

## Медицинская и биологическая физика Medical and Biological Physics

ID: 2011-03-2076-A-1260

Оригинальная статья

Терехов И.В., Петросян В.И., Дягилев Б.Л., Солодухин К.А., Аржников В.В., Бондарь С.С.

### Молекулярные механизмы иммунореабилитации при использовании низкоинтенсивного СВЧ-излучения

*ООО «Телемак»*

#### Резюме

Цель исследования – изучение биологических эффектов СВЧ-излучения плотностью потока мощности 100 пВт/см<sup>2</sup> на состояние внутриклеточных механизмов трансдукции мононуклеаров цельной крови больных внебольничной пневмонией в острой фазе заболевания. Методом ИФА определялся цитокиновый статус и внутриклеточное содержание ряда молекул, обеспечивающих внутриклеточную трансдукцию. Показано, что облучение сопровождается ростом содержания белка p53 на 25%, NFκB 12,5%, IkB 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-излучение, цитокины, внутриклеточная трансдукция, Акватон

#### Введение

Формирование благоприятного течения восстановительного процесса после перенесенных заболеваний и оперативных вмешательств невозможно без нормализации иммунной регуляции [1].

Воспаление как типовой патологический процесс сопровождает развитие большинства заболеваний и патологических состояний, являясь наиболее важным патогенетическим механизмом, определяющим их течение и исходы. В этой связи, нарушения межклеточной кооперации, наблюдающиеся в условиях неадекватной повреждению воспалительной реакции, являются предпосылками к развитию осложнений и затрудняют восстановление таких больных [1, 2].

Очевидно, что активация собственного потенциала организма в частности его иммунной системы, направленная на восстановление межклеточных взаимодействий является одним из основных условий полноценной реабилитации. При этом поиск и исследование новых лечебных факторов и механизмов следует считать актуальной и важной научно-практической задачей. В качестве одного из таких лечебных факторов, способных активировать саногенный потенциал клеточной системы организма следует рассматривать низкоинтенсивного СВЧ-излучения частотой 1000 МГц плотностью потока мощности (ППМ) ~100 пВт/см<sup>2</sup> [4, 5, 6].

Биологический эффект указанного излучения, сопоставимого по своей мощности с собственным излучением организма, реализуется благодаря резонансному характеру взаимодействия электромагнитного излучения (ЭМИ) с молекулярной структурой воды с передачей энергии находящимся в водной фазе биомолекулам [4, 6].

#### Цель

Изучение молекулярных механизмов реализации биологических эффектов ЭМИ СВЧ в отношении иммунной регуляции у больных с воспалительной активацией иммунной системы (на модели пневмонии).

#### Материал и методы

Обследовано 30 больных внебольничной пневмонией (ВП) в острой стадии заболевания (5-7 сутки) в возрасте 20-35 лет.

Оценка характера биологических эффектов СВЧ-излучения проводилась путем исследования цитокинового статуса (определение интерлейкина (ИЛ) 22, 23, 28А), уровня митоген-активированной протеинкиназы р38 MAPK, ядерного фактора транскрипции NFκB и его ингибитора IκB, цАМФ, белка р53 и BCL-2 и продукции антимикробного пептида LL-37 (кателицидина).

Основная группа была разделена на две подгруппы. Первая подгруппа – включала необлученные образцы крови больных ВП, вторая – образцы подвергнутые СВЧ-облучению в течении 45 минут. Контрольную группу составили 15 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с основной группой.

Облучение проводилось аппаратом микроволновой терапии «Акватор-02» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов), на частоте  $1000 \pm 0,01$  МГц. По окончании облучения образцы крови инкубировали в течение 24 часов при  $37^{\circ}$  С, после чего в клеточном супернатанте оценивали продукцию ИЛ-22, ИЛ-23, ИЛ-28А, цАМФ, р53, LL-37. В лизате мононуклеаров, выделявшихся на градиенте фикол-верографин, определяли содержание NFκB, IκB, BCL-2 и р38 MAPK.

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

### Результаты

Уровень исследуемых факторов у больных представлен в табл.1. Формирование воспаления сопровождалось увеличением 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 ( $p = 0,0041$ ). Так же отмечено повышение внутриклеточного уровня NFκB в 2,3 раза ( $p = 0,012$ ), IκB в 2 раза ( $p = 0,017$ ), р38 MAPK на 62% ( $p = 0,048$ ), BCL-2 в 2 раза ( $p = 0,0019$ ), LL-37 на 46,2% ( $p = 0,0007$ ). Кроме того отмечено снижение содержания цАМФ на 20,3% ( $p = 0,061$ ), белка р53 на 22,6% ( $p=0,045$ ). Установлено, что у заболевших соотношение NFκB/IκB, отражающее активацию генетических программ воспалительного процесса, повышалось с 1,26 до 1,47, а соотношение BCL-2/р53, отражающее баланс процессов апоптоза и пролиферации, увеличивалось в 2,6 раза с 0,97 до 2,5.

Таблица 1. Уровень исследуемых медиаторов в группах

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
NFκB, нг/мл	5,6±0,8	6,3±0,8	2,4±0,2
IκB, нг/мл	3,8±0,52	4,6±0,56	1,9±0,1
р38 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
р53, 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

Полученные данные указывают на существенную активацию иммунной системы, в частности антигенпрезентирующих клеток, а так же высокую активность ядерной транскрипции.

СВЧ-облучение сопровождалось ростом продукции ИЛ-23 и ИЛ-28А на 14% ( $p = 0,001$ ) и 17,6% ( $p = 0,031$ ) соответственно, а так же ИЛ-22 на 13,3% ( $p = 0,23$ ) и LL-37 на

4,4% ( $p = 0,01$ ). Так же отмечено повышение концентрации NF $\kappa$ B на 12,5% ( $p = 0,001$ ), а I $\kappa$ B на 21,1% ( $p = 0,00072$ ), со снижением их соотношения с 1,47 до 1,37. Кроме того облучение сопровождалось ростом внутриклеточного содержания фосфорилированной формы p38 MAPK на 18,2% ( $p = 0,011$ ).

Анализ взаимодействий в системе пролиферации и апоптоза показал способность облучения существенно повышать уровень белка p53, контролирующего множество внутриклеточных процессов, включая репарацию поврежденной ДНК на 25% ( $p < 0,001$ ). Учитывая многогранную контролирующую роль p53 в клетке, полученные данные свидетельствуют об активации внутриклеточных механизмов регулирующих стрессорные реакции [2, 7].

Установлено, что облучение способствовало росту продукции антиапоптотического белка BCL-2 на 11,5% ( $p = 0,12$ ), и цАМФ на 16,8% ( $p = 0,2$ ).

### Обсуждение

Хорошо известно, что взаимодействие бактериальных антигенов с Toll-подобными рецепторами антигенпрезентирующих клеток и их активация сопровождается синтезом провоспалительных цитокинов, в том числе, определяющих дифференцировку Т-хелперных клонов и регулирующих иммунологическую реактивность (ИЛ-1, ИЛ-12, ИЛ-23 и др.) [1, 2].

В этих условиях семейство ИЛ-12 играет существенную роль в дифференцировке Т-хелперных клонов и формировании Th1 типа иммунного ответа, усиливая так же цитотоксическую активность NK клеток. Известно, что ИЛ-23, входящий в семейство ИЛ-12, поддерживает пролиферацию Т-клеток памяти, активирует Т-хелперы-17 и реализует некоторые другие эффекты ИЛ-12. Активация Т-хелперов 1 типа и клеток памяти сопровождается продукцией ИЛ-22, стимулирующего продукцию белков острой фазы, антимикробных пептидов и матриксных металлопротеиназ [2].

В ответ на антигенное стимулирование антигенпрезентирующих клеток вирусными антигенами и липополисахаридами некоторых бактерий усиливается так же секреция интерферонов I типа, и, в частности, ИЛ-28А являющегося регулятором адаптивного иммунного ответа и противовирусной защиты.

Кроме того, активация Toll-рецепторов приводит к активации протеинкиназ, в частности p38 MAPK с фосфорилированием ряда белков входящих в состав транскрипционного фактора AP-1, ответственного за формирование воспалительного ответа и синтез антимикробных пептидов, в частности кателицидина, сурфактантных белков и др. молекул. Кроме того, провоспалительные цитокины, в частности ИЛ-1, активируют фактор транскрипции NF $\kappa$ B контролирующий синтез провоспалительных интерлейкинов, поддерживающих воспалительный ответ.

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 ряде случаев антигенная агрессия не формирует адекватного иммунного ответа, что создает предпосылки к затяжному и хроническому течению патологического процесса [1, 2].

О перспективности использования низкоинтенсивного СВЧ-излучения, в качестве регулятора внутриклеточного метаболизма, свидетельствует его влияние на продукцию факторов, определяющих реализацию программ воспаления, апоптоза и клеточного выживания. Активация каскада митоген-активируемых протеинкиназ приводящая к росту фосфорилированной формы p38 MAPK является пусковым стимулом активации транскрипционных факторов и протеина p53. Нормализация концентрации белка p53, контролирующего множество эффектов, направленных на минимизацию последствий повреждения ДНК и нарушения клеточного метаболизма, наряду со снижением соотношения BCL-2/p53, позволяют говорить об усилении контроля над клеточным метаболизмом [2, 7, 8].

Касаясь биофизических механизмов взаимодействия ЭМИ с клеткой, важно отметить ведущую роль воды в формировании биологических эффектов облучения. Учитывая, что молекулярная структура воды является колебательной системой способной к

резонансному взаимодействию с внешним СВЧ-полем, значительную роль в формировании биологических эффектов облучения играет трансформация и передача СВЧ-энергии с молекул воды на связанные с ними биомолекулы [4].

Первичной мишенью СВЧ-волн, очевидно, являются наиболее лабильные звенья внутриклеточных механизмов внутриклеточной трансдукции – протеинкиназы. Модификация их активности сопровождается активацией факторов транскрипции с соответствующими изменениями продукции информационных молекул – интерлейкинов и эффекторных молекул воспаления [2, 7].

Наблюдаемая каскадность формирования биологических эффектов ЭМИ указывает на физиологичность воздействия, а сами СВЧ-волны выступают в качестве подстроечного регулятора активности молекулярных механизмов восприятия и внутриклеточной передачи рецепторной информации.

### Заключение

1. Воспалительный ответ у больных ВП в острый период заболевания характеризовался ростом продукции ИЛ-22 в 2,6 раза ( $p=0,0012$ ), ИЛ-23 в 1,5 раза ( $p=0,021$ ), ИЛ-28А в 2,4 раза ( $p=0,0041$ ), NF $\kappa$ B в 2,3 раза ( $p=0,012$ ), его ингибитора в 2 раза ( $p=0,017$ ), р38 MAPK на 62% ( $p=0,048$ ), BCL-2 в 2 раза ( $p=0,0019$ ), кателицидина на 46,2% ( $p=0,001$ ). Отмечено снижение цАМФ на 20,3% ( $p=0,061$ ) и белка р53 на 22,6% ( $p=0,045$ ).
2. СВЧ-облучение сопровождалось увеличением содержания в мононуклеарах фосфорной формы р38 MAPK на 18,2% ( $p=0,011$ ), NF $\kappa$ B на 12,5% ( $p = 0,001$ ), I $\kappa$ B 22,5% ( $p = 0,00072$ ), снижением их соотношения NF $\kappa$ B/ I $\kappa$ B с 1,47 до 1,37 (в норме 1,27). Кроме того отмечалось увеличение продукции ИЛ-22 на 13,3% ( $p = 0,23$ ), ИЛ-23 на 14% ( $p = 0,001$ ), ИЛ-28А на 17,6% ( $p=0,031$ ), кателицидина на 4,4% ( $p = 0,01$ ), что указывает на стимуляцию антимикробной активности иммунной системы.
3. Установлена способность облучения увеличивать в острую фазу воспаления продукцию белка р53 на 25% ( $p<0,001$ ), понижать соотношение BCL-2/р53 с 2,5 до 2,3 ед., а так же повышать уровень цАМФ на 16,8%, что свидетельствует о потенциальной способности облучения влиять на процессы пролиферации и апоптоза.
4. Полученные результаты указывают на информационную роль низкоинтенсивного СВЧ-излучения в реализации его биологических эффектов.

### Литература

1. Чиркин В.В., Карандашов В.И., Палеев Ф.Н. Иммунореабилитация (патофизиологические и клинические аспекты).– М.: Медицина, 2003.– 400 с.
2. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия.– М.: Медицина, 2003.– 288 с.
3. Терехов И.В., Солодухин К.А., Никифоров В.С. Исследование возможности использования нетеплового СВЧ-излучения в реабилитационном периоде у больных внебольничной пневмонией // Физиотерапевт.– 2011.– №4.– С.12-17.
4. Бецкий О.В. Пионерские работы по миллиметровой электромагнитной биологии, выполненные в ИРЭ РАН // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника.– 2003.– №8.– С. 11-20.
5. Петросян, В.И. Резонансное излучение воды в радиодиапазоне // Письма в ЖТФ.– 2005.– Т.31, Вып. 23.– С.29-33.
6. Петросян В.И., Синицын Н.И., Ёлкин В.А. Роль молекулярно-волновых процессов в природе и их использование для контроля и коррекции состояния экологических систем // Биомедицинская радиоэлектроника.– 2001.– №5-6.– С. 62-129.
7. Чумаков П.М. Белок р53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии.–2007.–Т.47.–С.3-52.
8. Гуцкова Т.Н., Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Евстратова О.Ф., Бартенева Т.А. Морфофункциональные аспекты противоопухолевого эффекта низкоинтенсивного микроволнового резонансного излучения в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.– 2010.– Т.150.– №11.– С.595-600.