

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОМПОНЕНТОВ IL1/TOLL-СИГНАЛЬНОГО ПУТИ И NF-κB В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЧАСТОТОЙ 1 ГГц

И.В. Терехов¹, В.С. Никифоров², С.С. Бондарь¹, Н.В. Бондарь³, А.А. Воеводин⁴

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Северо-Западный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³ Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева, Орел, Россия

⁴ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

The effect of low-intensity electromagnetic irradiation with a frequency of 1 GHz on the content of the components of the IL1/TOLL signaling pathway and NF-κB in mononuclear cells of whole blood

I.V. Terekhov¹, V.S. Nikiforov², S.S. Bondar¹, N.V. Bondar³, A.A. Voevodin⁴

¹ Tula State Medical University, Tula, Russia

² North-Western State Medical University n. a. I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³ Orel State University, Orel, Russia

⁴ S.K. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russia

Сигнальный путь IL1/TOLL и ядерный фактор транскрипции NF-κB играют ключевую роль в защите от патогенных микроорганизмов, поэтому нарушения их функциональной активности под влиянием факторов химической и физической природы (активные формы кислорода, эндо и экзотоксины и т.п.) могут неблагоприятно отражаться на течении патологического процесса. Однако, несмотря на важную роль в обеспечении резистентности организма к инфекциям и саногенезе, значение IL1/TOLL-сигнального пути при бактериальных инфекциях, в том числе в постклиническую фазу, исследовано недостаточно полно. Также не в полной мере охарактеризовано влияние низкоинтенсивных излучений близких по частоте к используемым в радиосвязи стандартам GSM, на содержание в иммунокомпетентных клетках, в частности, мононуклеарах периферической крови (МНК) компонентов сигнального пути, а также ядерного фактора транскрипции NF-κB.

Цель исследования – изучение влияния микроволнового излучения частотой 1 ГГц на содержание в МНК практически здоровых лиц и пациентов, перенесших внебольничную пневмонию, компонентов IL-1/TOLL-сигнального пути и ядерного фактора транскрипции NF-κB.

Методом иммуноферментного анализа оценивали содержание в МНК компонентов ядерного фактора транскрипции NF-κB, протеинкиназы p38, TAK1, протеинов TRIM25, GADD45A и Bcl-xl, а также продукцию ИЛ-4, ИЛ-12, RANTES, кателицидина и MMP-12 после облучения цельной крови низкоинтенсивным электромагнитным излучением частотой 1 ГГц

Установлено, что в субклиническую фазу у пациентов с внебольничной бактериальной пневмонией (ВП) снижается содержание в МНК компонентов NF-κB, в частности, p50, p65, p52, RelB, IKKα, IKKβ, а также уровень фосфорилирования IκBα. Напротив, уровень c-Rel и IKKγ в МНК реконвалесцентов с ВП, превышает значения практически здоровых лиц. Указанные изменения сопровождаются снижением продукции цитокинов ИЛ-4, ИЛ-12, RANTES и кателицидина.

В исследовании показано, что низкоинтенсивное излучение частотой 1 ГГц стимулирует повышение в МНК содержания p65, IKKα, TAK1, TRIM25, а также способствует усилению продукции ИЛ-4, ИЛ-12 и LL37. Кроме того, микроволны оказывают стимулирующее влияние на фосфорилирование терминальной протеинкиназы MAPK/SAPK-сигнального пути – p38, наиболее выраженное у реконвалесцентов ВП.

Таким образом, на постклинической стадии внебольничной пневмонии происходит угнетение функциональной активности IL1/TOLL-сигнального пути и ядерного фактора

Signaling pathway IL1/TOLL and the nuclear transcription factor NF-κB plays a key role in the protection against pathogenic microorganisms, therefore, the violation of their functional activity under the influence of the chemical and physical nature (reactive oxygen species, endo and exotoxins, etc.) may adversely affect the course of pathological process. However, despite its important role in ensuring the resistance of the organism to infections and sanogenesis, the value of IL1/TOLL-signaling pathway in bacterial infection, including post-clinical phase, was studied insufficiently. Also not fully characterized the impact of low-intensity radiation close in frequency to those used in radio standards GSM, on the content of immunocompetent cells, particularly peripheral blood mononuclear cells (MNCs) of the components of signaling pathways and nuclear transcription factor NF-κB. The purpose of the study was to evaluate the influence of microwave radiation with a frequency of 1 GHz into the contents in the MNCs of healthy individuals and of patients with community-acquired pneumonia, components of the IL-1/TOLL-signaling pathways and nuclear transcription factor NF-κB. ELISA evaluated the contents in the MNC component of the nuclear transcription factor NF-κB, P38 protein kinases, TAK1, TRIM25 proteins, GADD45A and Bcl-xl, as well as the production of IL-4, IL-12, RANTES, cathelicidin and MMP-12 after exposure to low-intensity electromagnetic radiation with a frequency of 1 GHz on whole blood. Proved that subclinical phase in patients with community-acquired bacterial pneumonia (cap) reduces the content in the OLS components of NF-κB, in particular, P50, P65, p52, RelB, IKKα, IKKβ, and the level of IκBα phosphorylation. On the contrary, the level of C-Rel and IKKγ in the MNC of patients with VP greater than healthy individuals. These changes are accompanied by reduced production of cytokines IL-4, IL-12, RANTES and cathelicidin. The study found that low-intensity radiation of 1 GHz stimulates the increase in the MNC content of P65, IKKα, TAK1, TRIM25, and also contributes to the increased production of IL-4, IL-12 and LL37. In addition, microwaves have a stimulating effect on phosphorylation of the terminal kinase MARK/SAPK-signaling pathway – P38, which is most pronounced at the convalescent EP. Thus, in the post-clinical stage of community-acquired pneumonia is the inhibition of the functional activity of the IL1/TOLL-signaling pathways and nuclear transcription factor NF-κB, which is manifested by reduced production of MNCs cytokines that regulate the adaptive immune response (IL-4, IL-12). Effect on the cells of whole blood by microwaves with frequency of 1GHz is associated with activation of NF-κB, contributing to the increased production of IL-4, IL-12 and cathelicidin with

e-mail: trft@mail.ru

транскрипции NF- κ B, что проявляется снижением продукции МНК цитокинов, регулирующих адаптивный иммунный ответ (ИЛ-4, ИЛ-12). Воздействие на клетки цельной крови микроволнами частотой 1 ГГц сопровождается активацией NF- κ B, способствующим повышению продукции ИЛ-4, ИЛ-12 и кателицидина с увеличением содержания в МНК протеинов GADD45A и TRIM25, что обеспечивает нормализацию неспецифической резистентности и иммунологической реактивности у больных ВП.

Ключевые слова: IL1/TOLL-сигнальный путь, NF- κ B, TRIM25, микроволны.

Введение

IL-1/TOLL-сигнальный путь, играя важную роль в формировании иммунного ответа на внедрение во внутреннюю среду организма разнообразных инфекционных агентов, обеспечивает их рецепцию с последующей активацией механизмов саногенеза [1, 2]. IL-1/TOLL-сигнальный путь инициирует ответ острой фазы, проводя к исполнительному аппарату клетки сигналы от толл-подобных рецепторов (TLR), распознающих различные по своей химической природе паттерны патогенности, за счет активации терминальных протеинкиназ MAPK/SAPK-сигнального пути, в частности, p38, JNK и ERK [2, 3]. Ведущую роль в передаче сигнала от бактериальных патогенов с TLR внутрь клетки играют адапторные протеины MyD88/TIRAP, активируя транскрипционный фактор NF- κ B, участвующий в реализации программ саногенеза при развитии бактериальной инфекции [3, 4]. Ответ на внутриклеточные патогены, в том числе вирусы и микоплазмы, выступающие, как правило, в ассоциации с бактериальными возбудителями, опосредуется RIG-I-сигнальным путем, в котором ключевую регуляторную роль играет протеин TRIM25 [1, 5, 6]. Общим звеном указанных сигнальных путей, обеспечивающим их перекрестную активацию, является протеинкиназа TAK1 [7].

Хорошо известно, что воздействие на организм достаточно мощных стрессоров, таких как микроорганизмы, вирусы, а также массивная терапия гормонами коры надпочечников, приводят к дисрегуляции внутриклеточных молекулярных механизмов саногенеза, в частности, угнетению активности NF- κ B с подавлением функциональной активности мононуклеарных клеток периферической крови (МНК), способствуя затяжному течению заболевания или развитию повторной инфекции, определяя необходимость поиска дополнительных факторов, способных восстанавливать активность внутриклеточных сигнальных путей с одновременной нормализацией клеточной реактивности [4, 8, 9].

Одним из таких факторов является низкоинтенсивное электромагнитное излучение (ЭМИ) крайневысокочастотного и сверхвысокочастотного диапазонов [9, 10]. В частности, ЭМИ частотой 1 ГГц, соответствующее частоте колебаний молекул воды, проявляет выраженную биотропную активность, оказывая влияние на пролиферацию и дифференцировку фибробластов, а также иммунокомпетентных клеток цельной крови [10, 11]. Кроме того, микроволны частотой 1 ГГц стимулируют продукцию противовирусных интерферонов и отдельных цитокинов, способствуя повышению неспецифической защиты организма, а также усилению адаптивного иммунного ответа [12, 13].

Учитывая актуальность поиска новых факторов регуляции внутриклеточных процессов, целью на-

стоящего исследования являлось изучение влияния микроволнового излучения на частоте резонансной прозрачности водосодержащих сред на содержание в МНК практически здоровых лиц и пациентов, перенесших острый инфекционно-воспалительный процесс нижних отделов респираторного тракта, компонентов IL-1/TOLL-сигнального пути и ядерного фактора транскрипции NF- κ B.

Keywords: IL1/TOLL-signaling pathway, NF- κ B, TRIM25, microwave.

Материал и методы

Проведение клинического исследования было одобрено Ученым советом и Локальным этическим комитетом медицинского института ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет» (Протокол № 2 от 01.09.2014). Все пациенты и доноры подписывали информированное согласие.

Материалом для исследования служила венозная кровь, которую забирали в утренние часы (с 7:00 до 7:30) из локтевой вены. В основную (опытную) группу входили 30 пациентов мужского пола (средний возраст — $26 \pm 5,2$ г.) с бактериальной внебольничной пневмонией нетяжелого течения (60–65 баллов по шкале PORT) на 15–17 сут. заболевания (непосредственно перед выпиской из клиники). Контрольную группу составили 15 практически здоровых доноров крови в возрасте 20–37 лет (средний возраст — 27 ± 6 лет).

Каждый образец крови был разделен на 2 части, и в каждой группе были сформированы 2 подгруппы: 1 и 2. Образцы крови подгрупп 1 не подвергались воздействию микроволн, образцы крови подгрупп 2 — подвергались.

Диагноз пневмонии был верифицирован в соответствии с клиническими рекомендациями [14]. Критериями включения пациентов в исследование являлись: рентгенологическая верификация инфильтративных изменений в легких, односторонний сегментарный характер инфильтративных изменений, бактериологическая верификация грамположительных микроорганизмов, являющихся типичными возбудителями пневмонии (*s. pneumoniae*, *s. aureus*), а также *m. pneumoniae*, неосложненное течение заболевания, положительный эффект проводимой терапии (уменьшение объема инфильтративных изменений не менее чем на 2/3 от исходного уровня к моменту выписки из стационара). Все пациенты получали парентеральную антибиотикотерапию цефалоспорином III поколения (цефотаксим), в среднесуточной дозе 2 г, либо кларитромицином в среднесуточной дозе 1 г, нестероидные противовоспалительные препараты, физиотерапевтическое лечение.

Облучение образцов крови проводили с помощью генератора сигналов HP8664A с использованием излучающей антенны магнитного типа в дальней зоне облучателя, в условиях постоянного перемешивания [15].

В работе использовали наборы для культивирования и митогенной стимуляции клеток цельной крови «Цитокин-Стимул-Бест» (Вектор Бест, Россия). 1 мл цельной крови в стерильных условиях вносили во флакон, содержащий 4 мл поддерживающей среды DMEM, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). Образцы крови подгрупп 2 подвергали воздействию микроволн частотой 1 ГГц плотностью потока мощности 0,05 мкВт/см² в течение 40 мин., затем все образцы крови помещали в термостат (37°C) и инкубировали в течение 24 ч.

После инкубации из флаконов с образцами крови забирали 1 мл супернатанта для определения концентрации матриксной металлопротеиназы-12 (ММП-12), интерлейкинов (ИЛ) 4 и 12, хемокина, продуцируемого активированными Т-лимфоцитами (RANTES), эндогенного антимикробного пептида — кателицидина (LL37), антиапоптотического протеина Bcl-xl с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Для получения фракции МНК 4 мл клеточной суспензии наслаивали на раствор фиколл-верографина ($\rho = 1,077$, МедБиоСпектр, Россия) с последующим центрифугированием при 5000 об/мин. в течение 30 мин. Выделенные МНК дважды отмывали в фосфатно-солевом буфере и 1 мл клеточной суспензии, содержащей 5×10^6 клеток, лизировали, используя раствор следующего состава (Sigma-Aldrich, США): 10 mM Tris, pH 7,4; 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% глицерола, 0,1% SDS, 0,5% деоксихолата, 1 mM PMSF (матричный 0,3 M раствор в DMSO). В лизирующий раствор добавляли (ex tempore) 1% коктейля ингибитора протеаз (Sigma-Aldrich, США), выдерживали на льду (при $t = +4-5^\circ\text{C}$) в течение 15 мин., алиquotировали и замораживали при -76°C .

В полученных лизатах методом ИФА оценивали содержание E3-убиквитин-лигазы TRIM25, протеинкиназы TAK1 (MAP3K7), изоформ α , β , γ киназы ингибитора ядерного фактора транскрипции NF- κ B (IKK α , IKK β , IKK γ) и уровень субъединиц p65, p50, c-Rel, RelB, NF- κ B2 (p52) ядерного фактора транскрипции NF- κ B. Кроме того, определяли уровень фосфорилирования по серину в положении 32 ингибитора ядерного фактора транскрипции NF- κ B (I κ B α), а также уровень фосфорилирования по треонину/тирозину в положении 180/182 митоген-активируемой протеинкиназы p38.

Имуноферментный анализ проводили на анализаторе Personal LAB (Adaltis Italia S.p.A., Италия): разрешение фотометрирования не меньше 0,001 ед. оптической плотности (0,03%) и точность измерения оптической плотности не меньше 0,5%.

Для определения исследуемых факторов в лизатах МНК использовали наборы реактивов KH00221, KH00071 (Thermo Fisher Scientific, США), CSB-EL024461HU, CSB-EL005420HU, CSB-EL011572HU, CSB-EL013429HU, CSB-EL011574HU, CSB-EL019554HU, CSB-EL009161HU, CSB-EL015760HU (Cusabio Biotech, Китай), EK1111, EK1121, EK4101 (Panomix, США); в клеточных супернатантах — CSB-

E13208h, CSB-E14948h, CSB-EL027199HU (Cusabio Biotech, Китай), BMS287 (Bender Medsystems, Австрия), SEA111Hu (Cloud-Clone, США), MG51042 (IBL, Германия).

Подсчет клеток и анализ их жизнеспособности выполняли на счетчике клеток TC20 (Bio-Rad, США). Жизнеспособность выделенных МНК превышала 90%.

Статистическую обработку осуществляли с применением программы Statistica 7.0. Результаты исследования представлены в виде: медиана выборки; 25 и 75 перцентили (25%, 75%). Статистическую значимость (p) межгрупповых различий в несвязанных выборках оценивали с помощью U-критерия Манна — Уитни, в связанных — с использованием T-критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

Исходный уровень исследованных факторов в МНК и клеточных супернатантах в образцах необлученной крови представлен в табл. 1.

Проведенный анализ межгрупповых различий в необлученных образцах у реконвалесцентов с ВП и практически здоровых лиц свидетельствует о статистически значимом снижении содержания протеина p50 в основной группе, в сравнении с группой контроля, на 18,4%, RelB на 13,2%, NF- κ B2 на 33,3%, IKK α на 29,0%, IKK β на 3,8%, сопровождавшимся уменьшением фосфорилирования I κ B α на 29,0%. На этом фоне в основной группе, в сравнении с группой контроля, имело место повышение концентрации IKK γ на 11,1%, c-Rel на 18,3%, GADD45A на 25,3%, а также отмечалась тенденция к повышению уровня протеинкиназы p38 на 5,9%, протекавшая на фоне статистически значимого снижения в МНК уровня Bcl-xl на 25,0%.

В клеточном супернатанте основной группы, в сравнении с контрольной группой, отмечено статистически значимое снижение концентрации ИЛ-12 на 11,6%, ИЛ-4 на 21,5%, RANTES на 6,1%, на фоне тенденции к сокращению продукции эндогенного антимикробного пептида LL37 на 11,6%. Указанные изменения сопровождались повышенным уровнем ММП-12 на 21,6%.

Выявленные нарушения свидетельствуют о повышении содержания в МНК реконвалесцентов с внебольничной пневмонией компонентов MAPK/SAPK-сигнального пути и снижении отдельных субъединиц ядерного фактора транскрипции NF- κ B, ассоциированном со снижением продукции клетками ИЛ-4, ИЛ-12 и RANTES. Пониженная продукция указанных цитокинов, очевидно, является следствием угнетения адаптивного иммунного ответа за счет снижения функциональной активности Т-хелперов 1 и 2 типов, являющихся основными продуцентами соответствующих медиаторов [8, 12].

Результаты воздействия на клетки крови низкоинтенсивного электромагнитного излучения частотой 1 ГГц представлены в табл. 2.

Оценка различий исследуемых показателей в подгруппах 2 основной и контрольной групп, подвергнутых воздействию низкоинтенсивных микроволн частотой 1 ГГц, представлена в табл. 3.

Таблица 1. Исходное содержание исследованных факторов в МНК и клеточных супернатантах (результаты представлены как медиана (Me), нижний (25%) и верхний (75%) квартили)

Фактор	Контрольная группа (подгруппа № 1)			Основная группа (подгруппа № 1)			p
	Me	25%	75%	Me	25%	75%	
IkB α , ед/нг	1,07	0,605	1,495	0,76	0,63	1,17	p<0,001
p38, ед/нг	1,705	1,66	1,86	1,805	1,69	1,915	p = 0,68
TRIM25, нг/мл	0,8	0,65	1,015	0,81	0,6	1,0	p = 0,9
IKK α , нг/мл	0,733	0,663	0,814	0,677	0,436	0,711	p = 0,021
IKK β , нг/мл	0,582	0,475	0,679	0,56	0,347	0,649	p = 0,0001
IKK γ , нг/мл	0,461	0,437	0,496	0,512	0,436	0,644	p = 0,011
TAK1, нг/мл	1,052	0,974	1,105	1,038	1,003	1,181	p = 0,91
p50, нг/мл	0,859	0,734	0,907	0,701	0,629	0,765	p<0,001
p65, нг/мл	0,736	0,682	0,813	0,709	0,667	0,873	p = 0,25
RelB, нг/мл	0,75	0,727	0,759	0,651	0,626	0,686	p = 0,016
c-Rel, нг/мл	0,47	0,447	0,479	0,529	0,453	0,547	p<0,001
NF- κ B2, нг/мл	0,403	0,3	0,554	0,269	0,269	0,824	p = 0,09
ММП-12, нг/мл	0,855	0,765	0,865	1,04	0,75	1,24	p<0,001
LL37, нг/мл	7,34	6,28	8,66	6,49	5,79	7,12	p=0,1
RANTES, пг/мл	0,313	0,307	0,326	0,294	0,28	0,323	p<0,001
ИЛ-4, пг/мл	3,115	2,675	3,315	2,445	1,935	2,545	p = 0,87
ИЛ-12, пг/мл	2,585	2,115	2,825	2,285	2,105	2,905	p=0,87
Vcl-xl, нг/мл	0,66	0,57	0,82	0,495	0,415	0,61	p<0,001
GADD45A, нг/мл	0,447	0,39	0,606	0,56	0,343	0,688	p<0,001

p – статистическая значимость различий исследованных факторов у реконвалесцентов с ВП и практически здоровых лиц.

Таблица 2. Содержание исследованных факторов в МНК и клеточных супернатантах после воздействия микроволн частотой 1 ГГц (результаты представлены как медиана (Me), нижний (25%) и верхний (75%) квартили)

Фактор	Контрольная группа (подгруппа № 2)			Основная группа (подгруппа № 2)		
	Me	25%	75%	Me	25%	75%
IkB α , ед/нг	1,08	0,608	1,501	0,763	0,633	1,18
p38, ед/нг	1,974	1,922	2,154	2,683	2,512	2,846
TRIM25, нг/мл	0,891	0,724	1,13	0,884	0,655	1,091
IKK α , нг/мл	0,767	0,694	0,852	0,722	0,465	0,758
IKK β , нг/мл	0,59	0,48	0,685	0,566	0,351	0,657
IKK γ , нг/мл	0,466	0,446	0,501	0,519	0,442	0,652
TAK1, нг/мл	1,144	1,061	1,202	1,109	1,072	1,262
p50, нг/мл	0,866	0,743	0,914	0,707	0,635	0,772
p65, нг/мл	0,744	0,692	0,821	0,724	0,681	0,892
RelB, нг/мл	0,755	0,735	0,764	0,654	0,628	0,689
c-Rel, нг/мл	0,474	0,457	0,483	0,533	0,456	0,551
NF- κ B2, нг/мл	0,406	0,307	0,558	0,271	0,271	0,83
ММП-12, нг/мл	0,99	0,886	1,002	1,115	0,804	1,329
LL37, нг/мл	7,598	6,501	8,965	6,831	6,095	7,495
RANTES, пг/мл	0,316	0,312	0,329	0,296	0,282	0,325
ИЛ-4, пг/мл	3,215	2,761	3,421	2,525	1,998	2,628
ИЛ-12, пг/мл	2,675	2,19	2,923	2,32	2,137	2,949
Vcl-xl, нг/мл	0,661	0,572	0,821	0,502	0,421	0,619
GADD45A, нг/мл	0,457	0,41	0,619	0,567	0,347	0,696

Таблица 3. Различия исследуемых показателей в подгруппах основной группы и группы контроля, подвергнутых облучению (результаты в % представлены как медиана (Me), нижний (25%) и верхний (75%) квантили)

Фактор	Контрольная группа (подгруппа № 2)				Основная группа (подгруппа № 2)			
	Me	25%	75%	p	Me	25%	75%	p
IκBα, ед/нг	0,39	0,5	0,4	0,053	0,4	0,5	0,9	0,051
p38, ед/нг	15,8	15,8	15,8	0,005	48,6	48,6	48,6	0,002
TRIM25, нг/мл	11,4	11,4	11,3	0,02	9,1	9,2	9,1	0,002
IKKα, нг/мл	4,6	4,7	4,7	0,02	6,6	6,7	6,6	0,002
IKKβ, нг/мл	1,4	1,1	0,9	0,034	0,89	1,2	1,2	0,12
IKKγ, нг/мл	1,1	2,1	1,0	0,12	1,4	1,4	1,2	0,037
ТАК1, нг/мл	8,7	8,9	8,8	0,02	6,8	6,9	6,9	0,002
p50, нг/мл	0,8	1,2	0,8	0,06	0,9	1,0	0,9	0,055
p65, нг/мл	1,1	1,5	1,0	0,002	2,1	2,1	2,2	0,002
RelB, нг/мл	0,7	1,1	0,7	0,064	0,5	0,3	0,4	0,07
c-Rel, нг/мл	0,9	2,2	0,8	0,034	0,8	0,7	0,7	0,034
NF-κB2, нг/мл	0,7	2,3	0,7	0,034	0,8	0,7	0,7	0,002
ММП-12, нг/мл	15,8	15,8	15,8	0,001	7,2	7,2	7,2	0,002
LL37, нг/мл	3,5	3,5	3,5	0,002	5,3	5,3	5,3	0,002
RANTES, пг/мл	1,0	1,6	0,9	0,015	0,7	0,7	0,6	0,051
ИЛ-4, пг/мл	3,2	3,2	3,2	0,002	3,3	3,3	3,3	0,002
ИЛ-12, пг/мл	3,5	3,5	3,5	0,002	1,5	1,5	1,5	0,02
Vcl-xI, нг/мл	0,2	0,4	0,1	0,21	1,4	1,4	1,5	0,004
GADD45A, нг/мл	2,2	5,1	2,1	0,003	1,2	1,2	1,2	0,006

p – статистическая значимость различий исследованных факторов в крови у реконвалесцентов с ВП и практически здоровых лиц под влиянием микроволн (отношение показателей в образцах крови, подвергнутых облучению и необлученных).

Проведенный анализ последствий однократно-го воздействия на клетки цельной крови низкоинтенсивными микроволнами частотой 1 ГГц выявил повышение в группе реконвалесцентов ВП уровня фосфорилирования протеинкиназы p38, определяющей, в том числе, активность фактора транскрипции AP-1. На этом фоне уровни протеинкиназы TAK1 и E3-убиквитин-лигазы TRIM25 более значимо повышались у практически здоровых лиц.

Кроме того, было обнаружено, что в основной группе содержание каталитической субъединицы протеинкиназы ингибитора ядерного фактора транскрипции – IKKα, обеспечивающей фосфорилирование ингибитора ядерного фактора NF-κB, а также IKKγ, регулирующего активность комплекса, возросло более существенно, чем в группе контроля. Напротив, уровень IKKβ под влиянием облучения повышался несколько больше у практически здоровых лиц. Указанные изменения сопровождались близкими значениями динамики фосфорилирования IκB в обеих подгруппах, определяя соответствующее изменение транскрипционной активности NF-κB.

Также было доказано, что микроволны оказывают определенное влияние на продукцию клетками цитокинов и эффекторных факторов саногенеза, экспрессия генов которых контролируется факторами транскрипции NF-κB и AP-1. Проведенный анализ показал, что микроволны стимулируют повышение содержания в клетке антиапоптотического белка – Vcl-xI, уровень которого в облученных образцах крови основной группы возрастал более существенно,

чем в группе контроля, определяя торможение программ апоптоза и аутофагии МНК у обследованных больных. На этом фоне уровень GADD45A у практически здоровых лиц оказался более чувствительным к воздействию низкоинтенсивных микроволн, чем у реконвалесцентов ВП.

Таким образом, микроволны частотой 1 ГГц изменяют содержание в МНК ключевых компонентов, обеспечивающих регуляцию адаптивного иммунного ответа и неспецифической клеточной резистентности. Стимулируя фосфорилирование протеинкиназ p38 и IκB, микроволны способствуют нормализации активности IL-1/TOLL-сигнального пути и продукции цитокинов, регулирующих адаптивный иммунный ответ [6, 7, 12]. Кроме того, облучение стимулирует продукцию клетками эндогенного антимикробного пептида – LL37 и фактора ремоделирования межклеточного матрикса – ММП-12, повышая неспецифическую клеточную резистентность, активируя репаративные процессы в тканях, способствуя разрешению инфилтративных изменений [4, 16, 17]. Оказывая стимулирующее влияние на процессы, контролируемые фактором транскрипции NF-κB, под воздействием микроволн в клетках повышается содержание протеина GADD45A, обеспечивающего коррекцию генотоксических проявлений инфекционного процесса, а также усиление неспецифической клеточной резистентности [18].

Проведенный анализ последствий воздействия на клетки цельной крови низкоинтенсивных микроволн частотой 1 ГГц показал, что облучение оказывает

более выраженное влияние на уровень отдельных факторов в группе реконвалесцентов ВП, в сравнении с практически здоровыми лицами. Так, у пациентов, перенесших пневмонию, значительно изменялся уровень фосфорилирования p38, I κ B α , а также содержание протеинов TRIM25 и Vcl-x1, протеинкиназы IKK α , субъединицы p65 фактора транскрипции NF- κ B. Указанные изменения сопровождались более существенным повышением продукции ИЛ-4 и кателицидина, отражающим усиление гуморального звена иммунологической реактивности клеток цельной крови. При этом повышение содержания TRIM25 в МНК реконвалесцентов ВП свидетельствует об усилении противовирусной защиты под влиянием микроволн. Являясь одним из ключевых компонентов RIG-I-сигнальной системы, обеспечивающей распознавание проникших в цитозоль чужеродных нуклеиновых кислот, TRIM25 участвует в защите клетки от таких патогенов, как вирус гриппа, являющимся актуальным возбудителем суперинфекции у больных ВП.

Анализ потенциальных биофизических механизмов формирования эффектов электромагнитного излучения (ЭМИ) резонансных частот, свидетельствует в пользу гипотезы первичной рецепции ЭМИ молекулами воды, связанными с биологически активными молекулами, с трансформацией и переносом энергии микроволн на биомолекулы с последующим изменением их биохимической активности [10]. Указанный эффект сопровождается модификацией межмолекулярных взаимодействий, модулирующих биохимические процессы в клетке [19].

Выявленные эффекты, в частности, изменение содержания в МНК отдельных компонентов NF- κ B, сравнительно невелики по абсолютному уровню, тем не менее, надежно регистрируются при использовании количественного иммуноферментного анализа, отличающегося высокой чувствительностью. Данное обстоятельство свидетельствует в пользу физиологического характера воздействия низкоинтенсивных микроволн на внутриклеточные молекулярные системы. Каскадный механизм активации эффекторных факторов позволяет клетке реагировать на единичные молекулярные сигналы, многократное усиление которых компонентами сигнальных путей, в том числе протеинкиназами MAPK/SAPK-сигнального пути, обеспечивает формирование клеточного ответа необходимой направленности и силы [3, 4, 7, 14, 20]. При этом однократное воздействие ЭМИ, приводящее к изменению уровня фосфорилирования ингибитора I κ B α на 0,3–0,4%, определяю-

щее соответствующее повышение активности NF- κ B, сопровождается изменением продукции цитокинов и эффекторных молекул иммунного ответа, отличающимся на порядок от изменений содержания регуляторных молекул.

Заключение

Фаза реконвалесценции острого инфекционно-воспалительного процесса нижних отделов респираторного тракта при ВП отличается повышенным уровнем в МНК фактора c-Rel, регуляторной субъединицы IKK γ и протеина GADD45A, и пониженным содержанием p50, RelB, p52, IKK α , IKK β , Vcl-x1 и фосфорилированной формы I κ B α . Кроме того у реконвалесцентов ВП, в сравнении с практически здоровыми лицами, отмечается снижение продукции ИЛ-4 и RANTES и увеличение секреции ММП-12.

Указанные изменения протекают наряду с повышением содержания в МНК фосфорилированной формы протеинкиназы p38, свидетельствующим в пользу активации MAPK/SAPK-сигнального пути у реконвалесцентов ВП [4]. Подобные изменения продукции цитокинов и внутриклеточных компонентов отражают угнетение адаптивного иммунного ответа вследствие дисрегуляции молекулярных процессов в МНК, ассоциирующихся с постклинической стадией инфекционно-воспалительного процесса, что может привести к развитию у таких пациентов реинфекции и суперинфекции нижних отделов респираторного тракта, а также определять склонность к затяжному и атипичному течению заболевания [21].

На этом фоне воздействие на клетки цельной крови низкоинтенсивного ЭМИ частотой 1 ГГц способствует повышению уровня фосфорилирования p38 и I κ B α , стимулирует увеличение содержания в клетке протеинов TRIM25 и Vcl-x1, протеинкиназы IKK α , субъединицы p65 фактора транскрипции NF- κ B, повышая продукцию цитокинов и эндогенных антимикробных пептидов [12, 13, 16, 17].

Полученные результаты позволяют рассматривать низкоинтенсивное ЭМИ частотой 1 ГГц в качестве фактора физической природы, который может оказывать модулирующее влияние на активность внутриклеточных сигнальных путей и обладает иммуностимулирующим действием [12, 13]. Микроволны частотой 1 ГГц способствуют усилению неспецифической защиты, репарации, ускорению ремоделирования и обновления внеклеточного матрикса, в том числе, за счет повышения исходно сниженной активности ядерного фактора транскрипции NF- κ B [10, 11].

ЛИТЕРАТУРА:

1. Алямкина Е.А., Долгова Е.В., Проскурина А.С. и др. Внутриклеточные системы обнаружения экзогенных нуклеиновых кислот и механизмы запуска иммунных реакций в ответ на интернализацию экзогенной ДНК. Медицинская иммунология 2013; 5: 413-30.
2. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat. Immunol. 2010; 11(5): 373-84.
3. Zarubin T., Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. Cell Res. 2005; 15(1): 11.
4. Quinton L.J., Jones M.R., Simms B.T. et al. Functions and regulation of nf-kappab rela during pneumococcal pneumonia. J. Immunol. 2007; 178(3): 1896-903.
5. Stack J., Doyle S.L., Connolly D.J. et al. TRAM is required for TLR2 endosomal signaling to type I IFN induction. J. Immunol. 2014; 193(12): 6090-102.
6. Gack M.U., Shin Y.C., Joo C.H. et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature 2007; 446(7138): 916-20.
7. Omori E., Matsumoto K., Sanjo H. et al. TAK1 is a master regulator of epidermal homeostasis involving skin inflammation and apoptosis. J. Biol. Chem. 2006; 281(28): 19610-7.
8. Raphael I., Nalawade S., Eagar T.N. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. Cytokine 2015; 74(1): 5-17.
9. Sinitsyn N.I., Yolkin V.A., Gulyaev Yu.V. et al. Special function of the «millimeter wavelength waves - aqueous medium» system in nature. Critical Reviews in Biomedical Engineering 2000; 28(1-2): 269-305.
10. Petrosyan V.I. Resonance RF Emission from Water. Technical Physics Letters 2005; 31(12): 1007-8.
11. Sunkari V.G., Aranovitch B., Portwood N. et al. Effect of low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation. Electromagnetic Biology and Medicine 2011; 30(2): 80-5.

12. Солодухин К.А., Никифоров В.С., Бондарь С.С. и др. Влияние низкоинтенсивного СВЧ-облучения на внутриклеточные процессы в мононуклеарах при пневмонии. Медицинская иммунология 2012; 14(6): 541-4.
13. Терехов И.В., Бондарь С.С., Хадарцев А.А. Лабораторное определение внутриклеточных факторов противовирусной защиты при внебольничной пневмонии в оценке эффектов низкоинтенсивного СВЧ-излучения. Клиническая лабораторная диагностика 2016; 61(6): 380-4.
14. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2010; 12(3): 186-225.
15. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Бондарь С.С. Состояние рецепторзависимых сигнальных путей в агранулоцитах периферической крови реконвалесцентов внебольничной пневмонии под влиянием микроволнового излучения. Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры 2016; 93(3): 23-8.
16. Pomerantz J.L., Baltimore D. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. EMBO J. 1999; 18(23): 6694-704.
17. Millet P., McCall C., Yoza B. RelB: an outlier in leukocyte biology. Journal of Leukocyte Biology 2013; 94(5): 941-51.
18. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В. и др. Генотоксические поражения и болезни. Молекулярная медицина 2013; 3: 3-19.
19. Галль Л.Н., Галль Н.Р. Механизм межмолекулярной передачи энергии и восприятия сверхслабых воздействий химическими и биологическими системами. Биофизика 2009; 54(3): 563-74.
20. Потехина Е.С., Надеждина Е.С. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них Ste20-подобных протеинкиназ. Успехи биологической химии 2002; 42: 235-56.
21. Лебедева М.Н., Грищенко А.В. Особенности течения вторичных внебольничных пневмоний у военнослужащих по призыву. Военно-медицинский журнал 2009; 330(7): 24-8.

Поступила: 28.08.2016