

Игорь Владимирович Терехов – заведующий лабораторией молекулярно-клеточных технологий Обнинского института атомной энергетики филиала ФГОУ ВПО «Национальный исследовательский ядерный институт «МИФИ»». 249040 г. Обнинск, Студгородок, 1., e-mail: trft@mail.ru.

Константин Анатольевич Солодухин – доктор медицинских наук, доцент, заместитель начальника кафедры-клиники терапии ФГОУ ВПО «Саратовский военно-медицинский институт» МО РФ. 410017 г. Саратов, Ильинская пл., 17, e-mail:itskovitch69@mail.ru.

Виктор Сергеевич Никифоров – доктор медицинских наук, доцент кафедры военно-морской и госпитальной терапии ФГОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» МО РФ. 198013 г. Санкт-Петербург, Загородный пр., 47.

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЧ-ОБЛУЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ МОНОНУКЛЕАРОВ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ

Аннотация

Обсуждаются биологические эффекты низкоинтенсивного СВЧ-излучения (плотность потока мощности 10-80 нВт/см²) частотой 1000 МГц. Изучалось влияние СВЧ-облучения цельной крови на митоген-стимулированную продукцию ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13 и РАИЛ-1. На модели митоген-индуцированного клеточного стресса показано защитное действие низкоинтенсивного СВЧ-излучения на клетки крови, проявляющееся уменьшением продукции провоспалительных медиаторов и тенденцией к восстановлению измененной клеточной реактивности.

Ключевые слова: клеточный дистресс, иммунная дисфункция, цитокиновый профиль, СВЧ-излучение.

Цитокиновый дисбаланс и гиперпродукция медиаторов воспаления, в частности, провоспалительных интерлейкинов, являются патогенетической основой большинства септических состояний, коррекция которых в настоящее время является нетривиальной задачей. При этом, не смотря на проводимую интенсивную терапию с применением современных лекарственных средств, включая рекомбинантные интерлейкины, септические состояния сопровождаются высокой летальностью, а их лечение чрезвычайно затратно [2].

В качестве одного из путей улучшения исходов критических состояний может являться использование физических факторов активации саногенного потенциала

клеточной системы и восстановления нарушенной иммунной регуляции. Это особенно актуально в аспекте минимизации вмешательства в межклеточные взаимодействия с помощью химиотерапевтических средств, учитывая неполноту сведений о механизмах межклеточных взаимодействий.

Одним из немедикаментозных способов регуляции межсистемных взаимодействий в живых системах является низкоинтенсивное СВЧ-излучение частотой 1000 МГц плотностью потока излучаемой мощности в пределах 1–100 нВт/см² [7, 8]. Излучение с обозначенными параметрами, по мнению ряда исследователей, принимает участие в процессах синхронизации колебательной активности водных кластеров, входя в группу резонансных частот молекул воды [1, 5, 7, 8]. Очевидно, что изменение физико-химических свойств водных сред, за счет перераспределения СВЧ-энергии в молекулярной структуре воды, может оказывать непосредственное влияние на лиганд-рецепторные взаимодействия и состояние внутриклеточных процессов реализации различных клеточных программ [5, 6].

Цель исследования - изучить влияние СВЧ-излучения частотой 1000 МГц на цитокиновый профиль клеток цельной крови здоровых лиц, находящихся в условиях стимуляции поликлональным митогеном.

Материалы и методы

В исследовании использовано 30 образцов цельной крови практически здоровых добровольцев обоего пола в возрасте 20-45 лет. Стимуляция клеток цельной крови осуществлялась комплексным поликлональным активатором из набора «Цитокин-Стимул-Бест» (ЗАО «Вектор Бест»).

Оценка функциональной активности клеток и биологических эффектов СВЧ-излучения проводилась путем исследования цитокинового статуса методом иммуноферментного анализа. При этом в клеточном супернатанте оценивалась продукция следующих интерлейкинов (ИЛ): ИЛ-1 β , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-13 и рецепторного антагониста ИЛ-1 (РАИЛ-1).

В процессе исследования были сформированы четыре группы. Первая группа – контрольная, включала необлученные образцы крови, вторая – образцы подвергнутые СВЧ-воздействию ППМ 10 нВт/см², третья – ППМ 40 нВт/см², четвертая – 80 нВт/см².

Облучение проводилось аппаратом микроволновой терапии «Акватон-02» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов), на частоте 1000 \pm 0,01 МГц, мощность генерации составляла 1 – 6 мкВт, экспозиция – 20 минут. По окончании облучения образцы крови помещались в термостат, где инкубировались в течение 24 часов при 37 °С.

Статистическая обработка проводилась в программе Statistica 7,0. при этом

рассчитывалась медиана (Me), а так же 25 и 75 процентиля (25%, 75%) выборки. Оценка значимости (p) межгрупповых различий проводилась с помощью однофакторного дисперсионного анализа, линейный корреляционный анализ – методом Пирсона.

Результаты исследования

Цитокиновый профиль исследованных образцов крови представлен в табл.1.

Результаты исследования свидетельствуют о существенном влиянии электромагнитного излучения на функциональную активность клеток цельной крови стимулированных поликлональным митогеном. Проведенный однофакторный дисперсионный анализ выявил статистически значимые изменения стимулированной продукции ряда цитокинов под воздействием излучения (табл.2).

Анализ полученных результатов показал, что под влиянием кратковременного однократного облучения продукция ИЛ-1 β , играющего ключевую роль в процессе воспаления изменяется несущественно. Так, при ППМ 10 нВт/см² его продукция в сравнении с контролем увеличивалась всего на 2,9% (p=0,65), при ППМ 40 нВт/см² на 5,5% (p=0,72), при 80 нВт/см² на 2,87% (p=0,79). Продукция РАИЛ-1 в этих же условиях увеличивалась на 3,9% (p=0,36), 11,3% (p=0,029) и 13,9% (p=0,0043) соответственно. При этом следует отметить, что повышение минимального уровня секреции РАИЛ-1 при ППМ 80 нВт/см² составило 23,6%, максимальные же значения его продукции в сравнении с контролем возросли на 44,8%. В этих же условиях, увеличение минимальной продукции ИЛ-1 β составило 2,8%, т.е. практически не изменилось, при соответствующем снижении максимальных значений продукции на 20,8%. Таким образом в системе ИЛ-1 β – РАИЛ-1 имеет место смещение равновесия в сторону последнего, т.е. налицо ограничение провоспалительных влияний ИЛ-1 β .

Секреция хемокина ИЛ-8 под влиянием облучения ППМ 10 нВт/см² увеличивалась на 1,2% (p=0,97), т.е. оставалась практически неизменной. При ППМ 40 нВт/см², наблюдалось повышение его уровня на 5,2% (p=0,98). При дальнейшем увеличении мощности отмечено снижение продукции ИЛ-8 на 26,8% (p=0,28).

Динамика продукции клетками цельной крови противовоспалительного цитокина ИЛ-10 характеризовалась значительным ростом. Так, при минимальной мощности облучения (10 нВт/см²) отмечался прирост продукции указанного медиатора в сравнении с контролем на 12% (p=0,5), при увеличении мощности до 40 нВт/см², продукция возрастала на 62,9% (p=0,0028), при 80 нВт/см² увеличивалась в 1,95 раза (p=0,00007).

Исследование динамики ИЛ-13, способного ограничивать секрецию провоспалительных цитокинов макрофагами, выявило рост его продукции на 9,8% при ППМ 10 нВт/см²(p=0,14), при ППМ 40 нВт/см² на 21,9% (p=0,00029), при 80 нВт/см² на

23,5% ($p=0,000004$) в сравнении с контролем.

Взаимодействия между исследуемыми цитокинами в группах исследования представлены в табл.3.

Анализ корреляционных взаимоотношений выявил статистически значимую умеренной силы положительную связь продукции ИЛ-8 и ИЛ-1 β , являющуюся вполне закономерной. Значимых взаимозависимостей других медиаторов в данной группе не отмечалось.

Учитывая, что биологический эффект СВЧ-облучения наиболее ярко проявлялся при ППМ 80 нВт/см², анализ корреляционных взаимоотношений продукции исследуемых медиаторов был проведен именно в этой группе (табл.4).

Корреляционные взаимоотношения в группе, подвергнутой облучению, существенно отличались от таковых, установленных для контрольной группы. Под влиянием облучения произошло увеличение корреляции между ИЛ-8 и ИЛ-1 β , усилилась отрицательная связь ИЛ-1 β и ИЛ-13, а так же ИЛ-13 и ИЛ-8, достигнув статистически значимого характера. Проведенный анализ выявил умеренную, статистически значимую положительную связь продукции ИЛ-10 и РАИЛ-1. Кроме этого была выявлена отрицательная корреляция РАИЛ-1 и ИЛ-8, которая по абсолютной величине практически равна описанной выше, отличаясь лишь знаком. Следует отметить изменение характера связи ИЛ-1 β и РАИЛ-1, конкурирующих за соответствующий клеточный рецептор. Отмечающееся изменение характера связи от умеренной положительной до слабой отрицательной, определялось различным влиянием облучения на их продукцию (усиление продукции РАИЛ-1, угнетение ИЛ-1 β).

Таким образом, однократное 20-ти минутное СВЧ-воздействие на клетки цельной крови проводимое в условиях поликлональной митогенной стимуляции сопровождается существенными изменениями их функциональной активности направленными на компенсацию гиперреактивности и восстановление баланса провоспалительные /противовоспалительные медиаторы.

Обсуждение результатов

Состояние клеточного дистресса соответствует мощной стимуляции клеток бактериальными токсинами с формированием гиперэргии, наблюдаемой при сепсисе. В условиях гиперреактивности клеток крови, вызванной мощным длительным воздействием Т и В-клеточных митогенов создаются условия для угнетения продукции противовоспалительных медиаторов «раздраженными» клетками, за счет чего создаются предпосылки для потери управления формирующимся патологическим процессом и саморазрушения клеток и организма как системы.

Используемые в настоящее время химиотерапевтические подходы направлены на блокирование ключевых молекулярных звеньев передачи рецепторной информации и прерывание информационного канала, регулирующего синтез провоспалительных цитокинов либо других эффекторных молекул воспаления и ответа острой фазы.

Однако, исходя из патогенеза гиперэргической реакции и формирования клеточного стресса, в клетках остается значительный регуляторный потенциал, остающийся по ряду причин не востребованным. Активация данного саногенного потенциала, по существу представляющего собой задачу усиления транскрипции генов, контролирующих продукцию провоспалительных медиаторов.

Результаты проведенного исследования, выявившие достоверные изменения продукции РАИЛ-1, ИЛ-10, ИЛ-13 при стабильной продукции ИЛ-1 β и тенденции к снижению ИЛ-8, указывают на неспецифическую активацию механизмов противодействия митогенной стимуляции. Наблюдающийся в результате этого значительный рост продукции ИЛ-10, тормозящего пролиферативный ответ Т-клеток различные антигены и подавляющего продукцию активированными моноцитами ИЛ-1 β , а так же ряд других медиаторов. Повышение продукции ИЛ-13, оказывающего супрессорный эффект в отношении макрофагальной активности, ингибирующий кроме того продукцию NO, а так же активных форм кислорода, оказывающих цитотоксические эффекты может рассматриваться как механизм компенсации стимулирующей активности митогена.

Исследование взаимосвязей продукции различных цитокинов в контроле и при облучении позволяет говорить о нарушениях в системе регуляции клеточного ответа на стимулирующее действие митогена, проявляющееся отсутствием конгруэнтных изменений продукции цитокинов являющихся функциональными синергистами (в частности противовоспалительных цитокинов), а так же отсутствия отрицательной корреляции цитокинов-антагонистов, в пользу тесных взаимоотношений провоспалительных медиаторов. Указанные изменения, свидетельствуют о нарушении баланса в системе про- и противовоспалительных интерлейкинов и позволяют говорить о существовании серьезных нарушений регуляции продукции.

Влияние облучения проявляющееся увеличением продукции противовоспалительных интерлейкинов, так же характеризуется формированием тесных взаимосвязей между исследуемыми медиаторами, в частности положительной корреляцией ряда противовоспалительных медиаторов между собой, а так же формированием реципроктных взаимоотношений между про- и противовоспалительными цитокинами. Формирование таких взаимоотношений, а так же снижение силы и характера взаимосвязей некоторых

цитокинов, в частности ИЛ-13 и РАИЛ-1, очевидно, позволяют предполагать различные механизмы реализации биологических эффектов низкоинтенсивного СВЧ-излучения.

Сопоставление результатов, полученных в настоящем исследовании, с данными, имеющимися в литературе, свидетельствуют, что выявленные биологические эффекты СВЧ-излучения близки к таковым, полученным с использованием химиотерапевтических средств, таких как рекомбинантные интерлейкины [3].

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что низкоинтенсивное СВЧ-излучение ППМ 10–80 нВт/см² характеризуется выраженным влиянием на клетки цельной крови, проявляющимся изменениями клеточной реактивности, выражающимися в ослаблении негативного влияния митогенной стимуляции.

Возможным биофизическим механизмом наблюдаемых эффектов СВЧ-излучения, мощность которого сопоставима с мощностью, излучаемой самим организмом, является пространственно-временное упорядочивание молекулярной структуры воды, связанной с биомолекулами. При этом поглощенной водой и переданной биомолекулам электромагнитной энергии, достаточно для осуществления конформационных изменений и модификации активности, что позволяет говорить о регуляторной роли внешнего низкоинтенсивного излучения, по отношению к внутриклеточным процессам [2, 7]. Кроме этого, невозможно исключить взаимодействие внешнего излучения с собственными электромагнитными полями, обеспечивающими молекулярно-клеточную синхронизацию [7, 8].

Результаты проведенного исследования, обозначившие примерные границы оптимальной мощности воздействия, свидетельствуют о высоком физиотерапевтическом потенциале сверхмалого СВЧ-воздействия, что может быть использовано для коррекции патологических изменений возникающих при чрезмерной активации иммунной системы.

Выводы:

1. В исследовании выявлено ослабляющее действие СВЧ-излучения плотностью потока мощности 10-80 нВт/см² в отношении секреции клетками цельной крови, подвергнутых поликлональной активации, ряда провоспалительных медиаторов и активизирующее влияние на синтез противовоспалительных.
2. Результаты исследования свидетельствуют о нарастании эффекта облучения по мере увеличения мощности воздействия. При этом, последовательно изменяя плотность потока мощности излучения до 10, 40 и 80 нВт/см² был получен рост продукции РАИЛ-1 на 3,9% (p=0,36), 11,3% (p=0,029) и 13,9% (p=0,0043), ИЛ-10 на 12% (p=0,5), 62,9% (p=0,0028) и 95% (p=0,00007), ИЛ-13 на 9,8%

($p=0,14$), 21,9% ($p<0,0001$) и 23,5% ($p<0,0001$) соответственно. На этом фоне продукция ИЛ-1 β и ИЛ-8 характеризовалась тенденцией к снижению средних значений за счет ограничения субмаксимальных и максимальных ее уровней.

3. В группе контроля, образцы крови которой подвергались стимуляции, отмечено рассогласование продукции про- и противовоспалительных медиаторов, что свидетельствует о нарушении контроля клеточной реактивности. В этих условиях низкоинтенсивное излучение проявляет регуляторное действие, проявляющееся установлением соответствия продукции про- и противовоспалительных медиаторов.
4. Анализ результатов исследования свидетельствует о значительном физиотерапевтическом потенциале низкоинтенсивного СВЧ-излучения частотой 1000 МГц. При этом плотность потока мощности в диапазоне 10-80 нВт/см² и 20-ти минутная экспозиция позволяет сформировать значимый биологический эффект, регистрируемый спустя 24 часа после облучения.

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. Козлов В.К. Сепсис: Этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. / К.В.Козлов.- СПб.: Диалект, 2006.- 304 с.
3. Костюшко А.В. Влияние ИЛ-2 на локальную и системную продукцию цитокинов при экспериментальной пневмонии, вызванной *Escherichia coli* / А.В. Костюшко // Российский иммунологический журнал.- 2008.- Том 2 (11).- № 2-3.- С. 207.
4. Пальцев, М.А. Межклеточные взаимодействия / М.А. Пальцев, А.А. Иванов, С.Е. Северин.- М.: Медицина, 2003.- 288 с.
5. Петросян, В.И. Резонансное излучение воды в радиодиапазоне / В.И.Петросян //Письма в ЖТФ.- 2005.- Т.31, Вып. 23.- С.29-33.
6. Пономаренко, Г.Н. Биофизические основы физиотерапии / Г.Н. Пономаренко, И.И. Турковский. — М.: Медицина, 2006.- 176 с.
7. 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.
8. 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-

**BIOLOGICAL POTENTIAL OF MICROWAVE RADIATION OF LOW INTENSITY
AT THE ANTIGEN-INDUCED THE DISTRESS-SYNDROME OF BLOOD CELLS**

Terekhov I.V.¹, Solodukhin K.A.², Nikiforov V.S.³

¹Obninsk Institute of Atomic Energy, Department of Medicine, Head of Laboratory of Molecular Medicine, Candidate of Medical Science, 249040, Obninsk, Studgorodok, 1.

²

³S.M.Kirov's Military medical academy, naval and hospital department, 198013, Saint Petersburg, Zagorodny pr., 47.

The summary

Biological effects of microwave radiation (density of a stream of power 10-80 nW/cm²) by frequency of 1000 MHz are discussed. Irradiating influence on caused by a mitogen production IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-13 and IL-1Ra was studied by cells of integral blood of healthy faces. On model a mitogen-induced of cellular stress possibility of correction of level of mediators of an inflammation is shown by microwave radiation, using density of a stream of power 80 nW/cm².

Keywords: a cellular distress, cytokines, microwave radiation.

Цитокиновый профиль (пг/мл) в группах исследования

Цитокины	Группа	Показатели продукции цитокинов		
		Ме	25%	75%
ИЛ-1β	1	2573,5	2278,0	4123,0
	2	2651,5	2408,0	4266,0
	3	2714,0	2478,0	3982,0
	4	2647,5	2343,5	3263,5
РАИЛ-1	1	1408,5	1119,5	1525,0
	2	1466,0	1222,0	1568,0
	3	1568,0	1504,0	1687,0
	4	1605,5	1384,5	2208,5
ИЛ-8	1	4180,5	2563,5	5262,5
	2	4232,5	2931,5	5267,5
	3	4398,0	2745,0	5367,0
	4	3060,0	2075,0	4607,0
ИЛ-10	1	132,0	108,5	193,5
	2	150,0	107,5	203,0
	3	215,0	174,0	247,0
	4	258,0	199,5	270,5
ИЛ-13	1	1025,5	969,5	1081,5
	2	1137,5	1037,5	1163,5
	3	1251,0	1125,0	1285,0
	4	1266,5	1202,0	1323,5

Таблица 2

Результаты однофакторного дисперсионного анализа продукции цитокинов

Показатели	SS effect	Df effect	MS effect	F- критерий	p
ИЛ-1β	614258	3	204753	0,21	0,89
РАИЛ-1	1253974	3	417991	3,60	0,019
ИЛ-8	3965745	3	1321915	0,58	0,63
ИЛ-10	100638	3	33546	10,40	0,00002
ИЛ-13	621974	3	207325	10,67	0,00001

Таблица 3

Корреляция (r) митоген-стимулированной продукции цитокинов в группе контроля

r	ИЛ-10	РАИЛ-1	ИЛ-8	ИЛ-1 β	ИЛ-13
ИЛ-10	-	0,39	-0,02	0,14	0,11
РАИЛ-1	0,39	-	0,03	0,44	-0,41
ИЛ-8	-0,02	0,03	-	0,56*	-0,29
ИЛ-1β	0,14	0,44	0,56*	-	-0,33
ИЛ-13	0,11	-0,41	-0,29	-0,33	-

Примечание: * - уровень значимости коэффициента корреляции $p < 0,05$.

Таблица 4

Корреляция (r) митоген-стимулированной продукции интерлейкинов при СВЧ-облучении

r	ИЛ-10	РАИЛ-1	ИЛ-8	ИЛ-1 β	ИЛ-13
ИЛ-10	-	0,68*	-0,20	0,17	-0,14
РАИЛ-1	0,68*	-	-0,67*	-0,20	0,11
ИЛ-8	-0,20	-0,67*	-	0,61*	-0,52*
ИЛ-1β	0,17	-0,20	0,61*	-	-0,56*
ИЛ-13	-0,14	0,11	-0,52*	-0,56*	-

Примечание: * - уровень значимости коэффициента корреляции $p < 0,05$.