

УРОВЕНЬ ЭНДОГЕННЫХ АНТИМИКРОБНЫХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ У РЕКОНВАЛЕСЦЕНТОВ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМИ МИКРОВОЛНАМИ ЧАСТОТОЙ 1 ГГц

С.С. Бондарь

аспирант, кафедра внутренних болезней, Медицинский институт, Тульский государственный университет

И.В. Терехов

к.м.н., доцент, кафедра общей патологии, Медицинский институт, Тульский государственный университет
E-mail: trft@mail.ru

В.К. Парфенюк

д.м.н., профессор, кафедра факультетской терапии, лечебный факультет, Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России

Н.В. Бондарь

к.б.н., доцент, кафедра безопасности жизнедеятельности в техносфере и защиты человека в чрезвычайных ситуациях, Орловский государственный университет им. И.С. Тургенева

В.С. Никифоров

д.м.н., профессор, кафедра функциональной диагностики, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава России (Санкт-Петербург)
E-mail: Viktor.Nikiforov@szgmu.ru

Изучено влияние низкоинтенсивного микроволнового излучения частотой 1 ГГц на продукцию клетками цельной крови эффекторных молекул, определяющих неспецифический иммунный ответ. У пациентов, перенесших острый инфекционно-воспалительный процесс нижних отделов респираторного тракта, и у практически здоровых лиц в супернатантах клеток цельной крови оценено содержание кателицидина, белка нейтрофилов, повышающих проницаемость мембран, липополисахаридсвязывающего протеина, миелопероксидазы, белка клеток Клара, альфа-дефензина, гранзима и прокатепсина. Выявлено, что облучение крови излучением частотой 1 ГГц способствует активации нейтрофилов, моноцитов и НК-клеток с повышением неспецифической противоионфекционной защиты.

Ключевые слова: эндогенные антимикробные пептиды, микроволны, гранзим, белок клеток Клара, миелопероксидаза, микроволны.

Для цитирования: Бондарь С.С., Терехов И.В., Парфенюк В.К., Бондарь Н.В., Никифоров В.С. Уровень эндогенных антимикробных и цитотоксических пептидов у реконвалесцентов внебольничной пневмонии и его коррекция низкоинтенсивными микроволнами частотой 1 ГГц. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(11):40–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-11-06>

Растворимые гуморальные факторы неспецифического иммунного ответа, в том числе молекулы, обладающие бактерицидными свойствами, играют важную роль в формировании саногенетических реакций у пациентов с инфекционно-воспалительной патологией [1]. Содержание в межклеточной жидкости эндогенных антимикробных факторов (ЭАФ), иммуноглобулинов, матриксных металлопротеиназ, компонентов системы комплемента определяет течение и исход постклинической фазы иммуновоспалительного процесса. Вместе с тем известно, что патологические процессы часто сопровождаются снижением неспецифической ре-

зистентности организма, в том числе за счет депрессии продукции соответствующих эффекторных молекул [2, 3]. Указанное обстоятельство способствует формированию повторных инфекций, а также их затяжных форм, которые нередко протекают на фоне иммунодепрессии [4, 5].

Одной из задач повышения эффективности лечебных и реабилитационных мероприятий у пациентов с инфекционно-воспалительным процессом является активация эндогенных защитных механизмов саногенеза, в том числе за счет стимуляции продукции ЭАФ [6]. Для решения данной задачи в настоящее время широко используются не-

медикаментозные методы, в частности электромагнитное излучение миллиметрового диапазона, микроволны и терагерцевое излучение [6, 7]. Электромагнитные поля способствуют стимуляции внутриклеточной активности и продукции клетками информационных и эффекторных молекул, регулирующих разнообразные межклеточные взаимодействия [4, 5]. Микроволновое излучение частотой 1 ГГц оказывает модулирующее влияние на митоген-активируемый и янус-киназный сигнальные пути. Данное излучение, модулируя чувствительность клеток к внешним стимулам (таким как провоспалительные цитокины, факторы роста и т.п.) способно изменять продукцию ими разнообразных эффекторных молекул, что определяет важную роль микроволн в регуляции клеточных функций [6].

Высокая актуальность поиска новых немедикаментозных методов активации саногенеза обуславливает задачи исследования.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – оценка содержания в межклеточной среде эффекторных молекул, определяющих состояние неспецифической резистентности у пациентов, перенесших острый инфекционно-воспалительный процесс, и практически здоровых лиц на фоне облучения целевой крови низкоинтенсивными микроволнами частотой 1 ГГц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В соответствии с целью настоящей работы обследовано 30 пациентов мужского пола с бактериальной внебольничной пневмонией нетяжелого течения на 15–17-е сутки заболевания, перед выпиской из стационара. Средний возраст обследованных пациентов основной группы составил $25 \pm 5,5$ лет. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых молодых лиц из числа доноров крови в возрасте от 20 до 33 лет (средний возраст $26 \pm 4,3$ года).

Материалом для исследования служила венозная кровь, забиравшаяся в утренние часы из локтевой вены обследуемых лиц. Для проведения исследования внутриклеточных маркеров 1 мл целевой крови вносили во флакон, содержащий 4 мл среды DMEM, гепарин (2,5 ЕД/мл), гентамицин (100 мкг/мл) и L-глутамин (0,6 мг/мл). Подготовленные таким образом образцы облучали в течение 45 мин аппаратом микроволновой терапии «Акватон-02» (ООО «ТЕЛЕМАК», г. Саратов) на

частоте $1,0 \pm 0,025$ ГГц (плотность потока энергии – 50 нВт/см²) [4, 5]. После облучения флаконы помещались на 3 и 24 ч в термостат при 37 °С.

Образцы крови подвергали облучению с помощью генератора сигналов HP8664A с использованием излучающей антенны магнитного типа в дальней зоне облучателя, непосредственно перед их помещением в термостат в течение 40 мин. Плотность потока энергии микроволн составляла $0,05$ мкВт/см².

В клеточном супернатанте исследовали концентрацию кателицидина (LL-37), бактерицидного белка, повышающего проницаемость мембран (ВРІ), липополисахаридсвязывающего протеина (ЛПСБ), миелопероксидазы (МПО), белка клеток Клара (БКК), *альфа*-дефензина (АД), гранзима В (ГР) и прокатепсина В (ПК). При проведении иммуноферментного анализа (ИФА) использовали наборы реактивов Cusabio Biotech (КНР). Анализ проводили на анализаторе Personal LAB («Adaltis Italia S.p.A.», Италия).

Статистическую обработку выполняли в программе Statistica 7.0. Результаты исследования представлены в следующем виде: среднее значение признака (x), медиана (Me), 25 и 75 процентили выборки Q (25%; 75%). Статистическую значимость (p) межгрупповых различий оценивали с использованием H -критерия Краскела–Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание исследованных факторов в микронуклеарах периферической крови (МНК) и продукция цитокинов в группах представлены в таблице.

Проведенный анализ выявил снижение у пациентов в фазу реконвалесценции внебольничной пневмонии в сравнении с практически здоровыми лицами продукции АД в среднем на 56% ($H = 18,9$; $p = 0,00001$), ГР – на 5,8% ($H = 18,9$; $p = 0,19$) и LL-37 – на 1,0% ($H = 0,01$; $p = 0,92$). На этом фоне отмечалось повышение уровня ЛПСБ на 40,6% ($H = 17,5$; $p = 0,00003$), МПО – на 42,8% ($H = 20,1$; $p = 0,00001$), БКК – на 29,0% ($H = 9,3$; $p = 0,002$), ВРІ – на 14,8% ($H = 2,3$; $p = 0,13$), ПК – на 3,5% ($H = 0,08$; $p = 0,78$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенном угнетении у реконвалесценто внебольничной пневмонии бактерицидной активности нейтрофилов в пользу макрофагов.

Таблица. Состояние продукции эндогенных антимикробных пептидов у реконвалесцентов внебольничной пневмонии и практически здоровых лиц

Фактор	Контрольная группа				Основная группа			
	x	Q25	Me	Q75	x	Q25	Me	Q75
LL-37, нг/мл	2,0	1,87	2,01	2,14	1,98	1,61	2,0	2,26
ВР1, нг/мл	2,08	1,83	2,08	2,34	2,44	2,08	2,31	2,89
ЛПСБ, нг/мл	1,04	0,93	1,04	1,14	1,75	1,39	1,56	1,98
МПО, нг/мл	0,79	0,64	0,79	0,93	1,38	1,19	1,33	1,59
БКК, нг/мл	0,66	0,58	0,66	0,74	0,93	0,86	0,92	1,06
АД, нг/мл	7,24	6,97	7,23	7,51	4,64	3,68	4,07	5,84
ГР, пг/мл	2,38	2,18	2,38	2,59	2,25	2,01	2,2	2,34
ПК, нг/мл	2,77	2,51	2,78	3,04	2,87	2,35	2,71	3,13

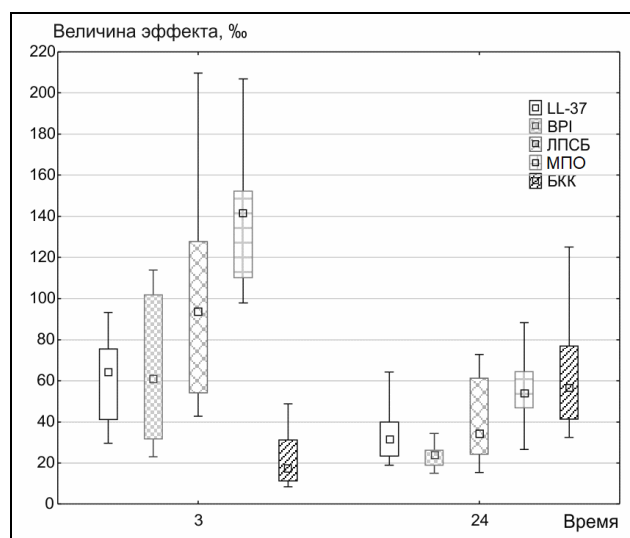


Рис. 1. Динамика содержания бактерицидных молекул в облученных образцах

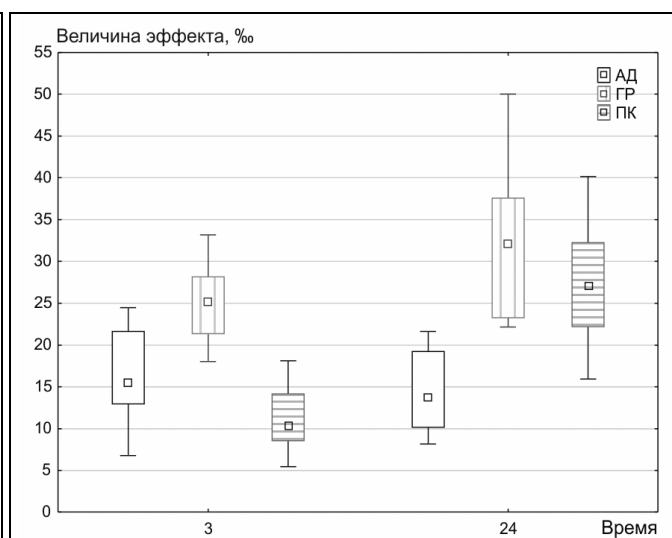


Рис. 2. Динамика содержания цитотоксических молекул в облученных образцах

На рис. 1 и 2 представлены эффекты низкоинтенсивного излучения частотой 1 ГГц (различие концентраций исследованных факторов в облученных и необлученных образцах спустя 3 и 24 ч после воздействия микроволн) в отношении продукции клетками цельной крови исследованных молекул. На рисунках обозначено: \top – максимальное значение; \perp – минимальное значение; \square –

медiana; \square – 25–75% выборки. Величина эффекта – различие между облученными и необлученными образцами (%), время – длительность экспозиции клеток после облучения (ч).

Проведенный анализ показал, что уже спустя 3 ч после воздействия на клетки цельной крови низкоинтенсивного излучения частотой 1 ГГц отмечается статистически значимый прирост уровня

LL-37 в среднем на 68,1‰ (H = 19,5; $p = 0,0001$), ВРІ – на 64,1‰ (H = 19,3; $p = 0,0001$), ЛПСБ – на 101,5‰ (H = 27,1; $p = 0,00001$), МПО – на 138,8‰ (H = 35,2; $p = 0,00001$), БКК – на 19,8‰ (H = 16,7; $p = 0,0003$), АД – на 16,2‰ (H = 14,1; $p = 0,02$), ГР – на 25,7‰ (H = 15,7; $p = 0,0004$), а ПК – на 11,1‰ (H = 11,5; $p = 0,031$). Спустя 24 ч после воздействия отмечался дальнейший рост продукции ГР, составивший 33,1‰ (H = 4,2; $p = 0,04$), ПК – 27,4‰ (H = 19,5; $p = 0,00001$), БКК – 60,8‰ (H = 18,8; $p = 0,00001$). На этом фоне стимулированный микроволнами прирост уровня LL-37 сократился до 33,0‰ (H = 12,8; $p = 0,0003$), ВРІ – до 23,4‰ (H = 15,0; $p = 0,0001$), ЛПСБ – до 44,4‰ (H = 11,7; $p = 0,0006$), МПО – до 56,1‰ (H = 21,8; $p = 0,000001$). Таким образом, эффекты облучения в отношении продукции LL-37, ВРІ, ЛПСБ, МПО убывают к исходу первых суток с момента облучения, тогда как продукция ГР, ПК, БКК возрастает. Уровень АД на этом фоне статистически значимо не меняется ($p = 0,46$).

Выводы

1. Постклиническая фаза острого инфекционно-воспалительного процесса в легких в фазу реконвалесценции внебольничной пневмонии сопровождается статистически значимым уменьшением уровня АД, ГР и LL-37, определяющим снижение у обследованных больных резистентности к бактериальным патогенам вследствие функционального истощения нейтрофилов. При этом отмечается повышение уровней ЛПСБ, МПО, БКК, указывающее на рост у реконвалесцентов внебольничной пневмонии активности моноцитов. На этом фоне облучение цельной крови уже спустя 3 ч после воздействия сопровождается статистически значимым повышением продукции LL-37, ВРІ, ЛПСБ, МПО, БКК, АД, ГР и ПК, что свидетельствует об активирующем влиянии микроволн на функциональную активность моноцитов, нейтрофилов и НК-клеток [2, 5, 7].
2. После прекращения воздействия спустя 24 ч все еще фиксировались статистически значимые различия уровней LL-37, ВРІ, ЛПСБ и МПО в сравнении с необлученными образцами, однако их уровни имели тенденцию к снижению. Отмечено дальнейшее повышение продукции ГР, ПК, БКК и сохранение достиг-

нутого уровня продукции АД, позволяющее говорить о поддержании стимулированной микроволнами активности НК-клеток спустя сутки после первичного облучения.

3. Полученные результаты позволяют рассматривать низкоинтенсивное микроволновое излучение частотой 1 ГГц в качестве фактора неспецифической противoinфекционной резистентности, способного стимулировать защиту в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий, а также вирусов, и тем самым снижать вероятность повторной внебольничной пневмонии [3, 5, 8]. При этом одним из возможных механизмов такого влияния микроволн может являться модуляция внутриклеточных молекулярных механизмов трансдукции рецепторных сигналов, TLR и NLR-сигнальных путей [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Kovach M.A., Ballinger M.N., Newstead M.W., Zeng X., Bhan U., Yu F.S., Moore B.B., Gallo R.L., Standiford T.J. Cathelicidin-related antimicrobial peptide is required for effective lung mucosal immunity in Gram-negative bacterial pneumonia // *J. Immunol.* 2012. V. 189. № 1. P. 304–311.
2. Gwyer Findlay E., Currie S.M., Davidson D.J. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics // *Bio-Drugs.* 2013. V. 27. № 5. P. 479–493.
3. Лебедева М.Н., Грищенко А.В. Особенности течения повторных внебольничных пневмоний у военнослужащих по призыву // *Военно-медицинский журнал.* 2009. Т. 330. № 7. С. 24–28.
4. 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. Т. 61. № 6. С. 380–384.
5. Терехов И.В., Хадарцев А.А., Никифоров В.С., Бондарь С.С. Функциональное состояние клеток цельной крови при внебольничной пневмонии и его коррекция СВЧ-излучением // *Фундаментальные исследования.* 2014. Т. 10. № 4. С. 737–741.
6. Хадарцев А.А. Биофизикохимические процессы в управлении биологическими системами // *Вестник новых медицинских технологий.* 1999. Т. 6. № 2. С. 34–37.
7. 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. Т. 93. № 3. С. 23–28.
8. Pachón-Ibáñez M.E., Smani Y., Pachón J., Sánchez-Céspedes J. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides // *FEMS Microbiol Rev.* 2017. Т. 41. № 3. С. 323–342.

Поступила 17 сентября 2018 г.

THE RELATIONSHIP OF THE ACTIVITY OF CASPASE-3, REGULATORS OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN HEALTHY YOUNG INDIVIDUALS UNDER THE INFLUENCE OF LOW-INTENSITY RADIATION OF 1 GHZ

© Authors, 2018

S.S. Bondar

Post-graduate Student, Tula State University

I.V. Terekhov

Ph.D. (Med.), Associate Professor, Tula State University

E-mail: trft@mail.ru

V.K. Parphenyuk

Dr.Sc. (Med.), Professor, Saratov Medical State University n.a. V. I. Rasumovskiy

N.V. Bondar

Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Orel State University n.a. I. S. Turgenev

V.S. Nikiforov

Dr.Sc. (Med.), Professor, North-Western State Medical University n.a. I. I. Mechnikov

E-mail: Viktor.Nikiforov@szgmu.ru

Aim. The study of the content in the extracellular environment of the concentration of molecules that determine the state of nonspecific anti-infective resistance in patients undergoing community-acquired pneumonia and practically healthy individuals against the background of whole-blood irradiation with 1 GHz low-intensity microwaves.

Methods. In patients with acute infectious inflammation of the lower respiratory tract and in healthy individuals in the supernatants of whole blood cells was assessed by the content of cathelicidin (LL-37), a protein of neutrophils, which increase membrane permeability (BPI), lipopolysaccharide-binding protein (LBP), myeloperoxidase (MPO), Clara cells protein (CCP), defensin alpha (aD), granzyme (GR) and procathepsin (PC).

Results. The results of the study indicate that low-intensity microwave irradiation after 3 hours after exposure is accompanied by an increase in the level of LL-37 by an average of 68.1‰ (p = 0.0001), BPI by 64.1‰ (p = 0.0001), LBP by 101.5‰ (p = 0.00001), MPO by 138.8‰ (p = 0.00001), CCP by 19.8‰ (p = 0.0003), aD by 16.2‰ (p = 0.02), GR by 25.7 (p = 0.0004‰), a PC 11,1‰ (p = 0,031). 24 hours after exposure, there was a further increase in GR, PC and CCP production. Against this background, there was a reduction in the level of LL-37, BPI, LPS, MPO.

Conclusions. Thus, the effects of irradiation on the production of LL-37, BPI, LPS, MPO decrease by the end of the first day from the moment of irradiation, while the production of GR, PC, CCP increases. Thus, irradiation of blood with radiation of 1 GHz frequency promotes activation of neutrophils, macrophages and NK cells with increase of nonspecific anti-infective protection.

Key words: microwaves, pneumonia, Clara Cell Protein, LBP.

For citation: Bondar S.S., Terekhov I.V., Parphenyuk V.K., Bondar N.V., Nikiforov V.S. The relationship of the activity of caspase-3, regulators of apoptosis and autophagy in healthy young individuals under the influence of low-intensity radiation of 1 GHz. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(11):40–44. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-11-06>

REFERENCES

1. Kovach M.A., Ballinger M.N., Newstead M.W., Zeng X., Bhan U., Yu F.S., Moore B.B., Gallo R.L., Standiford T.J. Cathelicidin-related antimicrobial peptide is required for effective lung mucosal immunity in Gram-negative bacterial pneumonia // J. Immunol. 2012. V. 89. № 1. P. 304–311.
2. Gwyer Findlay E., Currie S.M., Davidson D.J. Cationic host defence peptides: potential as antiviral therapeutics // BioDrugs. 2013. V. 27. № 5. P. 479–493.
3. Lebedeva M.N., Grishchenko A.V. Osobennosti techeniya povtornykh vnebol'nichnykh pnevmonij u voennosluzhashchih po prizyvu // Voenno-meditsinskij zhurnal. 2009. T. 330. № 7. S. 24–28.
4. Terekhov I.V., Bondar' S.S., Hadarcev A.A. Laboratornoe opredelenie vnutrikletочnykh faktorov protivovirusnoj zashchity pri vnebol'nichnoj pnevmonii v oценke effektivnosti nizkointensivnogo SVCh-izlucheniya // Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. 2016. T. 61. № 6. S. 380–384.
5. Terekhov I.V., Hadarcev A.A., Nikiforov V.S., Bondar' S.S. Funkcional'noe sostoyanie kletok cel'noj krovi pri vnebol'nichnoj pnevmonii i ego korrekciya SVCh-izlucheniem // Fundamental'nye issledovaniya. 2014. T. 10. № 4. S. 737–741.
6. Hadarcev A.A. Biofizikohimicheskie processy v upravlenii biologicheskimi sistemami // Vestnik novyh medicinskih tekhnologij. 1999. T. 6. № 2. S. 34–37.
7. Terekhov I.V., Hadarcev A.A., Bondar' S.S. Sostoyanie receptorzavisimyh signal'nykh putej v agranulocitah perifericheskoj krovi rekonvalescentov vnebol'nichnoj pnevmonii pod vliyaniem mikrovolnovogo izlucheniya // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury. 2016. T. 93. № 3. S. 23–28.
8. Pachón-Ibáñez M.E., Smani Y., Pachón J., Sánchez-Céspedes J. Perspectives for clinical use of engineered human host defense antimicrobial peptides // FEMS Microbiol Rev. 2017. V. 41. № 3. P. 323–342.