

УДК 615.849.11:[579.84:[577.114.4' 577.115] – 026.87]:(045)

ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭНДОТОКСИН СНИЖАЕТ ЕГО ЛЕТАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ

Брилль Г.Е., Егорова А.В., Бугаева И.О., Штефанова Г.С.

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского»
Минздрава России, Саратов, e-mail: meduniv@sgmu.ru

Исследовано влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения на летальный эффект бактериального липополисахарида. Раствор липополисахарида кишечной палочки подвергался воздействию электромагнитных волн с частотой 1 ГГц, плотностью мощности 0,0001 мВт/см² в течение 10 мин. В экспериментах на большой группе контрольных и облученных мышей проведен сравнительный анализ расчетных летальных доз бактериального ЛПС. При этом использовался метод пробит-анализа. Доказано, что облучение яда аппаратом «Аквагон-02», генерирующим излучение с частотой 1 ГГц, при плотности мощности 0,0001 мВт/см² в течение 10 мин, увеличивает ЛД₅₀ на 26%. Результаты, представленные в данной статье, вызовут несомненный интерес как теоретиков, так и практических врачей, поскольку они открывают перспективу немедикаментозной коррекции летальных эффектов бактериального эндотоксина.

Ключевые слова: бактериальный липополисахарид, УВЧ-излучение, летальная доза

ELECTROMAGNETIC INFLUENCE ON BACTERIAL ENDOTOXIN REDUCES ITS LETHAL EFFECT

Brill G.E., Egorova A.V., Bugaeva I.O., Shtefanova G.S.

Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, e-mail: meduniv@sgmu.ru

The influence of low-intensity electromagnetic radiation on the lethal effect of bacterial lipopolysaccharide was performed. A solution of lipopolysaccharide of *Escherichia coli* exposed to electromagnetic waves with a frequency of 1 GHz, the power density of 0,0001 mW/cm² for 10 min. In experiments on a large group of control and irradiated mice, a comparative analysis of the estimated lethal dose of bacterial lipopolysaccharide was performed. For this used probit analysis. It was established that UHF-Radiation (1 GHz, 0,0001 mW/cm², 10 min) increase by 26% LD50. The results presented in this article will cause undoubted interest of both theorists and clinicians, as they offer the prospect of non-pharmacological correction lethal effects of bacterial endotoxin.

Keywords: bacterial lipopolysaccharide, UHF-Radiation, lethal dose

Бактериальный липополисахарид (ЛПС, эндотоксин) представляет собой амфифильный биополимер, содержащий гидрофильные (О-специфические цепи, олигосахарид кора) и гидрофобный (липид А) фрагменты. Он является важнейшим фактором патогенности грам-отрицательных микроорганизмов, ответственным за развитие бактериального эндотоксикоза и его наиболее тяжелой формы – бактериально-токсического шока. Влияние ЛПС на макроорганизм проявляется в стимуляции лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток, усилении продукции интерлейкинов, фактора некроза опухоли-альфа и ряда других медиаторов, в активации системы комплемента и факторов свертывания крови, что может заканчиваться развитием диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови, эндотоксинового шока и острой полиорганной недостаточности [3, 6].

Актуальным является поиск способов уменьшения летальных эффектов ЛПС, что может открыть новые перспективы в детоксикации организма. Обычно для снижения токсичности ЛПС применяются различные химические вещества (катионные амфифильные молекулы, синтетические пептиды, полиамины, нетоксичный полисахарид

хитозан), уменьшающие патогенное действие ЛПС в результате образования с ним макромолекулярных комплексов [1, 2, 7, 8]. Перспективным направлением является создание олигонуклеотидных аптамеров, специфически связывающихся с ЛПС и снижающих его патогенную активность [5, 9].

Однако химическая модификация молекулы ЛПС не всегда оказывается доступной, удобной и приемлемой в силу дороговизны и малой доступности применяемых для этой цели веществ. Кроме того, вещества, используемые для модификации токсической молекулы, сами могут обладать биологической активностью и оказывать влияние на исследуемые функции.

В настоящей работе была поставлена цель: исследовать модифицирующее влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения с частотой 1 ГГц на структурообразовательные свойства и летальный эффект бактериального липополисахарида.

Материалы и методы исследования

В работе использовался ЛПС кишечной палочки 055:B5 (Sigma, США). Для исследования структурообразовательных свойств ЛПС разводили *ex tempore* в 0,9% растворе натрия хлорида (20 мг/мл). Приготовленную суспензию (2 мл) делили на 2 пробы: одна являлась контролем, а другая в течение 10 мин

подвергалась электромагнитному воздействию (частота – 1 ГГц, плотность мощности – 0,1 мкВт/см²) с помощью аппарата «Акватон-2» (производитель – НПП «Телемак», Саратов, Россия). Раструб излучателя помещался на расстоянии 10 см от облучаемого объекта.

Для изучения процесса спонтанного структурообразования ЛПС использовался метод клиновидной дегидратации [4], основанный на исследовании структурного следа (фации), формирующегося при высыхании капли препарата в стандартных условиях. 1 мкл исследуемой суспензии (контрольная проба) помещался на сухое, чистое, обезжиренное предметное стекло. Обычно наносились 6–8 капель для сравнительного анализа. Далее предметное стекло с препаратом в строго горизонтальном положении помещали в термостат и высушивали при 37 °С в течение 30 мин. Аналогично с контрольными пробами готовились опытные препараты.

После высыхания препараты подвергались микроскопическому исследованию. Применялась световая микроскопия (Zeiss, Germany) с фоторегистрацией структурного следа и сохранением информации в файле компьютера. Анализ фаций включал определение количественных показателей с последующей статистической обработкой. При этом использовалась специальная компьютерная программа, позволяющая рассчитывать следующие параметры: S_1 – площадь периферического ободка, нормированная на общую площадь фации; S_2 – площадь промежуточной (приободковой) зоны, нормированная на общую площадь фации; S_3 – площадь центральной зоны, нормированная на общую площадь фации; S_1/S_2 – смещение центра промежуточной зоны относительно центра ободка фации; S_2/S_3 – смещение центра центральной зоны относительно центра ободка фации. В центральной и промежуточной зонах фации рассчитывались: N – количество гребешков в типичном фрагменте фации; Average size (AS) – средний размер гребешков в типичном фрагменте фации; Entr. – неоднородность поверхности фации в типичном фрагменте; D согг. – корреляционная размерность типичного фрагмента. Количественные параметры обрабатывались статистически с расчетом средней арифметической (M) и её ошибки (m) с использованием статистического пакета программ Prizm-4. Достоверность различий средних вычисляли с использованием t -критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Определение летальных доз (ЛД) эндотоксина проводили на 84 нелинейных белых мышаксамцах массой 20 г, которые были разделены на 2 группы. Предварительно 25 мг ЛПС разводили в 25 мл дистиллированной воды (концентрация ЛПС = 1000 мкг/мл). Затем раствор ЛПС делился на 2 пробы: 10 мл – для контроля, 15 мл – для облучения. Облучение раствора ЛПС производилось в малой чашке Петри аппаратом «Акватон-02» в течение 10 мин. Выбор времени облучения был обоснован тем, что в течение 10 мин происходила модификация процесса структурообразования молекул ЛПС, что позволяло предположить изменение при этом его летальных свойств. Мышам первой группы (контроль) внутрибрюшинно вводили нативный (необлученный) ЛПС в дозах 100, 200, 300 и 400 мкг/мышь (соответственно 0,1, 0,2, 0,3 и 0,4 мл ЛПС). Число животных для каждой дозы – 8. Мыши второй (опыт-

ной) группы получали внутрибрюшинные инъекции предварительно облученного ЛПС в тех же дозах (объемах). Число животных для каждой дозы – 13. Наблюдение за животными проводилось в течение 24 часов после введения ЛПС. При этом учитывали количество погибших и выживших особей. Расчет летальных доз ЛПС производился методом пробит-анализа.

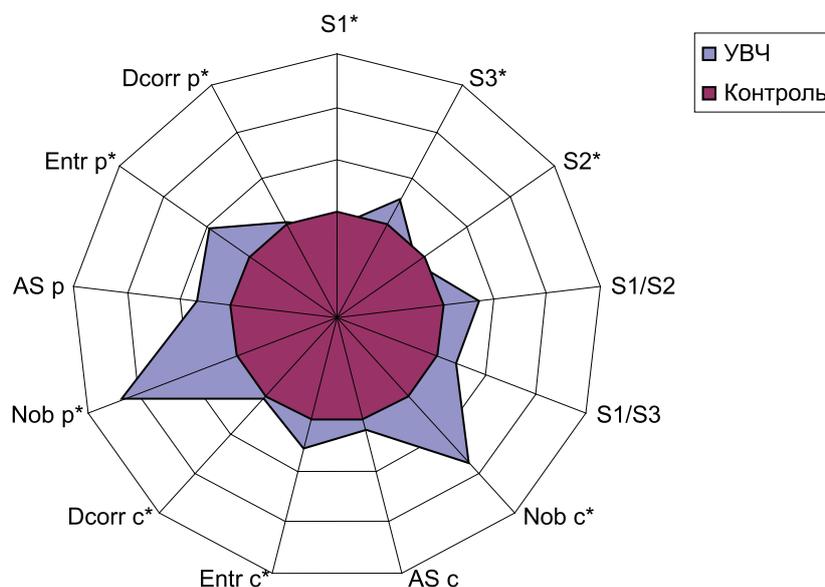
Результаты исследования и их обсуждение

Картина фаций, получаемых при дегидратации необлученной суспензии ЛПС в физиологическом растворе, отличалась разнообразием структурных элементов. Здесь чётко визуализировались 3 зоны: приподнятый ободок, обрамляющий фацию по периферии (периферическая зона), приободковая (или промежуточная) и центральная зоны. Облучение суспензии ЛПС низкоинтенсивным электромагнитным излучением приводило к заметной модификации процесса структурообразования. Результаты количественной обработки фаций, получаемых при клиновидной дегидратации суспензии ЛПС в контроле и после УВЧ облучения, представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением с частотой 1 ГГц приводило к изменению относительных размеров различных зон фации: уменьшались периферическая и приободковая зоны ($p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно), в то время как размер центральной зоны увеличивался на 20% ($p < 0,01$). После УВЧ-воздействия примерно в 2 раза возрастало количество гребешковых объектов в центральной и приободковой зонах фации ($p < 0,05$). Однако их средний размер не претерпевал существенных изменений. На этом фоне в 1,2 раза увеличивался показатель Entr, характеризующий структурную неоднородность центральной зоны фации ($p < 0,05$), а также на 32% возрастал показатель Entr приободковой зоны ($p < 0,02$). Достоверно изменялась и структурированность (корреляционная размерность) обеих анализируемых зон ($p < 0,02$).

Результаты экспериментов по определению летальных доз эндотоксина представлены в таблице. Как следует из таблицы, в контрольной группе при введении минимальной дозы ЛПС (100 мкг) погибла 1 мышь из 8, тогда как при введении максимальной дозы (400 мкг) погибли все мыши. В группе животных, получавших облученный ЛПС, от минимальной дозы яда не погибла ни одна мышь из 13, а при введении максимальной дозы погибли 12 мышей из 13.

**Электромагнитное воздействие
на бактериальный эндотоксин снижает его летальный эффект**



Изменение количественных параметров фаций бактериального ЛПС после УВЧ-облучения; контроль – 100% (условные обозначения показателей см. в тексте)

Результаты исследования летального эффекта нативного бактериального ЛПС и ЛПС после электромагнитного облучения

Нативный ЛПС (контроль)		Облучённый ЛПС (опыт)	
Доза ЛПС (мкг/мышь)	Умерло/всего	Доза ЛПС (мкг/мышь)	Умерло/всего
100	1/8	100	0/13
200	3/8	200	3/13
300	7/8	300	6/13
400	8/8	400	12/13

Для контрольной группы расчетные параметры ЛД составили:

- ЛД₁₆ – 124,7 мкг/мышь;
- ЛД₅₀ – 212,2 мкг/мышь;
- ЛД₈₄ – 299,7 мкг/мышь;
- ЛД₁₀₀ – 343,4 мкг/мышь.

Для опытной группы расчетные параметры ЛД составили:

- ЛД₁₆ – 188,2 мкг/мышь;
- ЛД₅₀ – 287,1 мкг/мышь;
- ЛД₈₄ – 386,0 мкг/мышь;
- ЛД₁₀₀ – 435,4 мкг/мышь.

Для группы контроля $M \pm m$ ЛД₅₀ составило – $212,2 \pm 25,2$, для опытной группы – $287,1 \pm 22,3$. Достоверность разницы (p) между ЛД₅₀ группы контроля и опытной группы < 0,02.

Результаты данных экспериментов свидетельствуют о том, что низкоинтенсив-

ное электромагнитное излучение частотой 1 ГГц, плотностью мощности 0,1 мкВт/см², воздействующее в течение 10 мин, достоверно снижает летальный эффект ЛПС на 26% ($p < 0,02$) и приводит к изменениям в суспензионной системе ЛПС-физиологический раствор, которые отражаются на кинетике структурообразования.

Данное наблюдение, несомненно, заинтересует как теоретиков, так и клиницистов, поскольку оно открывает перспективу немедикаментозной коррекции свойств бактериальных токсинов.

Список литературы

1. Давыдова В.Н. Взаимодействие бактериальных эндотоксинов с хитозаном. Влияние структуры эндотоксина, молекулярной массы хитозана и ионной силы раствора на процесс комплексообразования / В.Н. Давыдова, И.М. Ермак, В.И. Горбач // Биохимия. – 2000. – Т. 65. – С. 1278–128.
2. Ермак И.М. Модификация биологических свойств липополисахарида при образовании им комплекса

с хитозаном / И.М. Ермак, В.Н. Давыдова, В.И. Горбач // Бюл. эксперим. биол. мед. – 2004. – Т. 137. – С. 430–434.

3. Ильина А.Я. Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры / А.Я. Ильина, С.И. Лазарева, В.Г. Лиходед и др. // Рус. мед. журн. – 2003. – Т. 11. – С. 126–129.

4. Шабалин В.Н. Морфология биологических жидкостей человека / В.Н. Шабалин, С.Н.Шатохина. – М.: Хризостом, 2001. – 303 с.

5. Bruno J.G. In vitro antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer–C1qrs complexes / J.G. Bruno, M.P. Carrillo, T. Phillips et al. // Folia Microbiol. – 2008. – Vol. 53, № 4. – P. 295–302.

6. Dauphinee S.M. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells / S.M. Dauphinee, A. Karsan // Lab. Invest. – 2006. – Vol. 86. – P. 9–22.

7. Kaconis Y. Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides / Y. Kaconis, I. Kowalski, J. Howe et al. // Biophys J. – 2011. – Vol. 100, № 11. – P. 2652–2661.

8. Sil D. Biophysical mechanisms of the neutralization of endotoxins by lipopolyamines / D. Sil, L. Heinbockel, Y. Kaconis et al. // Open Biochem J. – 2013. – Vol. 7. – P. 82–93.

9. Wen A.A novel lipopolysaccharide-antagonizing aptamer protects mice against endotoxemia / A. Wen, Q. Yang, Li J. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2009. – Vol. 382. – P. 140–144.

References

1. Davydova V.N., Ermak I.M., Gorbach V.I. Vzaimodejstvie bakterial'nyh jendotoksinov s hitozanom. Vlijanie struktury jendotoksina, molekularnoj massy hitozana i ionnoj sily rastvora na process kompleksoobrazovaniya, Biohimija. 2000. T. 65. pp. 1278–128.

2. Ermak I.M., Davydova V.N., Gorbach V.I. Modifikacija biologicheskikh svojstv lipopolisaharida pri obrazovanii im kom-

pleksa s hitozanom, Bjul. jeksperim. biol. med. 2004. T. 137. pp. 430–434.

3. Il'ina A.Ja., Lazareva S.I., Lihoded V.G. i dr., Patogeneticheskie mehanizmy i klinicheskie aspekty dejstvija termostabil'nogo jendotoksina kishečnoj mikroflory, Rus. med. zhurn. 2003., T. 11. pp. 126–129.

4. Shabalin V.N., Shatohina S.N. Morfologija biologicheskikh zhidkostej cheloveka. M.: Hrizostom. 2001. 303 p.

5. Bruno J.G., Carrillo M.P., Phillips T. et al. In vitro antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer–C1qrs complexes, Folia Microbiol. 2008. Vol. 53, no. 4. pp. 295–302.

6. Dauphinee S.M., Karsan A., Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells, Lab. Invest., 2006. Vol. 86. pp. 9–22.

7. Kaconis Y., Kowalski I., Howe J. et al., Biophysical mechanisms of endotoxin neutralization by cationic amphiphilic peptides, Biophys J., 2011., Vol. 100, no. 11. pp. 2652–2661.

8. Sil D., Heinbockel L., Kaconis Y. et al., Biophysical mechanisms of the neutralization of endotoxins by lipopolyamines. Open Biochem J. 2013. Vol. 7. pp. 82–93.

9. Wen A., Yang Q., Li J. et al. A novel lipopolysaccharide-antagonizing aptamer protects mice against endotoxemia, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. Vol. 382. pp. 140–144.

Рецензенты:

Чеснокова Н.П., д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ» Минздрава России, г. Саратов;

Зимняков Д.А., д.ф.-м.н., профессор, заведующий кафедрой физики, ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А.», г. Саратов.

Работа поступила в редакцию 28.05.2014.