

6. Ceyskens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A. et al. Development of giant bacteriophage ϕ KZ is independent of the host transcription apparatus. *J Virol.* 2014, 88 (18): 10501-10510.
7. Fothergill J.L., Walshaw M.J.; Winstanley C. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Resp. J.* 2012, 40: 227-238.
8. Fernández L., Gooderham W.J., Bains M. et al. Adaptive resistance to the «last hope» antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54 (8): 3372-3382.
9. Henry M., Lavigne R., Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57 (12): 5961-5968.
10. James C.E., Fothergill J.L., Kalwij H. et al. Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2012, 21 (12): 216. doi: 10.1186/1471-2180-12-21.
11. Krylov V., Shaburova O., Pleteneva E. et al. Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Viol. Sin.* 2015, 30 (1): 33-44.
12. Lee J.Y., Chung E.S., Na I.Y. et al. Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, Jul 2. pii: dku238.
13. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2015, Nov 18. pii: S1473-3099(15)00424-7. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
14. Lavigne R., Burkaltseva M.V., Robben J. et al. The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology.* 2003, 312 (1): 49-59.
15. Magill D.J., Shaburova O.V., Chesnokova E.N. et al. Complete nucleotide sequence of phiCHU: a Luz24likevirus infecting *Pseudomonas aeruginosa* and displaying a unique host range. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015, 362 (9). pii: fnv045. doi: 10.1093/femsle/fnv045. Epub. 2015 Mar 30.
16. Winstanley C., Langille M.G., Fothergill J.L. et al. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 2009, 19 (1): 12-23.

Поступила 20.02.16

Контактная информация: Крылов Виктор Николаевич,
105064, Москва, пер. М.Казенный, 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.И.Долгушин¹, Ю.С.Шишкова¹, С.Н.Даровских², И.А.Комарова¹,
Н.В.Вдовина², Е.А.Мезенцева¹, К.В.Никушкина¹*

ОСОБЕННОСТИ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ПРИРОДНОГО И ТЕХНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, ²Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

Цель. Изучить in vitro действие микроволновых электромагнитных излучений (ЭМИ) СВЧ диапазона на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов. *Материалы и методы.* Нейтрофилы периферической крови 30 условно здоровых доноров в возрасте 18 — 20 лет подвергали воздействию широкополосного (природного, аналогичного радиоизлучению Солнца) и моночастотного (техногенного, аналогичного излучению сотовых телефонов, компьютеров, микроволновых печей и др.) ЭМИ в диапазоне частот 4 — 4,34 ГГц, генерированных СВЧ-генератором «АИМТ-1». После 16 мин воздействия изучалась жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов, фагоцитарная функция, лизосомальная активность клеток, оценивалась НСТ-восстанавливающая спо-

способность и содержание цитокинов в супернатантах. *Результаты.* После воздействия на нейтрофилы моделированным ЭМИ с техногенной частотно-временной структурой количество жизнеспособных нейтрофилов значительно снижалось, функциональный статус жизнеспособных клеток не изменялся. После воздействия ЭМИ природного происхождения нейтрофилы сохраняли свою жизнеспособность, в супернатантах определялся повышенный уровень ИЛ1 β и ФНО α , функциональный статус нейтрофилов мужчин оставался стабильным, а у женщин было отмечено усиление фагоцитарной способности и снижение продукции кислородных радикалов. *Заключение.* Выявленное снижение количества жизнеспособных нейтрофилов при воздействии ЭМИ техногенного происхождения может привести к нарушениям в системе врожденного иммунитета, других звеньев гомеостаза организма человека и развитию патологических состояний. В то же время, обнаруженные эффекты ЭМИ природного происхождения открывают перспективы использования моделированного микроволнового ЭМИ СВЧ диапазона в профилактической и клинической медицине.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 11–17

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, электромагнитное излучение, врожденный иммунный ответ

I.I. Dolgushin¹, Yu.S. Shishkova¹, S.N. Darovskikh², I.A. Komarova¹, N.V. Vdovina², E.A. Mezentseva¹, K.V. Nikushkina¹

FEATURES OF MODIFYING EFFECT OF LOW-INTENSITY ELECTROMAGNETIC RADIATION OF NATURAL AND TECHNOGENIC ORIGIN ON VIABILITY AND FUNCTIONAL STATUS OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES

¹South-Urals State Medical University, ²South-Urals State University, Chelyabinsk, Russia

Aim. Study effects of microwave electromagnetic radiation (EMR) of the SHF range *in vitro* on viability and functional status of neutrophilic granulocytes. *Materials and methods.* Neutrophils of peripheral blood of 30 conditionally healthy donors aged 18 — 20 years were exposed to the effect of broadband (natural, similar to sun radio emission) and mono-frequency (technogenic, similar to emission of cell phones, PCs, microwave ovens, etc.) EMR with frequency range of 4 — 4.34 GHz, generated by a SHF-generator «AIMT-1». 16 minutes after the effect, viability of neutrophilic granulocytes, phagocytic activity, lysosome activity of cells were studied, NBT-reducing ability and cytokine content in supernatant were evaluated. *Results.* The amount of viable neutrophils significantly reduced after the effect of modelled EMR with technogenic frequency-temporal structure, functional status of viable cells did not change. Neutrophils retained viability after the effect of EMR of natural origin, increased levels of IL1 β and TNF α was determined in supernatants, functional status of neutrophils of men remained stable, and in women an increase of phagocytic ability and a reduction of production of oxygen radicals was noted. *Conclusion.* The detected reduction of the amount of viable neutrophils under the effect of EMR of technogenic origin could result in disturbances in the system of innate immunity, other homeostasis elements of the human organism and development of pathologic conditions. At the same time, the detected effects of EMR of natural origin open perspectives of use of modelled microwave EMR of SHF range in prophylaxis and clinical medicine.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 11–17

Key words: neutrophilic granulocytes, electromagnetic radiation, innate immune response

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы традиционно относятся к фагоцитирующим клеткам, которые благодаря ряду уникальных свойств (высокой подвижности, способности легко передвигаться в тканях, наличию мощных бактерицидных и цитотоксических продуктов) рассматриваются как высокопрофессиональные «убий-

цы», составляющие своеобразный «отряд быстрого реагирования в системе врожденной противомикробной защиты организма» [Долгушин И.И., Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю., 2011]. Уже более ста лет изучаются их морфология и функции. Были проведены фундаментальные исследования тонкого строения, физиологии нейтрофилов, биохимического состава их гранул, расшифрованы структуры их метаболитов. Установлено, что помимо бактерицидных факторов в нейтрофилах присутствуют и синтезируются в процессе активации вещества с разнообразными регуляторными свойствами (простагландины, лейкотриены, ферменты, низко- и среднемолекулярные пептиды и др.), с помощью которых гранулоциты могут влиять на функции макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов, эпителиоцитов, фибробластов, на секрецию иммуноглобулинов, систему комплемента, фибринолиз и другие системы [1, 5]. Наиболее изучены у нейтрофилов антимикробные реакции. Свой бактерицидный внутри- и внеклеточный эффект они осуществляют как путем фагоцитоза, так и с помощью секреции компонентов своих гранул и ДНК в окружающую среду, осуществляя противомикробную защиту и участвуя в регуляции формирования микробиоценозов слизистых оболочек [3, 6]. На основании проведенных исследований была сформулирована концепция о роли нейтрофилов в поддержании гомеостаза организма человека в условиях окружающей среды [4].

Необходимо отметить, что за последние десятилетия произошли существенные изменения свойств окружающей среды. Некоторые из них являются необратимыми. В первую очередь, это касается природного электромагнитного фона, обусловленного космическими и геофизическими факторами. В настоящее время этот фон полностью подавлен электромагнитными полями и излучениями техногенного происхождения, создаваемыми электростанциями, линиями электропередач, железнодорожным и городским транспортом, телевизионными передатчиками, базовыми станциями сотовой радиосвязи, радиопередающими центрами связи и навигации, средствами мобильной и сотовой связи, радиолокационными станциями, медицинским оборудованием и т.п. Излучения техногенного происхождения рассматриваются специалистами как существенный фактор дестабилизации поддержания организмами своего гомеостаза [2].

Несмотря на большой объем проведенных исследований по определению влияния различных факторов на функционирование нейтрофилов малоизученной остается оценка их взаимодействия с ЭМИ различного происхождения. В этой связи, было исследовано модифицирующее действие моделированных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и показатели функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов периферической крови человека.

Цель настоящего исследования — изучить *in vitro* действие моделированных низкоинтенсивных микроволновых электромагнитных излучений, аналогичных природному и техногенному, на жизнеспособность, НСТ-восстанавливающую, фагоцитарную функции и лизосомальную активность нейтрофильных гранулоцитов, а также их способность к формированию нейтрофильных внеклеточных ловушек, продукцию провоспалительных цитокинов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника ЭМИ был использован СВЧ-генератор (диапазон частот 4 — 4,34 ГГц) «АИМТ-1» с рупорным излучателем. Моделирование в указанном диапазоне частот микроволнового «всплеска» радионизлучения

Солнца осуществляли изменением режима генерации широкополосного электромагнитного излучения, при котором в течение 8 мин осуществлялось излучение с возрастанием его интенсивности от 50 до 500 мкВт/см², а в последующие 8 мин использовался режим излучения, при котором указанные параметры интенсивности излучения изменялись в обратном порядке. Таким образом, общая продолжительность воздействия в каждом эксперименте составляла 16 мин и соответствовала одному моделированному микроволновому «всплеску» Солнца той же длительности в диапазоне частот 4 — 4,34 ГГц.

Для моделирования техногенного ЭМИ использовалось моночастотное излучение на частоте $f_0 = 4,13$ ГГц с интенсивностью излучения 500 мкВт/см². Общая продолжительность излучения в каждом эксперименте составляла также 16 мин.

Объектом воздействия электромагнитного излучения явились нейтрофилы периферической крови 30 условно здоровых доноров в возрасте 18 — 20 лет, у которых были исключены ОРВИ, тяжелая соматическая патология, воспалительные процессы бактериальной природы различных локализаций в стадии обострения, туберкулез, гепатит и ВИЧ-инфекция.

Жизнеспособность и функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов изучалась в цельной периферической крови 21 донора *in vitro*, которая сразу после взятия была разделена на 3 части. На одну часть клеток воздействовали ЭМИ природного происхождения на расстоянии 15 см от источника, вторую подвергали воздействию ЭМИ техногенного происхождения также на расстоянии 15 см от источника, а третью оставляли без воздействия в течение 16 минут (контроль). Для определения жизнеспособности, люминесценции лизосом и определения нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) периферическую кровь смешивали с 0,05 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. После 30 мин инкубации при температуре +37°C клетки помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и под иммерсией исследовали в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа «Люам». При таком способе окраски ядра жизнеспособных нейтрофилов окрашивались в ярко-зеленый цвет, внеклеточные ловушки были представлены тонкими ярко-зелеными нитями, занимающими пространство, в 2 — 3 раза превосходящее диаметр неизмененного нейтрофила, лизосомальные гранулы были ярко-оранжевого цвета. Рассчитывали процент жизнеспособных нейтрофилов и процент сформированных НВЛ, определяли лизосомальную активность как число нейтрофилов, имеющих лизосомальные гранулы. Для оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофилов постановку НСТ-теста осуществляли в модификации А.Н.Маянского и М.К.Виксмана. При учете реакции определяли процент НСТ-позитивных клеток и учитывали интенсивность реакции. Изучение способности нейтрофилов к фагоцитозу проводили по методу И.С.Фрейдлин (1984). При анализе фагоцитоза рассчитывали процент фагоцитов (активность фагоцитоза) и число поглощенных объектов в 100 подсчитанных нейтрофилах (интенсивность фагоцитоза) [3].

Для оценки содержания провоспалительных цитокинов в супернатантах нейтрофилов чистую фракцию гранулоцитов выделяли из 15 мл гепаринизированной (10 — 15 ЕД/мл гепарина фирмы «Гедеон-Рихтер», Венгрия) периферической венозной крови 30 доноров. С целью осаждения эритроцитов кровь отстаивали в стерильной пробирке с добавлением 10% раствора желатина в соотношении 10:1 при температуре +37°C в течение 30 минут. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси на двойном градиенте плот-

Таблица 1. Жизнеспособность, фагоцитарная функция и лизосомальная активность нейтрофильных гранулоцитов после воздействия низкоинтенсивным СВЧ электромагнитным излучением

Показатели жизнеспособности, фагоцитарной функции и лизосомальной активности	Пол донора	ЭМИ природного происхождения	ЭМИ техногенного происхождения	Контроль
Содержание жизнеспособных нейтрофилов, %	Муж. (n=10)	89,8±10,06 p ₁₋₂ = 0,024	70,0±13,0 p _{2-к} = 0,014	91,61±10,92
	Жен. (n=11)	88,7±22,44	76,9±14,0 p _{2-к} = 0,039	89,2±9,69
Внеклеточные ловушки, %	n=10	0,42±0,42	11,2±7,03	0,94±0,94
Активность фагоцитоза, %	Муж. (n=10)	17,83±16,51	12,92±16,42	14,47±27,3
	Жен. (n=11)	16,67±8,22	15,38±11,06	17,07±11,21
Индекс фагоцитоза, усл. ед.	Муж. (n=10)	1,5±0,57	1,46±0,85	1,66±1,27
	Жен. (n=11)	2,0±0,55	1,73±1,28	1,29±0,63 p ₁₋₃ = 0,039
Активность лизосом, %	Муж. (n=10)	92,5±4,62	90,0±9,23	92,0±10,49
	Жен. (n=11)	95,0±5,97	91,0±7,63	95,0±6,84

ности стерильных растворов фикола-урографина (Pharmacia, Швеция; Шеринг, Германия), доводили до концентрации 5×10^6 кл./мл. Полученную взвесь клеток делили на 3 части. На одну часть клеток воздействовали ЭМИ природного происхождения, вторую — подвергали воздействию ЭМИ техногенного происхождения, а третью оставляли без воздействия (контроль). Затем путем центрифугирования получали супернатанты, в которых методом ИФА определяли концентрацию продуцируемых нейтрофилами цитокинов: ИЛ8, ИЛ18, ИЛ1 β , ФНО α с помощью тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований установили, что в эксперименте *in vitro* после воздействия на нейтрофилы моделированным ЭМИ с техногенной частотно-временной структурой происходило значительное снижение количества жизнеспособных нейтрофилов периферической крови доноров вне зависимости от половой принадлежности последних (табл. 1). Природное ЭМИ не оказывало влияния на количество жизнеспособных нейтрофилов периферической крови доноров.

Фагоцитарная функция нейтрофилов изучалась на модели поглощения частиц полистирольного латекса. Представленные данные экспериментального исследования (табл. 1) наглядно демонстрируют, что после действия природных электромагнитных СВЧ излучений на нейтрофильные гранулоциты женщин происходит значительное увеличение количества захваченных латексных частиц. У мужчин фагоцитарная функция нейтрофильных гранулоцитов остается стабильной как при действии техногенного, так и при действии природного ЭМИ.

Для оценки лизосомального аппарата нейтрофилов и образования НВЛ проводили прижизненное окрашивание нейтрофилов акридиновым оранжевым. Представленные в табл. 1 результаты отражают стабильность показателей лизосомальной активности нейтрофилов, выделенных из периферической

Таблица 2. Показатели НСТ-теста нейтрофилов доноров при действии природного и антропогенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения

Показатели НСТ-теста		Пол донора	ЭМИ природного происхождения	ЭМИ техногенного происхождения	Контроль
Спонтанный	Активность, %	Муж. (n=10)	45,0±28,75	42,5±28,96	42,5±31,86
		Жен. (n=11)	52,38±25,09	35,0±26,89	52,38±25,72
	Индекс, усл. ед.	Муж. (n=10)	0,6±0,58	0,65±0,55	0,6±0,63
		Жен. (n=11)	0,8±0,51	0,45±0,41	0,67±0,53
Индукцированный	Активность, %	Муж. (n=10)	40,84±33,45	66,5±39,2	55,0±30,48
		Жен. (n=11)	50,0±29,77	50,0±29,64	78,85±13,27 p ₁₋₃ = 0,039
	Индекс, усл. ед.	Муж. (n=10)	0,55±0,6	1,02±0,73	0,52±0,73
		Жен. (n=11)	0,9±0,49	0,63±0,52	1,15±0,39

крови доноров, при этом активность лизосом нейтрофилов не изменяется при действии ЭМИ как природного, так и техногенного происхождения. Изменений в количестве НВЛ как в группах с воздействием ЭМИ, так и в контрольной группе, также выявлено не было.

Оценку кислородзависимого метаболизма нейтрофилов после воздействия указанных ЭМИ проводили при использовании НСТ-теста в двух вариантах: спонтанный и индуцированный частицами полистирольного латекса.

НСТ-редуцирующая активность нейтрофилов мужчин не изменялась при действии как природного, так и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения.

У женщин спонтанный НСТ-тест также не выявил изменений внутриклеточной продукции кислородных радикалов как при действии природного, так и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения. Однако после воздействия ЭМИ, аналогичного природному, и активации клеток частицами латекса НСТ-редуцирующая способность нейтрофильных гранулоцитов была значительно ниже контрольных показателей (табл. 2).

Таким образом, нами обнаружено, что действие техногенных электромагнитных СВЧ излучений не влияет на кислородзависимый метаболизм нейтрофилов мужчин и женщин. Действие природных электромагнитных СВЧ излучений блокирует НСТ-реакцию активированных нейтрофилов у женщин, у мужчин этот показатель остается стабильным.

При определении цитокинов в супернатантах нейтрофильных гранулоцитов достоверных различий содержания ИЛ8 и ИЛ18 в

Таблица 3. Показатели уровня цитокинов в супернатантах нейтрофилов доноров при действии природного и техногенного низкоинтенсивного СВЧ электромагнитного излучения (пг/мл)

Уровень цитокинов в супернатантах нейтрофилов	ЭМИ природного происхождения (n = 30)	ЭМИ техногенного происхождения (n = 28)	Контроль (n = 30)
ИЛ8	3,10±8,07	3,19±9,68	4,05±4,99
ИЛ18	4,34±2,28	5,07±1,96	4,94±2,24
ИЛ1β	3,84±2,23	3,21±2,87	2,95±2,22 p ₁₋₃ = 0,015
ФНОα	4,0±0,91	3,86±0,59	3,21±0,7 p ₁₋₃ = 0,002 p ₂₋₃ = 0,002

сравниваемых группах не выявлено. Уровень ИЛ1 β и ФНО α в супернатантах нейтрофилов, подвергшихся воздействию природного ЭМИ микроволнового диапазона, был достоверно выше, чем в контрольных группах. После воздействия техногенным низкоинтенсивным ЭМИ было зарегистрировано повышение уровня ФНО α (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенного исследования наглядно демонстрируют разные эффекты действия низкоинтенсивных электромагнитных излучений природного и техногенного происхождения на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов.

Итоги эксперимента свидетельствуют о выраженном влиянии техногенных ЭМИ на жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов мужчин и женщин. Техногенное ЭМИ может приводить к нарушению физиологических процессов организма человека, в которых нейтрофилы принимают участие: формирование колонизационной резистентности, противоопухолевая и антимикробная защита, регуляция системы гемостаза, изменение устойчивости к стрессовым факторам.

Действие моделированного природного ЭМИ иное: нейтрофилы сохраняют свою жизнеспособность и функциональный статус. При этом нами отмечено, что у женщин при действии природного ЭМИ повышается интенсивность фагоцитарной реакции гранулоцитов и снижается внутриклеточная продукция активных форм кислорода, отмечается повышение секреции нейтрофилами провоспалительных цитокинов ИЛ1 β и ФНО α .

Таким образом, ЭМИ различного генеза неодинаково влияют на функциональный статус нейтрофилов. Эти результаты представляют несомненный интерес и требуют дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев, Наукова Думка, 1988.
2. Григорьев Ю.Г., Григорьев К.А. Электромагнитные поля базовых станций подвижной сотовой связи и экология. Оценка опасности электромагнитных полей базовых станций для населения и биосистем. Радиационная биология. Радиоэкология. 2005, 45 (4): 726-731.
3. Долгушин И.И., Андреева Ю.С. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: методы обнаружения и оценка эффективности улавливания бактерий. Журн. микробиол. 2009, 2: 65-67.
4. Долгушин И.И., Бухарин О.В. Нейтрофилы и гомеостаз. Екатеринбург, УрО РАН, 2001.
5. Маянский А.Н. Галиуллин А.Н. Реактивность нейтрофила. Казань, Изд-во Казан. ун-та, 1984.
6. Шишкова Ю.С. Роль нейтрофилов в формировании колонизационной резистентности слизистых оболочек. Дис. д-ра. мед. наук. Челябинск, 2010.

Поступила 25.04.16

Контактная информация: Комарова Ирина Андреевна,
454092, Челябинск, ул. Воровского, 64, р.т. (351)232-73-71