с целью защиты от потенциального неблагоприятного влияния, так и с целью использования потенциала электромагнитных полей для регуляции функционального состояния организма.

Цель исследования – изучение молекулярных механизмов реализации биологического действия СВЧ-излучения нетепловой мощности.

Материалы и методы

В исследовании использовано 30 образцов цельной крови больных внебольничной пневмонией в острой стадии заболевания (5-7 сутки) в возрасте 20-35 лет.

Оценка биологических эффектов СВЧ-излучения проводилась путем исследования цитокинового статуса (определение интерлейкина (ИЛ) 22, 23, 28А), уровня митоген-активированной киназы р38 MAPK, факторов транскрипции (ядерный фактор транскрипции NF-κB и его ингибитор - IκB), цАМФ, белка р53 и BCL-2, а так же продукции антимикробного пептида LL-37 (кателицидина).

В процессе исследования основная группа была разделена на две подгруппы. Первая подгруппа – включала необлученные образцы крови (n=30), вторая – образцы подвергнутые облучению плотностью потока мощности (ППМ) 100 пВт/см² (n=30). Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с основной группой.

Облучение проводилось аппаратом микроволновой терапии «Акватон» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов), на частоте 1000±0,01 МГц с экспозицией 45 минут. По окончании облучения образцы крови помещались в термостат, где инкубировались в течение 24 часов при 37⁰ С, после чего в супернатанте оценивали продукцию ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-28А, цАМФ, белка р53,

кателицидина. В лизате мононуклеаров, выделявшихся на градиенте фиколаверографин, определяли NF-κB, ikB, BCL-2 и p38 MAPK.

Статистическая обработка проводилась в программе Statistica 7,0. при этом рассчитывалось среднее значение (m) ± среднеквадратичное отклонение (σ). Статистическая значимость (p) межгрупповых различий оценивалась с помощью t-критерия.

Результаты исследования

Уровень исследуемых факторов в группах, представлен в табл.1. Полученные данные свидетельствуют о том, что патологический процесс сопровождается ростом продукции ИЛ-22 в 2,6 раза ($p=0,0012$), ИЛ-23 в 1,5 раза ($p=0,021$), ИЛ-28 в 2,4 раза ($p=0,0041$), ядерного фактора транскрипции в 2,3 раза ($p=0,012$), его ингибитора в 2 раза ($p=0,017$), p38 MAPK на 62% ($p=0,048$), BCL-2 в 2 раза ($p=0,0019$), а так же рост продукции кателицидина на 46,2% ($p=0,0007$). На этом фоне содержание цАМФ снижалось на 20,3% ($p=0,061$) а белка p53 на 22,6% ($p=0,045$). Установлено, что у обследованных соотношение NF-κB/ikB, отражающее активацию генетических программ воспалительного процесса, повышалось на 17% с 1,26 до 1,47. В то же время соотношение BCL-2/p53 могущее служить показателем, отражающим соотношение процессов апоптоза и пролиферации, увеличивалось в 2,6 раза с 0,97 до 2,5.

Полученные данные указывают на существенную активацию провоспалительной активности клеток крови, высокую активность ядерных факторов транскрипции и существенное ингибирование программ апоптоза. Высокая активность внутриклеточных процессов сопровождается снижением цАМФ, что, очевидно, отражает относительный дефицит внутриклеточной энергетики у таких больных.

Проводимое в острую фазу ВП СВЧ-облучение, сопровождается статистически значимым ростом продукции ИЛ-23 и ИЛ-28А на 14% ($p=0,001$) и 17,6% ($p=0,031$) соответственно. Кроме того имела место тенденция к увеличению продукции ИЛ-22 на 13,3% ($p=0,23$). Так же

установлено повышение уровня эндогенного антимикробного пептида кателицидина на 4,4% ($p=0,01$).

Влияние облучения на внутриклеточный уровень ядерного фактора транскрипции и его ингибитор заключалось в увеличении их внутриклеточного содержания на 12,5% ($p=0,0011$) и 21,1% ($p=0,00072$) соответственно. При этом соотношение NF- κ B / κ B снижалось с 1,47 до 1,37. Таким образом, СВЧ-воздействие характеризовалось более выраженным влиянием на ингибитор ядерного фактора транскрипции и смещением равновесия в этой системе в сторону преобладания ингибитора.

Анализ взаимодействий в системе пролиферации и апоптоза показал способность излучения существенно повышать уровень белка p53, контролирующего множество внутриклеточных процессов, включая репарационные. Так, под влиянием облучения его уровень вырос на 25% ($p<0,001$), приблизившись к значению группы контроля. Полученные данные свидетельствуют об увеличении репарационного потенциала клеток, а так же повышения их общего уровня метаболизма, учитывая многогранную контролируемую роль p53 в клетке.

Проводимое облучение способствовало увеличению продукции белка BCL-2 на 11,5% ($p=0,12$), являющегося регулятором процессов апоптоза, блокирующим реализацию программ клеточной гибели.

Исследование состояния внутриклеточных киназных каскадов, в частности, уровня их активных форм, выявило увеличение концентрации фосфорилированной формы p38 MAPK на 18,2% ($p=0,011$).

Проведенное исследование выявило положительное влияние облучения на уровень цАМФ. Установлено, что уровень указанного медиатора в культуре облученных клеток возрастал на 16,8% ($p=0,2$), вплотную приближаясь к значениям контрольной группы.

Обсуждение результатов

Воспалительный ответ у больных внебольничной пневмонией сопровождается активацией внутриклеточных механизмов направленных на

реализацию саногенных программ. Закономерно, что реализация саногенного потенциала организма требует мобилизации ресурсов иммунной системы, сопровождающейся существенной перестройкой межклеточной кооперации. Антигенная стимуляция эффекторных клеток воспаления приводит к усилению продукции цитокинов, обеспечивающих адекватность межклеточных взаимодействий в условиях измененной реактивности и нарушения антигенного гомеостаза внутренней среды организма.

Взаимодействие бактериальных антигенов с Toll-подобными рецепторами и их активация сопровождается синтезом провоспалительных цитокинов, в том числе, определяющих дифференцировку Т-хелперных клонов и регулирующих иммунологическую реактивность.

Семейство ИЛ-12, представители которого секретируются в острый период заболевания дендритными клетками и макрофагами, играет важную роль в дифференцировке хелперных клонов и формировании Th1 типа иммунного ответа, а так же в усилении цитотоксической активности НК клеток. ИЛ-23, являющийся представителем суперсемейства ИЛ-12, способен поддерживать пролиферацию Т-клеток памяти и стимулировать секрецию ими интерферона-гамма. Кроме этого он активизирует Т-хелперы-17, обуславливающих защиту от внеклеточных патогенов, которые не могут быть эффективно элиминированы хелперами 1 и 2 типов. Активация интерлейкином-12 хелперов 1 типа и клеток памяти сопровождается продукцией ИЛ-22, стимулирующего продукцию печенью белков острой фазы, антимикробных пептидов и матриксных металлопротеиназ. Кроме этого он подавляет синтез ИЛ-4, усиливая Th1 тип иммунного ответа.

В ответ на антигенное стимулирование макрофагов вирусными антигенами, а так же липополисахаридами бактерий усиливается секреция интерферонов I типа, в частности, ИЛ-28А являющегося регулятором адаптивного иммунного ответа, проявляющего, кроме того антивирусную активность, блокируя репликацию вирусной РНК.

Таим образом, активация иммунной системы сопровождается соответствующим усилением экспрессии генов, контролирующих воспалительный ответ и продукцию эндогенных противомикробных пептидов, в частности кателицидина. Так в острый период пневмонии уровень исследованных цитокинов превышает контрольный в 1,5-2,6 раза, кателицидина на 46%.

Инфицирование респираторного тракта сопровождается активацией Toll-рецепторов антиген-распознающих клеток, с последующим включением внутриклеточных механизмов трансдукции и активацией внутриклеточных протеинкиназ, в частности p38 MAPK, JNK и др. После активации данные киназы запускают активацию ряда факторов транскрипции, в частности NF- κ B, AP1 и подобных им, ответственных за синтез провоспалительных цитокинов и антимикробных факторов.

Таким образом, активация механизмов трансдукции рецепторных сигналов включающих систему рецепторных протеинкиназ и факторов транскрипции, приводит к реализации программ саногенеза и через воспаление обеспечивает эффективную элиминацию возбудителя из организма.

Однако в реальных условиях существования организма находится множество внешних и внутренних факторов, не позволяющих максимально эффективно и полноценно активизировать имеющийся саногенный потенциал. При этом в ответ на повреждение клеток и тканей организма, а так же его внутренней среды, не формируется эффективная ответная реакция, в результате чего создаются предпосылки к затяжному и хроническому течению патологических процессов в организме, а так же молниеносного развития патологических реакций. Интенсивное промышленное развитие сопровождается экологическими нарушениями, приводя к тому, что все большее число людей сталкивается с неблагоприятными факторами окружающей среды и длительное время пребывает в условиях воздействия множества профессиональных вредностей. Длительное воздействие на

организм неблагоприятных факторов окружающей среды создает предпосылки для нарушений функционирования всех систем организма, включая иммунную. В этой связи показателен рост хронической воспалительной патологии, в особенности патологии респираторного тракта.

Нарушения функционирования внутриклеточных молекулярных механизмов в настоящее время все еще не могут быть эффективно скорректированы, в виду ограниченности информации о внутриклеточной физиологии, несмотря на детальную изученность отдельных ее звеньев.

В этой связи неспецифическая активация собственного саногенетического потенциала клеточной системы путем воздействия на нее электромагнитным полем, сопоставимым по мощности и другим параметрам с собственными полями, организма, может рассматриваться перспективным дополнением к существующим способам химической (молекулярной) коррекции их состояния.

СВЧ-излучение частотой 1000 МГц являющееся, по мнению ряда исследователей, резонансной частотой колебаний водных кластеров обеспечивает формирование выраженного биологического эффекта при достаточно малой ППМ [6, 8]. Указанное излучение, принимая во внимание резонансный характер взаимодействия его с молекулярной структурой воды, способно передавать свою энергию на макромолекулы, находящиеся в водной фазе [1, 3]. Полученная биомолекулами энергия способна, приводя к изменению свободной энергии, модифицировать их активность, облегчая функционирование «активированных» макромолекул в рамках реализующихся внутриклеточных программ, что в наибольшей степени актуально для таких молекул как киназы, обладающих высокой чувствительностью к внешним воздействиям [4, 5].

Анализ полученных результатов свидетельствует, что первичной мишенью СВЧ-волн являются внутриклеточные механизмы трансдукции (факторы транскрипции, киназы) коинтенсивного СВЧ-излучения, в качестве регулятора внутриклеточных процессов, свидетельствует его влияние на

продукцию факторов, определяющих реализацию программ апоптоза и клеточного выживания. Нормализация концентрации белка p21, блокирующего циклин-зависимые киназы, наряду со снижением соотношения BCL-2/p21, позволяют говорить об усилении контроля над клеточным циклом под влиянием облучения.

Таким образом, низкоинтенсивные СВЧ-волны выступают в роли подстроечного регулятора активности молекулярных механизмов восприятия и внутриклеточной трансдукции рецепторной информации. СВЧ-облучение модулирует клеточную активность, приводя к развитию биологических эффектов [6, 7, 8]. При этом общий вектор формирующихся изменений направлен на компенсацию влияния внешних возмущающих внутриклеточную среду факторов [6, 7].

Выводы

1. Воспалительный ответ у больных ВП в острый период заболевания характеризовался статистически значимым ростом продукции цитокинов (ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-28А), ядерного фактора транскрипции NF-κB и его ингибитора. Так же выявлено повышение уровня митоген-активируемой протеинкиназы p38, белка BCL-2 и кателицидина. Кроме того отмечено снижение цАМФ и белка p21, что свидетельствует о формировании внутриклеточного стресса.
2. Низкоинтенсивное СВЧ-облучение цельной крови сопровождалось увеличением внутриклеточной концентрации фосфорилированной формы p38 MAPK, повышением уровня ikB и NF-κB, со снижением их соотношения 1,47 до 1,37, указывающего на ограничение внутриклеточных механизмов реализации воспаления.
3. Кроме того, облучение сопровождалось ростом продукции ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-28А, а так же кателицидина. Учитывая роль рассмотренных медиаторов в организме, биологический эффект

облучения является следствием активации антигенпрезентирующих клеток, Т-хелперов-17 и Т-клеток памяти.

4. Установлена способность низкоинтенсивного СВЧ-излучения стимулировать продукцию белка p21 и понижать соотношение BCL-2/p21 с 3,6 до 2,7 ед., а так же нормализовывать уровень цАМФ, что свидетельствует об усилении контроля над клеточным циклом.
5. Полученные результаты указывают на то, что биологические эффекты низкоинтенсивного СВЧ-облучения реализуются посредством модификации внутриклеточных механизмов трансдукции рецепторных сигналов и направлены на активацию саногенного потенциала клеток иммунной системы.

Литература

1. Бецкий, О.В. Пионерские работы по миллиметровой электромагнитной биологии, выполненные в ИРЭ РАН / О.В. Бецкий // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника.- 2003.- №8.- С. 11-20.
2. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин.- М.: Медицина, 2003.- 288 с.
3. Петросян, В.И. Резонансное излучение воды в радиодиапазоне / В.И.Петросян //Письма в ЖТФ.- 2005.- Т.31, Вып. 23.- С.29-33.
4. Роль молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем / В.И.Петросян, Н.И.Синицын, В.А.Ёлкин и др. // Биомедицинская радиоэлектроника.- 2001.- №5-6.- С. 62-129.
5. Особая роль системы «миллиметровые волны - водная среда» в природе /Н.И. Синицын, В.И.Петросян, В.А. Ёлкин, и др. // Научные технологии.- 2000.- №2.- С.33-37.
6. Терехов, И.В. Особенности альвеолярно-капиллярных нарушений при нетяжелом отеке легких у крыс и их коррекция с помощью лечебного аппарата микроволновой терапии «Акватор» / И.В. Терехов, М.А. Дзюба,

С.С. Бондарь, Л.Г. Наджарьян // Биомедицинская радиоэлектроника.- 2011.- № 3.- С. 20-24.

7. Терехов И.В. Исследование возможности использования нетеплового СВЧ-излучения в реабилитационном периоде у больных внебольничной пневмонией / И.В. Терехов, К.А. Солодухин, В.С. Никифоров // Физиотерапевт.- 2011.- №4.- С.12-17.

8. Гуцкова Т.Н. Морфофункциональные аспекты противоопухолевого эффекта низкоинтенсивного микроволнового резонансного излучения в эксперименте /Т.Н. Гуцкова, Г.В. Жукова, Л.Х. Гаркави, О.Ф. Евстратова, Т.А. Бартенева //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.-2010.- Т.150.- №11.- С.595-600.

**REALISATION OF BIOLOGICAL EFFECT OF MICROWAVE
RADIATION BY ACTIVATION OF MOLECULAR MECHANISMS OF A
TRANSDUCTION**

Terekhov I.V., Arzhnikov V.V., Kondratev A.S.

In research influence of microwave radiation in density of a stream of power 100 pW/cm² on a state of intracellular mechanisms of a transduction and production of cytokines is discussed. It is shown, that microwave radiation is accompanied by growth of concentration of protein p21 on 47 %, NF-κB 12,5 %, iκB on 22 %, phosphor p38 MAPK on 18,1 %, BCL-2 on 11,2 %, cAMP on 16,8 %. It is established statistically significant growth of production IL-23 and IL-28A and as the tendency to growth IL-22 is found.

Key words: microwaves, cytokines, transduction, nf-kb, molecular biology.

Таблица 1

Уровень исследуемых факторов в острый период ВП

Показатели	Группы		
	1	2	Контрольная
ИЛ-22, пг/мл	4,4±1,5	5,0±1,5	1,7±0,3
ИЛ-23, пг/мл	3,5±0,4	4,0±0,31	2,3±0,1
ИЛ-28А, пг/мл	3,4±1,1	4,0±1,1	1,4±0,3
NF-κB, нг/мл	5,6±0,8	6,3±0,8	2,4±0,2
іκB, нг/мл	3,8±0,52	4,6±0,56	1,9±0,1
p38 MAPK, нг/мл	3,3±0,48	3,9±0,44	2,1±0,2
BCL-2, нг/мл	6,1±1,6	6,8±1,5	3,0±0,8
цАМФ, нг/мл	5,02±1,3	5,84±1,3	6,3±0,9
p53, Ед/мл	2,4±0,35	3,0±0,1	3,1±0,27
Кателицидин, мкг/мл	5,2±0,19	5,43±0,14	2,8±0,05