

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биофизики клетки Российской академии наук»

На правах рукописи

ЧЕРЕНКОВ

Дмитрий Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ
НЕИОНИЗИРУЮЩИХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ НИЗКОЙ
ИНТЕНСИВНОСТИ
НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

03.01.02 Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант: д.б.н., проф. Корнеева О.С.

Воронеж – 2015

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

CD – кластер дифференцировки (от англ.: *Cluster of differentiation*), специфичный антиген, выявляемый с помощью моноклональных антител.

DMEM – минимальная основная среда Дюльбекко

NOS – NO-синтаза

PBS – фосфатный буферный раствор

AM – амплитудная модуляция

АОК – антителообразующая клетка

БСА – бычий сывороточный альбумин

БТШ70, БТШ90 – белки теплового шока семейств 70 и 90, соответственно

ЕКК – естественные киллерные клетки

ИЛ – интерлейкин

ИФ – интерферон

КОЕ – колониеобразующая единица

Кон А – конканавалин А

ЛАК – лимфокин-активированные киллерные клетки

ЛПС – липополисахарид

ЛТ- лазерная терапия

ЛЭП – линия электропередач

МНС (ГКГС) - главный комплекс гистосовместимости

НИЛИ – низкоинтенсивное лазерное излучение

ПГЕ – простагландин Е

ПМ – плотность мощности (падающего излучения)

ПОЛ (POL) – перекисное окисление (окислительная деградация) липидов

СВЧ – сверхвысокие частоты

СОД – супероксиддисмутаза

Th – т-хелперы

Ts – т-супрессоры

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФНО- α – фактор некроза опухолей альфа

ФС – фотосенсибилизация

ЧМ – частотная модуляция

ЭЛОК – эндоваскулярное лазерное облучение крови

ЭМИ – электромагнитное излучение

ЭМП – электромагнитное поле

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ЭФРС – эндотелиальный фактор расслабления сосудов

СОДЕРЖАНИЕ:

Список условных обозначений и сокращений	2
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Современные представления о механизмах влияния ЭМИ низкой интенсивности на живые системы.	13
1.1.1. Механизм действия ЭМИ (КВЧ) на биологические объекты	14
1.1.2. Механизм действия ЭМИ (СВЧ) на биологические объекты	21
1.1.3. Механизм действия НИЛИ на биологические объекты	25
1.1.4. Клетки иммунной системы как мишень для воздействия ЭМИ	33
1.1.5. Молекулярные регуляторы и медиаторы иммунного ответа	45
1.2. Роль иммунной системы млекопитающих в ответах на воздействие неионизирующих электромагнитных излучений	65
1.2.1. Электромагнитные волны КВЧ и СВЧ-диапазона и иммунная система	65
1.2.2. Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) и иммунная система	77
Глава II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	90
2.1. Источники излучений	90
2.2. Животные	93
2.3. Выделение клеток	93
2.4. Модель опухолевого роста	93
2.5. Иммунизация	94
2.6. Измерение продукции цитокинов	94
2.7. Измерение продукции NO	94
2.8. Измерение уровня продукции БТШ и SAPK/JNK	95
2.9. Измерение скорости пролиферации клеток	95
2.10. Измерение цитотоксической активности ЕКК	96
2.11. Получение гидролизатов фукоидана и маннана	96
2.12. Определение антиоксидантной активности	97

2.13. Определение структуры иммуноглобулинов	97
Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	98
3.1. Ответы иммунной системы здоровых животных на воздействие низкоинтенсивных ЭМИ	98
3.1.1. Влияние низкоинтенсивных ЭМИ на продукцию цитокинов клетками иммунной системы животных	99
3.1.2. Уровень антителообразования при антигенной стимуляции в условиях облучения	114
3.1.3. Скорость пролиферации лимфоцитов в условиях облучения	116
3.1.4. Активность естественных киллерных клеток селезенки в условиях облучения	121
3.2. Сезонные изменения в ответах иммунной системы на воздействие ЭМИ у животных-гибернантов	126
3.3. Динамика развития новообразований и изменения в иммунной системе при облучении животных-опухоленосителей	132
3.4. Возможные механизмы действия низкоинтенсивных ЭМИ и регуляция ответа иммунной системы на излучение	159
3.4.1. Роль БТШ70 и БТШ90 при воздействии ЭМИ нетеплового уровня	160
3.4.2. Оксид азота (NO) как медиатор воздействия низкоинтенсивных ЭМИ	166
3.4.3. Роль каскада внутриклеточной сигнализации SAPK/JNK в ответах на низкоинтенсивные электромагнитные волны	170
3.4.5. Роль антиоксидантов: убихинонов Q, β -каротина и минорных углеводов, обладающих антиоксидантной активностью, в иммунном ответе клетки	182
3.5. Гипотетический механизм реализации клеточного ответа на низкоинтенсивные ЭМИ	196
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	202
ВЫВОДЫ	205
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	207

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследуемой проблемы

Исследование эффектов низкоинтенсивных электромагнитных излучений нетеплового уровня представляет собой одно из наиболее актуальных направлений в современной биофизике. В связи со стремительным развитием и распространением компьютерной техники, средств мобильной связи и бытовых электроприборов, возрастающим уровнем техногенного «электромагнитного загрязнения», подобные исследования сегодня особенно необходимы. За последнее десятилетие резко увеличилось количество источников электромагнитных излучений во всём диапазоне частот: появились новые линии электропередач, телевизионные и радиовещательные станции, установки мобильной и спутниковой связи, промышленные энергетические объекты. Стремительный рост количества источников низкоинтенсивного ЭМИ приводит к определенным биологическим и экологическим последствиям. Сегодня можно говорить о формировании нового фактора окружающей среды - ЭМИ антропогенного происхождения. При этом понимание значимости и механизмов влияния данного фактора на живые организмы на сегодняшний день является недостаточным. Существующие нормы воздействия ЭМИ на организм значительно отличаются между собой для разных стран. Несмотря на то, что развитие стандартов электромагнитного воздействия идет по пути ужесточения, их требования не подкреплены достаточно глубокими научными исследованиями и нуждаются в уточнении и научном обосновании, особенно в области минимально допустимых значений воздействия ЭМИ, поскольку эффект воздействия низкоинтенсивных излучений может зависеть от большого количества факторов, которые данными нормами не учитываются. Помимо этого следует отметить, что низкоинтенсивные ЭМИ различных частотных диапазонов (КВЧ, СВЧ и НИЛИ), применяются в медицине, для лечения и профилактики широкого круга заболеваний (Rojavin et al., 1998; Бецкий и др., 2000; Москвин и Буйлин, 2000). Научное обоснование тактики применения такого рода

воздействий в медицине при этом остается недостаточным, поскольку биологические механизмы действия низкоинтенсивных ЭМИ на биологические системы на сегодняшний день малоизучены. Имеющиеся сведения относительно действия нетеплового ЭМИ на организменном, клеточном и молекулярном уровнях не позволяют сформулировать четкие закономерности биологических эффектов электромагнитных волн. Ранее было неоднократно показано, что эффекты низкоинтенсивных ЭМИ проявляются на различных уровнях организации: от биологических молекул до целого организма. При этом ЭМИ существенно влияют на функционирование регуляторных систем организма (Бецкий и др., 1983; Артюхов и др., 2001). Одной из наиболее чувствительных к облучению ЭМИ систем организма является иммунная система, поскольку она представляет собой естественный барьер между организмом и воздействиями внешней среды (Walleczek, 1992; Владимиров, 1994; Klebanov et al., 1998; Артюхов и др., 2001;). Известно, что облучение ЭМИ при относительно высоких интенсивностях может вызвать нарушения, приводящие к иммунопатологии и онкологическим заболеваниям. Недостаточно изученными в этом плане остаются эффекты малых доз ЭМИ нетеплового уровня на иммунную систему млекопитающих в том числе при различных патологиях. В настоящее время показано, что низкоинтенсивное электромагнитное излучение различной природы оказывает существенное влияние на активность иммунокомпетентных клеток: нейтрофилов и макрофагов, процессы пролиферации и соотношение CD4+/CD8+ Т-лимфоцитов, провоцирует дегрануляцию тучных клеток и активацию кератиноцитов кожи и приводит к множеству опосредованных эффектов. (Бецкий и Ильина, 1989; Запорожан и др., 1997; Szabo et al., 2001; Козель и Попов, 2000; Попов и др., 2001; Safronova et al., 2002). В то же время необходимы систематические и более детальные исследования влияния нетепловых ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ на такие клетки иммунной системы, как естественные киллерные клетки (ЕКК), макрофаги, Т- и В-лимфоциты, осуществляющие надзорные, регуляторные и эффекторные функции, направленные поддержание целостности организма и уничтожение чужеродных субстанций. Кроме того,

несмотря на большое количество экспериментальных и теоретических данных, определенные успехи в объяснении механизмов действия низкоинтенсивных ЭМИ на различных уровнях организации, недостаточно ясна роль внутриклеточных и межклеточных сигнальных систем в опосредовании эффектов ЭМИ различной природы. Также отсутствуют систематические данные об изменении чувствительности живых систем к ЭМИ в зависимости от их физиологического состояния и микроокружения. В условиях непрерывно возрастающего количества источников низкоинтенсивных ЭМИ, окружающих человека в повседневной жизни, необходим поиск способов защиты и снижения чувствительности организма к их действию. Таким образом, исходя из вышесказанного, большой научный и практический интерес представляет собой изучение чувствительности компонентов иммунной системы млекопитающих к ЭМИ, а также выяснение закономерностей воздействия низкоинтенсивных ЭМИ на организм как в норме так и при патологиях.

Цель и задачи работы. Целью настоящего исследования явилось выявление закономерностей и механизмов ответа иммунной системы млекопитающих на действие низкоинтенсивных ЭМИ (КВЧ, СВЧ и НИЛИ) при различных физиологических состояниях организма.

В соответствии с целью, нами были поставлены задачи:

1. Определить пороговые значения чувствительности клеток иммунной системы (Т- и В-лимфоцитов, макрофагов, естественных киллерных клеток) к облучению ЭМИ (КВЧ, СВЧ и НИЛИ) *in vitro*.
2. Провести комплексное исследование эффектов как однократного, так и длительного (фракционированного) воздействия ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток здоровых животных, при облучении *in vivo*.
3. Исследовать зависимость эффектов ЭМИ от физиологического состояния организма с использованием в качестве модели животных-гибернантов в разные периоды активности.

4. Изучить влияние повышенного содержания антиоксидантов в рационе питания на показатели активности иммунной системы животных в условиях длительного (фракционированного) облучения низкоинтенсивными ЭМИ.

5. Выявить закономерности ответа иммунокомпетентных клеток на воздействие ЭМИ при длительном (фракционированном) облучении *in vivo* в условиях моделирования патологических состояний: иммунной реакции на введение чужеродного белка и развитие злокачественной опухоли.

6. Проанализировать имеющиеся в научной литературе сведения и вновь полученные данные о молекулярно-клеточных механизмах действия и разработать схему, отражающую участие низкоинтенсивных ЭМИ в активации сигнальных путей в клетках иммунной системы.

Научная новизна.

1. Впервые проведен сравнительный анализ влияния ЭМИ различной природы на иммунную систему млекопитающих путем комплексного исследования продукции цитокинов, монооксида азота (NO), БТШ70 и БТШ90, а также измерения пролиферативной, цитотоксической и антителообразующей активности иммунокомпетентных клеток в условиях облучения.

2. В диапазоне сверхмалых доз ЭМИ, показано, что для активации системы клеточного иммунитета *in vivo* достаточно воздействие в дозах $\sim 5 \times 10^{-2}$ Дж/см², а для угнетения $\sim 1,3 \times 10^{-1}$ Дж/см² падающего излучения. При воздействии *in vitro* эти цифры на порядок меньше: $\sim 6 \times 10^{-3}$ Дж/см² и $\sim 7 \times 10^{-2}$ Дж/см² соответственно.

3. Впервые обнаружено повышение продукции стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK и БТШ70 в клетках иммунной системы при облучении малыми дозами НИЛИ.

4. Показано развитие отдаленных эффектов облучения (до 96 часов) низкоинтенсивными ЭМИ на компоненты иммунной системы животных.

5. Впервые исследовано действие длительного фракционированного (до 30 суток) облучения ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ на иммунную систему млекопитающих.

6. Впервые было обнаружено угнетение уровня антителообразования у антиген-стимулированных мышей при использовании фракционированного режима облучения ЭМИ КВЧ с несущей частотой 40 ГГц.

7. Впервые, на модели зимнеспящих животных показано, что способность клеток, выделенных из животных, находящихся в состоянии пониженной физиологической активности реагировать на облучение низкоинтенсивными ЭМИ снижается до контрольного уровня, в то время как клетки, выделенные из животных в активных фазах годового цикла высокочувствительны к облучению.

8. При использовании моделей патологических состояний (инфекции и онкологического заболевания) показано угнетающее действие длительного фракционированного облучения низкоинтенсивными ЭМИ (10-30 суток) на продукцию фактора некроза опухолей (ФНО), интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-3) лимфоцитами, и активность естественных киллерных клеток (ЕКК) селезенки, что указывает на неблагоприятный характер такого воздействия.

9. Впервые обнаружено стимулирующее влияние диеты с антиоксидантами на биосинтез гликопротеинов углеводной части, а также на общий уровень содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови при развитии иммунного ответа, и на продукцию ФНО- α лимфоцитами в условиях длительного (фракционированного) облучения низкоинтенсивными ЭМИ СВЧ.

10. Показано, что воздействие низкоинтенсивными неионизирующими излучениями запускает механизмы стрессового ответа клеток иммунной системы.

Теоретическая и практическая ценность. Полученные в настоящей работе научные данные о влиянии ЭМИ (КВЧ, СВЧ и НИЛИ) как *in vitro*, так и *in vivo* на состояние иммунной системы, необходимы для понимания закономерностей и механизмов взаимодействия электромагнитного излучения нетеплового уровня с живыми объектами. Полученные в настоящей работе данные включены в курс лекций по дисциплине «Биофизика» для студентов специальности «Биоинженерия и биоинформатика» в ФГБОУ ВПО «ВГУИТ». Обнаруженные нами эффекты низкоинтенсивных ЭМИ несомненно, имеют не

только фундаментальное, но и прикладное значение, поскольку могут быть использованы как научное обоснование санитарных норм и правил электромагнитной безопасности. Кроме того, полученные данные могут быть использованы для разработки стратегии применения низкоинтенсивных ЭМИ в медицине.

Апробация работы. Материалы исследований были представлены в виде докладов на 17-ом международном симпозиуме «Electromagnetic Compatibility 2004» (Wroclaw, Poland, 2004); Третьем международном симпозиуме «Нетепловых медико-биологических эффектов электромагнитных полей и ионизированных газов» (San Antonio, Texas, USA, 2003); Всероссийских научных форумах с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2004, 2005); Международном конгрессе «Прогрессивные научные технологии для здоровья человека» (Крым, г. Ялта, 2005); конференции «Фундаментальные науки - медицине», (г. Москва, 2007); «8th John Humphrey advanced summer program in immunology» (Moscow, 2007); 8 - 14 Пушчинских международных школах-конференциях молодых ученых «Биология наука 21 века» (г. Пушкино, 2004 - 2012); XV международной конференции: «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Крым, г. Ялта, 2007); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12 (г. Пушкино, 2012); Международной конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (г. Воронеж, 2013).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано **36** работ в отечественной и зарубежной печати, в том числе **16** в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ.

Вклад автора. Личный вклад автора состоял в определении задач и выборе методов их решения, анализе теоретических данных, проведении экспериментов, интерпретации и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, соискатель принимал личное участие на всех этапах исследований от постановки задачи до проведения эксперимента, анализа и публикации полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эффекты однократного облучения организма млекопитающих ЭМИ КВЧ, СВЧ и НИЛИ нетеплового уровня могут наблюдаться в течение нескольких суток после воздействия.

2. Направленность эффектов низкоинтенсивных ЭМИ в диапазоне сверхмалых доз облучения, как изолированных клеток, так и целого организма зависит от длительности воздействия.

3. Воздействие слабого лазерного красного света (НИЛИ) вызывает активацию продукции белков сигнального каскада SAPK/JNK.

4. Применение маннозы и фукозы в качестве антиоксидантов влияет на физиологическое состояние иммунокомпетентных клеток и тем самым способно потенцировать эффекты низкоинтенсивных ЭМИ.

5. Схема участия низкоинтенсивных ЭМИ в активации сигнальных путей в клетке.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные представления о механизмах влияния низкоинтенсивных ЭМИ на биологические объекты

Механизмы действия электромагнитных излучений низкой интенсивности являются объектом изучения многих ведущих исследователей, начиная со второй половины XX века – времени зарождения и развития таких направлений науки как электромагнитная биология и электромагнитная медицина. Несмотря на большой объем полученных экспериментальных и теоретических данных и значительные успехи, достигнутые в этой области, интерес к данной проблеме не ослабевает и в настоящее время. Во многом это обусловлено многообразием и сложностью наблюдаемых эффектов на уровне от отдельных молекул до целых организмов. Биологические эффекты отражают тот потенциал использования низкоинтенсивных ЭМИ, который может быть реализован в различных отраслях деятельности человека при четком понимании закономерностей и механизма процессов, происходящих при действии ЭМИ на биологические системы. Следует отметить, что данные эффекты могут приводить и к негативным последствиям, в зависимости от условий облучения и физиологического состояния организма, что особенно важно при разработке правил безопасного обращения с источниками ЭМИ. В современной науке накоплен обширный материал, раскрывающий механизмы действия ЭМИ на биологические объекты, однако самой сложной для понимания остается область нетепловых эффектов ЭМИ ($\text{ППМ} \leq 10 \text{ мВт/см}^2$), при которых увеличение температуры объекта, на который оказывается воздействие, не является определяющим фактором ответа системы. (Кудряшов, Перов, Рубин, 2008) Изучение взаимосвязи процессов, происходящих в живых системах при действии ЭМИ нетеплового уровня, механизмов реализации наблюдаемых эффектов, и зависимости результатов облучения от состояния системы остается одной из актуальных задач электромагнитной биологии.

1.1.1. Механизмы действия ЭМИ КВЧ на биологические объекты

При рассмотрении вопроса о механизмах действия ЭМИ КВЧ, следует сначала остановиться на тех эффектах и характерных особенностях действия миллиметровых волн на биологические объекты, открытие которых послужило основой для разработки гипотез объясняющих природу наблюдаемых явлений. Начало изучению эффектов низкоинтенсивных (менее 10 мВт/см^2) электромагнитных волн миллиметрового диапазона положили работы А.С. Пресмана (Пресман и Левитина, 1962) и М.Б. Голанта с сотрудниками (Голант и др., 1965). Начало экспериментальным исследованиям, посвященным воздействию на биологические объекты ЭМИ КВЧ (30-300 ГГц), положили эксперименты с кроветворной и иммунной системами млекопитающих Севастьяновой и соавторов (Севастьянова и др., 1969, 1970). Дальнейшее стремительное развитие этого научного направления позволило сформулировать основные особенности влияния низкоинтенсивного ММ излучения на биологические объекты:

Нетепловой характер воздействия. Взаимодействие ММ излучения с веществом при плотностях потока мощности падающего излучения носит неэнергетический характер. Говоря о тепловом воздействии, всегда имеют в виду нагрев вещества, который и является причиной наблюдаемых эффектов. При ППМ, не превышающей 10 мВт/см^2 , четко регистрируются проявления нетепловых взаимодействий (Диденко и др., 1983; Grigor'ev et al., 2005). Интегральный нагрев облучаемого в эксперименте вещества обычно менее $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ при таких небольших величинах интенсивности излучения (Девятков и Бецкий, 1985). Это позволяет говорить о нетепловых эффектах воздействия, хотя даже при малых плотностях потока мощности ЭМИ КВЧ происходит значительное поглощение излучения объектом, что приводит к микронагреву отдельных участков облучаемого вещества.

Пороговый характер воздействия. Биологические эффекты ЭМИ КВЧ имеют пороговый (по мощности) характер то есть возникают, начиная с некоторой минимальной величины (порога). Эта особенность биологического

эффекта ЭМИ КВЧ проявляется в опытах *in vivo* и *in vitro*. На типичных графиках, отражающих зависимость биологических эффектов от мощности падающего излучения, существует плато – область проявления биологического эффекта, независящая от интенсивности излучения). Размер плато находится в соответствии со значительными (более двух-трех порядков) изменениями мощности облучения. Приведем конкретный пример такого эффекта: возрастание ППМ от 0,01 до 0,1 мВт/см² приводило к увеличению воздействия ЭМИ КВЧ до достижения максимального значения, которое даже при ППМ=10 мВт/см² оставалось неизменным (Девятков, 1985; Shahin et al., 2014). При увеличении в 105 раз плотности потока мощности в ходе облучения микроорганизмов проявление биологического эффекта остается на прежнем уровне (Голант, 1985). В трудах по изучению влияния на функциональную активность нейтрофилов мышей ЭМИ КВЧ также отмечается описанный эффект (Гапеев и др. 1996). Пороговый характер свидетельствует о возможном «информационном» механизме передачи сигнала: в таком случае эффект воздействия может определяться изменением длительности импульсов и паузой между ними. Характер передаваемого «сообщения» не подвержен влиянию изменения амплитуды импульсов, даже в очень больших пределах. Впервые данная гипотеза сформулирована в работах Пресмана, который ввел термин «информационное взаимодействие», характеризуя воздействие на биологические объекты нетепловых электромагнитных колебаний (Пресман, 1968).

Наличие амплитудно-частотных «окон» и зависимость от модуляции. В литературе отмечено, что отсутствует прямая пропорциональная зависимость эффектов воздействия ЭМИ КВЧ волн на биологические объекты от низких значений (менее 0.5 мВт/см²) плотности потока мощности (Лукьянова, 1998). Как следует из многих работ, между интенсивностью ЭМИ КВЧ и производимыми биологическими эффектами существует зависимость, которая не является пропорциональной, а скорее носит резонансный характер и определяется частотно-амплитудными «окнами» (Adey, 1980; Bell et al., 1994; De Iuliis et al., 2009). В ММ диапазоне спектра присутствуют определенные области, в которых

реакция биологического объекта детектируется, в то время как вне данных областей такой реакции нет. Отмечается, что амплитудой определяется то, по какому механизму проявляется отклик объекта, а определяющую роль играет частота воздействия (Девятков и Бецкий, 1985; Девятков и др., 1991). Таких чередований частотных полос с отсутствием и наличием биологических эффектов, обычно, довольно много (Grundler&Keilmann, 1983; Pakhomov et al., 1997). Эти данные согласуются с работой А.Б. Гапеева с соавторами, в которой показано, что такая частотная зависимость проявляется в биологических объектах вблизи рупора излучателя КВЧ (Гапеев и др., 1996).

На основании многочисленных экспериментальных данных исследователями были предложены гипотезы, объясняющие механизмы воздействия ЭМИ КВЧ на биологические объекты. Рассмотрим некоторые, наиболее распространенные из них.

Высвобождение ионов Ca^{2+} . По мнению многих авторов, часть биологических эффектов низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ обусловлены влиянием на процессы внутриклеточной сигнализации, являющиеся Ca^{2+} -зависимыми (Walleczek, 1992; Adey, 1993; Karabakbisian et al., 1994; Naziroglu et al., 2012). В ранних работах Adey показал на примере нервных клеток моллюска *Aplysia* и виноградной улитки рост калиевой проницаемости мембран в случае повышения содержания в эритроцитах внутриклеточного кальция (Adey, 1981). Также было установлено, что при воздействии ЭМИ КВЧ происходит высвобождение из поверхностного слоя мембран ионов Ca^{2+} , которые были связаны с макромолекулами (Adey, 1975). Другие авторы также отмечали сходный эффект: модификация активности Ca^{2+} -зависимых мембраносвязанных белков при облучении ЭМИ КВЧ (Geletyuk et al., 1995; Катаев и др., 1993), которая способна вызвать значительные изменения различных по типу клеток на уровне основных функций. Определено, что переключателем экспрессии различных генов являются колебания концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, которые в свою очередь обусловлены степенью воздействия на рецептор внешнего (Britch, 1999; Berridge, 1999; Youn, 2014). В отношении действия на нейронную сеть ММ излучения существует

следующая модель действия, осуществляемая через NMDA-рецептор, сопряженный с Ca^{2+} -каналом: колебания содержания кальция, индуцируемые излучением, ведут к росту рефрактерного времени нейронов (Сидоренко, 1996, 2002).

Поглощение ЭМИ КВЧ молекулами воды. Вода и водные растворы поглощают миллиметровые волны. Излучение при $\lambda=8$ мм ослабляется на 2 порядка слоем воды толщиной 1 мм и на 4 порядка при той же толщине слоя и $\lambda=2$ мм (Khurgin et al., 1994). Многие работы позволяют сделать выводы о роли водной среды в механизмах воздействия миллиметровых волн. Например, изучение прочности связи гем-глобин и осмотической устойчивости оболочек эритроцитов в водных растворах гемоглобина при воздействии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ, позволило выявить зависимость уровня воздействия на эритроциты от концентрации этих клеток в суспензии (Ильина и др., 1979; Коса et al., 2013). Максимальный эффект был обнаружен в условиях сильного разведения, поэтому было выдвинуто предположение, что влияние электромагнитного излучения определяется взаимодействием биологического объекта с находящейся в зоне действия излучения водной средой (через гидратную оболочку молекул и мембран), а не величиной поглощенной энергии. Позднее был проведен ряд исследований, в которых были предложены механизмы действия низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ на воду (Fesenko et al., 1995; Синицын и др., 1998; Бецкий и Лебедева, 2001). Тема возбуждения метастабильных состояний в структуре воды затронута в одной из этих работ; выявлено, что сетка водородных связей определяет физический механизм возникновения «памяти воды» (Гапочка и др., 1994). Атом водорода, находящийся в молекуле воды между атомами кислорода может находиться в двух равновероятных положениях, этим характеризуется водородная связь между двумя молекулами воды. Данный атом водорода (протон) может быть представлен в виде частицы, туннелирующей между двумя потенциальными энергетическими ямами. Резонансный характер поглощения миллиметрового излучения кластерными и клатратными образованиями $\{(\text{H}_2\text{O})_n$ при $n=50-60\}$

обусловлен тем, что в ММ и субмиллиметровом диапазонах лежат частоты переходов протона. Результаты экспериментов, опубликованные Фесенко и соавторами подтверждают, что водные растворы, как и вода способны в течение длительного времени (до нескольких десятков минут) сохранять информацию, так называемую «память», о факте облучения после предварительного воздействия ЭМИ КВЧ (Fesenko et al., 1995). После остановки облучения информация выражается в сохранении биохимической активности воды. Для водосодержащих биологических объектов физиками из Саратова был предложен физический механизм высокой чувствительности к воздействию низкоинтенсивных ЭМИ. У водных кластеров было открыто наличие собственных резонансных частот в диапазоне частот 50-70 ГГц, с чем и связан описанный эффект (Синицын и др., 1998). Волны на этих частотах могут проникать в глубину облучаемого объекта, так как в водосодержащих средах распространяются с очень малыми потерями. При этом во взаимодействие со слабым внешним сигналом вовлекаются внутренние структуры. Интересным является факт, что этот эффект выявлен лишь для изменения мощности облучения в диапазоне, не превышающем долей-единиц мкВт.

Конвективное движение жидкости при поглощении ЭМИ КВЧ водой и водными растворами. Поглощение миллиметрового излучения водой из-за возникающей вынужденной конвекции способно вызвать перемешивание облучаемой среды. Пороговые значения плотности потока мощности, при которых в экспериментах обнаруживалась конвекция, составляют порядка $0,5 \text{ мВт/см}^2$, при этом локально температура растворов не изменялась (Бецкий и др., 1983; Kalantaryan et al., 2010). Приповерхностное поглощение ЭМИ КВЧ вызывает изменение сил поверхностного натяжения на границе раздела фаз (жидкость - твердое тело воздух - жидкость), вследствие чего и возникает конвекция. В водном растворе конвекция может ускорять газообмен между воздухом и раствором, а не только приводить к локальному перемешиванию в зоне действия излучения, что было показано экспериментально (Шаров и др., 1983). Часто протекание различных объектов в биологических объектах

ограничено стадиями переноса вещества через водный слой, для таких объектов конвективное перемешивание водной среды может иметь значительные последствия. В частности, в липосомах происходит ускорение ПОЛ под влиянием ММ излучения на участвующие в реакции водорастворимые вещества. (Андреев и др., 1981; Di Donato et al., 2012). Существенным фактором является вызываемая излучением конвекция воды в примембранных слоях, которая влияет на процессы мембранного транспорта (Казаринов и др., 1984; Tadevosian et al., 2009). Активизируется перенос электрических зарядов и веществ из-за возникающего конвективного движения (Бецкий и Путвинский, 1986; Khizhnyak&Ziskin, 1996). Когда пороговые значения падающей мощности не превышают нескольких микроватт, может происходить конвекция не в объеме жидкости, а в слоях толщиной менее 1 мм (Khizhnyak&Ziskin, 1996). В живых клетках большинство функций обусловлены биологическими процессами, связанными с мембранами, поэтому основным «детектором» излучения в клетке можно считать именно биологические мембраны.

Поглощение излучения клетками кожи. Известно, что проникновение низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ в тело животного или человека почти не происходит за пределами кожного покрова (Бецкий и Ильина, 1989; Teksheva et al., 2014). Тонкий слой кожи (0,1-0,2 мм) – эпидермис – поглощает миллиметровые волны до 90-95% (Gandhi, 1983). В ММ диапазоне волн удельная поглощаемая мощность составляет 180-640 Вт/кг при плотности потока мощности 5 мВт/см² (Gandhi, 1983). Содержание воды в глубоких и поверхностных слоях кожи значительно различается, что может служить объяснением факта пространственно неоднородного поглощения энергии ЭМИ КВЧ (Фролов, 1982; Родштат, 1985; Woo et al., 2014). При этом возникают микротемпературные градиенты, распределенные по объему, так как эффективная глубина поглощения КВЧ очень мала (Бецкий и Девятков, 1996). Для холодовых рецепторов человека скорость роста температуры от 0,004 °С/с является пороговым стимулом, для тепловых – 0,001 °С/с, поэтому температурный градиент между слоями кожи, формируемый под действием излучения, часто

способен активировать термочувствительные нервные окончания, в том числе механорецепторы (Алексеев и др., 1997). Реализация биологических эффектов ЭМИ КВЧ низкой интенсивности осуществляется, помимо кожных рецепторов, через отдельные, например иммунокомпетентные, клетки кожи, а также кровеносные и лимфатические капилляры. Рост проницаемости протекающей жидкости в капиллярах, изменение гидратации рецепторных белковых структур, параметров импульсной электрической активности в периферических нервах и физико-химических характеристик внутрикапиллярной жидкости связаны с обозначенными структурами кожи. Таким образом, на организменном уровне влияние ЭМИ КВЧ проявляется лишь опосредованно при участии гуморальной, периферической нервной и иммунной систем, а кожные структуры - основные мишени при действии этих волн на биологические объекты. Чтобы определить мишени действия на кожные структуры ЭМИ КВЧ был проведен опыт с клетками эпидермиса, в ходе которого они подвергались облучению в течение 15-30 мин ЭМИ КВЧ (61,22 ГГц; 770 Вт/кг) (Szabo et al., 2001), в ответ на которое *in vitro* базальные кератиноциты не изменяли функциональной активности, оцениваемой по ИЛ-8-индуцированному хемотаксису, спонтанной пролиферации и адгезии. Однако под действием миллиметрового облучения происходит статистически достоверное, хотя и не большое, увеличение внутриклеточного уровня продукции ИЛ-1, что свидетельствует о факте активации базальных кератиноцитов под действием облучения человеческой кожи ЭМИ КВЧ. Интересно, что цитокин ИЛ-1 – главный медиатор развития местной защитной реакции на повреждение ткани, которая для восстановления ее целостности задействует почти все типы клеток-эффекторов воспаления.

1.1.2. Механизм действия ЭМИ СВЧ на биологические объекты

ЭМИ с частотами 3-30 ГГц относится к сантиметровому диапазону. Указанные частоты относят к сверхвысокочастотным (СВЧ) и радиочастотным микроволнам в России и за рубежом соответственно. Электромагнитное излучение в диапазоне сверхвысоких частот используют телевидении, различных видах связи (спутниковой и радиорелейной), а также радиолокации и радионавигации (Шеин, 2001). Механизмы действия низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ на биологические среды являются крайне малоизученными, но существуют общие закономерности реакции на облучение живого организма, потому можно в совокупности рассматривать биологические эффекты ЭМИ в диапазоне частот от 0,8 до 30 ГГц. Считается, что отраженная или проходящая энергия не оказывают влияния на объект, а лишь только поглощенная веществом часть энергии может вызвать изменения в нем (Давыдов и соавт., 1984; Перов и др., 2008), следует в первую очередь рассматривать первичные акцепторы низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ. Так как в сантиметровом диапазоне длина волны соизмерима с линейными размерами человека и лабораторных животных, облучаемые объекты могут являться резонирующими поглотителями. Таким образом, отдельные структуры тела могут поглощать энергию, как и все тело целиком. При облучении ЭМИ СВЧ доля энергии, которая будет поглощена тканями и органами, а также ее относительное распределение в них зависят от ряда факторов: электрических свойств тканей, длины падающей волны, ориентации объекта в поле, его размеров и формы (Штемлер и Колесников, 1978; Ганди, 1980). Жировая и костная ткань поглощают ЭМИ СВЧ менее эффективно, чем кровь, тканевая жидкость и мозг, то есть ткани с большим содержанием воды (Пресман, 1968; Шван и Фостер, 1980; Teksheva et al., 2014). Несмотря на огромное разнообразие биологических эффектов, физиологическое действие ЭМИ СВЧ нетеплового характера и его механизмы все еще остаются спорными. Одними из пионерских работ, посвященных изучению механизмов влияния ЭМИ СВЧ на биологические объекты, являются труды Пресмана А.С. (Пресман, 1968, 1974), Исмаилова Э.Ш. (Исмаилов, 1985), Холодова Ю.А. (Холодов, 1991). Существуют различные

предположения и гипотезы, но пока не имеется достаточно аргументированных причин реакции живых организмов на нетепловое воздействие СВЧ. Во многих источниках в передаче воздействия ЭМИ на биологические объекты вода рассматривается как первичная мишень (Fesenko et al., 1995; Гапочка и соавт., 2000; Cosentino et al., 2013). С проблемой резонансных биологических эффектов связана гипотеза о возможном «информационном действии» ЭМИ (Пресман, 1968; Иванов-Муромский, 1977; Valone, 2007). По мнению данных исследователей, в организме биологический эффект и роль ЭМИ стоит с позиции рассматривать с позиции информационного взаимодействия с биологическими системами, а не только с точки зрения энергетических эффектов. Вероятно, затрагивается генный уровень живых систем под действием ЭМИ СВЧ, о чем свидетельствуют современные научные данные. В последнее десятилетие появились доказательства прямого действия на ДНК низкочастотных излучений, что отражено во многих посвященных этой проблеме работах (Zmyslony et al., 2000; Blank & Goodman, 2001; Ivancsits S. et al. 2002; Furtado-Filho et al., 2014). Однако возможно, что некоторые полученные эффекты обусловлены тепловыми воздействиями, поскольку изменения наблюдаются при воздействии ЭМИ СВЧ с тепловой интенсивностью. Имеются немногочисленные работы, результаты которых выявляют прямую связь между действием нетепловых электромагнитных излучений и изменением структуры ДНК. Вероятно, нейроэндокринная система принимает участие в изменении генетического гомеостаза (Rakhomov & Akyel, 1997; Григорьев, 2000). Разнообразные эффекты низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ на нейроэндокринную систему вызывают различные поведенческие реакции животных. Это действие может выражаться на различных уровнях организации: системном, тканевом, клеточном. Энергия ЭМИ СВЧ поглощается опосредованно слуховым анализатором или непосредственно ЦНС (Пресман, 1968; Иванова, 1998, 1999; Valone, 2007; Eser, 2013). Изменения поведения животных, скорости проведения импульсов, секреции некоторых гормонов, главным образом отвечающих за передачу сигналов и импульсов ферментов, - все это является выражением возникающих эффектов. Также

возможен рост уровня эндорфинов у крыс, что, однако может быть обусловлено тепловыми эффектами. Следует отметить, что при этом функционирование эпифиза оставалось неизменным. Эпифиз синтезирует мелатонин, а согласно «мелатониновой гипотезе», развитию раковых заболеваний может способствовать снижение уровня или отсутствие мелатонина (Stevens et al., 1992). Из анализа этих данных следует вывод о биотропном действии низкоинтенсивного ЭМИ СВЧ на нейроэндокринную систему млекопитающих. Утверждения авторов об усилении адаптивной регуляции у организмов при действии ЭМИ СВЧ позволяют сделать предположение, что иммунная система, как и другие ответственные за биологические ответы системы, участвуют в этих процессах.

Роль модуляции. В научной литературе имеются данные, указывающие в формировании биологического эффекта важную роль играют амплитудная и частотная модуляции электромагнитных излучений (Григорьев, 1996). Актуальность проблемы электромагнитной безопасности несомненна и связана с применением модулированных ЭМИ, поэтому следует большое внимание уделить изучению их биологических эффектов (Коляда и Никитина, 1989; Marjanovic et al., 2014). Существует работа, формирующая представление об изменении иммунологического статуса экспериментальных животных под действием амплитудно-модулированных ЭМИ СВЧ низкой интенсивности ($ПМ=30 \text{ мкВт/см}^2$) (Veyret et al., 1991). Облучение СВЧ-диапазона без применения амплитудной модуляции не привело к изменениям в различных иммунных реакциях: титре антител, антителообразованию при предварительной иммунизации организма, способности к формированию бляшек. После применения амплитудной модуляции в исследованных реакциях были отмечены значительные изменения. Характер модуляции влияет на направленность изменений, а именно, при определенных частотах модуляции наблюдали значительное увеличение или понижение иммунореактивности организма. Так как эти эффекты (увеличение или снижение) могут быть вызваны действием на различные биологические мишени ЭМИ с определенными параметрами, они по-видимому, являются независимыми. На процессы антителообразования у

иммунизированных животных (Глушкова и др., 2001), цитотоксическую активность ЕКК селезенки (Фесенко и др., 1999), продукцию ФНО у облученных животных (Новоселова и Фесенко, 1998; Fesenko et al., 1999) частотно-модулированное (ЧМ) ЭМИ СВЧ (8.15-18 ГГц; ПМ=1 мкВт/см²; качающаяся частота 1 Гц) оказывает иммуностимулирующее действие. У животных с привитой карциномой Эрлиха проявлялась повышенная противоопухолевая резистентность при фракционированном облучении ЧМ ЭМИ СВЧ (Глушкова и др., 2002; Глушкова и др., 2003). Низкоинтенсивные (ППМ=5 мкВт/см²) ЭМИ СВЧ проявляют противоопухолевое (Акоев и др., 1995; Hou et al., 2014) и радиопротекторное действие (Акоев и др., 1994) при модуляции низкой частотой (12-14 Гц) в режиме качания. В некоторых случаях проявляются противоположные эффекты, в зависимости от частоты модуляции. Так, респираторный взрыв перитонеальных нейтрофилов мышей в зависимости от частоты модуляции может быть ингибирован (ЧМ=0,1, 16 или 50 Гц) или активирован (ЧМ=1 Гц) при действии ЧМ ЭМИ СВЧ (ППМ=50 мкВт/см²) (Гапеев и др., 1997). При низкой ПМ (1-4 мкВт/см²) у некоторых страдающих аллергией людей проявляется высокая восприимчивость к действию ЭМИ при определенной модуляции (Smith et al., 1986; Dokhnadze, 2011). Следовательно при помощи моделированных ЭМИ возможна коррекция патологических иммунологических состояний, так как прослеживается тесная взаимосвязь между действием электромагнитных излучений и механизмами сенсibilизации ряда иммунокомпетентных структур. ЭМИ низкой интенсивности может изменять чувствительность к другим факторам среды, с этим связана возможность значительной роли модуляции в реализации ответной реакции организма на воздействие (Григорьев, 1996). Это дополнительный критерий при оценке опасности для человеческого здоровья ЭМИ.

1.1.3. Механизм действия НИЛИ на биологические объекты

Теоретическая возможность усиления света за счет энергии из внешнего источника была обоснована советским физиком В.А. Фабрикантом в 1939 г., а в 1951 г. им, совместно с сотрудниками, была подана заявка на изобретение, которая называлась «способ усиления излучения при помощи вынужденного испускания». В 1952 г., независимо друг от друга, Н.Г. Басов, А.М. Прохоров в СССР, Ч. Таунс, Х. Цайгер и Дж. Тордон, в США, а также канадский учёный Дж. Вебер, предложили практический способ реализации усиления электромагнитных колебаний в СВЧ – диапазоне (Грибковский, 1988). В этом же году были созданы первые квантовые СВЧ-усилители (мазеры). Первый лазер на основе рубина, излучающий в видимой (красной) области спектра ($\lambda = 694,3$ нм) в 1960 г. сконструировал Т. Мейман (США). Спустя год был создан первый гелий – неоновый лазер (ГНЛ) ($\lambda = 632,8$ нм). Первые полупроводниковые лазеры были созданы одновременно в СССР и США в 1962 – 1963 гг. Затем лазерная техника развивалась стремительными темпами, в течение нескольких последующих лет была созданы лазеры, работающие на сотнях веществ, в различных областях спектра, однако лишь немногие из них стали выпускаться серийно и впоследствии нашли практическое применение в науке и технике, а также в медицине. (Москвин и Буйлин, 2000). Основа теории получения когерентного оптического излучения состоит в следующем: при инверсной заселённости уровней энергии E_2 и E_1 рабочей среды ($E_2 > E_1$) происходит вынужденное излучение, превалирующее над поглощением. В результате этого излучение с резонансной частотой усиливается при прохождении через активную среду. Полученный таким образом свет представляет собой сверхлюминесцентное излучение. Для возникновения сверхлюминесценции в систему генерации вводят положительную обратную связь, помещая рабочую среду в оптический резонатор. Простейшим резонатором могут служить два зеркала, расположенных параллельно. Для вывода части излучения из системы одно из зеркал делают наполовину прозрачным (Григорьев и Мейлихов, 1991). Основными элементами лазера, независимо от его типа

являются: рабочее вещество, источник накачки, создающий инверсную заселённость в рабочем веществе, и оптический резонатор.

Основные свойства лазерного излучения:

Высокая когерентность (лазерное излучение обладает когерентностью, превышающей в 10^{17} раз когерентность световой волны при той же интенсивности, излучаемой самыми моноэнергетическими нелазерными источниками света). Выделяют *пространственную и временную* когерентности. Временная когерентность описывает поведение волны в течение времени, измеряется в одной точке поля в разные моменты времени. Временная когерентность тесно связана с понятием монохроматичности излучения. Параметр, характеризующий когерентность представляет собой время когерентности: $\tau_k \approx 1/\delta\nu$, (здесь $\delta\nu$ – ширина спектральной линии) (Гц). Понятие пространственной когерентности относится к полям, измеряемым в двух различных точках пространства в одинаковый момент времени. При этом длиной когерентности (l_k) называют расстояние, на котором сохраняется пространственная когерентность. Следует отметить, что большинство источников лазерного излучения имеет весьма малую длину пространственной когерентности, то есть уже на незначительном расстоянии от источника излучаемый свет ведёт себя как пространственно некогерентное излучение. Степень пространственной когерентности определяется геометрическими параметрами источника излучения, временной – спектральным составом излучения.

Монохроматичность - если излучение обладает достаточно малой шириной спектра, его считают монохроматичным. Условно излучение считается монохроматичным, если оно обладает шириной спектра 0,3 нм (или меньшей). Наименьшую ширину спектральной линии имеют полупроводниковые лазеры импульсного типа. У непрерывных, одномодовых лазерных установок ширина спектральной линии также составляет менее 0,3 нм.

Поляризация – это свойство электромагнитного излучения, описывающее его поперечную анизотропию, то есть неэквивалентность различных направлений в плоскости, перпендикулярной направлению луча. Иными словами, представляет

собой степень симметрии распределения вектора напряжённости магнитного и электрического полей относительно направления распространения электромагнитной волны. Электромагнитная волна называется поляризованной, если магнитная и электрическая составляющие вектора напряжённости поля совершают колебания с постоянной разностью фаз. Если же колебания происходят хаотично, то такая волна является неполяризованной (в частности, это происходит в результате отражения, преломления или рассеяния при распространении волн в анизотропных средах). Гелий-неоновый лазер (ГНЛ) обладает степенью поляризации близкой к 100%. Полупроводниковые лазеры, как правило, отличаются меньшей степенью поляризации - приблизительно 90 % (Москвин и Буйлин, 2000). Поскольку для подведения лазерного излучения облучаемому объекту часто используют оптоволоконные световоды, то при прохождении через световод параметры излучения могут изменяться в различных пределах.

Направленность – это свойство лазерного излучения, являющееся следствием его когерентности. Данное явление характеризуется одинаковым направлением распространения фотонов в луче. Наиболее высока степень направленности излучения ГНЛ лазера, а полупроводниковые лазеры испускают значительно более расходящееся излучение.

Мощность излучения – это его энергетическая характеристика. Единица измерения мощности в системе СИ – ватт (Вт).

Плотность мощности (ПМ) – отношение мощности падающего излучения к площади облучаемой поверхности, перпендикулярной направлению излучения. В качестве единицы измерения ПМ в системе СИ используется ватт/м² (Вт/м²).

Современные лазеры, в импульсном режиме генерации, позволяют получать излучение с максимальной мощностью до 10^{14} Вт. Принято условно различать высокомошные лазеры (мощностью более 10^3 Вт) и маломощные - позволяющие создавать излучение мощностью менее 10^{-1} Вт. К лазерам средней мощности относят устройства с промежуточными значениями мощности излучения. Данная классификация является удобной лишь в случае применения её в области техники.

Лазеры медицинского назначения стоит рассматривать с точки зрения воздействия, которое они оказывают на облучаемый объект. Поэтому, в лазерной терапии излучение подразделяют на жёсткое – мощностью 30 мВт/см² и более, мягкое – мощностью до 4 мВт/см², и среднее – мощностью свыше 4, но менее 30 мВт/см² (по данным Байбекова и соавт., 1991). В медицинской практике жёсткое НИЛИ применяется в стоматологии для лечения некоторых заболеваний зубов и полости рта (Прохончуков и Жижина, 1996). Мягкое излучение используют в рефлексотерапии, излучение средней жесткости – для воздействия на область проекции различных внутренних органов, либо на патологические очаги, при их поверхностном расположении. Излучаемая мощность терапевтических лазеров импульсного типа обычно составляет не более 0,03 мВт при рекомендуемых режимах воздействия, что на несколько порядков меньше мощности инфракрасных лазеров непрерывного типа, применяемых в терапии, но при этом достигаемый эффект часто выше (Луцкевич и др., 1989; Семионкин и др., 2011). Данный факт представляется весьма важным для исследования процессов взаимодействия лазерного света с биообъектами, поскольку воздействие НИЛИ при весьма малой мощности излучения не может приводить к заметному нагреву облучаемой поверхности. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что достигаемые при облучении эффекты обусловлены более сложными процессами, чем локальное повышение температуры облучаемого объекта.

Выяснение молекулярных механизмов действия НИЛИ на живые системы является одной из самых сложных задач лазерной биофизики. Обнаружение разнообразных эффектов действия лазерного света на различных уровнях (от молекулярного и клеточного до уровня целого организма) дает возможность построения гипотез, описывающих самые разнообразные пути действия НИЛИ. Это приводит, зачастую, к противоречивым результатам. Тем не менее, исследователи стремятся найти общие фундаментальные принципы, лежащие в основе и необходимые для анализа и понимания процессов, происходящих в живых системах под влиянием лазерного света. Важнейшим этапом этой работы стал поиск первичных акцепторов НИЛИ. Поглощение света является одной из

важнейших компонент взаимодействия излучения с облучаемым объектом. Энергия поглощённого объектом излучения при этом может переходить в тепло и рассеиваться, либо инициировать фотохимические реакции. Исследованию первичных механизмов действия НИЛИ на биологические объекты посвящены работы многих отечественных учёных. Ю.А. Владимиров выдвинул три основные гипотезы о механизме действия низкоинтенсивного лазерного излучения (Владимиров и др., 1994). Их суть заключается в следующем:

1. Фотодинамическое действие НИЛИ. Фотоны поглощаются молекулами-фотосенсибилизаторами (например, порфиринами). Поглощение приводит к активации мембранных процессов ПОЛ в клетках, подавляет активный транспорт ионов Ca^{2+} в мембранах митохондрий и эндоплазматического ретикулаума, увеличивает проницаемость мембран для ионов кальция. Образующиеся в результате ПОЛ продукты окисления приводят к праймингу лейкоцитов, что вызывает усиление респираторного взрыва в ответ на действие стимула, например, введение зимозана. Гипотеза о роли увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме при облучении НИЛИ позволила объяснить ряд известных фактов о стимулирующем действии малых доз лазерного света и подавляющем действии на клетки высоких доз НИЛИ, а также зависимость эффектов облучения от изначального физиологического состояния клетки (Владимиров, 1994).

2. Фотореактивация супероксиддисмутазы (СОД). Вызываемая облучением элиминация супероксидного анион-радикала в результате реактивации СОД может быть связана с NO – опосредованной регуляцией микроциркуляции крови в тканях. Мощным источником оксида NO, который выступает в роли предшественника фактора расслабления эндотелия сосудов (ФРС) служит индуцибельная NO – синтаза (Бриль и Бриль, 1997). Увеличение продукции NO клетками, в частности, лейкоцитами происходит одновременно с «кислородным взрывом» фагоцитов, который проявляется в стремительном увеличении концентрации активных форм кислорода (АФК), в первую очередь, супероксидного анион-радикала, который способен взаимодействовать с NO, образуя пероксинитрит ($ONOO^-$). Молекула пероксинитрита является

функциональным антагонистом NO: вызывает адгезию и взаимную агрегацию лейкоцитов, приводит к вазоконстрикции и т.д.). В связи с этим, реактивация СОД и последующая элиминация супероксидного анион-радикала в клетках выступает как фактор, обеспечивающий NO – зависимую стимуляцию микроциркуляции крови в тканях. Фотореактивацией СОД объясняется эффект ускорения заживления ран при облучении НИЛИ (Владимиров, 1994).

3. Процесс фотолиза соединений, содержащих NO. Предположительно, под действием излучения, молекула NO высвобождается из нитрозильного комплекса гемопротеинов, следствием чего является активация гуанилат-циклазы, что приводит к вазодилатации – хорошо известному эффекту НИЛИ (Владимиров, 2004).

В качестве возможных первичных фотоакцепторов лазерного излучения в эукариотических клетках другие исследователи называют промежуточную форму молекулы цитохром-с-оксидазы (Pastoreetal., 1992; Кару и Афансьева, 1995; Кару и др., 1998;). Согласно данной гипотезе, излучение с различной длиной волны поглощается разными хромофорами молекулы цитохром-с-оксидазы при различных редокс-состояниях, в частности, Cu_A (восстановленный) поглощает при $\lambda_{max} = 620$ нм, другие хромофоры в более длинноволновой области спектра: Cu_B (окисленный) поглощает при $\lambda_{max} = 680$ нм, Cu_B (восстановленный) при $\lambda_{max} = 760$ нм, и Cu_A (окисленный) при $\lambda_{max} = 820$ нм. В клетках прокариот (*E.coli*) фотоакцепторами предположительно могут выступать bd и bo цитохромные комплексы. (Афанасьева и др., 1995). Изменения редокс-состояния хромофора Cu_B , который является частью каталитического центра молекулы цитохром-с-оксидазы, вследствие облучения могут приводить к уменьшению количества связанного NO в каталитическом центре. В течение последнего десятилетия активно изучается возможная функция NO как основного медиатора воздействия НИЛИ (Karū et al., 2005). При физиологических условиях молекула NO выступает в качестве модулятора (ингибитора) активности цитохром-с-оксидазы путем взаимодействия с Cu_B хромофором (Brown, 1999; Wilson et al., 1997). При патологических состояниях может происходить увеличение выделяемого оксида

NO клетками макрофагов, что приводит к возрастанию вероятности ингибирования цитохром-с-оксидазы в клетках. При таких условиях возрастание дыхательной активности клеток в результате облучения НИЛИ может служить возможным объяснением положительных результатов применения лазеров в терапии. Молекулы, способные поглощать видимый свет, в частности, некоторые компоненты дыхательной цепи такие как профирины и флавопротеины могут выступать в качестве эндогенных фотосенсибилизаторов (Giese, 1980; Spikes, 1989; Alexiades-Armenakas, 2006). Учеными разработана гипотеза о том, что поглощение квантов света профиринами и флавопротеинами приводит к усиленной генерации синглетного кислорода $^1\text{O}_2$ к клеткам (в этом заключается фотодинамический эффект облучения) (Karu et al., 1981; Vajgar et al., 2014). Эту реакцию можно считать основным путем фотодинамического повреждения при облучении клеток большими дозами лазерного света (Karu, 1989). При этом некоторые исследователи приводят данные о том, что невысокие концентрации $^1\text{O}_2$ вызывают ускорение клеточной пролиферации (Murell, 1990). При дезактивации электронвозбужденного состояния некоторая часть энергии возбуждения переходит в тепловую, следствием чего может являться возникновение очагов локального нагрева абсорбирующих хромофоров. Даже кратковременное нагревание поглощающих биомолекул способно индуцировать изменения конформации, приводящие к инактивации (или активации) ферментных систем в клетках (Стефанов, 1976; Lloyds, 1995). Проведенные исследования с использованием клеток HeLa и E. coli показали, что возникающий под воздействием ультракоротких (фемтосекундных) лазерных импульсов локальный нагрев влияет на реакции биологического клеточного ответа (Клебанов и др., 1991). Кроме концепций, предполагающих наличие специфических акцепторов излучения, исследователями разработан ряд гипотез неспецифического действия НИЛИ. В частности, влияние лазерного света на молекулы биополимеров объясняют мембранотропным действием излучения, приводящим к изменением состояния липидного бислоя, а так же непосредственным действием на белковые глобулы. (Спасов и др., 1998; Козель и

Попов, 2000). При этом, конформационные изменения белковых молекул могут сопровождаться модуляцией метаболических и рецепторных процессов (Мажуль и др., 2000). Возникающие структурно-функциональные перестройки мембранных макромолекул создают физико-химическую основу для формирования неспецифических адаптационных клеточных процессов, что стимулирует биосинтетические и биоэнергетические процессы на уровне организма (Чудновский и др., 2002). Основой для создания физической модели процессов взаимодействия НИЛИ с биологическими объектами, служит предположение, что в качестве общего, неспецифического акцептора излучения выступает гуморальная система организма, при этом биологические жидкости, выполняют функцию матрицы, на которой протекают метаболические процессы (Чудновский и др., 2002). К такому же выводу относительно механизма реализации биологических эффектов электромагнитного излучения пришли и другие авторы (Пономарёв и Фесенко, 2000). Возникающие при действии НИЛИ на биологические растворы и жидкости физические эффекты изменяют потенциальные барьеры биохимических реакций, регулирующих процессы жизнедеятельности клеток, что в итоге приводит к формированию отклика живой системы на излучение (Минц и Скопинов, 1989; Бриль и др., 1998; Чудновский и др., 2002). Несмотря на значительные успехи электромагнитной биологии, на сегодняшний день нельзя отдать предпочтение какой-либо одной из разработанных учеными теорий, потому что ни одна из них не приводит исчерпывающих объяснений всей совокупности обнаруженных эффектов низкоинтенсивных ЭМИ. В связи с этим дальнейший поиск акцепторов электромагнитного излучения, выяснение роли клеточных структур и сигнальных путей в реализации биологического действия ЭМИ является важнейшим направлением современной электромагнитной биологии и медицины.

1.1.4. Клетки иммунной системы как мишень для воздействия ЭМИ

Иммунная система с функциональной точки зрения представляет собой барьер между организмом и окружающей средой, определяющий характер взаимодействия и ответа организма на компоненты окружающей среды. С этой позиции можно рассматривать иммунную систему, как потенциальную мишень для такого фактора окружающей среды, как электромагнитное излучение. Причём объектами воздействия ЭМИ могут быть как эффекторные, так и регуляторные компоненты иммунной системы. Считается, что мишенями резонансного колебания электромагнитного поля являются органеллы и мембранные образования, в них под действием ЭМИ на живую клетку происходят структурно-функциональные изменения. Результатом этого действия является формирование физико-химической основа для изменения связанных с переносом электронов и протонов процессов метаболизма. Далее последовательно происходят неспецифические реакции клетки и целого организма на сформированной основе. Различия на этом (акцепторном) уровне можно отметить лишь в биофизических тонкостях взаимодействия биотканей и электромагнитных. Однако на уровне ответа клетки, ткани или организма на действие ЭМИ наблюдаемые эффекты могут существенно различаться, что определяется функциональным назначением облучаемых клеток. Поскольку иммунная система, с одной стороны, обладает высокой чувствительностью к внешним факторам, а с другой стороны имеет мощный эффекторный потенциал, представляется целесообразным рассматривать её как один из ключевых объектов, определяющих характер взаимодействия низкоинтенсивных ЭМИ и живого организма. Иммунная система состоит из совокупности базофилов лимфоцитов, фагоцитов, макрофагов, тучных и дендритных клеток, а также специализированных эпителиальных клеток, иммунный ответ формируется при участии каждого из перечисленных видов клеток. Лимфоциты выделяются из этих клеток тем, что имеют специфичность к чужеродным субстанциям, обладают иммунологической памятью, а также распознают окружающие объекты по системе «свой/чужой». В реакциях приобретенного иммунитета они играют ведущую роль. Роль остальных типов

иммунных клеток в приобретенном иммунитете заключается в: усилении фагоцитоза и, как следствие, повышении эффективности уничтожения антигенов; передаче сигналов для активации лимфоцитов; секреции воспалительных медиаторов. Иммунный ответ лимфоцитов заключается в продукции цитокинов – особых белковых молекул, которые регулируют иммунный ответ и работают как иммунорегуляторные гормоны. В крови и лимфе постоянно находится значительная часть лимфоцитов, они выполняют надзорные, эффекторные и регуляторные функции, способны мигрировать в ткани и лимфоидные органы. Осуществляемые лимфоцитами функции направлены на поддержание целостности организма и уничтожение чужеродных субстанций. Существует множество групп лимфоцитов, каждая из групп обладает специфическими рецепторами на определенные антигены, этим обеспечена возможность организма отвечать почти на любой антиген.

Лимфоциты различаются между собой по функциональным свойствам и специфичности своих рецепторов. Основных классов лимфоцитов два: предшественники антителообразующих клеток – В-лимфоциты; тимусзависимые лимфоциты – Т-лимфоциты, которые делятся на подклассы. Существуют Т-лимфоциты, опосредующие регуляторные функции: хелперы – их функция «помогать», и супрессоры – их функция «подавлять» развитие иммунного ответа, в частности, антителообразование. Другие Т-лимфоциты осуществляют «киллерную» функцию, то есть запускают воспалительные реакции, выделяя цитокины, или напрямую разрушают несущие на себе антигены клетки. Таким образом Т-супрессоры, Т-хелперы, Т-киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты) и Т-клетки, участвующие в иммунологических процессах, связанных с реакцией замедленной гиперчувствительности, составляют Т-клеточную систему.

Кроме В- и Т-лимфоцитов известны осуществляющие неспецифические цитотоксические реакции лимфоциты. Это натуральные киллеры (НК) или естественные киллерные клетки (ЕКК), которые используя системы распознавания, не похожие на системы Т- и В-лимфоцитов, способны убивать некоторые виды клеток опухоли. Учитывая важность выполняемых функций,

изменение структурно-функционального состояния клеток иммунной системы, вызванное воздействием низкоинтенсивных ЭМИ может приводить к серьезным последствиям на организменном уровне. В связи с этим следует рассмотреть в отдельности вклад отдельных компонентов иммунной системы в общую реакцию организма на внешние воздействия.

Тучные клетки. Дендритные клетки. Первыми компонентами иммунной системы организма на пути электромагнитного излучения различной природы являются тучные клетки, содержащиеся в соединительной ткани кожи, и дендритные клетки лимфоидной и эпителиальной ткани, в том числе выстилающей сосуды. Усиленная тучноклеточная реакция проявляется при облучении опухолей некоторыми видами НИЛИ. Тучные клетки представляют собой высокоспециализированные иммунные клетки соединительной ткани позвоночных животных и занимают одно из центральных мест в аллергической реакции. Роль тучных клеток состоит в активации иммунной реакции там, где локализован патоген. С позиции аллергических реакций базофил – циркулирующий аналог тучной клетки. Принципиально их объединяет следующее: продукция рецепторов, высокоаффинных к константному фрагменту IgE и присутствие в цитоплазме множества гранул с ферментами и гистамином. Феномен дегрануляции тучной клетки или базофила представляет собой активацию сигнального каскада, приводящую к морфологической перестройке клетки и выбросу активных веществ – медиаторов аллергии из цитоплазматических гранул. Активация сигнального каскада и последующая дегрануляция происходят очень быстро – примерно в течение минуты. Внутриклеточная передача сигнала происходит по тому же механизму, что и в лимфоцитах и нейтрофилах, связанному с семейством тирозинкиназ. Возможно применение лазерного излучения для приостановки роста опухоли, так как тучные клетки поглощают из межклеточной среды необходимые для функционирования других клеток полисахариды (гепарин и др.), то есть являются конкурентными. Перспективность этого направления подтверждена экспериментальной практикой (Плетнев, 1996). Так, в отдельных случаях у

животных была отмечена резорбция опухоли при действии низкоинтенсивного лазерного излучения на перевиваемую клеточную суспензию. В конечном итоге у животных исчезала восприимчивость к данному виду опухоли. Дендритные клетки представляют собой овальные, круглые или полигональной формы крупные (15-20 мкм) клетки с ядром, расположенном эксцентрически, на мембране имеются многочисленные разветвлённые отростки (Caetano Reise Sousa, 2006). Дендритные клетки выполняют следующие функции: презентация антигенов Т-клеткам, регуляция активации и супрессии иммунного ответа, контроль дифференцировки Т-лимфоцитов. Дендритные клетки способны, используя пиноцитоз, фагоцитоз и рецептор-опосредованный эндоцитоз, поглощать из окружающей среды антигены – это их важная особенность. В подслизистой желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов, в толще эпителия слизистой оболочки кишечника, то есть в тканях, соприкасающихся с внешней средой, находится наибольшее число дендритных клеток.

В-лимфоциты возникают из плюрипотентных кроветворных стволовых клеток (Osmond, 1980). Формирование В-клеток у млекопитающих начинается на стадии эмбрионального развития в печени, а затем продолжается в костном мозге. (Cooper, 1981; Fritz et al., 2014). В завершение созревания, В-клетки проникают в кровеносные сосуды, покидая костный мозг, расселяются в селезенке, лимфатических узлах и других лимфоидных тканях. По наличию поверхностных иммуноглобулинов выявляют количество В-лимфоцитов среди лимфоидных клеток, циркулирующих с кровью, в периферической крови это число составляет примерно от 5 до 15%. Молекулы иммуноглобулинов действуют как антигенспецифические рецепторы, встроенные в клеточную мембрану, синтезируются они конститутивно. В-клетки периферической крови экспрессируют иммуноглобулины следующих изотипов: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, большинство составляют IgM, IgD, на долю остальных изотипов приходится менее 10%. Однако в слизистой кишечника много В-лимфоцитов, несущих IgA. В-клетки на своей поверхности экспрессируют ряд других молекулярных

маркеров, помимо иммуноглобулиновых рецепторов. Например, большинство В-клеток несет МНС (главный комплекс гистосовместимости) класса II, которые необходимы для взаимодействий с Т-клетками. В процессы активации клеток и «хоминга» вовлечены C3b (CD35,CR1) и C3d (CD21,CR2) – обнаруживаемые на большинстве В-лимфоцитов рецепторы для компонентов комплемента. Антигенсвязывающий рецептор антител участвует в активации В-клеток путем взаимодействия комплекса комплемент + антиген с маркерами CD19/CD21. На В-клетках выявлены Fc-рецепторы для экзогенного IgG (FcγR11, CD32), с помощью этих рецепторов для В-клеток передаются сигналы отрицательной регуляции. Маркер CD40 играет важную роль в контактных взаимодействиях между В- и Т-клетками (Banchereau, Rousset, 1991). В индукции ответа В-лимфоцитов роль CD40 установили, обнаружив комитогенный эффект моноклональных антител к этому маркеру. Далее были проведены опыты с совместным действием, индуцировавшем длительную пролиферацию В-клеток, антител к CD40 и ИЛ-4 на покоящиеся лимфоциты, при пролиферации наблюдалось переключение изотипов иммуноглобулина (Banchereau et al., 1991). CD40-зависимую пролиферацию, помимо ИЛ-4, интенсифицируют ИЛ-10 и ИЛ-13. Стимулирующие сигналы, которые поступают в человеческую клетку через рецептор для антигена (BCR) и CD40, проявляют синергизм. В-клетки начинают усиленно вырабатывать ФНО-α, ФНО-β, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-1β, ГМ-КСФ при действии сигнала, возникающего при перекрестном сшивании мембранного CD40 (van Kooten, Banchereau, 1996). Под действием этого сигнала также усиливается экспрессия защитных факторов (Vcl-2, Vcl-XL), что предотвращает апоптоз В-клеток (Choi et al., 1995). Переключение изотипов иммуноглобулинов в стимулированных В-клетках обеспечивает сшивание CD40 мембранных молекул, при этом цитокинами может быть модифицирован набор изотипов (Kawabe et al., 1994). Более того, дифференцировка В-клеток также обусловлена сигналом, подаваемым через CD40. Созревание плазматических клеток обеспечивается кратковременным сигналом, а созревание В-клеток памяти – более длительным (Arpin et al., 1995). Участие В-лимфоцитов в гуморальном иммунном ответе и реализация основных

определяющих это участие событий обеспечивается сигнализацией через CD40 (van Kooten, Banchereau, 1996). Антитела класса IgM синтезируются В-клетками в основном при развитии первичного иммунного ответа, при этом за 14 суток проявляется иммунная реакция на антиген. Повторное введение этого же антигена вызывает гораздо более быстрый (7 суток) иммунный ответ, в итоге В-клетки в большом количестве производят высокоаффинные антитела IgG.

Т-лимфоциты. Предшественники Т-лимфоцитов, как и В-лимфоцитов, образуются из стволовых кроветворных клеток, затем созревают в тимусе, где происходит селекция Т-лимфоцитов, определяющая специфичность периферических Т-клеток организма. В тимусе клетки, способные к реакции против собственных антигенов, могут элиминироваться. Две главные субпопуляции Т-лимфоцитов: Т-хелперы и Т-супрессоры обладают комплексной антигенной специфичностью, при таком типе специфичности одновременно происходит распознавание аутологичного кодируемого главным комплексом гистосовместимости (ГКГС, МНС) мембранного белка и чужеродного антигена. Если Т-клетки способны одновременно определять чужеродные антигены продукты собственных МНС-генов, то они могут быть положительно отобраны в тимусе. Возможно, при этом на поверхности эпителия тимуса Т-клетки распознают собственные МНС-молекулы. Т-хелперы стимулируют пролиферацию В-клеток и их дифференцировку в антителообразующие клетки (АОК) – в этом состоит одна из их важных регуляторных функций. Известно, что Т-клетки полностью определяют ответ В-клеток на большинство белковых антигенов. Это тимусзависимые антигены, поскольку они не могут индуцировать ответ у животных, которые с рождения не имеют тимуса и у которых не обнаруживаются периферические Т-лимфоциты. Т-клетки не вовлечены в стимуляцию антителообразования для некоторых типов антигенов, например, бактериальных липополисахаридов (ЛПС) и растворимых полисахаридов. Однако, согласно литературным данным, в определенных условиях и в этих случаях Т-клетки влияют на ответ (Goldsby et al., 2002). Функционирование Т-хелперов может осуществляться двумя основными способами. Один из них

требует прямого взаимодействия Тх-клетки и В-лимфоцита. Другой способ заключается в секреции Т-клеточных цитокинов, которые необходимы для активации В-клеток (Parker, 1993). Взаимодействие В- и Т-лимфоцитов является процессом, направленном в две стороны: Т-клетки передают сигнал к делению и дифференцировке В-клеткам только после того, как те презентуют антиген. Хелперная функция Т-лимфоцитов в активации В-лимфоцитов может осуществляться путем образования цитокинов, оказывающих влияние на В-лимфоциты (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6). Помимо прочего, Т-х лимфоциты способны синтезировать ФНО- α и ФНО- β . Активация В-клеток может быть спровоцирована и другими цитокинами (ИЛ-11, ИЛ-13), которые аналогичны ИЛ-4 по характеру действия (Goldsby et al., 2002). Известно, что Т-хелперы делятся на две субпопуляции (Th1 и Th2). Профиль цитокинов, производимых ими, различается, что определяет тип иммунного ответа. Th1-клетки человека, обычно, вовлечены в воспалительные реакции и продуцируют набор цитокинов ИФ- γ , ФНО- β , ИЛ-2. Клетки Th2 синтезируют цитокины ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10 и ИЛ-13 и, таким образом, происходит усиленная продукция антител, особенно IgE. В следствие этого, происходят аллергические реакции из-за гиперпродукции антител. Th1-клетки выделяют цитокины, снижающие активность Th2-клеток, и наоборот. То есть иммунный ответ происходит либо по Th1-, либо по Th2-типу. Th1- и Th2-клетки различаются также по маркерам поверхности. Th2-клетки продуцируют один из рецепторов для ФНО – маркер CD30. Для клеток Th1 свойственно присутствие одной из иммуноглобулин-подобных молекул – LAG-3-антигена (Goldsby et al., 2002). Ещё одна регуляторная функция Т-лимфоцитов – угнетение иммунного ответа, то есть супрессорная активность, характерная для популяции Т-супрессоров. Пути подавления иммунного ответа Т-клетками (CD4+ и CD8+) могут быть различными: экспрессия “супрессивных” цитокинов, прямое цитотоксическое воздействие на антигенпрезентирующие клетки, передача сигнала отрицательной регуляции (при взаимодействии с лигандами CTLA-4). Т-супрессоры подавляют дифференцировку и пролиферацию В-лимфоцитов. Вследствие чего: тормозится

продукция всех классов антител, растет конкуренция антигенов, угнетаются реакции гиперчувствительности замедленного типа, формируются цитотоксические Т-лимфоциты, поддерживается иммунологическая толерантность. Т-супрессоры могут быть специфическими (их действие для определенного антигена специфично) и неспецифическими (при повторных воздействиях или при поступлении повышенных доз антигена накапливаются). Т-супрессоры, проявляющие неспецифическую активность, при паразитарных инфекциях, при росте опухоли, при развитии реакции отторжения трансплантата, при аутоиммунном заболевании накапливаются при повторном действии чужеродных антигенов или митогенов. В результате происходит замедление пролиферации клеток, различных иммунных реакций, накопления эффекторных лимфоцитов (Romangani, 1994; Ройт и др. 2000). Эффекторные функции в иммунном ответе выполняют цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). Одной из их наиболее важных функций является лизис клеток, на поверхности которых есть антигены, к которым они специфичны. В частности, такими антигенами являются антигены гистосовместимости, опухолевые и вирусоспецифические антигены (Henkart, 1985; Wiersinga, 2014). ЦТЛ, в большинстве своем распознают антиген в комплексе с молекулами МНС класса I, так как несут маркер CD8+. При этом часть ЦТЛ распознают презентируемый в комплексе с молекулами МНС класса II антиген, они относятся к CD4+ субпопуляции, а их количество составляет около 10% (Ройт и др., 2000). Существует ряд механизмов поражения мишени цитотоксическими Т-лимфоцитами (Berke, 1994), в частности, непосредственная передача сигнала, когда через поверхностные структуры происходит клеточный контакт, или непрямая сигнализация через ФНО. Также обнаружены белковые гранулы в цитоплазме ЦТЛ CD8+, которые вызывают повреждение цитоплазматической мембраны клетки-мишени, высвобождаясь вблизи ее поверхности (Griffiths, 1997). Тип ЦТЛ определяет, какое сочетание этих трех механизмов будет применено в данных условиях. Высвобождение таких цитотоксических пептидов, как сериновая эстераза, перфорин, гранзимы, из гранул субпопуляции ЦТЛ CD8+ обеспечивает их цитотоксическое действие (Shi

et al., 1992; Froelich et al., 1998). Во время дегрануляции цитотоксических Т-лимфоцитов непосредственно у цитоплазматической мембраны клетки-мишени высвобождаются перфорин и гранзимы (ферменты). В присутствии Ca^{2+} происходит ферментативная полимеризация перфорина с образованием полиперфориновых каналов в мембране мишени. Через эти каналы внутрь клетки проникают выделяемые токсические вещества, в частности, гидролитические ферменты, которые выделяются цитолитической клеткой и повреждают клетку-мишень (Shresta et al., 1998). Гранзимы А и В запускают апоптоз клеток и фрагментацию ДНК посредством внутриклеточных сигналов (Heusel et al., 1994; Shresta et al., 1995). Механизм цитотоксического действия $CD4^+$ клеток отличается от механизма субпопуляции ЦТЛ $CD8^+$, так как не содержат перфорин и их действие на клетки-мишени не обусловлено присутствием Ca^{2+} . Опыты на цитотоксических Т-клетках “нокаутных” мышей это подтверждают (Lowin et al., 1994; Kagi et al., 1994; Walsh et al., 1994). Направленная сайт-специфическая мутация у этих мышей привела к подавлению экспрессии гена перфорина. Заметное повышение экспрессии лигандов Fas (FasL) происходит в при активации ЦТЛ. Рецепторные молекулы Fas связываются с FasL, в результате эти рецепторы агрегируют на поверхности клетки-мишени. Далее внутриклеточные белки MORT-1 ассоциируют, что вызывает апоптоз инфицированной вирусом или опухолевой клетки (Kagi et al., 1994). В период созревания лимфоцитов Fas зависит и играет определяющую роль в выживании и устранении их определенных субпопуляций. Молекулы Fas и ФНО-рецепторы имеют схожее строение, что доказывает возможность участия ФНО- α и ФНО- β в поражении мишеней. Цитоплазматические “смертоносные” домены, то есть структуры контроля выживания клеток, присутствуют у тех и у других. В гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов иногда присутствуют ФНО- β (лимфотоксин) и ФНО- α . Однако цитотоксичность не обеспечивается самими цитокинами: время действия ФНО гораздо большее, чем отдельной цитотоксической клетки (3-4 ч) (Ройт и др., 2000).

Естественные киллерные клетки (ЕКК). Резидентная популяция лимфоцитов, присутствующих в тканях организма млекопитающих, включает в себя ЕКК. Соотношение содержания ЕКК от общей популяции лимфоцитов в селезенке, лимфоузлах и легких составляет 10 %, 2-7 % и 30 % соответственно (Whiteside et al., 1990). Помимо этого, в кишечнике, коже и плаценте также обнаружены ЕКК (Taglibue et al., 1982; Daien et al., 2014). Но самым большим содержанием ЕКК отличается печень здорового человека – до 50 % (Hata et al., 1991; Garcia-Barcina, 1995). В различных тканях и органах цитотоксичность ЕКК неодинакова. В порядке убывания цитотоксической активности ЕКК органы и ткани, содержащие их, можно расположить следующим образом: печень и периферическая кровь – наибольшая активность; клетки селезенки, лимфоузлов, миндалин – средняя активность; тимус и костный мозг – наименьшая активность (Levitt et al., 1991; Rajaram et al., 1990). Свойства зрелых Т-клеток и В-клеток не присущи ЕКК, хотя их и относят к лимфоцитам. Предшественники, из которых развиваются ЕКК, находятся в костном мозге, что показали эксперименты по трансплантации (Raulet, 1999). Известно, что существуют две популяции ЕКК, различающиеся фенотипически. Большинство составляет субпопуляция ЕКК, у которых мало выражена экспрессия маркера CD56, но которые отличаются высоким содержанием Fc γ рецептора III (Fc γ RIII, CD16) на клеточной поверхности – CD56+NK, остальные (около 10%) - это клетки с высоким CD56 и низким содержанием CD16 – CD56-NK. Популяция CD56+NK клеток проявляет более высокую цитотоксическую активность, чем популяция естественных киллерных клеток, отличающихся низкой экспрессией CD16 (Lanier et al., 1986; Carville et al., 2013). Соотношение экспрессии рецепторов активации (CD16, NKR-P1, CD28) или ингибирования (ILT, KIR, CD49-NKG2), в основном, определяет цитотоксическую активность ЕКК. Также сильно влияет наличие различных костимулирующих и адгезивных молекул клеточной поверхности лимфоцитов (CD2, CD49e, 2B4, CD44, L-селектин) (Leibson, 1997; Lanier, 1998, 2001; Moretta et al., 2001). NKp44, NKp46 и NKp30 – рецепторы, через которые опосредована цитотоксичность ЕКК. На активированных ЕКК экспрессируется NKp44, в то

время как на активированных, так и на покоящихся клетках обнаружены NKp46 и NKp30. Лиганды клеток-мишеней (CD54 и CD58) взаимодействуют с указанными рецепторами, вследствие чего ЕКК активируются и происходит лизис мишеней, сопровождающийся гиперпродукцией ИФ- γ и ФНО- β . Однако функция цитотоксичности регулируется посредством рецепторов подавления цитотоксичности KIR (от англ. *killer inhibitory receptor*), которые также экспрессируются на поверхности ЕКК. Поэтому отсутствие взаимодействия KIR-МНС 1 является условием активации ЕКК посредством NKp46, NKp44 и NKp30. Аутологичные ЕКК могут не атакуя собственные нормальные клетки уничтожать аномальные клетки, так как каждая киллерная клетка обладает как минимум одним специфичный к собственным антигенам МНС рецептором подавления цитотоксичности (KIR). Известно, что рецептор лектинового типа С CD49-NKG2A экспрессируется субпопуляцией CD56-NK, для прекращения цитолиза этот рецептор выступает как KIRs. Однако молекулы KIRs и CD16 на клеточной поверхности CD56-NK присутствуют в низкой концентрации (Voss et al., 1998; Andre et al., 2000). Из цитоплазмы ЕКК на стадии лизиса происходит секреция сериновых эстераз, перфоринов и протеогликанов из азурофильных цитолитических гранул, в результате образуются цилиндрические трансмембранные поры и происходит цитолиз (Jin et al., 1989; Defino&Adanrio, 1991; Pirozhkov et al., 1995). Кроме этого, в процессе лизиса клеток-мишеней важную роль играет ФНО- β (Leskovar et al., 1993). Цитотоксическая активность естественных киллеров очень высока, потому они способны разрушать несколько клеток-мишеней. Присутствие Ca^{2+} и Mg^{2+} в среде является необходимым условием лизиса клеток-мишеней и образования пор выделяемыми при активации ЕКК перфорины (Brooks et al., 1982; Shresta et al., 1998; Martinez et al., 2013). ЕКК выделяют хемокины и цитокины, важные для защиты организма и регуляции иммунного ответа, а также ИФН- γ и рецепторы для множества монокинов, что отличает их от Т-лимфоцитов (Carson et al., 1994; Aste-Amezaga et al., 1994; Fehniger et al., 1999). CD56-NK клетки продуцируют малые количества ИЛ-10, ИЛ-13, ФНО- β (лимфотоксин), ГМ-КСФ и ИФН- γ после стимуляции

рекомбинантными монокинами *in vitro*, основным источником иммунорегуляторных цитокинов является субпопуляция CD56+NK (Cooper et al., 2001). Сравнение субпопуляций CD56+NK и CD56-NK показало, первые продуцировали значительно больше ИФН- γ и ФНО- β по сравнению со вторыми при совместном культивировании естественных киллерных клеток с ЛПС-активированными макрофагами, выделяющими ИЛ-12 и ИЛ-15. Схожие эффекты были обнаружены при активации ЕКК неспецифическими активаторами лимфоцитов – форболовым эфиром и иономицином (Cooper et al., 2001). По мнению авторов, наличие макрофагов и других антигенпрезентирующих клеток определяет функциональная активность CD56+NK клеток в неспецифическом иммунитете. Интересен факт, что для продукции каждого цитокина CD56+NK клетками, по-видимому, необходимы монокины в разных комбинациях (Cooper et al., 2001). Например, к экспрессии ГМ-КСФ приводит комбинация ИЛ-15+ИЛ-18, ИЛ-12+ИЛ-18 – комбинация, оптимальная для экспрессии ИФН- γ популяцией ЕКК, а продукцию ИЛ-10 определяет комбинация ИЛ-12+ИЛ-15. Для регулирования продукции цитокинов естественными киллерами важна качественная и количественная характеристика экспрессии монокинов под внешним воздействием. Естественные киллеры – это популяция клеток с функциями «иммунологического надзора», они на ранних стадиях распознают и уничтожают потенциально опасные клетки: зараженные внутриклеточными паразитами, вирусами и генетически изменённые. В медицине ЕКК могут быть применены при лечении внутриклеточных инфекций и онкологических заболеваний, при исследовании иммунной системы организма. Также индекс цитотоксичности естественных киллерных клеток может служить объективным показателем реакции организма на стресс, обусловленный неблагоприятными внешними условиями или заболеванием.

1.1.5. Молекулярные регуляторы и медиаторы иммунного ответа

Взаимодействие макрофагов и лимфоцитов приводит к иммунной реакции, в результате такого взаимодействия выделяются цитокины и другие низкомолекулярные агенты. Существуют следующие группы цитокинов: хемокины, интерлейкины, интерфероны, колониестимулирующие факторы (КСФ) и факторы некроза опухолей. Некоторые из малых молекул, среди которых высокой реакционной способностью выделяется оксид азота (NO), так же как и цитокины значительно влияют на функциональную активность клеток и являются веществами-регуляторами (Коган, 1999; Lodish et al., 2000). При опухолеобразовании, стрессе, повреждении, воспалении значительно расширяется качественный и количественный состав имеющих дистантную и местную активность цитокинов в сравнении с организмом в нормальном физиологическом состоянии (Богдашин и др., 1991; Суслов, 1990). Судя по экспрессии генов ряда цитокинов, они почти не должны выделяться в иммунной системе в состоянии покоя (Ярилин, 1997). Спонтанно вырабатываются только некоторые из цитокинов, такие как интерлейкины ИЛ-15 и ИЛ-12 (Doherty et al., 1996). Однако цитокины и другие регуляторные молекулы могут активно вырабатываться в ответ на внешние стрессирующие воздействия на организм. К таким факторам относится, в том числе, электромагнитное излучение. Например, имеются данные о том, что под влиянием низкоинтенсивного электромагнитного излучения происходит усиление продукции NO в организме (Adey, 1997; Yoshikawa et al., 2000). Это способно привести к значительным изменениям в процессах внутриклеточной сигнализации и многих биохимических реакциях организма, подвергнутого действию ЭМИ. Понятие об иммуноцитокиновом статусе появилось после разработки доступных методов оценки цитокинов, также был определен круг иммунопатологий, сопровождаемых значительными нарушениями рецепции и продукции цитокинов. Взаимодействие клеток злокачественных опухолей с иммунокомпетентными клетками опосредуется через цитокины (Щепеткин и др., 1994). Ряд форм миелоидных и лимфоидных лейкозов поддерживаются цитокинами, пара- и аутокринно действующими. Крайне

значимы цитокины в патогенезе онкологических болезней лимфоидной ткани и злокачественных заболеваниях крови, когда клетки, являющиеся продуцентами или мишенями цитокинов, подвержены опухолям. Помимо цитокинов в регуляции работы иммунной системы принимают более сложные молекулы, в частности белки теплового шока (БТШ), продуцируемые клетками под действием стрессовых стимулов, и, помимо шаперонных функций, выполняют некоторую роль в функционировании стероидных и ядерных рецепторов, в презентации антигена, в апоптозе и межклеточном транспорте (Kumaraguru et al., 2002; Srivastava, 2002). В последнее время значительное количество ученых занимаются вопросами протекторных свойств белков теплового шока с целью создания стратегий их медицинского применения. Медиаторы и регуляторы иммунного ответа могут являться как самостоятельными мишенями для низкоинтенсивных ЭМИ, так и являться продуктом активации клеток, подвергнутых облучению. Таким образом, важно понимание их роли в процессах взаимодействия клеток иммунной системы и возможных последствий воздействия ЭМИ на уровень продукции и этих молекул.

Интерлейкин-2. Интерлейкины являются одной из самых многочисленных групп цитокинов, различающихся по функциональной активности, клеткам-продуцентам, молекулярным характеристикам. Процессы клеточной дифференцировки, межклеточных взаимодействий и клеточной активации проходят при участии интерлейкинов, их секреция не является конститутивной, но строго регулируема (Mizel, 1989; O'Garra, 1989; Magyari et al., 2014). Не только иммунокомпетентные, но и иные клетки способны продуцировать ИЛ. Главнейший медиатор клеточного иммунитета – ИЛ-2, участвующий в осуществлении противоопухолевой резистентности и иммунной защиты (Ярилин, 1997). Синтезируют интерлейкин-2, изначально известный как фактор роста Т-клеток (ФРТК) в основном антиген-стимулированные Th1 лимфоциты (Morgan et al., 1976; Hammerich et al., 2014). Экспрессию ИЛ-2 можно спровоцировать антителами к поверхностным молекулам лимфоцитов или стимуляцией клеток фитогемагглютинином (ФГА), митогенными лектинами и конканавалином А (Кон

А) (Samelson et al., 1983). Первичную структуру человеческого интерлейкина-2 составляют 133 аминокислотных остатка, между цистеиновыми остатками в положениях 58 и 105 существует внутримолекулярная дисульфидная связь, которая определяет биологическую активность ИЛ-2. С помощью электрофореза определено, что молекулярная масса данного цитокина – 15-17 кДа (Robb, 1984; Smith, 1988). ИЛ-2, связываясь с поверхностными рецепторами Т-клеток, поддерживает их пролиферацию, как и другие факторы роста (Robb, 1984; Hashizume et al., 2010). Помимо того, ИЛ-2 провоцирует рост цитотоксической активности моноцитов и Т-лимфоцитов, а также индуцирует продукцию фактора роста В-клеток (ИЛ-4 или BCGF-1) и интерферона- γ (Ferencik, 1993). Дифференцировка, пролиферация, рост активности ЕКК также обусловлены этим цитокином (Henney et al., 1981; Tarrío et al., 2014). Прямого цитостатического или цитотоксического действия почти на все опухолевые клетки ИЛ-2 не оказывает (Ferencik, 1993), его противоопухолевый эффект объясняется стимулированием цитотоксической активности лимфокинактивированных киллеров (LAK) и индуцированием лимфоцитов опухолевого инфильтрата (TIL) (Rosenberg et al., 1986; Rosenberg et al., 2014). Через LAK опосредована гибель широкого спектра трансформированных, неопластических и некоторых нормальных тканей (Grimm et al., 1982). Интерлейкин-2 стимулирует для каждого типа клеток активность, направленную на выполнение их главных защитных функций: в НК – противоопухолевую активность; в Т-клетках – собственную продукцию и цитотоксические свойства, в моноцитах – фагоцитоза, продукцию цитокинов, бактерицидность; в В-клетках – синтез антител (Kintzel & Calis, 1991). В человеческом организме ИЛ-2 оказывает праймирующий эффект на нейтрофилы (Ferrante, 1992), провоцирует продукцию NO (Hibbs et al., 1992), предотвращает апоптоз активированных клеток (Ярилин, 1997). На примере ИЛ-2 видна связь между иммунными и нервными реакциями, данный цитокин: активирует NO-синтазу, посредством стимуляции холинэргических нейронов; повышает активность нейронов, вызывает дифференцировку и пролиферацию дифференцировку олигодендроцитов; активирует липо- и циклоксигеназный

механизмы, сопровождаемые продукцией лейкотриенов и простагландина E2 (McCann et al., 1998). Ключевыми цитокинами в реакции гиперчувствительности замедленного типа являются ИЛ-3 и ИЛ-2, простагландин E2 в регуляции их экспрессии имеет следующее значение: в его присутствии растет интенсивность продукции мышиными Т-клетками ИЛ-3, интенсивность продукции ИЛ-2 при этом не меняется (Marcinkiewicz et al., 1992). Интерлейкины-2 функционируют главным образом при межклеточном взаимодействии по ауто- и паракринному механизмам. ИЛ-2 являются медиаторами короткодистантного действия, продуцируются индуцибельно, в лимфоцитах в состоянии покоя ген ИЛ-2 не экспрессируется (Симбирцев, 1998). В Т-клетках транскрипционный фактор NF-AT регулирует экспрессию гена и, как следствие, синтез ИЛ-2. Этот цитокин контролирует ряд реакций иммунной системы, которые имеют клинический эффект. Это реакции на опухолевые и трансплантированные ткани; при аутоиммунных заболеваниях – реакции на нормальные клетки; реакции на инфекционные организмы. У пациентов с ВИЧ-инфекцией, с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID), системной волчанкой, инсулинозависимым сахарным диабетом наблюдаются низкие уровни продукции ИЛ-2. После трансплантации костного мозга могут наблюдаться аномалии в функционировании иммунной системы, причиной этому возможно служит сниженная продукция ИЛ-2. Также известно о подобных нарушениях экспрессии людей, страдающих Т-клеточно лейкемией, множественным склерозом, гипогаммаглобулинемией, ВИЧ-инфекцией (Malkovsky et al., 1988).

Интерлейкин-3 имеет большое количество альтернативных названий: гемопоэтический ростовой фактор, фактор роста тучных клеток, мульти-колониестимулирующий фактор, WEHI-3-ростовой фактор, панспецифичный гемопоэтин (Burgess et al., 1980; Schrader, 1986; Kritas et al., 2014), такое количество различных наименований свидетельствует о множестве биологических активностей интерлейкина-3. На данный момент подтверждено, что один и тот же ген отвечает за продукцию всех вышеперечисленных факторов (Schrader, 1986). Продуцируется ИЛ-3, главным образом, антиген- и

митогенактивированными Т-клетками (Crapper & Schrader, 1983; Stoeckle et al., 2013), а также кератиноцитами, натуральными киллерами, тучными клетками, эндотелиальными клетками и моноцитами. Конститутивно ИЛ-3 продуцируется некоторыми линиями иммунокомпетентных клеток (Th, которые экспрессируют антигены Thy-1 и Lyl-1) (Hapel et al., 1981). Ингибирование продукции ИЛ-3 вызывают те же вещества (циклоспорин А, глюкокортикоиды), что подавляют активацию Т-лимфоцитов. Данные экспериментов *in vitro* показали, что продукция интерлейкинов-2 и интерлейкинов-3, а также пролиферация лимфоцитов существенно растет в присутствии полисахаридов PAP-I (*Phytolacca acinosa*) (Wang & Zheng, 1997). В 1982 г. для интерлейкина-3 с молекулярной массой 21-36 кДа было определено, что его первичная структура включает в себя 152 аминокислотных остатка. Также выяснено существование в положениях 84 и 16 дисульфидной внутримолекулярной связи между остатками цистеина и наличие в положениях 70 и 15 гликозилированных сайтов (Ihle et al., 1982). Известен факт, что в ИЛ-3-зависимых клеточных линиях при связывании интерлейкина-3 со своим рецептором происходит фосфорилирование нескольких цитоплазматических белков (p38, p56, p70), помимо самого рецептора, а также активация протеинкиназы С (Mui et al., 1992). С помощью тирозинкиназ для ИЛ-3 передается сигнал с рецепторов (Ярилин, 1997). Анализ данных о рекомбинантном интерлейкине человека, крысы и мыши подтвердил, что ИЛ-3 для многих клеточных линий является гемopoэтическим регулятором (Morris et al., 1990). Митогенный сигнал от этого интерлейкина в первую очередь поступает к мегакариоцитам, плюрипотентным стволовым клеткам, эритроцитам, эозинофилам, нейтрофилам, базофилам, макрофагам и мастоцитам, которые и являются клетками-мишенями для цитокина (Ferencik, 1993; Aglietta et al., 1993). Интерлейкин-3 осуществляет взаимосвязь гемopoэтической и иммунной систем, поддерживая развитие и пролиферацию гематопоэтических клеток-предшественников практически всех видов (Whetton & Dexter, 1988; Luo et al., 2012). Как и другие гематопоэтические цитокины, ИЛ-3 на уровне фактора транскрипции (NF-κB) задействован в трансдукции сигналов, стимулирующих

выживание клеток и синтез ДНК. Жизнеобеспечение, развитие и функционирование гематopoэтических клеток невозможно без присутствия ИЛ-3, указанные клетки вносят вклад в ход аллергических реакций, а также в антипаразитическом как клетки-эффекторы (Mach et al., 1998; Lantz et al., 1998). Определено, что интерлейкин-3 стимулирует дифференцировку и рост тучных клеток, базофилов, клеток немедленной аллергии, эозинофилов, помимо того в макрофагах вызывает фагоцитоз, а в тучных клетках – рост экспрессии гистамина (Медуницын и др., 1980; Медуницын, 1999). ИЛ-3 в макрофагах и моноцитах вызывает экспрессию генов ГКГС II (главный комплекс гистосовместимости класса II), которая обычно индуцируется ИФ- γ , в то время как при действии на тучные клетки указанный цитокин не дает этим молекулам экспрессироваться (Lindemann & Mertelsmann, 1993). Известно, что генерация цитотоксических Т-клеток может увеличиваться при действии ИЛ-3 *in vitro*, который таким образом оказывает влияние на Т-клеточные ответы (Curtsinger & Fan, 1984). Таким же образом ИЛ-3 может влиять и на супрессорные Т-клетки (Abbud-Filho et al., 1984; Auclair et al., 2014). В культурах *in vitro* натуральная цитотоксическая активность усиливается интерлейкином-3 (Palacios et al., 1984). Действие ИЛ-3 поддерживает рост клеток, обладающих НК-активностью (Palacios & Garland, 1984; Omori-Miyake et al., 2014). Синтез других ИЛ активируется интерлейкином-3, таким образом, очевидно, что регуляция секреции цитокинов – иерархическая (Myint et al., 1999). Секреция интерлейкинов 1 и 6, а также ФНО в макрофагах, стимулированных липополисахаридами, зависит от наличия ИЛ-3 (Cohen et al., 1991). Пролиферативный потенциал гемопоэтических клеток-предшественниц усиливается как ФНО, так и ИЛ-3, которые при этом проявляют аддитивность (Caux et al., 1996). Также известно, что разные типы аллергических сыпей сопровождаются активацией экспрессии ФНО и ИЛ-3 (Hermes et al., 1999). ИЛ-3 увеличивает синтез ФНО, потенцируя цитотоксическую активность макрофагов, а при активации экспрессии интерлейкина-8 демонстрирует синергизм с ФНО- α (Фрейдлин и Шейкин, 2001). При пролиферации лимфоцитов CD34 кофактором служит интерлейкин-3 (Lemoli et al., 1993). В клетках кожи ИЛ-3 синтезируется в

количестве наногаммов, стимулируя рост кератиноцитов и гемопоэтических колоний (Hancock et al., 1988; Luger & Schwarz, 1991). Эозинофила и моноциты праймируются интерлейкином-3 в человеческом организме (Yuo et al., 1992; van der Bruggen et al., 1993). У человека в комплексе с иными цитокинами интерлейкин-3 проявляет себя как фактор роста и дифференцировки как злокачественных, так и нормальных В-клеток (Tadmori et al., 1989). При воздействии ИЛ-3 на макрофаги и моноциты биологический эффект следующий: продукция свободных радикалов, активация фагоцитоза, индуцирование генов фактора некроза опухоли α , интерлейкинов 1 и 8, экспрессия генов ГКГС (Frendl et al., 1990; Takahashi et al., 1993; Lindemann et al., 1993). Было проведено множество исследований, но роль ИЛ-3 не выяснена до конца, например, неизвестными остаются механизмы регуляции пролиферации и дифференцировки клеток. Помимо того, видимо интерлейкин-3 для нормального гематопоэтического развития не является незаменимым фактором. В подтверждение этому, нормальную модель гемопоэза показывают безтимусные мыши, у которых на экспрессию ИЛ-3 нет Т-клеточной реакции (Nishinakamura et al., 1996). Есть предположение, что цитокиновая система обладает свойством полифункциональности, которая обеспечивает взаимозаменяемость цитокинов и избыточность их функции. Интерлейкин-3 – медиатор затрагивающих центральную нервную систему физиологических и патофизиологических процессов. Активация и пролиферация микроглиальных клеток происходит под действием ИЛ-3, который также способен интенсифицировать дифференцировку сенсорных и холинэргических нейронов (Sugita et al., 1999). Известно, что первичная демиелинизация у трансгенных мышей и сопутствующее двигательное заболевание провоцируется сниженной продукцией интерлейкина-3 клетками микроглии в ЦНС (Chiang et al., 1996). Также при нечувствительности к ИЛ-3 у трансгенных мышей, прогрессирует неврологическая дисфункция (Sugita et al., 1999). В клетках-мишенях для ИЛ-3 сверхэкспрессия этого фактора, возможно, выполняет главную роль в онкогенезе. Интерлейкин-3 конститутивно продуцируется клетками лейкемии WEHI-3В, следовательно он выполняет

важную функцию в их генезе (Schrader & Crapper, 1983). При опухолях цитокины часто являются паракринно и аутокринно выделяемыми ростовыми факторами, особенно заметна функция аутокринных факторов для метастазирующих злокачественных новообразований. В крови у пациентов с множественной миеломой формирование из клеток предшественников злокачественных плазмобластов индуцируется ИЛ-3 и ИЛ-6 (Bergui et al., 1989).

Интерлейкин 6 (ИЛ-6) изначально описали как фактор 2, стимулирующий В-клетки, по-другому – фактор дифференцировки В-клеток. Является гликопротеином, продуцируется фибробластами, мононуклеарными фагоцитами, лимфоцитами, эндотелиальными клетками, гепатоцитами, мезенгиальными и другими клетками, молекулярная масса ИЛ-6 составляет 20-30 кДа (Kishimoto, 1989; Takas et al., 2014). ИЛ-6 относят к завершающим ход воспалительной реакции цитокинам, поскольку хоть и оказывает мощное противовоспалительное действие, но синтезируется несколько позже ИЛ-1 и ФНО, ингибируя их выработку. Помимо ИЛ-1 и ФНО- α индукторами образования ИЛ-6 являются колониестимулирующие факторы, интерфероны, митогены, бактериальные продукты. Влияние интерлейкина-6 на регуляцию иммунного ответа заключается в: усилении антителообразования; стимуляции дифференцировки и пролиферации В-клеток; воздействии на экспрессию мегакариоцитов и мультипотентных колониобразующих факторов; стимулировании синтеза белков плазмы гепатоцитами; подавлении апоптоза нейтрофилов, высоко цитотоксически активных к опухолевым клеткам (Dardenne & Savino, 1996; Arzt & Stalla, 1996; Sanchez-Garcia et al., 2006). Рецептор ИЛ-6 составляют две полипептидные цепи: gp80 (α -цепь) и gp130, роль рецептора в механизме функционирования этого интерлейкина крайне важна. При передаче сигнала ИЛ-6 в клетку последовательность взаимодействия такова: присоединение интерлейкина-6 к α -цепи его рецептора, связывание полученного комплекса с gp130, ковалентная гомодимеризация gp130 с последующим внутрицитоплазматическим фосфорилированием различных субстратов. На примере множественной миеломы продемонстрировано, что под влиянием интерлейкина-6 активация gp130

тормозит апоптоз опухолевых клеток, стимулируя их пролиферацию (Тупицын, 2001). Также известно, что ИЛ-6 способствует росту экспериментальных злокачественных новообразований: рака почки, шейки матки, толстой кишки, предстательной и молочной желез. Имеются свидетельства, что при большинстве опухолей обнаруживается повышенная экспрессия ИЛ-6, при неблагоприятном клиническом развитии болезни (Кадагидзе, 2003). Таким образом, для онкологической практики большое значение имеет регуляция содержания ИЛ-6.

Фактор некроза опухолей (ФНО, TNF) является ключевым фактором среди всех цитокинов в регуляции многих патологических и физиологических внутриклеточных процессов. ФНО принимает участие в процессах пролиферации, воспаления, окислительного метаболизма (Vassalli, 1992; Aggarwal et al., 1996), а также вызывает некроз и апоптоз, в зависимости от типа клеток (Laster et al., 1988; Schulze-Osthoff et al., 1992). Этот цитокин – мощный регулятор иммунного ответа и воспалительной реакции, обладает способностью разрушать раковые клетки. Известно, что ФНО- α проявляет противоопухолевую активность *in vivo* и *in vitro*, впервые его выделили из сыворотки экспериментальных животных, которым вводили эндотоксин, а затем отмечали уменьшение опухолей (Carswell et al., 1975). ФНО путем активации эндонуклеазы нарушает функции митохондрий, поэтому для его противоопухолевой активности не характерна селективная токсичность и видовая специфичность в отношении клеток опухолей. Цитостатический эффект фактора некроза опухоли α на раковые клетки реализуется активацией других цитокинов или непосредственно. Таким образом, двойная роль ФНО заключается в стимулировании роста через индуцированную им продукцию факторов роста и в токсическом действии на раковые клетки. Все типы макрофагов продуцируют ФНО- α в ответ на разные сигналы, такие как: вирусы, липополисахариды, лизаты микроорганизмов, индуцированные ЛПС в сочетании с ИФ- γ моноциты крови. Макрофаги – главные источники ФНО- α в организме, поскольку другими клетками этот цитокин синтезируется в значительно меньших количествах. ФНО- α при хронических нарушениях вызывает истощение организма, он известен как кахектин. Активированные Т-

лимфоциты секретируют ФНО- α , называемый лимфотоксином. Изначально фактор некроза опухоли- α экспрессируется как прогормон, состоящий из 235 аминокислот, затем из них в результате процессинга остаются для человека 157 аминокислотных остатка, для мыши – 156. Между мышинными и человеческими белками гомология составляет 79%. ФНО- α синтезируются как мономеры с молекулярной массой около 17 кДа, которые затем спонтанно агрегируют в мультимерные белки – димеры, тримеры и т.д. Через специфические рецепторы на клеточной поверхности действует тример, являющийся активной формой. И лимфотоксин, и кахектин, обладают цитотоксическим и цитостатическим действием на разные клетки опухолей, проявляя плеiotропную активность, влияния на клетки в нормальном состоянии эти молекулы-иммуномодуляторы не оказывают (Ferencik, 1993). Помимо ИФ- γ , и другие цитокины, например, интерлейкины 1 и 2, гранулоцитмакрофаг/макрофаг-колониестимулирующие факторы (ГМ-КСФ и М-КСФ) стимулируют продукцию ФНО (Aggarwal et al., 1996). Также синтез ФНО активируется ионизирующей радиацией и другими стрессующими воздействиями, в том числе, физиологическими (лихорадка, шок) (Hallahan et al., 1994). Некоторые цитокины (ИЛ-10, ИЛ-6, Г-КСФ, ИФ- γ), ингибиторы синтеза простагландинов, стероиды, иммуносупрессивные агенты способствуют угнетению экспрессии ФНО (Aggarwal et al., 1996). Стимулирование ФНО- α -рецепторов в различных клетках приводит к интенсивному росту уровня АФК внутри клетки (Зенков и др., 2001). Фактор некроза опухоли α праймирует моноциты (Kitagawa et al., 1996) и нейтрофилы человека (Utsumi et al., 1992; Vajaj et al., 1992), индуцирует NO-синтазу (Bose et al., 1995; Titheradge, 1999). Помимо того, прослеживается корреляция между чувствительностью/резистентностью клеток к ФНО и сниженным/повышенным уровнем СОД в них. В фибропластах ингибиторы протеинкиназы С вызывают рост апоптоза этих клеток, индуцированного ФНО, при этом не изменяются сродство и количество рецепторов к ФНО- α , но конститутивно высокая для этих клеток экспрессия Zn-СОД снижается (Kobayashi et al., 1997). Биологический эффект действия фактора некроза опухоли на моноциты и макрофаги проявляется

в усилении: прокоагулянтной активности, продукции простагландина E₂, Г- и ГМ-КСФ, ИЛ-1, ИЛ-3 и ИЛ-6 (Riedy et al., 1992; Vassalli, 1992; Wanidworanun et al., 1993). В некоторых работах описаны антиапоптозные эффекты фактора некроза опухоли α (Colotta et al., 1992; Murray et al., 1997), а также его роль в активации функций полиморфно-ядерных лейкоцитов (Yuo et al., 1989; Keerthy et al., 2014). Существует мнение активация NF- κ B (постоянна экспрессия короткоживущих ингибиторов апоптоза) обеспечивает антиапоптозный эффект описываемого цитокина (Ward et al., 1999). Апоптогенную же активность ФНО- α объясняется активацией каскада каспаз (апоптозных протеаз) (Yamashita et al., 1999; Tudan et al., 2000). В нормальных состояниях ФНО- α отводится важная физиологическая роль в иммунорегуляции, но иногда при патологических состояниях инфекционной и неинфекционной природы он оказывает патологическое воздействие, участвуя в микрососудистой гиперкоагуляции, прогрессировании воспаления, гемодинамических нарушениях и метаболическом истощении (Zhang et al., 1998). Есть сведения о роли ФНО- α в течении ревматоидного артрита (Brennan et al., 1992), сепсиса (Fong et al., 1989), сердечной недостаточности различных форм (Насонов и др., 1999). Интересен следующий факт: у пациентов с сердечной недостаточностью и сепсисом кардиомиоциты способны экспрессировать ФНО- α , в отличие от тех же клеток здоровых людей (Doiyama et al., 1996). На ряду с этим, существуют работы, подтверждающие противовоспалительное действие этого цитокина. Известна способность ФНО- α при рассеянном склерозе снижать продолжительность и интенсивность воспаления в ЦНС (Liu et al., 1998). Важно обратить внимание, что интерлейкин 1 и фактор некроза опухоли принимают участие в регулировании ангиогенеза (Фрейдлин и др., 2001), без которого репарация ран невозможна. Ангиогенез выполняет важные функции при атеросклерозе, росте опухолей, ревматоидном артрите и т.д.. При ВИЧ-инфекции отмечается усиление спонтанной продукции моноцитами и макрофагами ФНО- α , гиперпродукция которого свидетельствует о прогрессировании болезни (Хаитов и др., 1995). ФНО- α , ИЛ-2, ИФ- γ , ИЛ-1 выступают в качестве модуляторов воспаления,

провоцируемого повреждением эндотелия (Amento et al., 1991). Действие фактора некроза опухоли α на клетки эндотелия включает в них гены, отвечающие за экспрессию веществ, способствующих атеросклерозу (Berk et al., 2001). Среди них необходимо выделить митогенактивируемую протеинкиназу (МАРК), которая путем фосфорилирования регулирует активность множества факторов транскрипции. Помимо того продуктами генов, индуцируемых ФНО- α , являются N-концевая киназа c-Jun (jnk) и киназа ERK1/2, регулируемая внешними сигналами (Berk et al., 2001). Известен протекторный эффект данного цитокина при введении его в организм перед получением доз ионизирующей радиации. Лабораторные животные после инъекции ФНО- α способны выжить при воздействии доз радиации, смертельных для не получавших цитокин животных (Neta et al., 1991). Предполагают, что ФНО- α регулирует восстановление поврежденной ДНК, поскольку именно с такими повреждениями часто связана радиоиндуцированная летальность (Lazutka, 1996).

Интерферон (ИФН). Открытие интерферона произошло в 1957 г. Интерфероны составляют группу выделяемых клеткой в ходе защитной реакции белков и гликопротеидов, обладающих биологической активностью. Информацией, вызывающей защитную реакцию может быть: воздействие антигенов, митогенов, вирусной инфекции. ИФН являются наиболее быстро реагирующей системой защитного иммунитета, обладающей следующими биологическими свойствами: антипролиферативное и противовирусное действие; повышение активности эффекторов специфического и естественного иммунитета; стимуляция апоптоза; регуляция процессов клеточной дифференцировки; усиление эффекта цитостатических препаратов; угнетение образование фиброза (Кадагидзе, 2003; Mann-Chandler, 2005). Около 20 известных интерферонов с различной структурой и биологическими свойствами относятся к трем видам – α , β и γ , объединённым по типам: I (α и β), II (γ) (Кузнецов, 1987; Dempsey, 2014). ИФН- α называют лейкоцитарным, поскольку основную часть его синтезируют мононуклеарные фагоциты. ИФН- β носит название фибропластный интерферон, так как как изначально был выделен из культуры фибробластов. Однако на

данный момент известно, что при условии необходимой стимуляции почти все типы клеток способны экспрессировать интерфероны I типа (Siegal et al., 1999). ИФН I проявляют следующие биологические свойства: угнетает пролиферацию клеток и репликацию вирусов, модулирует экспрессию генов МНС класса 1, усиливает активность ЕКК. Существенное отличие ИФН II типа от ИФН I является его способность оказывать влияние на иммунорегуляцию. Интерферон I типа называют иммунным, к этому типу относится ИФН- γ , который в нативном состоянии имеет молекулярную массу 40-50 кДа и является гомодимером. Молекулярная масса интерферона II типа зависит от степени гликозилирования белков. Есть сведения об экспрессии ИФН- γ различными клетками, например, моноцитами и некоторыми другими клетками, но основной его источник – клетки, относящиеся к лимфоидному ряду: NK, CD8⁺ Т-киллеры, CD4⁺ Т-хелперы после воздействия антигенов и с и последующей стимуляцией интерлейкинами 2 и 12 (Демьянов и др., 2003). Также почти все клетки экспрессируют рецепторы для ИФН- γ . ИФН- γ является плейотропным цитокином. Помимо противовирусного действия, он участвует в регуляции антителообразования, реакциях гиперчувствительности как замедленного, так и немедленного типов, оказывает влияние на дифференцировку В- и Т-клеток, стимулирует активность NK и фагоцитарную активность макрофагов, активизирует нейтрофилы. Экспрессия генов главного комплекса гистосовместимости I и II классов вызывается интерфероном- γ не только на поверхности лимфоцитов, но нервных, раковых клеток, миеломоноцитов, фибробластов (Василенко и др., 2003; Strehl et al., 2005). Потенцирование эффекта лимфотоксинов интерфероном- γ заключается в стимулировании цитолитического действия на клетки, инфицированные вирусами. Явление противовирусного действия интерферонов против онкогенных и неонкогенных вирусов было открыто в числе первых и хорошо изучено (Friedman, 1977; Galabru et al., 1984). В белках вирусов ИФН- γ нарушает процессы трансляции и транскрипции. Данный цитокин оказывает иммуномодулирующее воздействие, которое зависит от времени введения ИФН и интенсивно применяется в медицине: стимулирует/угнетает образование антител,

ускоряет/замедляет отторжение трансплантата, повышает цитотоксичность НК и фагоцитарную активность макрофагов. На основе ИФН созданы лекарственные препараты, используемые при вирусных, онкологических и других заболеваниях. В терапии аутоиммунных болезней может быть применено ингибирование ИФН (Skurkovich et al., 2006). В свете указанных фактов актуальным представляется поиск путей регуляции синтеза интерферонов в клетках, участвующих в иммунном ответе. Необходимо обратить внимание, что цитокины связывают иммунную систему с другими, главным образом – с нервной. Важно отметить, Интересно, что на лимфоцитах находятся рецепторы для модуляторов синаптической передачи и нейромедиаторов, а на нервных клетках и их отростках – рецепторы, связывающие иммуномедиаторы (Василенко и др., 2000). Ряд работ доказывают существование продуцирующихся в ЦНС цитокинов, обладающих нейро- и иммуотропным действием (Blalock, 1989; Becher et al., 1996). При патологиях нейроиммунных взаимодействий часто возникают различные, в том числе онкологические заболевания, развитие которых связано с иммуносупрессивными эффектами боли и стресса (Page et al., 1997). Существует ряд мембранных рецепторов, общих для нейронов и иммунокомпетентных клеток, позволяющих производить обмен информацией с помощью иммуно- и нейромедиаторов (Василенко и др., 2000).

Белки теплового шока (БТШ). Основную роль в защите организма от повреждающего действия играют белки теплового шока. Их название обусловлено историей их открытия: впервые белки теплового шока обнаружили у дрозофил после нагревания (Ritossa, 1962). Известно, БТШ могут быть конститутивными и индуцибельными, синтезируемыми при воздействии стрессов, при которых может произойти денатурация белков (Lindquist et al., 1988; Jaattela, 1999). Среди факторов, индуцирующих синтез БТШ выделяют: ишемию, действие внутриклеточных токсинов, тяжелых металлов, повышенных температур (Sharp et al, 1999), травмы и ряд заболеваний (Yenari et al, 1999). Определено, что антигены различного происхождения активируют экспрессию БТШ (Kumaraguru et al., 2002; Srivastava, 2002). По признаку молекулярной массы белки теплового

шока делят на 6 семейств: малые БТШ, БТШ40, БТШ60, БТШ70, БТШ90, БТШ110 (Lindquist et al., 1988; Przepiorka et al., 1998; Fink, 1999; Hartl et al., 2002). Функция индуцибельных белков теплового шока заключается, главным образом, в протекции белков от полипептидной адгезии и деградации (Yenari et al., 1999). Помимо того, они принимают участие в функционировании стероидных и ядерных рецепторов, представлении антигена, апоптоза и межклеточного транспорта. В настоящее время изучению защитных свойств БТШ посвящено значительное число работ, имеющих большое значение для исследования путей использования БТШ в медицинских целях. Семейство БТШ 70 характеризуется высокой степенью гомологии и консервативности. Гены, кодирующие белки этого семейства находятся у человека на шестой хромосоме в участке генов главного комплекса гистосовместимости. Этими генами кодируются белки, состоящие из 641 аминокислотного остатка (Gunter et al., 1994). У млекопитающих в одной клетке часто находятся сразу несколько представителей данного семейства, в основном это: конститутивный БТШ 70к; индуцибельный БТШ 70; белок, находящийся в митохондриях; белок, регулирующийся глюкозой (P78). Тотальная гомология белков в семействе БТШ 70 – 50 %, хотя гомология некоторых участков, например центр связывания АТФ составляет до 80 %. Рентгеноструктурный анализ показал, что в молекулах этих белков присутствуют два домена. Консервативный N-концевой состоит примерно из 450 аминокислотных остатков, а вариабельный C-концевой – из 200, они разделены последовательностью, содержащей участок узнавания протеолитическими ферментами (Flaherty et al., 1990). Помимо того, молекулы белков теплового шока 70 включают в себя 2 центра связывания кальция, первый располагается в каталитической части, а второй – на поверхности (около 227-231 аминокислот) (Sriram et al., 1997). Считается, что нейроэндокринный механизм регуляции синтеза белков теплового шока является основным. Экспрессия активируется при связывании стероидных гормонов и растворимых рецепторов цитоплазмы, а также при стимуляции β -адренорецепторов. БТШ 70 и БТШ 70к способны совместно с другими белками клетки формировать смешанные олигомеры (Brown

et al., 1993). Структура перирибосом защищается от повреждений белками теплового шока 70 (Pelham, 1986), ими же угнетается активность ФТШ. Также БТШ 70 участвуют в презентации антигенов и отчасти регулируют активность собственных генов (Milani et al., 2002). Видимо шаперонная активность БТШ 70 является основой многих из функций (Маргулис и др., 2000; Milani et al., 2002).

Семейство БТШ 90 представлено в клетках двумя близкими по структуре изоформами: БТШ 90 α и БТШ 90 β , молекулы которых включают в себя две спаренных глобулы (Nemoto et al., 1997). Оба конца молекул этих белков содержат участки, отвечающие за шаперонную активность. При этом, на N-конце находится участок связывания гелданамицина и сосредоточено множество заряженных аминокислот (Grenert et al., 1997). Для функционирования БТШ 90 очень значима его связь с АТФ (Obermann et al., 1998). Зависимое от АТФ связывание денатурированных полипептидов происходит в двух доменах молекулы БТШ 90 (Young et al., 1997). Гелданамицин не позволяет денатурированному белку связываться и угнетает активность БТШ 90, обусловленную АТФ, а также его шаперонную активность. Ингибирование шаперонной активности происходит благодаря связыванию гелданамицина с БТШ 90 и, возможно изменению конформации последнего (Grenert et al., 1997).

В семействе белков теплового шока необходимо выделить БТШ 27. При стандартных условиях БТШ 27 являются крупными олигомерами, молекулярная масса которых доходит до 700 кДа. На молекуле БТШ 27 находятся сериновые остатки в положении: 15, 78 и 82. Фосфорилирование этих остатков является необходимым условием работоспособности БТШ 27 (Mehlen et al., 1997). Показано, что воздействие на клетки омега-3 жирных кислот, ИЛ-1 α , ФНО, форболового эфира приводит к уменьшению размера олигомеров (Kato et al., 1994). Действие перечисленных факторов стимулирует фосфорилирование БТШ 27, влияя на динамику цитоскелета и вызывая дробление крупных агрегатов на меньшие изомеры с молекулярными массами 30-400 кДа. Окислительный стресс вызывает фрагментацию актиновых микрофиламентов, модификация сериновых остатков в белках теплового шока 27 провоцируется теми же факторами. На

данный момент хорошо изучено функционирование в эукариотической клетке нескольких шаперонных систем, находящихся в цитоплазме и митохондриях и основанных на белках теплового шока (Azem et al., 1997; Chen et al., 1998). Также исследован шаперонный комплекс, основанный на белках теплового шока 70, находящийся в эндоплазматическом ретикулуме (Wearsh et al., 1998). Основная часть шаперонных систем включает в свой состав БТШ 70 и 70к, способные узнавать пептиды (денатурированные или вновь синтезированные), участвовать в транспортировке их в органеллы клеток, помогать в процессе сборки надмолекулярных структур и белков. Защитная функция белков теплового шока представляет собой большой интерес. Впервые это свойство БТШ было замечено, когда у подверженных мягкому тепловому шоку (нагрев до невысоких температур) клеток одновременно наблюдалось накопление БТШ и рост устойчивости к усиленным цитотоксическим воздействиям. Данное явление названо термотолерантность (Lindquist, 1986). Учитывая все описанные выше функции этих белков, немало исследователей проявило интерес к изучению способов медицинского применения БТШ, в частности диагностики заболеваний при помощи определения концентрации содержания БТШ. В ряде случаев значение имеет содержание в тканях и органах пациентов не только белков теплового шока, но и антител к ним, поскольку известно более 20 заболеваний инфекционной природы, при которых обнаруживаются антитела к белкам теплового шока (Morimoto et al., 1994). Изобретение препарата, способного индуцировать синтез белков из семейств БТШ 90, БТШ 70 и БТШ 27, произошло в результате поиска возможностей повышения концентрации белков теплового шока (Vigh et al., 1997). Также предлагается для повышения концентрации белков теплового шока 70 у пациентов применять магнитные поля перед операцией. Помимо того, на основе БТШ возможно создание вакцины против рака (Hoos et al., 2003). К сожалению, в медицинской практике используется далеко не весь потенциал БТШ, поиск способов регуляции концентрации БТШ и ее повышения в тканях организма является на данный момент одним из наиболее перспективных направлений.

Оксид азота (NO). Первые сведения о биологической роли оксида азота появились в 1986 г., тогда NO был определен как эндотелиальный фактор релаксации сосудов (ЭФРС). В скором времени было обнаружено, что NO как медиатор участвует в деятельности иммунной, нервной и других систем. В 1995 г. NO уже было посвящено уже более 5000 публикаций (Проскуряков и др., 1999). Журнал «Science» в 1992 г. объявил NO молекулой года (Cubotta et al., 1992), а ученые, которые открыли и во многом описали биологические свойства NO, получили Нобелевскую премию в 1998 г. за научные достижения в области физиологии и медицины (Arnold et al., 1977; Furchgott et al., 1980; Ignarro et al., 1986). Развитие иммунологии, токсикологии, физиологии, фармакологии, нейробиологии послужило основой для открытия у NO свойств биологических свойств универсальной регуляторной молекулы, которые определяют ее как биологический мессенджер. Это короткоживущий, высоколабильный, реактивный свободный радикал. Немало работ посвящены изучению механизмов биосинтеза оксида азота (Bredt et al., 1994; Marletta, 1993). При двухстадийном ферментативном окислении гуанидиновой группы L-аргинина в организме человека и животных образуется NO, при этом промежуточным продуктом NG-гидрокси-L-аргинин. В реакции гидроксирования принимает участие кофактор тетрагидробиоптерин, данная реакция ингибируется CO и является кальций-кальмодулинзависимой. Далее синтезируется NO (как свободный радикал) и L-цитруллин в стехиометрическом соотношении (Knowles et al., 1994). Известно, что NO-синтаза существует в двух изоформах: конститутивная (cNOS), которая находится в ткани постоянно, и индуцибельная (iNOS). Еще одним признаком, по которому NO-синтазу разделяют на различные виды является преимущественная локализация в тканях, соответственно NO-синтаза бывает: эндотелиальная (eNOS), нейрональная (nNOS), макрофагальная (mNOS). Конститутивными являются eNOS и nNOS, а mNOS функционирует главным образом как индуцибельная форма, которая обычно синтезируется при активации клеток цитокинами. Места ее локализации: клетки эндотелия, гладкие мышцы макрофаги, гепатоциты (Bredt et al., 1994). В макрофагах генерация NO

стимулируется бактериальными липополисахаридами, ИЛ-2, ИФ- γ , иногда в сочетании с ФНО- α (Adamson et al., 1993; Al-Ramadi et al., 1992; Fast et al., 1993; Juretic et al., 1995). Окислы азота выделяются в течение нескольких часов после стимуляции клеток, в отличие от других активных форм кислорода, которые синтезируются уже через несколько минут (Marletta et al., 1988; Mauel et al., 1991). Молекула NO регулирует активность ряда ферментов и внутриклеточную концентрацию ионов кальция (Реутов и др., 1997; McKelvey et al., 1988), а также обеспечение цитотоксической и цитостатической активности макрофагов и моноцитов по отношению к чужеродным клеткам, например микробным, и активация Т-лимфоцитов и IgE (Al-Ramadi et al., 1992; Mills, 1991). Эндотелиальные клетки синтезируют NO, который предотвращает адгезию нейтрофилов к эндотелию и агрегацию тромбоцитов а также является фактором релаксации (Furlong et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Sneddon et al., 1988; Lefer et al., 1991; Al-Qattan et al., 2006). Клетки нервной системы экспрессируют NO – медиатор синаптической пластичности, нейроиммунных коммуникаций, памяти (Kolb et al., 1992; Snyder, 1992). Большое внимание уделяется изучению роли оксида азота в биологии злокачественных опухолей (Ahmad et al., 1997; Lechner et al., 2005; Quintero et al., 2006). NO синтезируется почти всеми компонентами-регуляторами роста новообразований: инфильтрующими иммунными клетками, эндотелиальными клетками сосудов опухоли, самими опухолевыми клетками. (Chhatwal et al., 1994) Способность опухолевых макрофагов экспрессировать NO-синтазу в значительной мере определяет процесс роста опухоли (Drapier et al., 1991; Dinapoli et al., 1996). Также существует предположение о взаимосвязи образования метастазов опухолей и NO (Hesla et al., 1997; Williams et al., 2005). Например, между метастазированием меланомы и активностью индуцируемой NO-синтазы у экспериментальных животных продемонстрирована отрицательная корреляция (Dong et al., 1994). Повышение уровня синтеза NO может осуществляться путем усиления синтеза NO-синтазы *de novo*, либо путем активации NO-синтазы, которая уже имеется (Calza et al., 1993; Shen et al., 1995). С активацией NO-синтазы взаимосвязаны рост

внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и свободных жирных кислот, активация свободнорадикального окисления (Ignarro, 1989; Mittal, 1993; Busse et al., 1994; Graier, 1995). Инициирование транскрипции генов, кодирующих NOS, возможно происходит при активации фактора транскрипции NF κ B, при этом значительная роль отводится кальцию, свободным радикалам, ФНО- α и интерлейкинам (Busse et al., 1994, Kroncke et al., 1995; Jordan et al., 1995). Известно, что при стрессе происходит неспецифический рост факторов активации или индукции NO-синтазы (Kovacheva et al., 1995; Stratakis et al., 1996). Также интересно, что в организме одним из основных регуляторов ответа на стрессорное воздействие является NO (Малышев и др., 1998). При воздействии различных стрессоров обнаруживается как снижение, так и рост синтеза NO. Первое отмечается при длительном действии повреждающих факторов среды, второе – как правило, действию средних по силе или кратковременных стрессоров (Busse, 1993). Потому существует предположение, что при чрезмерной реакции на стресс на стадии истощения происходит снижение продукции NO, а на стадии мобилизации – ее увеличение. В ходе NO-зависимой регуляции стресс-реакции гипоталамус посылает широко разветвленную NO-эргическую иннервацию на гипофиз (Vanhatalo et al., 1995). Модуляция секреции основных гипофизарных гормонов стресса (лютенизирующий гормон, пролактин, вазопрессин) осуществляется гипофизом. Поэтому можно сделать предположение о важности NO в регуляции гипофизарных функций, а следовательно - в предотвращении чрезмерно сильной активации периферического звена стресс-системы (Малышев и др., 1998). NO осуществляет может блокировку периферического выброса стресс-гормонов и прямо защищает органы и клетки от стрессорных повреждений. Обобщение указанных фактов позволяет сказать, что именно NO является одним из главнейших медиаторов эндокринной, иммунной и нервной систем, который принимает участие в регуляции и поддержании гомеостаза. Хотя в последние десятилетия это соединение изучается широко и всесторонне, еще далеко не завершены исследования значения как научного, так и практического. Не вызывает сомнений то, что изучение роли NO в развитии патологий и механизмах ответа на стресс является перспективным направлением.

1.2. Роль иммунной системы млекопитающих в ответах на воздействие неионизирующих электромагнитных излучений

Известно, что на воздействие окружающей среды, независимо от его характера первыми реагируют три системы организма: нервная, эндокринная и иммунная, обеспечивая согласованную работу всех систем организма. Иммунная система при этом обеспечивает поддержание целостности и генетической однородности организма в целом. Эти три системы функционально взаимосвязаны и работают в виде единого блока, осуществляя контроль гомеостаза и координацию работы всех систем. (Wilder, 1995). Роль иммунной системы заключается в формировании естественного барьера на пути различного рода инфекций, а также в защите организма от новообразований, паразитарных инвазий и обеспечении функционирования «иммунологической памяти». Изучение воздействия низкоинтенсивного ЭМИ на функциональное состояние иммунной системы является важным аспектом электромагнитной биологии, и в том числе, электромагнитной терапии, т.к. наблюдаемые эффекты низкоинтенсивных ЭМИ тем или иным образом связаны с действием на иммунную систему.

1.2.1. Электромагнитные волны КВЧ и СВЧ-диапазона и иммунная система

Действие ЭМИ (КВЧ). В научной литературе, особенно в отечественной, к настоящему времени накоплен весьма обширный материал о применении низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ и СВЧ в медицинской практике (Девятков, 1985; Девятков, 1989; Киричук и др., 1999; Бецкий и др., 2000). Методическую основу терапии с применением ЭМИ (КВЧ) составляет использование определенных, так называемых «терапевтических» частот - 62,12, 53,57 и 42,25 ГГц, что соответствует длинам волн излучения 4,9, 5,6 и 7,1 мм. Известно, что терапевтические эффекты ЭМИ (КВЧ) наблюдаются при интенсивностях падающего излучения в диапазоне от 10 мВт/см² до 0,001 мВт/см² и ниже

(Девятков и др., 1994). ЭМИ (КВЧ) в условиях стационара применяются для лечения различных сердечно-сосудистых (Головачева, 1995; Киричук и др., 1991), кожных (Адаскевич, 1995) а также неврологических заболеваний (Мирютова и др., 2000), а также язвенной болезни органов пищеварения (Пославский и др., 1999; Брискин и др., 1996). По данным исследователей в основе действия ЭМИ (КВЧ) лежит их способность повышать неспецифическую резистентность организма при широком круге патологических состояний и лимитировать развитие стресс-реакции (Чуян и др., 2002) Следует отметить, что стресс-реакция является неспецифическим компонентом практически всех заболеваний (Селье, 1960). Неспецифический характер эффектов ЭМИ (КВЧ) реализуется прежде всего через вовлечение регуляторных систем организма, и способность миллиметровых волн повышать антиоксидантный и иммунологический статус (Филиппов и др., 1991; Пославский, 1991; Адаскевич, 1995). Результаты клинического использования ЭМИ (КВЧ) свидетельствуют о скорее качественных, нежели количественных, изменениях иммунологического статуса организма. Примером иммуностимулирующего действия ЭМИ (КВЧ) является работа, посвященная исследованию профилактического и защитного действия миллиметрового излучения при инфекции вируса гриппа (Рыжкова и др., 1991). В этой работе показан, защитный эффект ЭМИ (КВЧ) при амплификации вируса гриппа, как на здоровых животных перед их заражением, так и на уже инфицированных животных. Положительный эффект был зарегистрирован как при оценке выживаемости животных после инфицирования вирусом, так и при оценке средней продолжительности жизни после инфицирования. Стимуляция неспецифического иммунного ответа после облучения ЭМИ (КВЧ) характеризуется повышением активности макрофагов, усилением пролиферации Т-лимфоцитов и нормализацией отношения CD4⁺/CD8⁺ клеток (Постовит, 1989; Kutsenok, 1994; Островский и Николаева, 1995; Хоменко и др., 1995; Rojavin et al., 1997; Запорожан и др., 1997). При этом также отмечено увеличение количества В лимфоцитов и модулирующее действие на продукцию ряда иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) (Babak & Goncharova, 1995; Bakalyuk et al., 1997). В ответ на

облучение вовлечены также общие и аллергенспецифические IgE и циркулирующие иммунные комплексы сыворотки крови (Гедымин и др., 1994; Адаскевич, 1995). Согласно современным представлениям, неспецифическую резистентность организма можно охарактеризовать по функциональному состоянию лимфоцитов и нейтрофилов в циркулирующей крови. Исследования, проведенные на крысах-самцах, которых фракционировано (по 30 мин в сутки) облучали ЭМИ (КВЧ) при длине волны (λ) 7,1 мм; и мощности (ПМ) 0,1 мВт/см² показали увеличение содержания в нейтрофилах катионных белков, кислой фосфатазы, пероксидазы, протеаз и липидов в течение 9 суток эксперимента, что указывает на повышение функциональной активности иммунокомпетентных клеток (Чуян и др., 2002). Изменение дегидрогеназной активности лейкоцитов подтверждает данный вывод. В частности, исследователи наблюдали значительное увеличение средней активности глицерофосфатдегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы в клетках лимфоцитов и нейтрофилов крови. Это свидетельствует об активации метаболизма (как аэробного, так и анаэробного) данных клеток. Наряду с этим, существуют работы, в которых показана не стимуляция, а напротив, супрессия неспецифической резистентности организма в условиях облучения ЭМИ (КВЧ). Однократное облучение здоровых мышей ЭМИ (КВЧ) со следующими параметрами: 42,0 ГГц; ППМ=150 мкВт/см²; время экспозиции 20 мин, уже через 3 часа приводило к снижению на 50% фагоцитарной активности нейтрофилов в периферической крови подопытных животных (Коломыцева и др., 2002). В другой работе фракционированное (90 мин в сутки) воздействие ЭМИ (КВЧ) с параметрами: 42,2 ГГц; АМ=10 Гц; ПМ=1 мкВт/см², в течение 30-ти суток приводило к стойкому снижению цитотоксической активности ЕКК, как у здоровых животных, так и у животных с экспериментальным опухолевым ростом (Огай, 2003). Помимо этого, на поздних стадиях эксперимента наблюдали угнетение способности Т-лимфоцитов мышей обеих групп отвечать на митогенные стимулы. Учитывая результаты приведенных работ, нельзя исключить возможность неблагоприятного действия ЭМИ (КВЧ) на человеческий организм. Тем не менее, в КВЧ-терапии эффективно используется выраженное

корректирующее действие ЭМИ (КВЧ), в частности, на гемостаз и реологические свойства крови (Подолько и др., 2000; Киричук и Махова, 2000). Воздействие ЭМИ КВЧ оказывает противовоспалительный эффект и купирует болевой синдром (Бессонов и др., 1997; Мочалов и др., 2000). Облучение поврежденных участков тела и трудно заживающих ран стимулирует репаративную регенерацию (Струсов и др., 1995; Гуляев и др., 1999). Показано усиление митотической активности клеток поврежденной роговицы глаза после её облучения ЭМИ КВЧ (Rosenthal et al., 1975; Черкасов и др., 1978). Отмечено повышение активности гуморального и клеточного иммунитета у больных с неврологическими заболеваниями, прошедших курс ЭМИ-терапии (Родштат, 1994). Показан положительный эффект ЭМИ КВЧ и при онкологических заболеваниях разной этиологии (Девятков и др., 1991; Бецкий, 1993; Соколов и др., 1996). Антистрессовый эффект облучения ЭМИ КВЧ отмечен при исследовании функциональной реабилитации больных с поражениями нервной системы и нервными расстройствами (Слугин и др., 2000). При лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки положительный эффект ЭМИ КВЧ заключается в уменьшении обсемененности бактериями *Helicobacter pylori* слизистых оболочек (Каменев, 1999; Киричук и Махова, 2000). Интересны эффекты терапии с применением ЭМИ КВЧ на гормональном уровне: показано корректирующее действие на группу гастроинтестинальных гормонов, уменьшение концентрации гастрина, гистамина, кальцитонина в плазме крови, повышение образования защитных гликопротеинов желудочной слизи, циклических нуклеотидов, простагландинов серии E, секретина и других гормоноподобных веществ. При этом вышеперечисленные эффекты сочетаются с повышенным уровнем антиоксидантной активности и содержания липидов и витамина E в эритроцитах, что приводит к нормализации показателей свертывающей системы крови. Показано, что ЭМИ КВЧ оказывает влияние на состояние антиоксидантной системы организма и участвует в регуляции процессов ПОЛ. В частности, при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы облучение повышало антиоксидантный статус организма, о чем свидетельствуют изменения в клетках количества продуктов ПОЛ (Лебедева и др., 1995). Изменение

интенсивности процессов ПОЛ и тиол-дисульфидного обмена наблюдали при воздействии ЭМИ КВЧ на здоровый организм (Мартынюк и Темуриянц, 1995). Чувствительность процесса ПОЛ к воздействию низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ подтверждается исследованиями фосфолипидного состава эритроцитарных мембран (Баджинян и др., 2003). Показано, что ЭМИ КВЧ ($\lambda=5,5$ мм; ПМ=10 мВт/см²) при однократной экспозиции в течение 20 мин организма крысы вызывают стимуляцию ПОЛ в клетках эритроцитов и в плазме крови, но наиболее значительными оказались изменения мембран эритроцитов. Во-первых, наблюдали повышение количества лизоформ фосфолипидов, во-вторых, уменьшение содержания фосфатидилэтаноламинов и фосфатидилхолинов, что приводило к изменению физических параметров мембраны (жесткости и вязкости). Имеются также данные, о том, что низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ ингибирует респираторный взрыв нейтрофилов (Сафронова и др., 1997). Влияние ЭМИ КВЧ на содержание нейтрофилах активных форм кислорода в присутствии кальциевого ионофора и фторболового эфира объясняется ускорением гидролиза фосфолипидов и увеличением сродства протеинкиназы С по отношению к внутриклеточным ионам кальция. В последние десятилетия накоплены данные о том, что при облучении низкоинтенсивным ЭМИ в организме млекопитающих может происходить значительное усиление продукции оксида азота (NO), являющегося высокорекреационноспособным радикалом и сигнальной молекулой (Adey, 1997; Yoshikawa et al., 2000). Интерес представляют результаты исследования влияния ЭМИ КВЧ на гормональный статус организма. В частности, показано изменение уровня гормонов, синтезируемых в коре надпочечников, определяющих развитие реакции на стресс. Повышение содержания оксикортикостероидов в крови (на фоне снижения в коре надпочечников аскорбиновой кислоты) было обнаружено при облучении ЭМИ КВЧ достаточно давно (Залюбовская, 1979). Впоследствии было показано, что эффекты 17-оксикортикостероидов условиях облучения низкоинтенсивными ЭМИ КВЧ на клеточном уровне обусловлены влиянием системы БТШ. В частности, Родштатом (Родштат, 2001) предложено следующее объяснение: при нагревании до 43°С клеток в культуре ткани млекопитающих они

синтезируют БТШ семейств 25, 70 и 90 в большом количестве (указанные БТШ способны переводить в раствор и обеспечивать сворачивание денатурированных или неправильно свернутых белков). БТШ90 связываются с неактивными формами рецепторов стероидных гормонов и таким образом регулируют их функцию. Средняя температура кожных покровов человека составляет около 34-35°C. При непрерывном воздействии ЭМИ КВЧ низкой интенсивности (ПМ 10 мВт/см²) может приводить к некоторому локальному нагреву участка облучения - до 1°C (Родштат, 1999). В связи с этим, имеются определенные предпосылки для повышения уровня БТШ в клетках кожи больного или здорового человека при длительном воздействии ЭМИ КВЧ. Исследователи, рассматривающие кожу в качестве многослойного поглотителя способного к интерференции, подтверждают обоснованность такого предположения (Козарь и др., 2002). Присутствие эффекта интерференции на границе слоев поглотителя может приводить к локальному повышению напряженности электромагнитного поля в дермальных слоях кожи, вследствие чего возникает резонансное поглощение энергии электромагнитного излучения. Таким образом, длительное воздействие ЭМИ КВЧ на кожные покровы может вызывать появление областей повышенного локального нагрева отдельных участков кожной ткани, в результате чего условная граница нетеплового воздействия на таких участках может быть превышена. В качестве одного из эффектов ЭМИ исследователи также отмечают протекторную роль ЭМИ КВЧ на кроветворные органы здоровых животных при последующем облучении ионизирующим ЭМИ. Этот эффект возникает лишь при предварительном облучении ММ волнами. При обратной последовательности облучения (рентгеновское, а затем ЭМИ КВЧ) возникает, напротив, усиление эффектов рентгеновского излучения. При этом показано, что воздействие только ЭМИ КВЧ в тех же дозах не приводит к значительным изменениям в работе кроветворной системы. Севастьяновой было предложено объяснение механизма защитного эффекта ЭМИ КВЧ связанного с изменением характера ответа иммунной системы на ионизирующее излучение (Севастьянова, 1983). Ей был открыт эффект ускоренного восстановления киллерной функции резидентных лимфоцитов после

действия рентгеновского излучения у подопытных мышей предварительно подвергнутых облучению низкоинтенсивным ЭМИ КВЧ с частотой 42,2 ГГц. В частности, данные Севастьяновой свидетельствуют о том, что у предварительно облученных ЭМИ КВЧ животных линии СВА восстановление киллерной активности резидентных лимфоцитов происходило в среднем в 1,5 раза быстрее, чем при действии одного лишь рентгеновского излучения. При таком комбинированном воздействии ускорялись процессы миграции лимфоцитов в лимфоузлы: этот процесс протекал в среднем в 2-3 раза быстрее, чем при облучении только рентгеновским излучением. Исследовали также влияние ММ волн на процессы кроветворения животных с экспериментальными опухолями, и выяснили, что ЭМИ КВЧ не приводило к торможению роста новообразования, однако при этом и не усиливало ее рост (Севастьянова, 1983; Севастьянова и др., 1985). Было показано увеличение средней продолжительности жизни облученных опухоленосителей на 10-15 дней в сравнении с контрольной группой животных с экспериментальными опухолями. Состав периферической крови предварительно облученных ЭМИ КВЧ животных после воздействия жесткого рентгеновского излучения отличался по качественным показателям от животных, подвергшихся воздействию рентгеновских лучей, а затем облученных ЭМИ КВЧ: содержание лейкоцитов и эритроцитов было выше. Наблюдалося торможение роста экспериментальной саркомы при комбинированном воздействии (ЭМИ КВЧ + Рентгеновское излучение) в сравнении с действием только лишь рентгеновского излучения (Севастьянова, 1983; Севастьянова и др., 1985). Пресман и Левитина (Пресман и Левитина, 1962) обнаружили уменьшение уровня смертности крыс, подвергнутых в течение 25 дней облучению ежедневно по 30 минут ЭМИ КВЧ ($\lambda=10,7$ мм; ПМ=10 мВт/см²), а затем γ -излучением (600р). Защитный эффект ЭМИ КВЧ в этом случае исследователи объяснили влиянием слабых электромагнитных волн на функции головного мозга, а именно таламо-гипоталамической области, которая отвечает за регуляцию содержания лейкоцитов в крови. Путем экспериментов на крысах, получавших высокие дозы циклофосфана, была показана высокая эффективность модулированного ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц) (Жукова и др.,

2002). В данных экспериментах также наблюдали регрессию, как метастазов, так и первичной опухоли, помимо протекторного действия ЭМИ КВЧ. Кроме того, регрессию метастазов и первичной опухоли наблюдали и в отсутствие цитостатического препарата. Исследуя действие ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц; ПМ=31 мВт/см²) на подавление иммунной системы циклофосфамидом показали, что облучение мышей по 30 мин ежедневно в течение 3 дней не являлось защитой от иммуносупрессии. Более того, облучение крыс, получавших циклофосфамид, в значительной степени снижало уровень лейкоцитов и количество клеток костного мозга (Logani et al., 2002). При фракционированном воздействии (30 мин/сутки в течение 3-х суток) ЭМИ КВЧ (31 мВт/см², 42,2 ГГц) на мышей, наблюдали ускорение процесса пролиферации и повышение соотношения CD4+/CD8+ лимфоцитов в селезенке облученных животных, получавших циклофосфамид, в сравнении с также получавшими данный препарат необлученными животными. При этом, облучение вызывало увеличение уровня продукции интерферона (ИФН- γ) в Т лимфоцитах, однако не оказывало влияния на уровень ИЛ-10 в данных клетках. Кроме того, наблюдали эффект спонтанного высвобождения ФНО- α в группе получавших циклофосфамид мышей, после облучения ЭМИ КВЧ. Продукция ФНО- α перитонеальными макрофагами облученных животных в среднем в 4 раза превышала продукцию данного цитокина клетками группы получавших циклофосфамид необлученных животных. Открытое повышение уровня продукции ФНО- α иммунокомпетентными клетками после облучения ЭМИ КВЧ исследователи связывают с усилением продукции ИФН- γ – цитокина, активирующего макрофагальные клетки (Makar et al., 2003). Многосторонние аспекты действия ЭМИ КВЧ, рассмотренные выше, демонстрируют значительную сложность взаимодействия низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ с биологическими объектами и структурами. Безусловно, среди известных эффектов низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ одним из наиболее важных для объяснения механизма влияния на целостный организм, является иммуномодулирующее действие данного излучения.

Влияние ЭМИ СВЧ. Немаловажным аспектом для понимания механизмов действия ЭМИ СВЧ, является изучение влияния низкоинтенсивных ЭМИ на иммунную систему, представляющую собой естественный барьер, отвечающий за обеспечение защиты организма от воздействия внешних факторов и условий окружающей среды. Роль ЭМИ СВЧ в качестве иммуномодулятора в настоящее время изучается многими исследователями. Однако, как правило такие исследования носят в значительной степени феноменологический характер и результаты их интерпретации бывают крайне противоречивы. Так, одни из первых работ в этой области показали, что облучение иммунокомпетентных клеток ЭМИ СВЧ *in vitro* вызывает угнетение фагоцитоза (Mayers & Habeshew, 1973), изменение метаболизма, фагоцитарной, и бактерицидной функций лейкоцитов (Szmigielski, 1975) а также повышение спонтанной пролиферации и пролиферативного индекса лимфоцитов (Vijayaiahmi et al., 1997). В то же время, данные, полученные другими авторами, указывают на отсутствие изменений в пролиферативной активности лимфоцитов (Smialowicz, 1979). Похожая картина складывается и в отношении цитотоксичности иммунокомпетентных клеток. Так, Szmigielski указывает на увеличение цитотоксичности лимфоцитов и макрофагов под действием микроволн с частотой 3 ГГц (Szmigielski et al., 1978). Увеличение цитотоксической активности макрофагов и Т-лимфоцитов мышей под действием ЭМИ СВЧ (10 ГГц, 1 мВт/см² было обнаружено Новоселовой и соавторами (Novoselova et al., 1999). Однако прямо противоположный эффект наблюдали при облучении ЭМИ СВЧ с частотой 450 МГц и модуляцией 60 Гц. В данных условиях происходило угнетение цитотоксичности Т-клеток по отношению к клеткам-мишеням. Другие авторы наблюдали подавление активности ЕКК селезенки при облучении микроволнами с интенсивностью 25 мВт/см² (Yang et al., 1983), и при 10 мВт/см² (Nakamura et al., 1997). Направленность эффектов, возможно, зависит от условий облучения и различного исходного физиологического состояния клеток. Сходная ситуация наблюдается в отношении влияния ЭСМИ СВЧ на процессы антителообразования: одни авторы указывают на увеличение титра антител после облучения и возрастание количества антителопродуцирующих клеток (Czerski, 1975; Elekes et al.,

1996), другие не обнаруживают заметного влияния ЭМИ СВЧ на антителообразование (Liddle et al., 1986). Интересна работа Veuret с соавторами, в которой получены разнонаправленные эффекты облучения на рост бляшкообразующих клеток и титр антител в зависимости от применяемой модуляции (Veuret et al., 1991). О запуске сигнальных процессов в клетке, влияющих на экспрессию генов свидетельствует значительное усиление ДНК-связывающей способности фактора NF-κB в человеческих моноцитах (в 3,6 раза). Анализируя представленные работы необходимо учитывать также влияние ЭМИ СВЧ на процессы апоптоза, которые регулируют продолжительность жизни клетки и определяют направление иммунного ответа. Исследователи показали в ряде работ, что низкоинтенсивное ЭМИ СВЧ, оказывает значительное влияние на активность ферментов. В связи с этим можно предположить, что изменения клеточного иммунитета могут быть опосредованы изменениями активности ферментов. Анализ имеющихся в литературе публикаций позволяет с уверенностью говорить о ярко выраженном действии ЭМИ СВЧ, носящим иммуотропный характер. Однако имеющихся в литературе сведений явно недостаточно для создания полной картины процессов, обусловленных действием ЭМИ СВЧ, поэтому требуются более детальные и подробные исследования иммуотропных эффектов излучений. Отдельного упоминания заслуживает возможная связь между удаленностью низкочастотных источников ЭМИ (ЛЭП, электростанции) от жилья и риском возникновения онкологических заболеваний. В ряде работ отечественных и зарубежных ученых показано существование повышенного риска заболеваемости людей всеми видами онкологических заболеваний, в том числе опухолями мозга и лейкемией у людей, проживающих вблизи линий электропередач и попадающих под воздействие ЭМП (Savitz et al., 1988; Coleman et al., 1989). При этом другие авторы не обнаружили повышенного риска онкологических заболеваний (Fulton et al., 1980). Примерно в половине проведенных исследовательских работ, проведенных как среди рабочих и служащих различных промышленных предприятий, так и среди населения, проживающего вблизи источников ЭМП, была обнаружена корреляция между повышенным электромагнитным фоном и

вероятностью развития новообразований. Однако весьма неоднозначные результаты получены при изучении влияния низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ на канцерогенез у животных. Было показано, что ЭМИ СВЧ (5 мкВт/см^2 ; в диапазоне 2-18 ГГц) вызывает снижение скорости роста опухоли, и повышает вероятность её регресса у мышей с искусственно привитой карциномой (Акоев и др., 1995); Также было показано, что ЭМИ СВЧ ($\text{ПМ}=10 \text{ мкВт/см}^2$ в диапазоне 12,5-17 ГГц,) увеличивало вероятность выживания мышей, подвергнутых облучению летальными дозами рентгеновских лучей (Макаренко и др., 1996); ЭМИ СВЧ ($\text{ПМ}=10 \text{ мкВт/см}^2$ в диапазоне 12,5-17 ГГц,) при действии *in vitro* при повышении мощности приводило к гибели опухолевых клеток (Девятков и соавт., 1998). Многие авторы в это же время не обнаружили какого-либо эффекта облучения ЭМИ СВЧ на возникновение и протекание процессов канцерогенеза у животных (Marino et al., 1996; Mc Lean et al., 1991; Sasser et al, 1998; Toler et al., 1997). Однако обнаружено появление многоядерных гигантских макрофагов в ответ на облучение (Trosic, 2001) и, наконец, в ряде лабораторий показаны отрицательные эффекты ЭМИ СВЧ при канцерогенезе, такие как: ускорение развития лимфом (Reracholi et al., 1997); спонтанное образование опухолей в брюшной полости животных (Коновалов и Сериков, 2001); показано промоторное действие ЭМИ СВЧ на развитие рака легких у животных (Коноплянников и соавт, 1998) а также возникновение лейкемии после облучения (Bernard et al., 2001). Исходя из вышесказанного, можно заключить, что сведения о влиянии низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ на развитие рака не имеют однозначного характера. Не отмечено также изменений в функционировании эпифиза, секретирующего мелатонин, снижение уровня или отсутствие которого может способствовать развитию раковых заболеваний, согласно «мелатониновой гипотезе» (Stevensetal, 1992). Поэтому, несмотря на представленные многообразные эффекты, до сих пор не получено объективных доказательств непосредственного канцерогенного действия ЭМИ СВЧ низкой интенсивности, что делает допустимым применение этого типа излучения в медицинских целях. Так, например, ЭМИ СВЧ используют для лечения тиреодита (Будянская и соавт., 1997), туберкулеза (Савула и Кравченко,

1997), путем восстановления иммунного гомеостаза организма. В клинической практике широко используются аппараты типа «Луч-3» генерирующие излучение в дециметровой области (2450 МГц, 2,5 - 20 Вт) а также аппараты «Гамма-7Н» генерирующие более высокочастотное излучение (10 ГГц, ПМ=1 мкВт/см²). Медицинскими показаниями к применению прибора «Луч-3» являются: различные воспаления и заболевания кожных покровов. Показаны защитные эффекты воздействия излучения аппарата «Гамма-7Н» на вегетативную нервную, а также на эндокринную систему (Бецкий и соавт., 2000). Кроме того, низкоинтенсивные электромагнитные волны различных частотных диапазонов используются при комплексной терапии злокачественных новообразований (Белецкая, 1996; Кабисов, 1997; Запорожан и др., 1997; Лебедева и Котровская, 1999;). Литературные данные указывают на возможную корреляцию между развитием новообразования и степенью воздействия на человеческий организм электромагнитного поля. На сегодняшний день еще не существует однозначного мнения по данному вопросу, как нет и ясности, какие именно дополнительные условия могут способствовать возникновению и развитию новообразований, из чего складывается возможная предрасположенность к возникновению рака у людей, находящихся в частом контакте с электромагнитными излучениями. Ученые рассматривают возможность роли ЭМИ в качестве промоторов и сопромоторов онкологических заболеваний. Анализ существующих мировых данных по этой проблеме позволяет лишь сделать вывод об актуальности дальнейшего систематического исследования влияния низкоинтенсивных ЭМИ различных диапазонов на возникновение и развитие онкологических заболеваний. При этом становится очевидной необходимость более четкого регламентирования гигиенических норм и параметров излучений, приводящих к тяжелым последствиям для здоровья. Помимо этого, успешное применение низкоинтенсивных электромагнитных излучений разных диапазонов в лечении ряда заболеваний позволяет утверждать о целесообразности разработки новых, более детально обоснованных методов применения этих излучений в медицине.

1.2.2. Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) и иммунная система

В клинических и экспериментальных исследованиях нередко говорится о стимулирующем действии лазерного излучения на иммунитет (Коломиец и др., 1996; Москвин и др., 2000; Kandolf-Sekulovic et al., 2003). В литературе данных об экспериментальных исследованиях значительно меньше, чем о клинических, но имеющиеся экспериментальные данные говорят, что НИЛИ обладают широким спектром иммунных и гормональных эффектов. В опытах *in vitro* обнаружено, что гелий-неоновый лазер обладает активизирующим действием на ряд некоторые параметры иммунных клеток. Обнаружено, что после облучения клеток лазером мощностью 0,5-15 мВт усиливается экспрессия рецепторов к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах и активных форм кислорода спленоцитами и нейтрофилами, активизируется фагоцитоз, запускается процесс дегрануляции тучных клеток, стимулируется дифференцировка клеток костного мозга (Гамалея и др., 1983; Щепеткин и Удут, 1993). Особенный интерес представляет труд Г.И. Клебанова (Клебанов и др., 2002), посвящённый воздействию НИЛИ на синтез (NO) и цитокинов (ИЛ-1 β и ФНО α) у крыс клетками перитонеального экссудата мононуклеарными лейкоцитами крови *in vitro*. В процессе эксперимента при облучении суспензии макрофагов ГНЛ происходило усиление продукции NO. Отметим, что этот рост экспрессии прекращался при инкубации клеток в присутствии циклогексимида и L-N-монометиларгинина, которые являются транскрипционным ингибитором синтеза белков и субстратным ингибитором NO-синтазы соответственно. Это говорит о том, что синтезируемая *de novo* iNOS макрофагов являлась источником оксида азота, который определялся в ходе исследования. Помимо того, в работе определено, что при облучении суспензии моноцитов лазером увеличение дозы способствует усилению продукции ИЛ-1 β и ФНО- α , составляя, соответственно, 425 % и 625 % по отношению к контролю при достижении максимума (доза от 2 до 6 Дж/см²) (Клебанов и др., 2002). Были проведены клинические исследования, и установлено, что НИЛИ корректирует, нормализует функциональное состояние иммунной системы, это, в основном,

можно отнести к клеточному иммунитету: иммунорегуляторный индекс (соотношение субпопуляций Т-клеток), количество активных и общих Т-лимфоцитов. Также известно о восприимчивости рецепторного аппарата и митотической активности мембран иммунокомпетентных клеток к влиянию низкоинтенсивного лазера (Мидленко и др., 1990; Хорошилова и др., 1993; Petrov, 2004.), эти воздействия имеют дозозависимый характер, а интенсивность иммуномодулирующего эффекта обусловлена начальным состоянием иммунокомпетентных клеток и длиной волны излучения (Миненков и др., 1992). При вторичных иммунодефицитных состояниях, которых сопутствуют постоперационным состояниям и ряду хронических воспалительных заболеваний наблюдаются наиболее явные изменения количества Т-лимфоцитов. Курс лазерной терапии приводил к достоверной стимуляции Т-хелперов, в то же время пул Т-супрессоров оставался неизменным или уменьшался (Мазо и др., 1998). Данные об изменении в ходе лазерной терапии количества В-лимфоцитов довольно сильно разнятся. Существуют данные о нормализации количества В-лимфоцитов, но наряду с тем, есть предположение, что В-лимфоциты обладают резистентностью к действию лазера (Купин и Сорокин, 1985; Осина, 1996). Большое количество работ посвящено иммуноглобулинсинтезирующей функции В-лимфоцитов, обобщая, можно сказать, что под влиянием НИЛИ дисбаланс содержания сывороточных иммуноглобулинов устраняется (Москвин и др., 2000). Некоторые проводимые клинические исследования являются свидетельством, того что при облучении низкоинтенсивным лазером происходит стимуляция макрофагов. В макрофагах и нейтрофильных лейкоцитах при действии лазерного света интенсифицируются процессы фагоцитоза, а именно, захват и переваривание микроорганизмов (Байбеков и др., 1993; Чекмарев и др., 1996; Dube et al., 2003; Burduli et al., 2004). Воздействие гелий-неонового лазера ($\lambda = 632,8$ нм, ПМ = $0,5$ Вт/см²) при действии *in vitro* и *in vivo* на форменные элементы крови пациентов с болезнью Паркинсона нормализовало активность Mn- и Cu/Zn-зависимой СОД и моноаминооксидазы В (Витрещак и др., 2003). Имеются данные, что для усиления иммунокорректирующего противовоспалительного и эффектов у

пациентов с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки, при вторичном иммунодефиците имеет смысл проводить курс облучения НИЛИ области тимуса наряду с областью эпигастрия. При подобном лечении происходит увеличение числа Т-хелперов и нормализация количества аутоантител, Т- и В-лимфоцитов, циркулирующих иммунных комплексов (Мидленко и др., 1990). Также по имеющимся экспериментальным данным при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения на область тимуса в Т-зависимых зонах лимфатических узлов происходит стимуляция лимфопоэза. При этом непосредственно в тимусе, в его мозговом веществе, растет число макрофагов что, по авторскому мнению, является положительной тенденцией, так как указанные клетки имеют большое значение в антигензависимой дифференцировке лимфоцитов (Бородин и др., 1997). Как видно из многочисленных источников, НИЛИ, главным образом, оказывает стимулирующее действие на иммунную систему, но в ряде случаев преобладают угнетающие эффекты. Очевидно, сказывается влияние различных диапазонов используемых режимов и доз НИЛИ, а также неодинаковых условий воздействия. Свидетельства иммунокорригирующего действия НИЛИ, вероятно, говорят о зависимости направленности эффектов воздействия от исходного состояния объектов, подвергающихся облучению. Лазерная терапия широко распространена в медицинской практике, благодаря влиянию НИЛИ на иммунологические показатели, она появилась около 40 лет тому назад и на даны момент широко применяется в России и странах СНГ, Японии, Израиле, Китае, Латинской Америке (Клебанов и др., 2004). Для лечения тромбозов применяли ВЛОК курсом 5-7 процедур, длительность воздействия 5-10 мин, $\lambda = 820-890$ нм, мощность 5-10 мВт. Как результат отмечалась нормализация процессов окислительной дегградации липидов в клетках крови, происходило восстановление коллоидно-осмотического давления и гистогематической проницаемости. Также при посттромбофлебитической болезни параметры облучения были следующими: курс лечения 7 дней, продолжительность воздействия 5 мин, $\lambda = 337$ нм, ПМ = 5 мВт/см². Или применялся другой вариант: курс лечения 7 дней, продолжительность воздействия 5 мин, $\lambda = 840$ нм, ПМ 20

мВт/см². Патологическая проницаемость капилляров в результате такого лечения снижалась в 2 раза, при этом в пораженных тканях происходил рост окислительно-восстановительного потенциала в 1,5 раза и увеличение ПОЛ в клетках крови на 20 %. При поставленном диагнозе диабетическая ангиопатия нижних конечностей применялся следующий режим: время воздействия 10-15 мин, $\lambda = 632,8$ нм, мощность 10 мВт, доза 6-9 Дж, в результате увеличивалась площадь поперечного сечения сосудов, ускорялся кровоток, нормализовались показатели деформабельности эритроцитов и вязкости крови (Скобелкин, 1989; Lysov, 1992; Puggioni et al., 2005). Гипертоническая болезнь (ГБ) является показанием к применению ВЛОК курсом 10 ежедневных процедур: экспозиция 30 мин; $\lambda = 632,8$ нм, мощность 1 мВт. В результате снижалось диастолическое давление (ДАД) на 12,5 %; систолическое артериальное давление (САД) на 15,5 %; среднее гемодинамическое давление на 17,9 %, общее периферическое сопротивление сосудов (ОПСС) на 18,8 %. Также был отмечен положительный эффект в отношении периваскулярного отека и скорости капиллярного кровотока (Титов и др., 1995). Применение ВЛОК в сочетании с надвенным (чрескожным) лазерным облучением крови (НЛОК) практикуется при стойкой вторичной артериальной гипертензии (АГ) (Шабанов и др., 1990; Чернопятов и др., 1992; Shuvalova et al., 2001; Ponomarenko et. al., 2003, 2005). НИЛИ применяют в дерматологии, в частности, при таких заболеваниях как нейродермит, атопический дерматит, хроническая экзема, плоский лишай. Выраженный терапевтический эффект у 33,9 % пациентов и улучшение – у 62,3 % констатировали при воздействии ГНЛ курсом 25-30 ежедневных сеансов на пораженные участки ($\lambda = 633$ нм, выходная мощность 20 мВт, экспозиция 3-8 мин) (Иванов и др., 1976). С помощью контактной флуоресцентной микроскопии установили, что у больных экземой кистей воздействие НИЛИ ($\lambda = 633$ нм) на лихеноидные и инфильтративные высыпания повышает проницаемость цитоплазматических мембран клеток эпидермиса, усиливая транспортные процессы в коже (Макаренко и др., 1984). Применение более щадящих режимов воздействия: 12-15 сеансов; $\lambda = 632,8$ нм; ПМ до 2 мВт/см²;

экспозиция до 500 с, позволяло добиться положительных результатов в лечении микробной экземы и нейродермитов (Карагезян и др., 1986, 1988). НИЛИ находит применение при лечении опоясывающего лишая и герпетических поражений кожи (Dionetto et al., 1994; Moore, 1996) а также постгерпетической невралгии (Farago, 1994; Kemmotsu et al. 1994; Moore, 1996), васкулитов и склеродермии (Simmer et al., 1994). При терапии кожных заболеваний наблюдаемые эффекты в большинстве случаев сводятся к интенсификации эпителизации эрозий и заживления, анальгическому эффекту, продлению периода ремиссии. Оториноларингология также применяет НИЛИ: при хроническом тонзиллите изначально использовали излучение ГНЛ с длиной волны 630 нм (Преображенский и др., 1988; Шустер и др., 1988), после чего применяли лазеры с излучением $\lambda=337$ нм (синяя область спектра). В настоящее время широко распространены комбинированные способы лечения с применением аппаратов, функционирующих в красной и инфракрасной областях спектра, в связи с чем лазеры синей области спектра практически вытеснены (Москвин и др., 2000). На данный момент рекомендовано применение инфракрасного и красного лазерного света с длинами волн соответственно 890 нм и 632,8 нм. При этом используются режимы мощности в диапазоне от 6,4 мВт/см² до 600-700 мВт/см² (Попов и др., 1991; Рыжова, 1994; Плужников, 1997). Продолжительность курса лечения составляет 6-10 сеансов, а время одной процедуры – 2-4 мин. Одно из наиболее распространенных детских заболеваний верхних дыхательных путей – хронический аденоидите – успешно лечится при помощи как непрерывного излучения гелий-неонового лазера, так и импульсного воздействия инфракрасным лазером с частотой 80 Гц, мощностью 4-6 Вт (Попов и др., 1991; Petrek et al., 1991; Kirichuk et al., 2004). Помимо того, практикуют рефлексотерапию и облучение проекции зоны печени (Буйлин, 1996). Наблюдают положительную динамику, а именно, вегетативные реакции нормализуются, уменьшается количество выделений из носа и восстанавливается носовое дыхание (Курочкин и др., 1997). Положительный эффект у пациентов экспериментальной группы наблюдался около 7,5 месяцев, контрольной группы – 1,5-2 месяца. Терапия

низкоинтенсивным гелий-неоновым лазером ($\lambda = 632,8$ нм) успешно применяют для лечения острого и хронического фарингита, заболеваний гортани. При этом используются следующие режимы: мощность 2-10 мВт/см²; время экспозиции от 1 до 5 мин; сеансы проводят ежедневно, общим числом от 5 до 10 (Лапченко и др., 1991; Пономарева, 1994; Плужников и др., 1995; Плужников, 1997; Наседкин, 2000). Облучение через гибкое моноволокно, пропущенное через пункционную иглу или катетер применяют при воспалениях носа и придаточных пазух (Талалаев, 1998), также рекомендуют непосредственно облучать слизистую оболочку пазухи при помощи дренажного отверстия, предварительно дренируя её (Чканников и др., 1996). Для терапии воспалений в слуховой трубе (Шустер и др., 1988) и среднем ухе распространено применение кварцевых световодов, подведенных при помощи полимерных шунтов, которые выводятся из полости при операции (Мишенькин и др., 1991). Отмечено, что при таком подходе снижается частота обострений, ускоряется закрытие перфораций барабанной перепонки, улучшаются иммунологические показатели (Карабаев и др., 1988). Известны данные о способности НИЛИ к улучшению реологических свойств крови и микроциркуляции, активированию окислительно-восстановительных процессов, уменьшению гиперкоагуляционного потенциала, что обосновывает использование лазеротерапии при лечении неврологических патологий, причем наиболее распространено применение гелий-неонового лазера и инфракрасных импульсных полупроводниковых лазеров (Москвин и др., 2000). Лазерную рефлексотерапию используют при спастических гемипарезах после перенесенного инсульта, а также при диагностированном астено-невротическом синдроме, при этом клинико-электрофизиологический эффект является крайне положительным (Анищенко и др., 1999; Неретин и др., 1990). Существует предположение, что усилением адаптационно-защитных реакций обусловлены сдвиги в сторону выздоровления при использовании лазерной терапии у пациентов с вегетативными полиневропатиями (Спасиченко и др., 1990). Были проведены электроэнцефалографические (ЭЭГ) исследования и при использовании ЛТ у 82 % обследуемых зафиксировано появление α -ритма

десинхронизированных ЭЭГ и его усиление при ранее пониженном α -индексе. В случае первоначальных изменений ЭЭГ, носящих функциональный характер, в ходе лазерной терапии также отмечены положительные сдвиги в показателях ЭЭГ (Спасиченко и др., 1990). Есть предположение о активирующем действии ЛТ на процессы регенерации при повреждении нервных клеток (Берснев и др., 1990). Большой опыт накоплен в терапии ишемических сосудистых заболеваний мозга с помощью ВЛОК а (Крюк и др., 1986; Скупченко, 1994). В процессе ВЛОК падает содержание лейкоцитов, одновременно растет относительная концентрация лимфоцитов, происходит усиление функциональной активности нейтрофилов, что является свидетельством интенсификации иммунологической реактивности организмов пациентов. Внутрисосудистое облучение крови (ВЛОК) широко применяется в комплексном лечении аутоиммунных заболеваний, например, ревматоидного артрита (РА), клиническая эффективность такого лечения колеблется от 60 до 95 % (Basford, 1989; Brosseau et al., 2000; Ottawa Panel, 2004). Имеются данные о сравнении эффективности ВЛОК и НЛОК (надвенное лазерное облучение крови) при облучении циркулирующей крови пациентов с РА гелий-неоновым лазером, при этом клинические эффекты от применения этих двух способов облучения оказались вполне сопоставимы. НЛОК и ВЛОК при облучении гелий-неоновым лазером циркулирующей крови больных РА производят иммуномодулирующий эффект на ИЛ-2-зависимое звено пролиферативного ответа мононуклеаров. Показаны случаи, когда внутривенное облучение оказало побочные действия или было неэффективным в терапии РА (Зверева и др., 1990, Токмачев и др., 1993). Некоторые публикации посвящены иммуномодулирующему эффекту НИЛИ в практике терапии бронхиальной астмы (Палеев и др., 1993; Александрова и др., 1998; Душкин и др., 1998; Milojevic et al., 2003). В результате применения лазеротерапии в комплексном лечении пациентов, страдающих бронхиальной астмой, улучшались и клинические, и лабораторные показатели. Вплоть до 1981 г. существовало убеждение, что основным противопоказанием к использованию лазерной терапии являются онкологические заболевания. Но после появления сведений о успехе в

применении облучения ГНЛ при терапии больного раком гортани, ЛТ в лечении раковых опухолей начала свое стремительное развитие и в последние десятилетия стала входить в лучевую терапию раковых больных как один из основных элементов. Оценка влияния ЛТ лучевых реакций при развитии рака выявила, что ряд иммунологических показателей сдвигается в сторону нормализации. Существует практика применения внутривенного облучения крови пациентов с раком гортани совместно с лучевой терапией. При этом снижается частота развития лучевых реакций и происходит улучшение иммунологических показателей (Genot et al., 2005). При воздействии некоторых видов НИЛИ на опухоли отмечается повышение тучноклеточной реакции. С учетом такого факта, что тучные клетки есть клетки конкурентные, то есть из межклеточной среды они захватывают полисахарида, например, гепарин, которые необходимы другим клеточным элементам, проясняется перспектива применения лазеротерапии в целях остановки роста опухолей. Был проведен эксперимент, в котором на перевариваемую суспензию клеток действовали ГНЛ, в результате чего у ряда животных происходила резорбция опухоли и к данному виду опухоли животные теряли восприимчивость (Плетнев, 1996). Подводя небольшой итог, можно заявить о целесообразности выработки стратегий применения ЛТ в терапии злокачественных новообразований, что подтверждают обнаруженные эффекты угнетения роста раковых клеток вместе с положительной динамикой иммунологических показателей. В последние годы онкологами исследуются возможности применения соединений порфириновой группы в диагностике и подавлении опухолевого роста. Порфирины способны к селективному накоплению в тканях опухоли, на чем и основывается диагностика и лечение – ФТД (фотодинамическая терапия). Флюоресцентная диагностика раковых болезней и фотодинамическая терапия опухолей подразумевает введение в организм красителей, входящих в эту группу соединений. Фотоактивацию гематопорфиринов проводят с помощью красного света $\lambda=633$ нм, так как он является наиболее проникающим в ткани. Ограничение на применение этого способа накладывают следующие факты: сложность метода и возможность

осложнений; ограничение небольшим спектром нозологических форм новообразований. Данный метод может применяться только в практике с малыми опухолями, расположенными доступно к освещению лазером в условиях искусственной фотосенсибилизации, основанием для которой является появление в организме большого числа свободных радикалов. Они оказывают на опухоль разрушающее действие, но помимо того, способствуют ослаблению организма, его старению и сами зачастую провоцируют появление раковых опухолей (Волегов и др., 2001). Но ФДТ, имея указанные недостатки, один из перспективных путей терапии раковых заболеваний различных локализаций, например рака пищевода, мочевого пузыря, легких. Также ряд клинических данных свидетельствует о положительном эффекте ФТД в лечении таких новообразований как опухоли головы и шеи, саркома Капоши, рак кожи, метастазы раковых новообразований молочной железы, злокачественные глиомы, карциномы яичников (Кац и др., 1992; Pass, 1993; Dougherty et al., 1998; Hussain et al., 2006; Togashi et al., 2006). Достоверно установлено, живые клетки и ткани, содержащие эндогенный и экзогенный фотосенсибилизатор, повреждаются действием на них света по ряду ключевых механизмов – первичных и вторичных (Васильев и др., 2003). Первичные включают в себя следующие виды воздействия: некротическое, цитотоксическое, апоптогенное; вторичные объединяют воздействие иммунозависимое и ишемически опосредованное. Довольно полно изучен путь прямого цитотоксического воздействия фотодинамической терапии (Jogi, 1990; Luksiene, 2003). Поглощение кванта света молекулой фотосенсибилизатора (ФС) приводит к переходу в возбужденное электронное состояние из основного. У активированных молекул фотосенсибилизаторов проявляется способность к индукции фотохимических реакций двух типов. Первый тип фотоокисления подразумевает, что Возбужденный ФС напрямую взаимодействует с субстратом, образуя переходные соединения, которые способны реагировать с кислородом, в результате чего образуются его свободные радикалы. Второй тип реакций начинается с переноса энергии с возбужденного ФС на молекулы O_2 , в результате чего образуется

синглетный кислород, который затем участвует в образовании нестабильных циклических пероксидов, подверженных разрушению в ферментативных и термических процессах. Это приводит к формированию продуктов деструкции субстрата и свободных радикалов. Супероксидный анион-радикал, синглетный кислород, гидроксильный радикал и другие активные формы кислорода генерируются в результате реакций как первого, так и второго типа (Кузнецова и др., 1998; Dougherty et al., 1998; Yamamoto et al., 2003). Известно, что окислы азота способны играть важные роли в каскаде биохимических фотоиндуцированных реакций (Henderson et al., 1999; Korbelik et al., 2000). При этом количество генерированных АФК и антиоксидантная активность биологического объекта оказывают значительное влияние на показатели интенсивности и характера цитотоксического действия (Girotti, 1998). Локализация в клетке фотосенсибилизатора играет определяющую роль в формировании результата фотодинамического воздействия (Bernardy et al., 1999; Minamikawa et al., 1999), коим может являться апоптоз и некроз, а также имеет место явление остановки клеточного цикла, но нормальная жизнедеятельность затем восстанавливается (Castro et al., 1996; Dougherty et al., 1998; Fisher et al., 1995; Moore et al., 1997). Важно, что в результате действия ФТД уменьшается число клеток опухоли, также возможно разрушение сосудов, питающих опухоль, в результате чего происходит аноксия ее клеток. АФК активирует ПОЛ в мембранах и ферментативных системах эндотелия, которые являются ключевыми в повреждениях эндотелиальных клеток, наряду с другими клетками сосудистой стенки. Возможна полная окклюзия сосудов, несущих кровь в опухоль из-за фототоксических изменений эндотелия сосудов (Fingar, 1990; Henderson et al., 1992). Оксидантный стресс, индуцированный ФДТ, приводит к гибели клеток, нарушению трофики и оксигенации тканей как результат ишемических повреждений сосудов опухоли. Это ведет к возникновению воспалительных иммунных реакций, при которых активируются клетки миелоидного ряда. К месту локализации опухоли первыми поступают клетки иммунной системы, называемые нейтрофилами (Krosi et al., 1995; De Vree et al., 1996). Они

накапливаются в периваскулярной области и сосудах, питающих опухоль, происходит выделение токсических продуктов метаболизма кислорода и накопление лизосомальных ферментов, участвующих в индукции повреждений сосудов и клеток опухоли (Korbelik et al., 1999). Происходит быстрое разрушение активированных нейтрофилов, выделяются хемотаксические факторы, которые привлекают другие клетки-участники воспаления. Вскоре после инвазии нейтрофилами в опухоли растет числа тучных клеток (Krosl et al., 1995). Следующая волна инвазии макрофагами, моноцитами и другими воспалительными клетками происходит из-за сигнала, подаваемого высвобождающимся содержимым гранул тучных клеток и хемоаттрактантами нейтрофилов (Васильев и др., 2003). Дальнейшая динамика повреждения тканей опухоли сильно зависит от опухоль-ассоциированных макрофагов, которые по некоторым данным могут накапливать порфирины в количествах, превышающих их содержание в клетках опухоли в 9 раз (Hamblin et al., 1994). Происходит интенсификация продукции АФК, противовоспалительных цитокинов, лизосомальных ферментов; фагоцитарная активность макрофагов после фотодинамической терапии растет (Quin et al., 1993). В результате ФДТ с метатетра-(гидроксиферил)хлорином повышалась поглотительная способность макрофагов, интенсифицировался синтез ФНО и продукция NO (Coutier et al., 1999). При использовании гематопорфиринов с ФДТ росла цитотоксическая активность макрофагов *in vitro* относительно некоторых опухолей (Korbelik et al., 1994). По-видимому, рост цитотоксической активности макрофагов при ФДТ опосредован, свидетельством чему является отсутствие активации в случае, когда облучению подвержены высокоочищенные макрофаги в присутствии ФС (Reiter et al., 1999). Воспаление, индуцированное ФДТ происходит с усилением продукции различных цитокинов фагоцитирующими макрофагами: ИЛ-1, 2, 6, 10, ИФН- γ , ФНО- α (Evans et al., 1990; Herman et al., 1996; Gomer et al, 1996; Gollnick et al, 1997; Coutier et al., 1999). Этими медиаторами контролируются этапы воспаления, являющиеся критически важными, в частности, под их контролем происходит индукция прокоагулянтной активности эндотелиоцитов и

макрофагов, хемоаттракция лейкоцитов к воспалительному очагу, синтезируются адгезивные молекулы, стимулируется цитотоксичность макрофагов и гранулоцитов, усиливается фагоцитоз. Под действием макрофагальных цитокинов происходит вовлечение в процесс воспаления полиморфноядерных лейкоцитов, эпителиальных и других клеток (Васильев и др., 2003). Специфический иммунный ответ при ФДТ опухоли формируется при разрушении клеток, опосредованном механизмами, описанными выше (Dougherty et al., 1998). По авторскому мнению, специфическая иммунная реакция развивается в несколько этапов. На первом активируются опухоль-ассоциированные макрофаги и дендритные клетки, рекрутированные медиаторами воспаления к опухолевому узлу. Эти клетки представляют иммунокомпетентным клеткам антигены клеток опухоли, которые были повреждены или убиты ФДТ, а также продукты воспалительной деструкции тканей новообразований. Антигенпрезентирующие клетки (АПК) производят процессинг антигенов к опухолям и осуществляют их презентацию на своих мембранах в комплексе с антигенами МНС. Представление опухолевых антигенов сопровождается стимуляцией Т-хелперов, которые, в свою очередь, индуцируют процесс формирования популяции Т-лимфоцитов, которые являются опухолеспецифическими. Цитотоксические Т-лимфоциты после активации взаимодействуют с клеткой опухоли и убивают ее с помощью двух основных механизмов. Когда происходит контакт с CD8⁺ Т-лимфоцитов гранзимсодержащие гранулы и перфорин выводят своё содержимое в пространство между мишенью и цитотоксической клеткой, в результате чего первая разрушается. Осуществление второго механизма цитотоксического воздействия происходит через передачу апоптотического сигнала через FAS-лиганд, который находится на поверхности активированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов. Важно, что клеточное звено доминирует в иммунном ответе, индуцированном ФДТ, это является его отличительной особенностью. Выявлено, что лизаты клеток опухоли, обработанных ФДТ, преимущественно активируют Т-клеточный иммунитет и обладают высокой иммуногенностью (Gollnick et al., 2002). То есть, ФДТ можно отнести к перспективным методам, актуальным в

современной терапии раковых болезней. ФДТ присуща способность к интеграции различных механизмов лечебного действия, направленного на ликвидацию новообразований. Но также известно, что при достаточно высокие уровни облучения и дозы фотосенсибилизатора могут способствовать развитию иммунодепрессивного состояния, что сопровождается торможением кожной гиперчувствительности, а также подавляется пролиферация активированных Т-клеток (Lynch et al, 1989; Quin et. al., 1993; Simkin et al., 2000). Сказанное заставляет обратить внимание на необходимость доскональной проработки вероятных последствий действия НИЛИ на организм.

Анализ опыта использования низкоинтенсивных ЭМИ в медицине и наличия различных биологических эффектов приводит к четкому выводу о необходимости и далее изучать взаимодействия ЭМИ, прежде всего, с иммунной системой, а также другими системами, участвующими в защитных реакциях организма.

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Источники излучений

ЭМИ КВЧ. В качестве источника ЭМИ КВЧ использовали генератор Г4-141 российского производства со следующими характеристиками: амплитудная модуляция (меандр) 10 Гц; несущие частоты 40 и 42,2 ГГц; средняя плотность потока мощности $0,5 \text{ мкВт/см}^2$. Для проведения облучения животных применяли камеру размером $25 \text{ см} \times 25 \text{ см} \times 40 \text{ см}$, изготовленную из органического стекла. Камеру размещали в «дальней» зоне излучателя при температуре $20\text{-}22 \text{ }^\circ\text{C}$; расстояние от рупора антенны составляло 40 см; апертура – $35 \text{ мм} \times 45 \text{ мм}$. Облучение суспензий клеток проводили в 24-луночных планшетах для культивирования в концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/мл среды. Применяли среду RPMI-1640, содержащую эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС) в количестве 10 %. При облучении клеток над планшетом располагали рупор генератора на расстоянии 40 см. . Непосредственно для измерений применяли антенну измерителя диаметром 13 см. На рисунке 1 показан способ фиксации и установки антенны на нужном расстоянии от генератора. В ходе замеров антенну сдвигали с шагом в 1 см в двух перпендикулярных направлениях от центра, фиксируя показатели мощности при каждом смещении. После измерения при высокой выходной мощности генератора распределения потока на поверхности, антенну генератора демонтировали и определяли точное значение выходной мощности в центре поля, используя закрепленную через волновод высокочувствительную магнитную головку. Максимальная плотность потока мощности (3 мкВт/см^2) наблюдалась в центре облучаемой области, минимальная ($0,1 \text{ мкВт/см}^2$) – в 20 см от центра.

ЭМИ СВЧ. Источником ЭМИ СВЧ служил генератор качающейся частоты Я2Р – 7612 российского производства, оснащенный аттенюаторами для регулировки выходной мощности. Диапазон частот составил 8,15-18 ГГц, режим качания – 1 Гц; средняя плотность потока энергии – 1 мкВт/см^2 . При облучении

использовали камеру размером 25 см × 25 см × 40 см, изготовленную из органического. Расстояние от объекта до основания рупора антенны «П6-23А» составляло 80 см, апертура – 25×34 см.

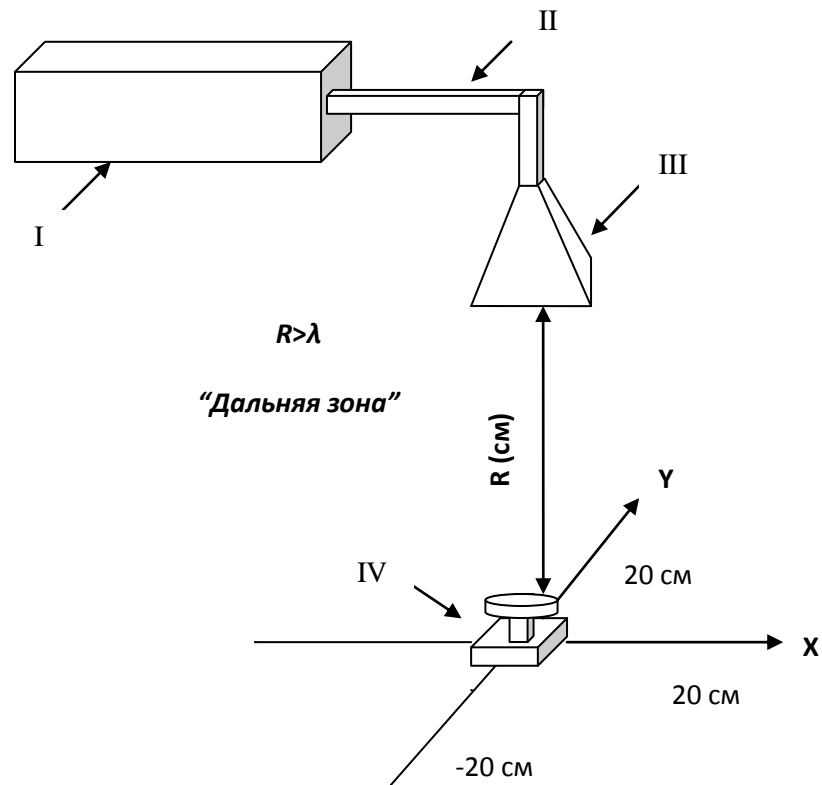


Рис. 1. Определение плотности потока мощности генератора при помощи измерителя «ПЗ-18»

I – генератор; II – волновод; III – рупор прямоугольной антенны, IV – антенна измерителя плотности потока мощности «ПЗ-18» (Россия); R – расстояние от облучаемого объекта до рупора антенны; λ – длина волны

НИЛИ. В работе гелий-неоновый лазер ЛГН-111 российского производства использовали в качестве источника НИЛИ. ЛГН-111 имеет следующие характеристики: длина волны $\lambda = 632,8$ нм; плотность мощности падающего излучения – $0,2$ мВт/см². При проведении опыта *in vivo* облучению через световод подвергались разные участки кожи животных: область задней конечности и область проекции тимуса. Облучение опухоленосителей производилось непосредственно в области опухоли. Предварительно с облучаемых участков кожи сбрасывалась шерсть. Перед облучением НИЛИ производили фиксацию тела животного и экранирование с помощью плотной белой бумаги с отверстием в области экспонируемого участка диаметром 1 см. Выделенные иммунокомпетентные клетки (перитонеальные макрофаги, Т- и В-лимфоциты, ЕКК) облучались в питательной среде RPMI-1640 (с 10% ЭТС) в чашках Петри (d50,h10 мм) и культуральных флаконах (10 ml, Corning, США).



Рис. 2. Облучение клеток *in vitro* с помощью лазера ЛГН 111 (Россия)

1- лазер, 2 – источник питания, 3 – головка световода,

4 – облучаемая поверхность

2.2. Животные

В экспериментах использовали самцов мышей аутбредного стока NMRI, вес которых составлял 20-25 г. Линия животных была подарена фирмой «Charles River Laboratories» Филиалу Института биоорганической химии РАН и поддерживается в питомнике института. Также опыты проводили на зимнеспящих *Citellus Undulatus Pallas* (якутских длиннохвостых сусликах) обоего пола, вес которых составлял 300-450 г. Сусликов предварительно отлавливали в августе и содержали в стандартных условиях вивария; зимой температура содержания сусликов составляла 4°C.

2.3. Выделение клеток

Все операции по выделению клеток проводили на льду, в стерильных условиях. Спленциты, выделяли из гомогената селезенки, путем избирательного гемолиза с использованием изотонического раствора хлористого аммония. Фракции Т- и В-лимфоцитов получали методом положительной селекции (Wysocki & Sato, 1978) на пластиковых чашках Петри (100 × 15 мм, Corning, США), нагруженных кроличьими афинно-очищенными антителами к IgG мыши (200 мкг/мл). Макрофаги выделяли методом перитонеального смыва (Клаус, 1990) с последующим разделением клеток избирательной адгезией к полистиролу, по описанному ранее методу (Огай, 2003). Выделенные клетки инкубировали в питательных средах DMEM, RPMI-1640, с добавлением 2мМ L-глутамина и 10 % ЭТС (HyClone, США) при 37°C, в атмосфере 5% CO₂.

2.4. Модель опухолевого роста

Развитие солидной опухоли инициировали подкожным введением в область задней конечности 2×10^5 клеток асцитной карциномы Эрлиха в 200 мкл

физиологического раствора (0,87% NaCl). Средняя продолжительность жизни животных после инъекции составляла 55 суток.

2.5. Иммунизация

Животных иммунизировали внутрибрюшинно аффинно-очищенной карбоангидразой, полученной из бычьих эритроцитов (Sigma, USA). Вводили по 50 мкг белка с полным (первая иммунизация) и неполным (вторая иммунизация – через 14 суток) адьювантом Фрейнда (Sigma, США). Смесь антиген-адьювант составляла объем 0,5 мл. Для измерения уровня продукции антител использовали свежеприготовленные образцы раствора плазмы крови животных в PBS (pH 7,2).

2.6. Измерение продукции цитокинов

Концентрацию ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН- γ , ФНО- α определяли в лизатах клеток и сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), с использованием соответствующих моноклональных антител (Invitrogen, Stressgen, США), и пероксидазных конъюгатов (ИМТЕК, Россия). Образцы окрашивали с помощью раствора ABTS, измерение оптической плотности проводили при 405нм на многолучевом спектрофотометре для 96-луночных планшет (Tritek Multiscan MCC/340, Flow Laboratories, Финляндия). Концентрацию ФНО- α также оценивали методом цитотоксического теста, с использованием ФНО-чувствительной линии клеток L-929.

2.7. Измерение продукции NO

Концентрацию NO в лизатах клеток и сыворотке крови определяли по содержанию пероксинитрита, при помощи реактива Грисса (Ding et al., 1988; Green et al., 1982).

2.8. Измерение уровня продукции БТШ, NFκB, IκB и SAPK/JNK

Содержание белков семейств БТШ70-72 и БТШ 90, NFκB, IκB в клеточных лизатах определяли методом иммуноблоттинга. Результаты детектировали с помощью системы реагентов ECL (GE Healthcare, UK) и регистрировали на фотопленке (Kodak). Анализ полос фосфоресценции проводили с использованием компьютерной программы QARA (ИТЭБ РАН, Пущино, Россия). Содержание *Phospho*-SAPK/JNK определяли методом иммуноблоттинга с использованием поликлональных кроличьих антител к синтетическому фосфопептиду SAPK/JNK, фосфорилированному по двум остаткам тирозина в положениях 183 и 185 (CellSignalingtechnology, США). Для проявления белка использовали систему реагентов ECL (Amersham, Швеция). Эксперимент проводили в трех независимых повторях. Результаты иммуноблоттинга анализировали, применяя программу QARA. Данная программа предназначена для определения относительного содержания исследуемого белка в полосе, определение происходит по интенсивности окрашивания полосы антителами (OD), за вычетом фона, с точностью 95 %.

2.9. Измерение скорости пролиферации клеток

Скорость пролиферации Т- и В- лимфоцитов определяли по уровню включения в ДНК пролиферирующих клеток метил-3H-тимидина (2 мкКи/мл, удельная активность = 210 ГБк/мМ), по описанному ранее методу (Coligan et al., 1991). С помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика (“Beckman LS Analyzer”, США) измеряли радиоактивность включенной метки.

2.10. Измерение цитотоксической активности ЕКК

Цитотоксическая активность была определена описанным ранее методом (Рыкова и др., 1981). Мишенями для ЕКК служили клетки миелолейкоза человека K562, предварительно меченные добавлением в питательную среду 10 мкКи/мл 3[3H]-уридина (удельная активность 0,85 пБк/моль) (Рис. 3). На счетчике “Beckman LS Analyzer” в толуольном сцинтиляторе измеряли радиоактивность клеток-мишеней.

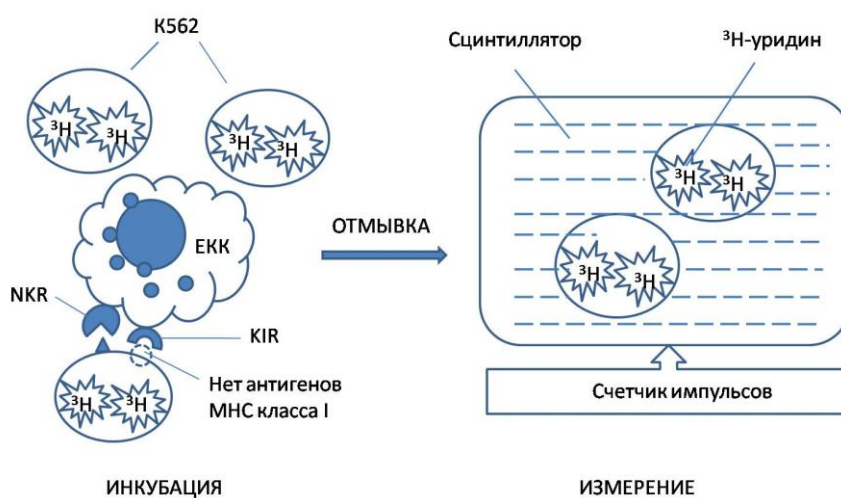


Рис. 3. Схема определения цитотоксической активности ЕКК

2.11. Получение гидролизатов фукоидана и маннана

Гидролизаты получали в следующих условиях: 1% раствор фукоидана и маннана гидролизовали путем добавления серной кислоты до концентрации 30% при температуре 35°C в течение 15, 40 и 60 минут, после чего реакцию останавливали путем нейтрализации кислоты гидроксидом натрия до достижения pH=7,0. В экспериментах также использовали ферментативные гидролизаты маннана, полученные путем добавления к 1% раствору маннана 50 ед./мл ферментного препарата β -маннаназы. Ферментативный гидролиз проводили в течение 1, 3 и 5 часов

при рН=7.0, далее проводили инактивацию фермента, нагревая его в течение 5 минут до 100°C. Полученные гидролизаты очищали от взвесей центрифугированием в течение 30 минут при 3000 об./мин и фильтрованием.

2.12. Определение антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность тестируемых веществ определяли на приборе для измерения антиоксидантной активности «Цвет Яуза-01-АА» (Россия). В качестве стандарта использовали кверцитин.

2.13. Определение структуры иммуноглобулинов

Образцы иммуноглобулинов мыши были предоставлены Институтом вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН. В работе использовали реагенты для электрофореза, поставляемые фирмами Amresco и Bio-RAD, растворители и кислоты для масс-спектрометрии, поставляемые фирмами Sigma-Aldrich, Lab-Scan, Bruker и Dionex. Во всех экспериментах была использована деионизованная вода для МС-ВЭЖХ. Для представления и обработки масс-спектров использовали программное обеспечение, поставленное совместно с приборами фирмой Bruker Daltonics, а также лицензионный программный продукт фирмы MatrixScience для идентификации белков по данным масс-спектрометрии Mascot.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Ответы иммунной системы здоровых животных на воздействие низкоинтенсивных ЭМИ

Для решения поставленных задач мы провели комплексное исследование состояния иммунной системы животных, подвергнутых воздействию различных ЭМИ низкой интенсивности. Изучали также ответы изолированных иммунокомпетентных клеток (перитонеальных макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, пула клеток селезенки - спленоцитов). В ходе проведенных экспериментов оценивали продукцию различных цитокинов, оксида азота, белков теплового шока, уровень антителообразования и скорость пролиферации иммунокомпетентных клеток, цитотоксическую активность ЕКК. Полученные результаты позволили оценить степень влияния низкоинтенсивных ЭМИ на ключевые показатели состояния иммунной системы, зависимость силы и направления ответов иммунной системы от условий облучения. Новые данные необходимы для понимания механизма процессов, происходящих в организме под воздействием низкоинтенсивных ЭМИ. На настоящий момент есть множество доказательств того, что ЭМИ провоцируют серьезные изменения в живых организмах, причем эффекты, производимые ЭМИ, могут быть как стимулирующими, так и депрессивными, и наблюдаются на различных уровнях организации от микроорганизмов до млекопитающих (Pakhomov et al., 1998; Pakhomov, Murphy, 2002; Ярилин, 1997). Хотя отдельные авторы воспринимают указанные эффекты как экспериментальные артефакты (Gandhi, 1980), клиническое использование ЭМИ в целях профилактики и лечения целого спектра заболеваний широко распространено (Девятков, Бецкий, 1987; Девятков и др., 1991). Принимая во внимание тот факт, что электромагнитные волны очень активно применяются в медицине, необходимо обладать более точными знаниями о механизмах, с помощью которых низкоинтенсивные электромагнитные излучения влияют на метаболизм биологических объектов

3.1.1. Влияние низкоинтенсивных ЭМИ на продукцию цитокинов клетками иммунной системы животных

Интерлейкины. В экспериментах по изучению влияния однократного облучения АМ ЭМИ КВЧ на продукцию интерлейкинов применяли стандартное время экспозиции животных (2-96 ч), время же облучения изолированных спленоцитов составляло от 0,5 до 2,5 ч. Нами определено, что каким бы ни был способ воздействия, облучение с несущей частотой не вызывало достоверных изменений продукции ИЛ-3 спленоцитами, стимулированными ФГА как *in vivo*, так и *in vitro*. Однако обнаружено снижение продукции ИЛ-2 при облучении мышей в течение 48 часов (рис. 4). В случае облучения *in vitro* спленоцитов изменения продукции как ИЛ-2, так и ИЛ-3 не были отмечены.

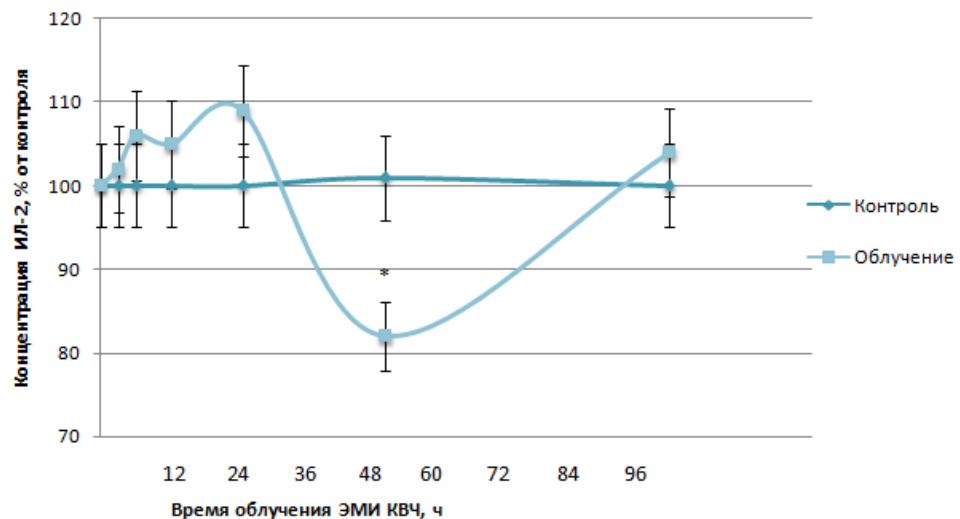


Рис. 4. Продукция ИЛ-2 (а) ФГА-стимулированными спленоцитами при однократном облучении АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 40 ГГц) здоровых мышей. За 100% принято значение концентрации: ИЛ-2 – 60 нг/мл.

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Таким образом, нами продемонстрировано, что изученные интерлейкины 2 и 3 практически не принимают участия в иммунном ответе, связанном с однократным воздействием АМ ЭМИ КВЧ. Активность некоторых клеток таких как ЕКК, В- и Т-лимфоцитов, тканевых макрофагов и макрофагоподобных клеток

регулируется в организме посредством ИЛ-2. В клинических и экспериментальных опытах исследователи пытаются применить ИЛ-2 в лечении новообразований (Amato et al., 2006; Wei et al., 2006). Рост и дифференцировка ранних кроветворных клеток-предшественников стимулируется ИЛ-3, являющимся полипептином. Им же стимулируется формирование из костномозговых предшественников гранулоцитов, макрофагов и дендритных клеток. Помимо того, ИЛ-3 является активатором эозинофилов, ростовым фактором тучных клеток и ингибитором развития К-клеток (Aglietta et al., 1993; Медуницын, 1999; Sanchez-Garcia et al., 2006). Для экспрессии интерлейкина 2 лимфоцитами селезенки были определены дозовые зависимости при действии НИЛИ *in vitro*. Выявлено, что действие лазерного света практически не влияет на синтез данного цитокина, можно отметить только незначительную активацию экспрессии ИЛ-2 после экспозиции лимфоцитов в течение 60 с (данные не приведены). Продукция ИЛ-3 при облучении *in vitro* испытывала более значительные колебания: облучение клеток со сравнительно меньшей дозой (экспозиция 30 с) приводило к достоверному снижению синтеза ИЛ-3, в то время как увеличенная доза (экспозиция 180 с) провоцировала заметную активацию его продукции (рис. 5).

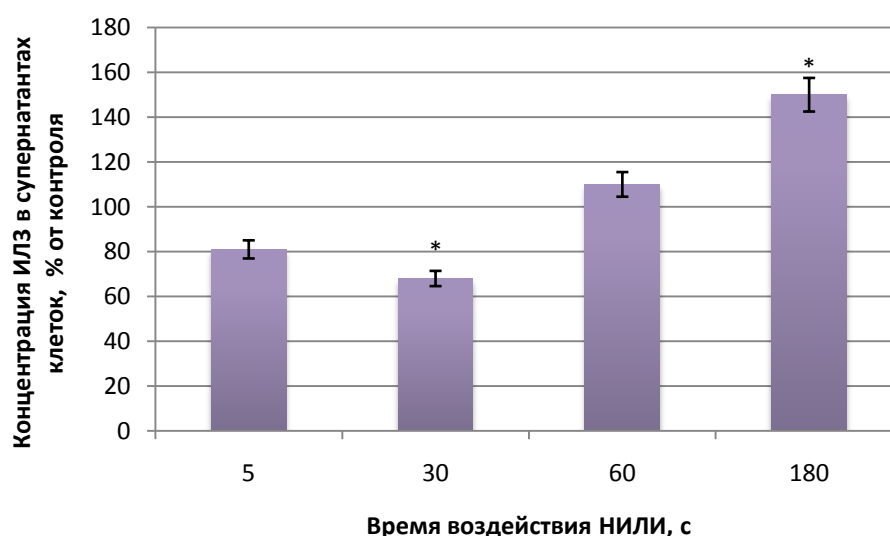


Рис. 5. Экспрессия лимфоцитами селезенки интерлейкина
Достоверное отличие от контроля * $p < 0,01$

На основании полученных результатов можно заключить, что воздействие НИЛИ на изолированные лимфоциты селезенки не приводит к значительному изменению продукции ИЛ-3 и ИЛ-3 этими клетками. Однако иные результаты были получены в серии экспериментов по исследованию действия НИЛИ *in vivo* на показатели клеточного иммунитета мышей. По разработанной нами модели воздействия облучали область задней лапы или участок в области проекции тимуса, который является центральным органом иммунной системы. С облучаемых участков предварительно сбривали шерсть. Проводили однократное облучение в течение 1 мин (12×10^{-3} Дж/см²) и длительного фракционированное облучение в течение 30 суток каждые 48 часов с продолжительностью одной экспозиции 1 мин (12×10^{-3} Дж/см²). Необлученные животные являлись контрольной группой. Наблюдали значительное повышение продукции ИЛ-2 Т-клетками через 12 часов после однократного облучения (рис 6 а), при действии на область тимуса отмечали наиболее заметный эффект. Через 24 часа после облучения наблюдали увеличение экспрессии ИЛ-2 Т-клетками, а через 48 часов интенсивность экспрессии ИЛ-2 падала практически до контрольного значения. Обнаружена высокая степень корреляции между изменением продукции ИЛ-2 Т-лимфоцитами и содержанием этого цитокина в сыворотке крови через 12 и 24 часа после воздействия излучения (рис. 6 б), значительных отличий в показателях при воздействии на области задней лапы и тимуса не отмечено. По прошествии 48 часов с момента облучения в сыворотке крови обнаруживался уровень ИЛ-2, превышающий контрольный.

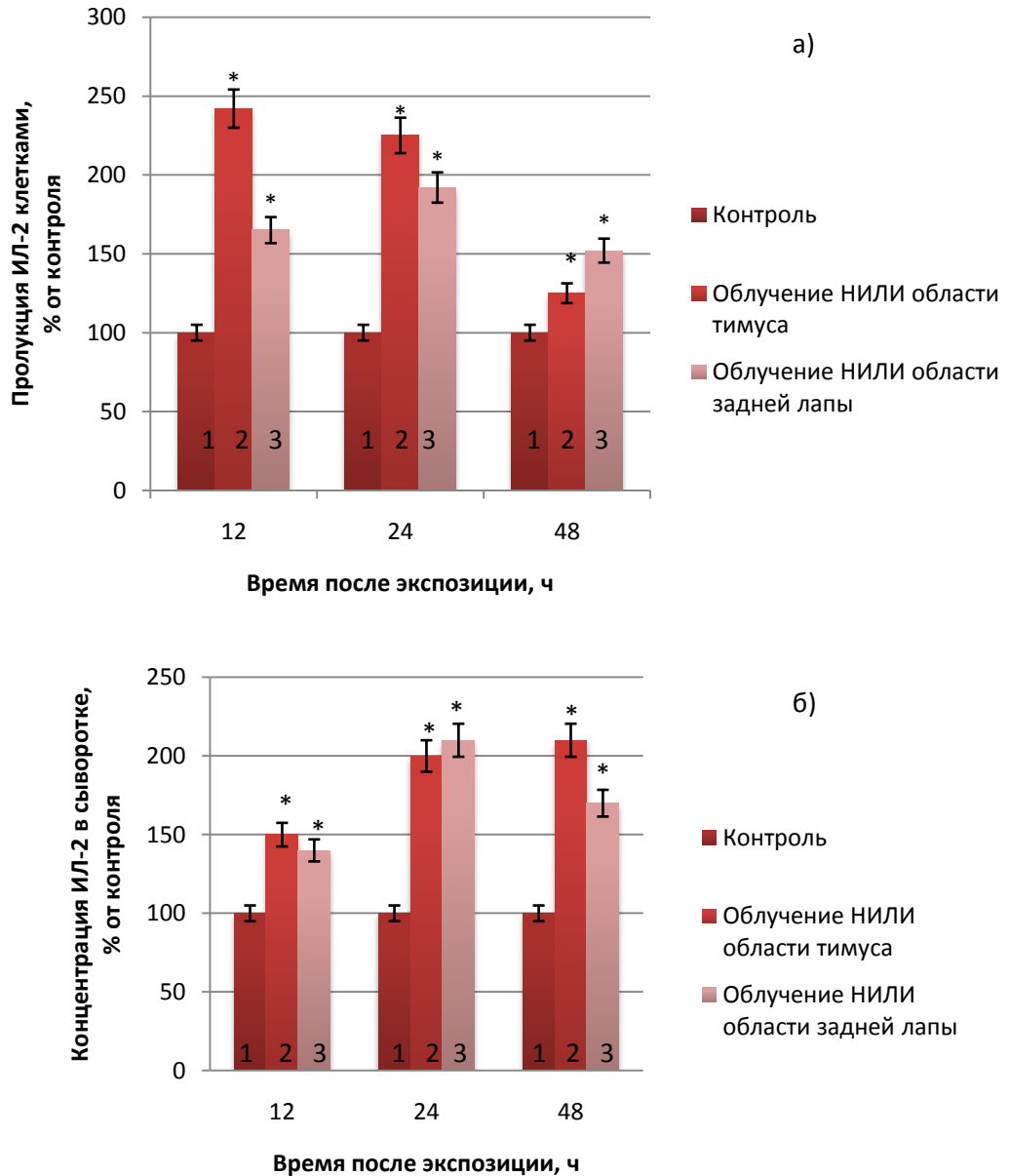


Рис. 6. Продукция Т-лимфоцитами селезенки интерлейкина 2 (а) и содержание в сыворотке крови мышей интерлейкина 2 (б) при однократном воздействии НИЛИ в течение 1 мин:

1- контроль, 2- облучение НИЛИ области тимуса,

3- облучение НИЛИ область задней лапы.

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

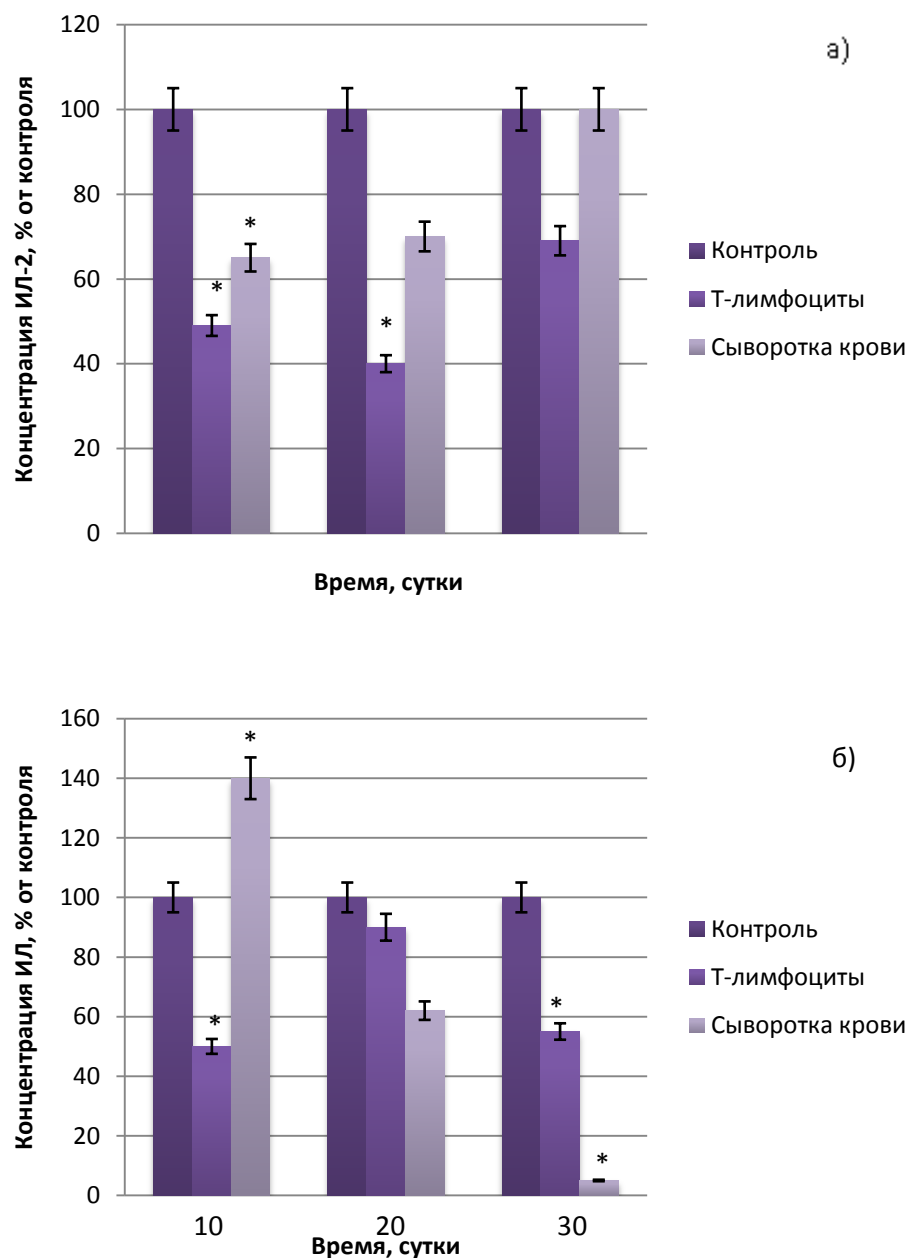


Рис. 7. Влияние НИЛИ на продукцию Т-лимфоцитами селезенки интерлейкина 2 и его концентрацию в сыворотке крови здоровых животных при воздействии излучения на зону тимуса (а) и задней лапы (б)

Условные обозначения: 1 - контроль; 2 - Т-лимфоциты; 3 - сыворотка крови

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Фактор некроза опухолей. ФНО в организме выполняет функцию медиатора разнообразных процессов, например, участвует в активации нейтрофилов, повышает их адгезивные свойства, а также адгезивные эндотелиальных клеток сосудов (Beutler et al., 1989, Brown, 1991; Berry et al., 2005; Hartmann et al., 2005). Помимо этого, ФНО- α выступает в качестве паракринного и аутокринного активатора макрофагов и для макрофагов и клеток Лангерганса в коже является хемоаттрактантом (Зубова и др., 2001). При нормальном состоянии организма ФНО- α выполняет основополагающую физиологическую роль в регуляции иммунитета, но при различных инфекционных и неинфекционных заболеваниях он может участвовать в развитии гемодинамических патологий, воспаления, метаболического истощения, оказывая таким образом патологическое действие (Zhang et al., 1998). ФНО является ключевым цитокином, задействованным в развитии такой патологии как опухолевый рост. Поэтому мы провели тщательное исследование влияния низкоинтенсивных ЭМИ на продукцию данного цитокина иммунокомпетентными клетками в различных условиях. Первым этапом нашей работы была оценка действия АМ ЭМИ КВЧ (40 ГГц) *in vitro*. Предварительные исследования показали, что эффекты ЭМИ КВЧ отмечаются при продолжительности облучения не менее 2 ч, в связи с чем и было выбрано минимальное время экспозиции (суммарная доза облучения). При изучении эффектов *in vitro* время экспозиции ограничивалось 2,5 ч, так как те же предварительные исследования выявили неспособность изолированных клеток полноценно функционировать по истечении этого времени. Это вызвано отсутствием необходимых условий культивирования, а именно, CO_2 , pH, и определенная температура. Проведение же облучения непосредственно в CO_2 -инкубаторе способно было экранировать объект. На рис. 9 и 8а показаны эффекты действия АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 40 ГГц) *in vitro* на продукцию фактора некроза опухоли экспонированными клетками. Мы выявили, что при получасовом и полуторачасовом облучении не происходит значительных изменений продукции ФНО перитонеальными макрофагами, в то время как часовая экспозиция этих клеток провоцирует увеличение продукции ФНО на 20 %

(рис. 9). Продление экспозиции до 2 и 2,5 ч вызывало наибольшую стимуляцию экспрессии макрофагами ФНО, увеличение продукции составляло 1,5 и 1,4 раза, соответственно. Похожая динамика продукции фактора некроза опухоли отмечена и при облучении спленоцитов с той разницей, что активация клеток происходила при самой непродолжительной экспозиции – 30 мин (рис. 8 а). Максимум продукции (в два раза больше контроля) ФНО спленоцитами обнаружен при дозе облучения, составляющей 1 ч, что меньше, чем для макрофагов. Стимулирующий эффект облучения по мере увеличения его продолжительности *in vitro* постепенно снижался: отличий от контроля в продукции ФНО не было уже после 2 ч облучения, а при экспозиции в течение 2,5 ч результатом было достоверное угнетение (до 70 % от контроля) экспрессии ФНО спленоцитами. При действии ЭМИ КВЧ (1 мкВт/см^2) на изолированные спленоциты был обнаружен «всплеск» ФНО-продуцирующей способности клеток уже при небольшом времени воздействия (0,5 час), при увеличении времени воздействия до 1-1.5 часов наблюдали постепенное снижение уровня ФНО в клетках. При этом характер ответа клеток при сдвиге частоты облучения от 40 ГГц до 42,2 ГГц принципиально не изменялся (рис. 8).

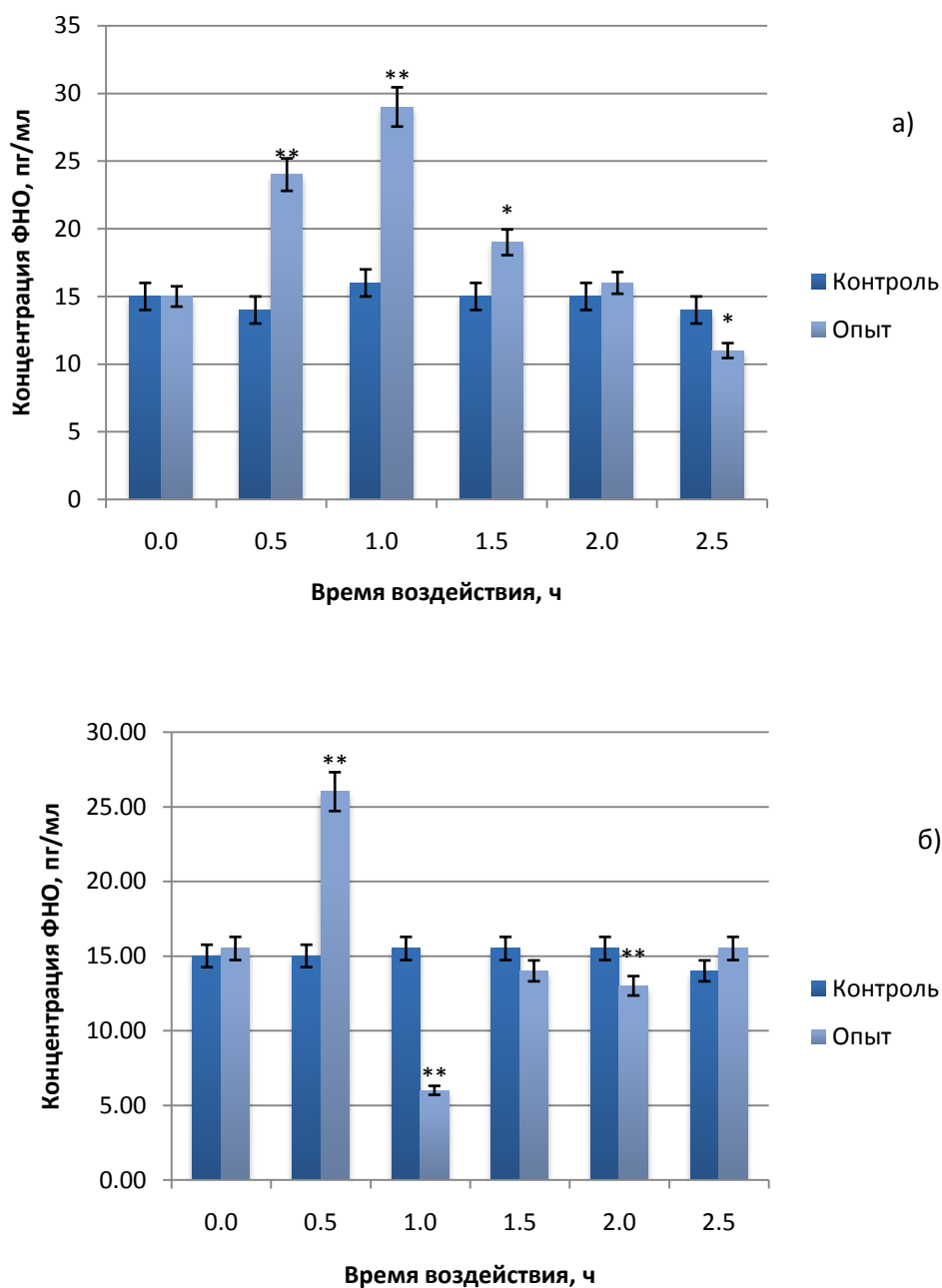


Рис. 8. Продукция ФНО- α спленocyтaми мышей при действии ЭМИ КВЧ с частотой 40 ГГц (а) и 42,2 ГГц (б)

Достоверное отличие от контроля ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

При облучении перитонеальных макрофагов ЭМИ КВЧ наблюдали 35-40% активацию продукции ФНО- α при воздействии >1 ч (рис. 9).

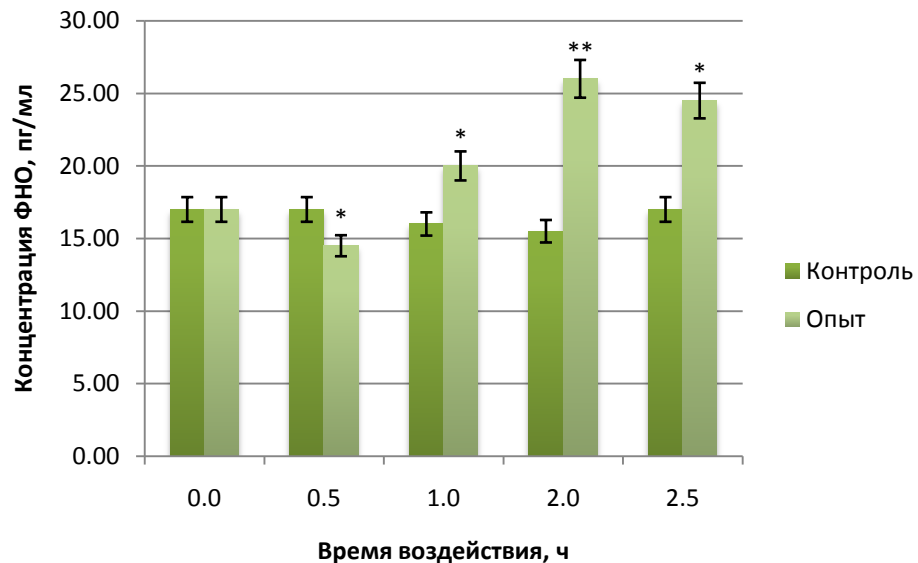


Рис. 9. Продукция ФНО- α макрофагами мышей при действии ЭМИ КВЧ с частотой 40ГГц.

Достоверное отличие от контроля ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

Отметим, что после облучения спленоцитов и макрофагов изменение их ФНО-продуцирующей активности было несинхронным. Например, воздействие излучения в течение 0,5 и 1,5 часов стимулировало продукцию ФНО спленоцитами и снижало продукцию ФНО макрофагами вплоть до нормы. Экспозиция же в течение 2 и 2,5 часов оказывала стимулирующее действие на продукцию указанного цитокина макрофагами, но угнетало его продукцию спленоцитами до нормальных значений (2 ч) и даже ниже нормы (2,5 ч) (сравн. рис. 8 а и рис. 9). Возможно, что наблюдаемая асинхронность эффектов обусловлена различным уровнем чувствительности исследованных клеточных популяций к электромагнитному излучению. Нами изучена дозовая зависимость продукции ФНО перитонеальными макрофагами (рис. 10) и спленоцитами (рис. 11 а) после однократного облучения мышей с частотой АМ ЭМИ КВЧ (40 ГГц)

in vivo. Очевидно, клеточная ФНО-продуцирующая активность изменяется немонотонно в зависимости от продолжительности облучения мышей. Так, в течение первых суток воздействия наблюдали разнонаправленные колебания, а в дальнейшем у облученных животных прослеживается устойчивая стимуляция экспрессии цитокина в сравнении с контрольной группой. Важно отметить, что для макрофагов и спленоцитов практически равной была интенсивность максимального стимулирующего воздействия облучения на продукцию ФНО. Супрессивный эффект облучения на продукцию ФНО макрофагами изменялся с меньшей амплитудой, чем его стимулирующий эффект, что свидетельствует о преимущественно стимулирующем действии ММ волн на продукцию ФНО иммунокомпетентными клетками облученных животных.

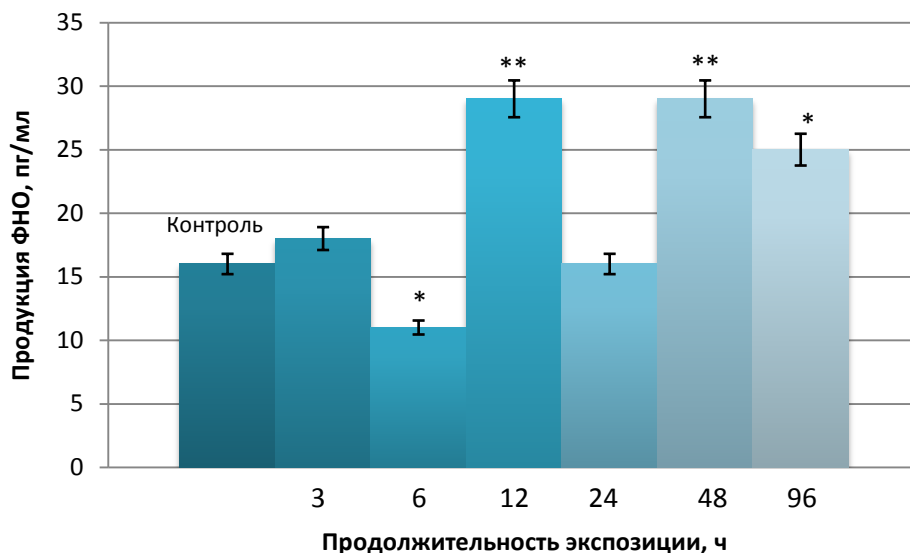


Рис. 10. Продукция ФНО перитонеальными макрофагами здоровых мышей после однократного облучения АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 40 ГГц)

Достоверное отличие от контроля ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

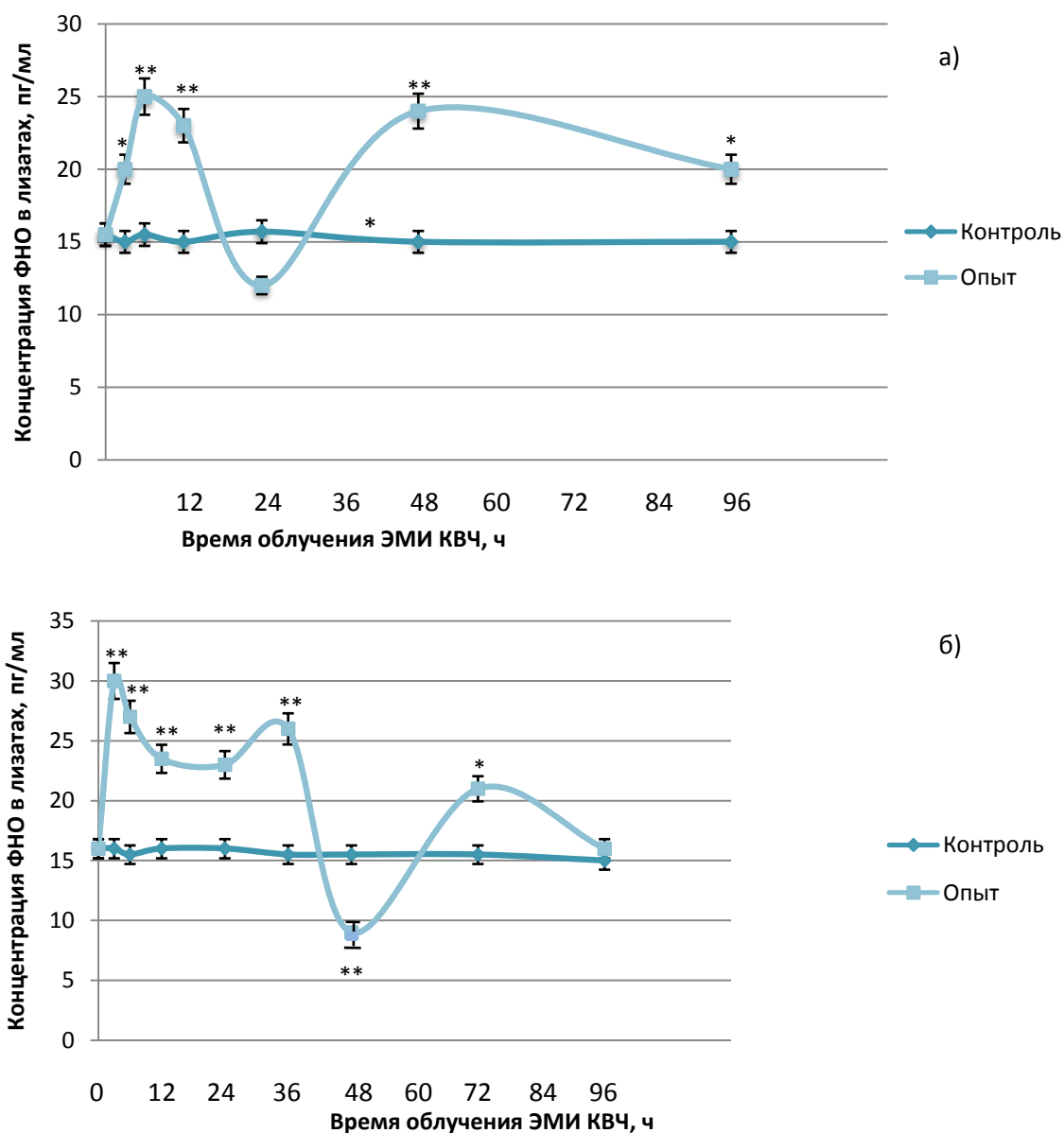


Рис. 11. Продукция ФНО спленоцитами при действии низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ с частотой 40 ГГц (а) и 42,2 ГГц (б)

Достоверное отличие от контроля ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

Полученный график, отражающий зависимость эффекта воздействия излучения от дозы облучения, проиллюстрировал заметную стимуляцию экспрессии макрофагами мышей ФНО в условиях 12 и 48 ч непрерывного облучения (рис. 10). Рост уровня продукции цитокина спленоцитами был также отмечен при 5, 12 и 48 ч воздействия излучения на животных (рис. 11 а). При этом, для макрофагов и спленоцитов значение максимального стимулирующего

эффекта было практически равным: 170 % и 160 % относительно контроля соответственно. Интересен факт, что продолжительное (в течение 4-х суток) действие излучения на мышей вело к росту ФНО-продуцирующей активности макрофагов и спленоцитов.

После 5 ч облучения отмечено достоверное снижение продукции ФНО макрофагами мышей (до 70 % от контроля), для спленоцитов указанного эффекта не обнаружено (рис. 10). Облучение мышей в течение 24 ч не вызывало изменения относительно к контрольного уровня продукции ФНО как в макрофагах, так и в спленоцитах.

Сравнивая динамику продукции ФНО спленоцитами и макрофагами нельзя не заметить, что при относительно небольших сроках экспозиции животных эффекты облучения являются разнонаправленными. Например, угнетение продукции ФНО макрофагами и в то же время резкое увеличение продукции ФНО спленоцитами отмечено после 5 ч облучения мышей (рис. 11 а). Такая асинхронная динамика продукции цитокина макрофагами и спленоцитами говорит о неодинаковой чувствительности этих клеток к действию АМ ЭМИ КВЧ в первые периоды воздействия излучения. Однако через 24 часа облучения и более продукция ФНО у обеих популяций клеток изменялась одинаково. Возможно, это связано со способностью организма к адаптации к продолжительному воздействию АМ ЭМИ КВЧ независимо от используемой частоты. Также интересно провести сравнение амплитуд стимулирующего эффекта на продукцию ФНО макрофагами и спленоцитами при облучении *in vitro* и *in vivo*. ФНО-продуцирующая активность макрофагов при действии облучения как *in vitro*, так и *in vivo* максимально изменялась примерно на один порядок (150 % и 170 % соответственно). При этом действие облучения на целый организм вызывало значительно меньший рост уровня продукции ФНО (160 %) по сравнению с эффектом от облучения изолированных клеток селезенки (200 %). При сравнении ранее полученных в нашей лаборатории данных о действии низкоинтенсивного ЧМ ЭМИ СВЧ на уровень продукции фактора некроза опухоли (Глушкова, 2002; Fesenko et al., 1999), с данными, полученными в ходе

настоящей работы, можно обнаружить, что клеточный иммунный ответ на облучение ЭМИ СВЧ и КВЧ имеет различный характер. Во-первых, при воздействии сантиметровых волн отмечена гораздо более высокая амплитуда ответов на облучение (*in vivo* и *in vitro*), чем амплитуда стимуляции экспрессии ФНО при действии миллиметровых волн, что говорит о зависимости эффектов от частотного диапазона. Кроме того, динамика продукции указанного цитокина макрофагами во время продолжительной экспозиции при действии на животных ЭМИ КВЧ изменялась немонотонно, в то время как та же зависимость при действии ЭМИ СВЧ была монотонной, имела область плато и плавно восстанавливалась до нормальных значений. Обобщая, при условии равных доз действия ЭМИ диапазонов СВЧ и КВЧ отмечено стимулирующее действие СМ волн в использованных дозах, в то же время ММ волны оказывали как стимулирующее, так и угнетающее действие, при том, данный факт справедлив для иммунного статуса целого организма и отдельных клеток. Стимуляция продукции ФНО макрофагами заметна также при воздействии НИЛИ *in vitro* (рис. 12). Действительно, лазерное излучение вызывало активацию продукции ФНО- α при различных дозах, но уровень активации продукции ФНО- α был значительно выше в условиях 30 с и 60 с экспозиции по сравнению с действием излучения в течение 180 с. Важно отметить, что уровень продукции ФНО- α был заметно повышен уже после экспозиции в течение 5 с (доза 10^{-3} Дж/см²), что указывает на крайне высокую чувствительности клеток к влиянию малых доз лазерного излучения.

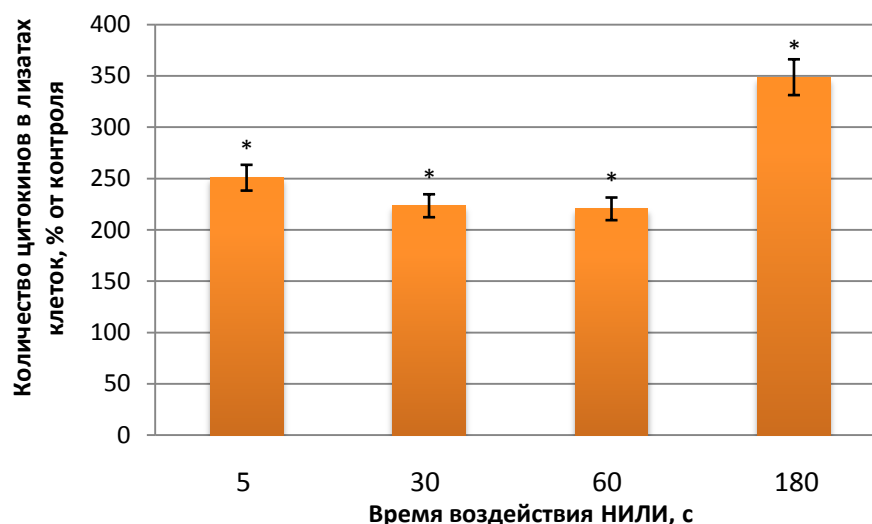


Рис. 12. Зависимость продукции ФНО- α иммунными клетками от времени воздействия НИЛИ

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,01$

Длительное фракционированное воздействие НИЛИ *in vivo* также приводило к увеличению продукции ФНО иммунокомпетентными клетками. При облучении здоровых животных в области тимуса отмечено изменение общей концентрации цитокина в сыворотке крови, коррелирующее с изменениями продукции фактора некроза опухоли Т-клетками мышей после облучения ($r=0,884$, $p < 0,05$). Достоверное увеличение уровня содержания ФНО в сыворотке крови, видимо вызванное интенсификацией его продукции спленоцитами (рис. 13 а), имело место только на 10 день курса воздействия (доза $0,036 \text{ Дж/см}^2$). При более продолжительных сроках воздействия происходила нормализация продукции данного цитокина. Вместе с тем, действие на область лапы красного света не выявляет прямой зависимости уровня продукции цитокина иммунокомпетентными клетками от концентрации ФНО в крови. На 10 день курса воздействия (доза $0,036 \text{ Дж/см}^2$) замечено повышение общей концентрации ФНО, в то время как а ФНО-продуцирующая активность исследованных клеток иммунной системы оставалась неизменной. Сверх того, достоверного снижения ФНО-продуцирующей функции клеток не было отмечено даже при значительном

угнетающем действии на концентрацию цитокина в сыворотке при длительном действии на область задней лапы (30-дневный курс) (рис. 13 б). Возможно, в данном случае имеет место угнетение продукции ФНО функции у других клеточных популяций, вносящих вклад в общее содержание ФНО в сыворотке крови.

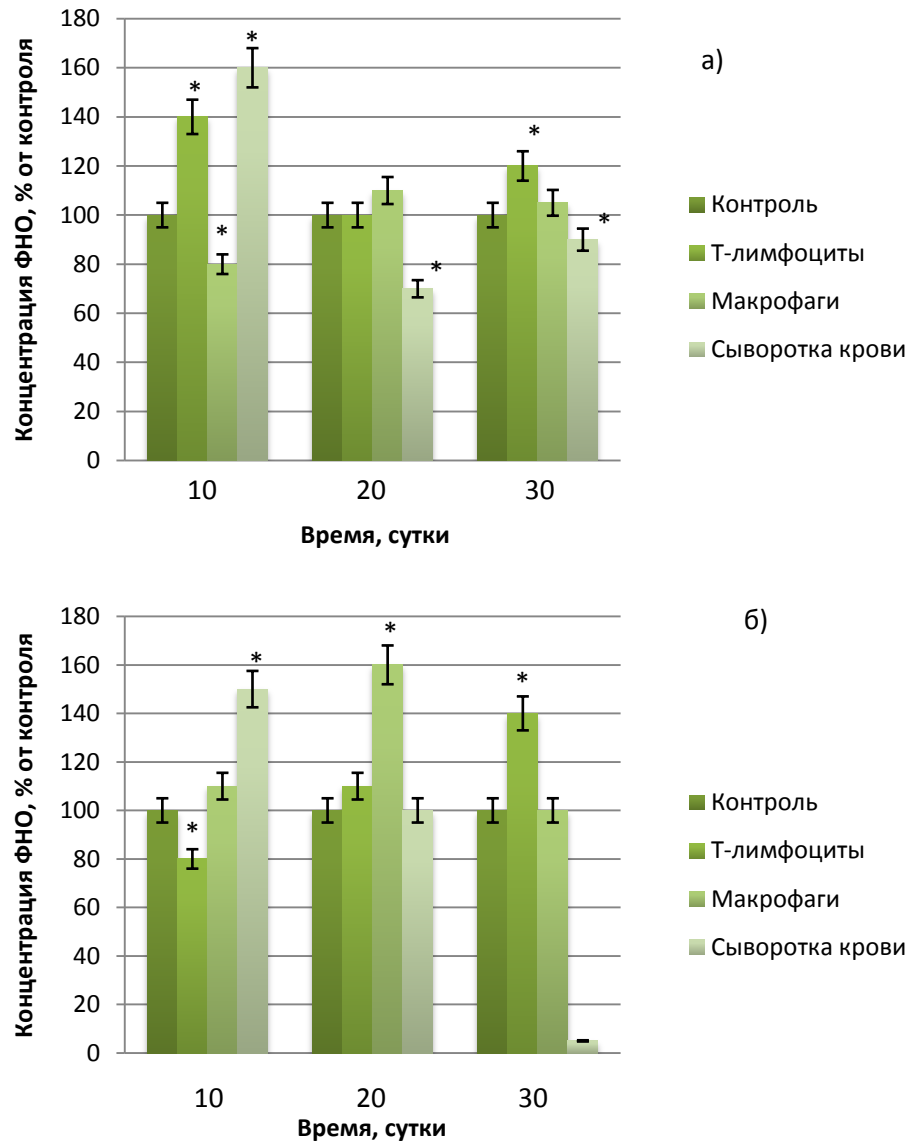


Рис. 13. Зависимость продукции ФНО иммунокомпетентными клетками и его концентрации в сыворотке крови от времени действия НИЛИ на зону тимуса (а) и задней лапы (б) здоровых животных

Достоверное отличие от контроля * ($p < 0,05$)

Учитывая обнаруженные эффекты изменения продукции ФНО при использовании электромагнитных волн различной природы, целенаправленно подбирая дозы облучения, возможно стимулировать неспецифический иммунный ответ, повышая уровень эндогенной продукции ФНО. Данный факт, полученный в настоящей работе, может иметь большой вес при выработке стратегии применения низкоинтенсивных ЭМИ в терапии, эффективность которой уже доказана клинически.

3.1.2. Уровень антителообразования при антигенной стимуляции в условиях облучения

Образование антител является основой гуморального иммунитета, поэтому важно изучить реакции организма на облучение в состоянии антигенной стимуляции, что является моделью иммунного ответа на появление чужеродных молекул в организме при заболеваниях. Это имеет особое значение при выработке стратегии применения ЭМИ в терапии. Нами было проведено изучение эффектов воздействия ЭМИ КВЧ (40 ГГц) *in vivo* при фракционированном облучении иммунизированных животных, что максимально близко использованию миллиметровых волн в клинической практике. Животных подвергали ежедневной экспозиции в течение 1,5 ч на протяжении 30-ти дней. Уровень антителообразования определяли через 14 суток после проведения первичной и повторной иммунизации при развитии первичного и вторичного иммунного ответа соответственно. У иммунизированных мышей после фракционированного облучения определяли, помимо содержания антител (IgG) в крови, количество спленоцитов, которое является одним из важнейших показателей при оценке иммунного ответа, так как Т-клетки при участии В-лимфоцитов осуществляют регуляцию синтеза иммуноглобулинов и выброса антител в кровяное русло. Нами определено, количество спленоцитов у иммунизированных мышей при облучении АМ ЭМИ КВЧ не изменялось (данные не показаны). Обнаружено, что в ходе развития первичного иммунного ответа у иммунизированных животных как облученных, так и необлученных уровни антителообразования не отличались

(данные не приведены). Таким образом, облучение АМ ЭМИ КВЧ не влияло на процессы образования иммуноглобулинов у мышей, подвергнутых иммунизации, при развитии первичного иммунного ответа.

Эти данные значительно разнятся с результатами ранее проведенного в нашей лаборатории исследования, в ходе которого было обнаружено, что при облучении ЭМИ СВЧ (8,15-18,0 ГГц) при развитии первичного иммунного ответа значительно повышается содержание антител в плазме крови мышей после иммунизации (Глушкова и др., 2001). Обратный эффект мы обнаружили при развитии вторичного иммунного ответа, когда при фракционированном воздействии АМ ЭМИ КВЧ на протяжении 30 дней, значительно возрастал уровень антител после повторного введения антигена. На рис. 14 видно, что при развитии вторичного иммунного ответа фракционированное облучение снижает уровень антителообразования у иммунизированных мышей.



Рис. 14. Влияние низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ (40 ГГц) на уровень антителообразования иммунизированных животных при развитии вторичного иммунного ответа

Контроль – иммунизированные мыши, опыт – облученные иммунизированные мыши. Оптическая плотность при проведении ИФА определена как среднее значение для 6 мышей, для каждой из которых проводили индивидуальные измерения в 9-ти повторах

На основании полученных данных, а также проведенных ранее в нашей лаборатории исследований (Глушкова 2001, Огай, 2003) можно заключить, что эффект влияния облучения на процессы антителообразования при антигенной стимуляции может быть разнонаправленным или вовсе отсутствовать. Это зависит как от условий иммунизации, так и от параметров используемых электромагнитных волн.

3.1.3. Скорость пролиферации лимфоцитов в условиях облучения

В данной части нашей работы приведены результаты исследования по воздействию АМ ЭМИ КВЧ (42.2 ГГц, модуляция 10 Гц) и частотно-модулированного ЭМИ СВЧ (8.15-18 ГГц, частота качания, 1 Гц) на активность пролиферации клеточных популяций, которые непосредственно участвуют в развитии иммунного ответа: Т- и В-лимфоцитов. Без ясных представлений о механизмах. Не имея четкого представления о механизмах взаимосвязи клеток, участвующих в формировании иммунитета, со слабыми электромагнитными волнами, трудновыполнимой представляется задача формулировки общих закономерностей, не менее сложно оценить эффективность их иммуномодулирующих эффектов. Для решения обозначенных проблем мы сравнивали эффекты от облучения целого организма и экспозиции изолированных лимфоцитов *in vitro*, то есть при отсутствии факторов, относящихся к регуляции клеточного метаболизма нейроэндокринной системой. Имеются довольно противоречивые сведения об иммуотропных эффектах высокочастотных ЭМИ. Это во многом обусловлено значительной вариабельностью объектов и условий облучения в проводимых работах. Поэтому мы стандартизировали условия облучения мышей, применяя равные интенсивности и время воздействия излучения, но различные частотные характеристики. Результаты предварительных исследований учитывались при выборе времени экспозиции. Т- и В-клетки селезенки мышей способны к усиленной пролиферации при наличии митогенов, этот факт использовался для оценки уровня их ответа. При изучении действия ЭМИ СВЧ *in vitro* облучались на

протяжении 1 часа и 5 часов. В этом случае наблюдался рост скорости пролиферации В- и Т-клеток, при этом уровень пролиферации Т-клеток, вызванной митогеном возрастал примерно в 2 раза, в то время как иммунный ответ подверженных облучению В-лимфоцитов увеличивался до 135 % по сравнению с необлученными клетками (рис. 15 б).

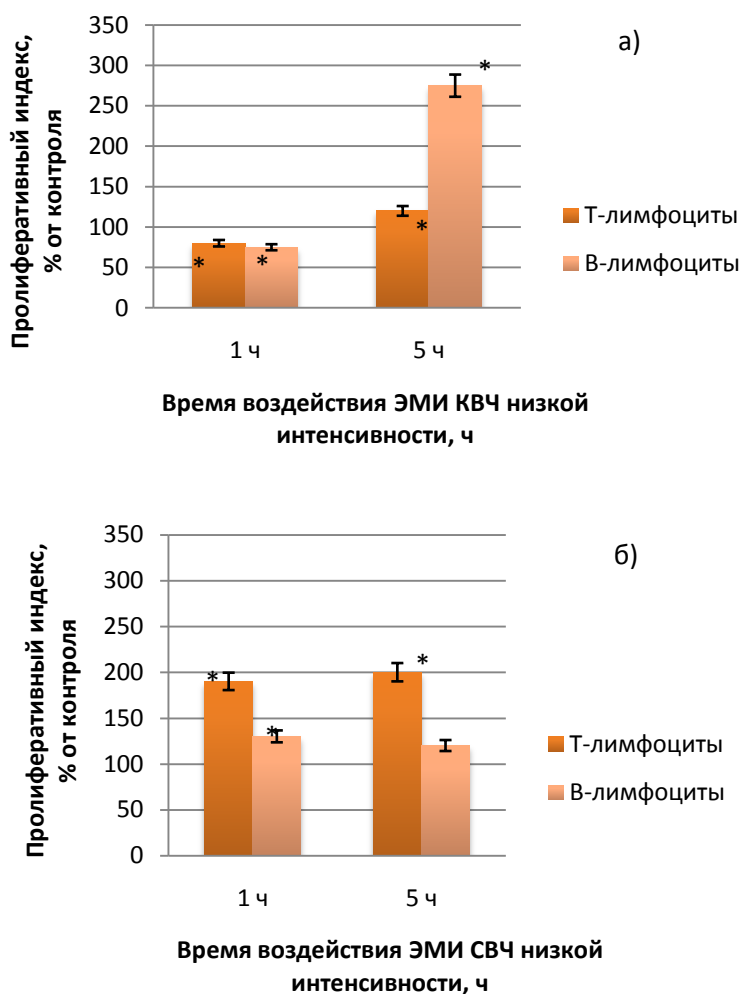


Рис. 15. Активность пролиферации В- и Т-лимфоцитов селезенки мышей при облучении *in vitro* АМ ЭМИ КВЧ (а) и ЧМ ЭМИ СВЧ (б) низкой интенсивности

Каждое значение является средним показателем для 6 мышей, для каждой из которых пролиферативную активность лимфоцитов измеряли индивидуально в 6 повторах. Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

В случае использования АМ ЭМИ КВЧ *in vitro* на протяжении 1 часа обнаружили его угнетающее действие на Т- и В-клетки, притом уровень трансформации Т-лимфоцитов достоверно уменьшался на 22 % (рис. 15 а), а для В-лимфоцитов, подверженных облучению, ЛПС-индуцированная пролиферация снижалась примерно на 25 % (рис. 15 а). Однако после 5 часового воздействия, эффект сменялся на противоположный. На рисунке 15 б показаны представлены воздействия частотно-модулированного ЭМИ СВЧ (8,15-18 ГГц, 1 мкВт/см²) *in vivo* в течение 5 ч на уровень включения радиоактивно-меченого [³H]-тимидина в стимулированные лимфоциты. Стимуляцию Т-лимфоцитов проводили, добавляя в среду конканавалин А (Кон А), а В-лимфоцитов – добавляя липополисахариды (ЛПС).

В результате измерений определено, облучение животных ЧМ ЭМИ СВЧ длительностью 5 часов приводит к двукратному возрастанию пролиферативной активности Т-лимфоцитов (рис. 15 б). На рисунке 15 б видно, что однократное облучение ЧМ ЭМИ СВЧ *in vivo* оказывало стимулирующее действие и на активность пролиферации В-лимфоцитов, но здесь эффект был не столь значительным (до 118 % от контроля). Низкоинтенсивное ЭМИ КВЧ (1 мкВт/см², 42.2 ГГц, модуляция 10 Гц) при 5-ти часовой экспозиции мышей тоже заметно активировало Т- и В-лимфоциты селезенки (рис. 15 б), наблюдалось повышение уровня пролиферации лимфоцитов в 2-3 раза относительно. Для оценки физиологической роли стимулирующего действия частотно-модулированного ЭМИ СВЧ исследовали активность пролиферации Т-лимфоцитов селезенки мышей, подвергнутых антигенной стимуляции путем внутрибрюшинного введения Кон А (*иммунизированные мыши*). На рисунке 16 представлены результаты, которые указывают, что введение митогена стимулирует активность Т-клеток, как и 5-ти часовое воздействие на животных ЧМ ЭМИ СВЧ. К тому же, выявлено, что действие этих двух факторов, вызывающих повышение пролиферативной активности Т-лимфоцитов, аддитивно. Рост уровня пролиферации Т-лимфоцитов мышей после иммунизации и увеличение количества этих клеток в селезенке коррелируют между собой. Обращает на себя

внимание то, что низкоинтенсивное ЧМ ЭМИ СВЧ, при этом заметно не влияет на изменение числа Т-лимфоцитов селезенки (рис. 17). То есть ЧМ ЭМИ СВЧ, в отличие от ЭМИ КВЧ, влияет на функциональные изменения субпопуляции Т-лимфоцитов, не затрагивая их структурные изменения (рис. 18).

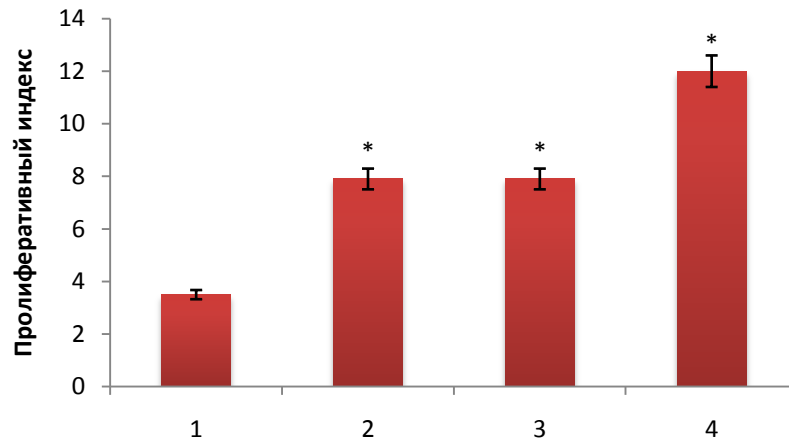


Рис. 16. Влияние воздействия ЧМ ЭМИ СВЧ в течение 5 часов на пролиферативную активность Т-лимфоцитов селезенки мышей после иммунизации

1-контроль; 2- животные, подвергнутые облучению; 3- животные, подвергнутые иммунизации; 4- животные, подвергнутые иммунизации и облучению. Каждое значение является средним для 5 мышей, для каждой из которых индивидуально провели измерение пролиферативной активности лимфоцитов в 6 повторах

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

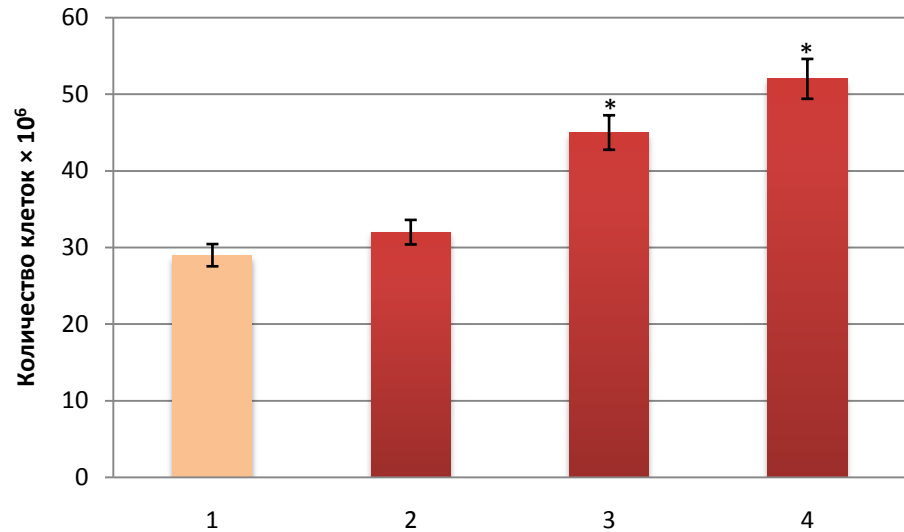


Рис. 17. Влияние ЧМ ЭМИ СВЧ на количество Т-лимфоцитов селезенки мышей после иммунизации

1-контроль; 2- животные, подвергнутые облучению; 3- животные, подвергнутые иммунизации; 4- животные, подвергнутые иммунизации и облучению. Каждое значение является средним для 5 мышей, для каждой из которых индивидуально провели измерение пролиферативной активности лимфоцитов в 6 повторах. Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

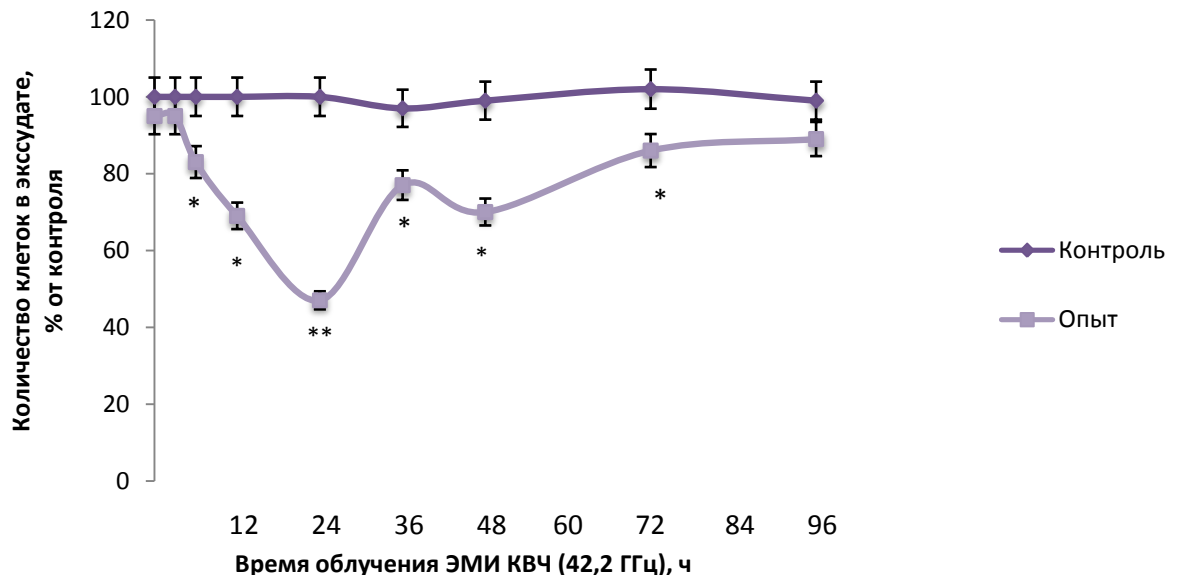


Рис. 18. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на численность популяции перитонеальных макрофагов мышей

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

3.1.4. Активность естественных киллерных клеток селезенки в условиях облучения

Естественные киллерные клетки – это популяция клеток, которые выполняют функцию так называемого «иммунологического надзора». ЕКК способствуют распознаванию на ранних стадиях и уничтожению клеток, представляющих для организма опасность, например, подверженных заражению внутриклеточными паразитами и вирусами. Для организма эти клетки являются одним из важнейших элементов защиты от раковых опухолей, а также от перехода доброкачественных новообразований в злокачественные. Таким образом при оценке способности клеточного иммунитета к сопротивлению вирусам и опухолевому росту важнейшим диагностическим признаком является именно активность ЕКК. Ранее исследователями было обнаружено, что АМ ЭМИ КВЧ (37,5 ГГц) стимулирует активность ЕКК крови при облучении клеток *in vitro* длительностью 1-2 ч. (Федорчук и др., 1992). На данном этапе работы нами было изучено влияние низкоинтенсивных ЭМИ разной природы на цитотоксическую активность ЕКК селезенки мышей. Кроме того, нами выявлено повышение активности ЕКК под действием ЭМИ СВЧ *in vitro* (рис. 19), что согласуется с данными других исследований (Федорчук и др., 1992). При этом облучение клеток ЭМИ КВЧ низкой интенсивности в течение 1 часа не приводило к изменению активности ЕКК селезенки.

Иные данные мы получили при исследовании действия на активность ЕКК селезенки низкоинтенсивного лазерного излучения. Отмечена тенденция к росту цитотоксической активности ЕКК при облучении клеточной суспензии НИЛИ 60 с. Увеличение экспозиции до 180 с вело к снижению активности этих клеток (рис. 20). Аналогичную динамику наблюдали при изучении длительного фракционированного воздействия НИЛИ *in vivo*.

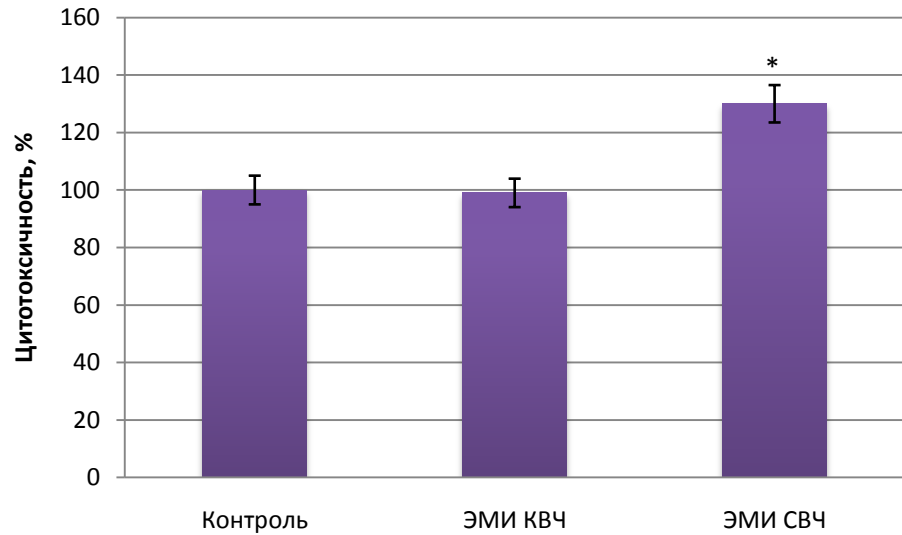


Рис. 19. Влияние ЭМИ КВЧ и ЭМИ СВЧ низкой интенсивности на цитотоксическая активность ЕКК селезенки мышей при облучении *in vitro* в течение 1 часа

Каждое значение является средним для 6 мышей, для каждой из которых индивидуально измеряли активность ЕКК в 12 повторах.

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

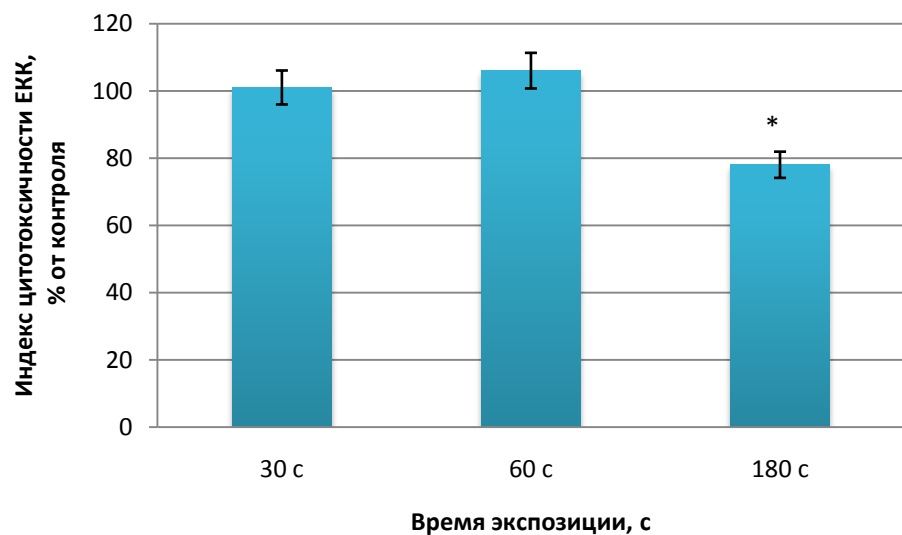


Рис. 20. Изменение активности ЕКК селезёнки под действием НИЛИ

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,01$

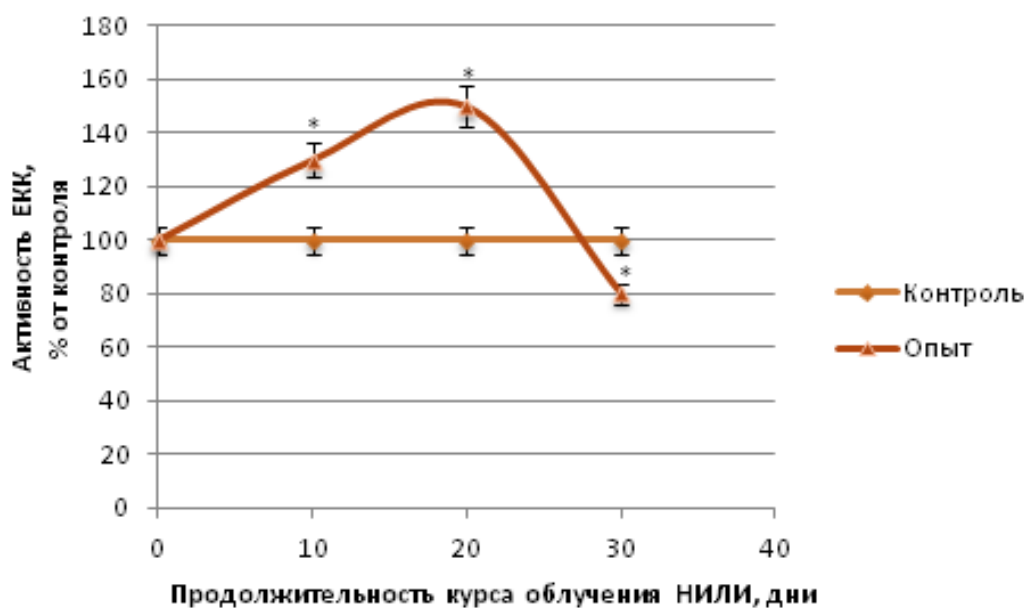


Рис. 21. Зависимость цитотоксической активности ЕКК селезенки мышей от длительности фракционированного воздействия *in vivo*.

Опыт – облучение задней лапы

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Таким образом, в результате обобщения экспериментальных данных, полученных в этой части работы, можно сделать вывод о разнонаправленности изменений функциональной активности естественных киллерных клеток селезенки при действии однократного облучения здоровых животных *in vivo* низкоинтенсивным лазерным излучением, ЧМ ЭМИ СВЧ и АМ ЭМИ КВЧ. Интересно отметить, что в случае с ЧМ ЭМИ СВЧ *in vivo* мы не выявили достоверных изменений цитотоксической активности ЕКК при экспозиции животных на протяжении 5 часов, что проиллюстрировано на рисунке 22. Стало ясно, что для проявления эффекта ЧМ ЭМИ СВЧ *in vivo* время облучения должно быть довольно продолжительным и составлять не менее 24 часов (рис. 22), в таком случае отмечается максимальная активация естественных киллерных клеток. Хотя стоит заметить, что дальнейшее увеличение продолжительности экспозиции не вызывает более интенсивного стимулирующего действия ЭМИ. Например, непрерывно 48-часовое облучение мышей приводило к тому же эффекту ЭМИ СВЧ, что и при 24-часовой продолжительности облучения

(рис. 22). Сверх того, экспозиция мышей на протяжении трех суток оказывала на ЕКК селезенки меньшее стимулирующее действие (130 % от контроля), чем при меньшая продолжительность действия электромагнитных волн. Полученные результаты указывают, что стимулирующий эффект ЭМИ СВЧ проявляется при определенной продолжительности воздействия излучения (от 5 ч до 72 ч). Понятно, что это свидетельствует о дозовой зависимости эффекта ЧМ ЭМИ СВЧ. Также возможно, полученные результаты говорят об особенностях гомеостаза естественных киллерных клеток, реализующих свою активность посредством кооперативного действия нескольких популяций клеток. Принимая во внимание указанные факты, становится очевидной необходимость последить за динамикой активности ЕКК в некоторый период после прекращения действия ЭМИ СВЧ и ЭМИ КВЧ. Результаты показали, что стимулирующий эффект воздействия ЧМ ЭМИ СВЧ сохраняется в течение 96 часов после воздействия (рис. 23), в то время как при воздействии ЭМИ КВЧ сколько-нибудь длительного эффекта не наблюдается (данные не приведены).

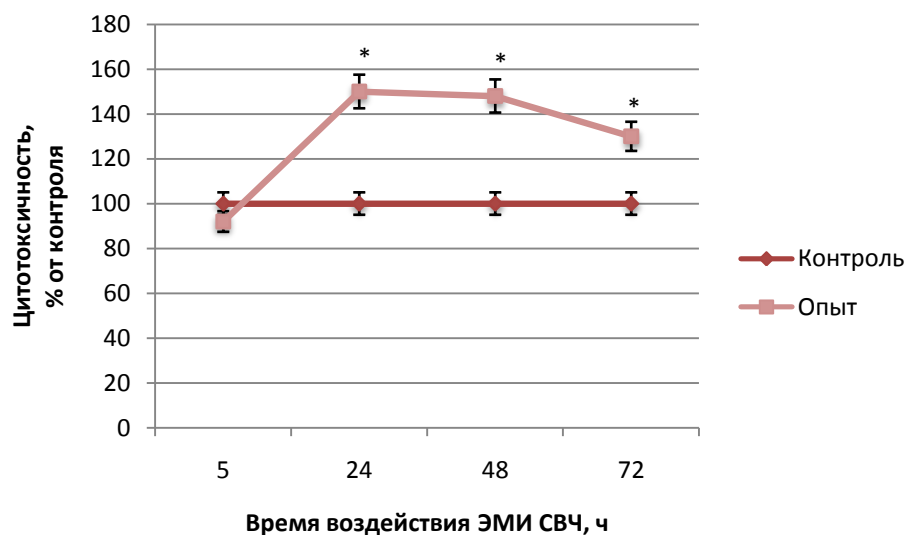


Рис. 22. Влияние действия на мышей ЭМИ СВЧ *in vivo* на цитотоксическую активность ЕКК селезенки

Каждое значение является средним для 5 мышей, для каждой из которых цитотоксическая активность ЕКК была определена индивидуально в 12 повторах

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Таким образом, становится понятной необходимость использования относительно большого периода экспозиции животных для проявления стимулирующего эффекта ЭМИ СВЧ. Тот факт, что стимулирующее действие излучений на активность ЕКК является не просто пролонгированным, но даже имеет место его усиление спустя 24 ч после окончания облучения, говорит о существовании в организме животных, подвергнутых облучению, сложных процессов межклеточного взаимодействия, которые не только обеспечивают сохранение уровня активности ЕКК, но и в дальнейшем способствуют его повышению.

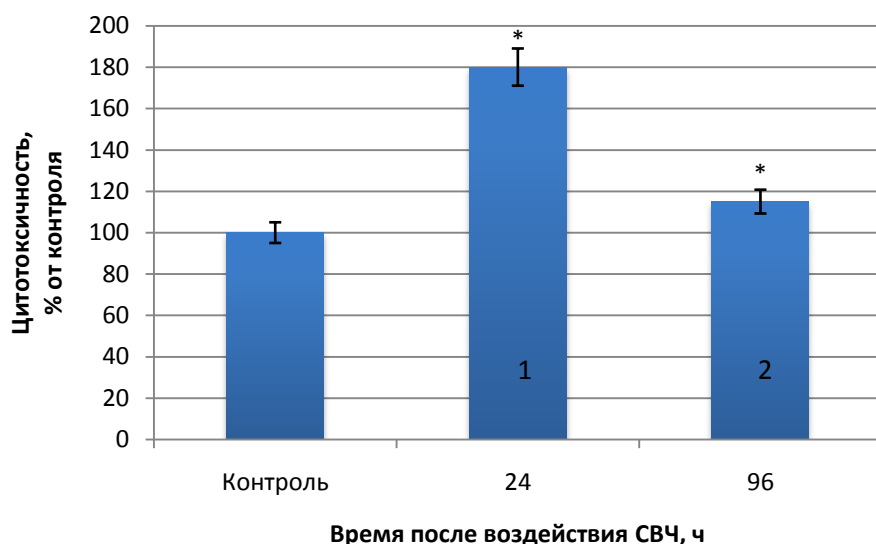


Рис. 23. Зависимость цитотоксической активности ЕКК от времени после облучения мышей ЧМ ЭМИ СВЧ

1 – время облучения животных составило 48 часов, измерение цитотоксичности ЕКК проводили через 24 часа после окончания экспозиции;
2 – время облучения животных составило 24 часа, измерение цитотоксичности

ЕКК проводили через 96 часов после окончания экспозиции

Каждое значение является средним для 3-5 мышей, для каждой из которых измерение цитотоксической активности ЕКК проводили

индивидуально в 12 повторах

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

3.2. Сезонные изменения в ответах иммунной системы на воздействие ЭМИ СВЧ у животных-гибернантов

Известно, что достаточно наличие высокого барьера у животного организма при изменяющихся внешних условиях обеспечивается нормальной жизнедеятельностью клеток и структур иммунной системы. В период зимней спячки у гибернантов происходят физиологические перестройки, требующие мобилизации всех ресурсов, в то числе, иммунитета. Способность организма таких животных проявлять адекватные защитные реакции при изменении внешних условий окружающей среды характеризует его иммунологическую чувствительность. Это причина, по которой уникальной биологической моделью для изучения ряда аспектов функционирования иммунной системы являются гибернирующие животные. В частности, они представляют интерес для исследования регуляции клеточного иммунитета. Для выяснения чувствительности к действию электромагнитных волн на разных стадиях физиологического состояния клеток, различных по уровню метаболизма большое значение имеет изучение иммунных ответов клеток гибернирующих животных после экспозиции. Для суслика нормальной является температура тела порядка 37-39 °С (Калабухов, 1956), но в период зимней спячки ее значение всего на несколько градусов превышает 0 °С. Помимо пониженной температуры для зимней спячки сусликов характерно резкое снижение метаболизма и сердечного ритма. На протяжении 15-19 дней зимой у сусликов продолжается глубокое оцепенение (баут), затем на период около суток организм возвращается примерно к нормальным показателям, происходит пробуждение животного, но оно в это время не потребляет пищу. Длиннохвостые якутские суслики относятся к истинным гибернантам, для спячки которых характерно уменьшение продолжительности баутов с приближением теплых сезонов, таким образом, в феврале периоды глубокого оцепенения длятся порядка 14 дней, а в марте – уже 6 дней. Схожая динамика характерна и для колебания температуры тела и продолжительности периодов спячки и активности. То есть температура тела

зимне спящих животных с сентября по октябрь выше, чем в ноябре-феврале, а период вхождения в оцепенение наоборот – короче (Wang, 1987). В данной работе были использованы суслики в период гибернации (январь, февраль), то есть продолжительность баутов являлась максимальной и была возможность указать середину этого периода с высокой точностью, когда нами и проводились исследования. Изучению подвергались различные физиологические состояния гибернирующих сусликов: группа 1 – состояние полного оцепенения (температура тела приблизительно 4 °С); группа 2 – состояние после помещения животных в условия комнатной температуры на 1,5-2 часа (температура тела 27 °С); 3 группа – активное состояние животных, которые в середине периода баута помещались в условия комнатной температуры на 24 часа (температура тела 35 °С). Таблица 1 содержит сведения о динамике продукции ФНО Т-лимфоцитами и макрофагами селезенки сусликов, во время гибернации в зависимости от их физиологического состояния, а также результаты воздействия ЧМ ЭМИ СВЧ низкой интенсивности *in vitro*. В результате проведенных исследований стало очевидным, что при искусственном пробуждении сусликов происходит повышение температуры тела животных с 4 °С до 27 °С, что приводит к резкому увеличению продукции макрофагами фактора некроза опухоли. Вместе с тем, уровень продукции ФНО перитонеальными макрофагами не увеличивался при последующем увеличении температуры до 35 °С вплоть до перехода сусликов в активное состояние. Из данных табл. 1 видно, что действие *in vitro* в течение 1 ч ЧМ ЭМИ СВЧ (8,15-18 ГГц, 1 мкВт/см²) повышает примерно на 56 % продукцию ФНО макрофагами, полученными из животных, температура тела которых около 4 °С. В отличие от сусликов, которые находятся в состоянии глубокой гипотермии, для животных в пробуждающемся и активном состоянии не было отмечено стимуляции синтеза ФНО макрофагами при воздействии ЧМ ЭМИ СВЧ, хотя данные клетки синтезировали довольно большие количества цитокина (79-80 пг/мл). Т-лимфоциты являются одними из основных продуцентов ФНО, помимо макрофагов, причем их разные субпопуляции выполняют эффекторные и регуляторные функции, являясь посредниками в развитии иммунного ответа

организма. Это говорит о целесообразности изучения сезонных изменений активности Т-клеток якутских длиннохвостых сусликов в различном состоянии в условиях облучения ЧМ ЭМИ СВЧ. В ходе исследований выявлено, что полученные из животных в январе-феврале Т-лимфоциты, проявляли незначительную ФНО-продуцирующую активность (концентрация ФНО около 23 пг/мл) (табл. 1). Окончание состояния гипотермии (4 °С) и переход к состоянию пробуждения (27 °С) и далее к активному (35 °С) не оказывал значительного влияния на продукцию фактора некроза опухоли Т-лимфоцитами, в отличие от макрофагов. В табл. 1 показано, что переход в более активное физиологическое состояние сопровождается не только ростом температуры тела, но и повышением чувствительности Т-лимфоцитов к ЭМИ. Причем более заметные результаты воздействия ЧМ ЭМИ СВЧ отмечаются при достижении температурой тела значений 27 °С и 35 °С. То есть измерение продукции ФНО дало представление о том, что при переходе от пониженной температуры к нормальной для двух популяций клеток животных имеет место заметная разница в изменении функционального состояния. Показано, искусственное пробуждение (то есть изменение внешних условий) провоцируют более высокий уровень ответов у перитонеальных макрофагов, чем у Т-клеток. Вообще, Т-лимфоциты в данном случае проявляют стабильность уровня синтеза ФНО, который в различных состояниях гибернантов остается почти неизменным. Говоря о чувствительности клеток к ЧМ ЭМИ СВЧ, отметим, что у Т-лимфоцитов чувствительность повышается при переходе в более активное состояние по ходу возрастания температуры тела сусликов.

Далее нами была оценена по включению [³H]-тимидина в клетки скорость пролиферации Т-лимфоцитов. Проводили сравнение пролиферативного ответа Т-клеток селезенок сусликов на конканавалин А, в результате выявлено что для лимфоцитов из пробудившихся сусликов ответ был выше, чем для лимфоцитов животных, находящихся в полном оцепенении (рис. 24).

Таблица 1

Продукция ФНО спленоцитами якутских сусликов, выделенными на разных стадиях годового цикла, при действии ЭМИ СВЧ

Концентрация ФНО, пг/мл	Время года							
	Зимний период (температура тела)			Март	Апрель	Май	Июнь	Октябрь
	4 °С	26 °С	36 °С					
Контроль	21±2,8	23±3,1	25±2,9	20±2,1	22±1,9	20±2,4	21±2,2	15±1,2
Облучение ЭМИ КВЧ (1 ч)	23±2,9	41±3,8*	40±4,0*	40±3,9*	35±2,9*	40±4,2*	40±4,8*	33±3,9*

* достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Обнаружено стимулирующее действие ЧМ ЭМИ СВЧ на пролиферативную активность Т-клеток, когда происходит переход в активное состояние из полного оцепенения. Пролиферативная активность Т-лимфоцитов, полученных из пробужденных животных, возрастала практически в 2 раза. Вместе с тем, уровень пролиферации облученных Т-клеток у сусликов в состоянии полного оцепенения (4 °С) обнаруживал лишь тенденцию к некоторому повышению. То есть, пробуждение сусликов в зимний период провоцирует резкую активацию клеточного иммунитета (повышение ФНО-продуцирующей способности макрофагов и скорости пролиферации Т-клеток в ответ на внешние воздействия), являющуюся процессом, напрямую направленным на защиту организма. Показано, что интенсивность ответа клеток на действие митогена и ЧМ ЭМИ СВЧ находится в зависимости от температурных параметров тела животного и от интенсивности метаболизма Т-лимфоцитов.

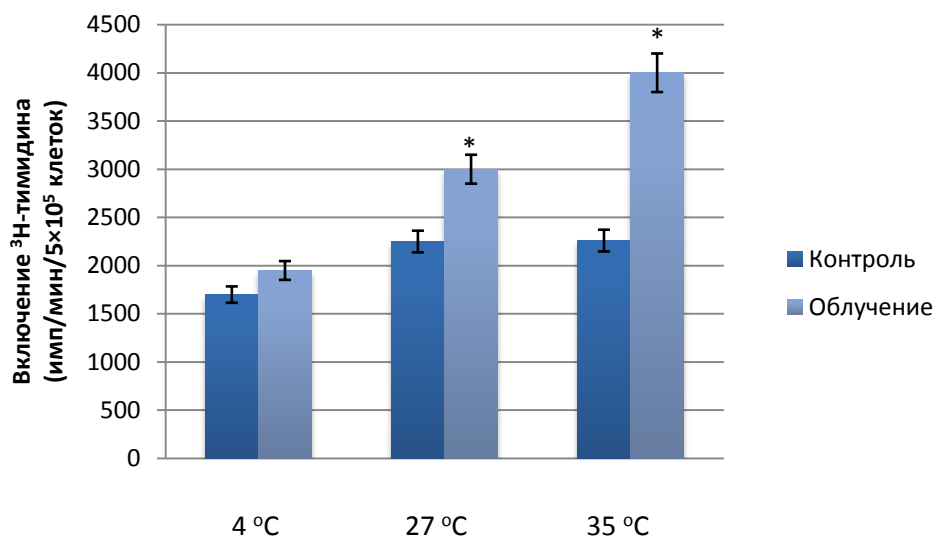


Рис. 24. Влияние облучения *in vitro* ЧМ ЭМИ СВЧ на пролиферативную активность Т-клеток селезенки сусликов в период спячки (январь-февраль) Каждое значение является средним для трех экспериментов, каждый из которых проводили с 3-4 животными

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

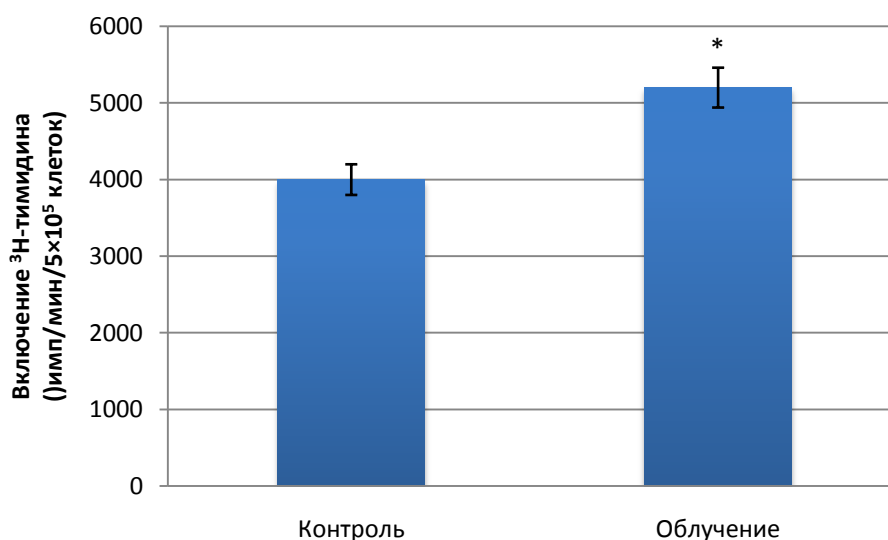


Рис. 25. Влияние облучения *in vitro* ЧМ ЭМИ СВЧ на пролиферативную активность Т-клеток селезенки сусликов в весенне-летний период (март-июнь) Каждое значение является средним для трех экспериментов, каждый из которых проводили с 3-4 животными

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Результаты, представленные на рисунке 25, являются свидетельством того, что воздействие в течение 1 часа на Т-лимфоциты частотно-модулированного ЭМИ СВЧ ведет к заметному усилению пролиферативного ответа Кон А-стимулированных клеток (5мкг/мл). При этом действие электромагнитных волн не провоцировало изменений интенсивности спонтанной пролиферации Т-лимфоцитов сусликов. Из табл. 1 видно, макрофаги, выделенные в октябре, снижали уровень продукции ФНО с 70-82 пг/мл до 18 пг/мл. То есть интенсивность продукции ФНО почти не отличалась от значений показателя для периода глубокого оцепенения, в то время как в случае с пробуждением зимой и в весенне-летний период в макрофагах клетки наблюдался очень высокий уровень продукции ФНО. В октябре был обнаружен функциональный спад иммунокомпетентных клеток, несмотря на который, облучение ЭМИ СВЧ перитонеальных макрофагов вело к росту продукции ФНО почти в два раза, что свидетельствует о том, что эти клетки являются функционально компетентными и сохраняют свойственную млекопитающим чувствительность к ЧМ ЭМИ СВЧ. В результате этой части работы можно сделать вывод, что низкоинтенсивное частотно-модулированное ЭМИ СВЧ активизирует функции иммунокомпетентных клеток, что проиллюстрировано ростом интенсивности пролиферации и индукцией продукции ФНО в указанных клетках. Физиологическое состояние гибернантов напрямую влияет на чувствительность их клеток воздействию частотно-модулированного ЭМИ СВЧ. Отметим, при воздействии электромагнитных волн в весенне-летний период ответы клеток гибернантов более выражены.

3.3. Динамика развития новообразований и изменения в иммунной системе при облучении животных-опухоленосителей

Одна из самых тяжелых патологий млекопитающих – это канцерогенез. Состояние иммунной системы организма напрямую влияет на клинический прогноз относительно этой болезни. Многие публикации содержат результаты последних десятилетий в области изучения проблемы иммунопатогенеза, который сопровождается развитием злокачественных новообразований (Inagawa et al., 1998; Booth et al., 2001; Во et al., 2001). Существует обширный выбор противоопухолевых агентов, но актуальным является поиск оптимальных путей терапии раковых заболеваний. Одним из возможных способов лечения злокачественных заболеваний является иммунотерапия, в ходе которой активируется естественный противоопухолевый потенциал организма, ведь именно состояние иммунной системы определяет, насколько успешным будет проводимое лечение. На ранних стадиях развития опухоли естественный противоопухолевый контроль осуществляют две группы неспецифических иммунных эффекторов – цитотоксические макрофаги или дендритные клетки, а также ЕКК – натуральные киллеры (Bani et al., 1995; Кузнецов, 2000). Это является причиной, по которой терапия на ранних стадиях онкогенеза должна содержать в себе процессы активации основных звеньев противоопухолевой резистентности, повышения активности ЕКК и стимуляции продукции цитотоксических агентов, в частности, NO и провоспалительных цитокинов, к которым относятся ИЛ-2 и ФНО. К тому же, необходимым составляющим лечения злокачественных заболеваний является адекватная защита клеток, участвующих в иммунном ответе организма, от «агрессивного» воздействия синтезируемых ими токсических агентов, а также противоопухолевых лекарств. Подобным защитным действием обладают БТШ (Bellmann et. al., 1996; Buzzard et. al., 1998). На данный момент обнаруженные иммуномодулирующие свойства низкоинтенсивных ЭМИ в качестве вспомогательного средства для лечения злокачественных заболеваний привели к предложению использования излучений

разной природы. В частности, много раз доказано успешное применение лазера при ФДТ и адоптивной иммунотерапии опухолей. Однако до настоящего времени не существует обоснованного способа подбора индивидуальной дозы воздействия в процессе использования электромагнитной терапии. Биологические эффекты ЭМИ часто возникают при воздействии, которые отличаются от рекомендуемых терапевтических доз в десятки и сотни в меньшую сторону. Помимо этого пока нет полной картины состояния иммунной системы больных раковыми заболеваниями, подвергаемых продолжительному курсу электромагнитной или лазерной терапии. Целью данного этапа работы было исследование влияния низкоинтенсивных ЭМИ на организм мышей с опухолевым ростом.

Характеристика модели онкогенеза. В работе были использованы мыши-опухоленосители с солидной формой асцитной карциномы Эрлиха. Продолжительность жизни животных в среднем была около 55 суток (табл. 6). Была измерена активность лимфоидных клеток опухоленосителей, в результате чего выяснено, что интенсивность и направленность иммунных ответов при росте солидной опухоли находятся в зависимости от стадии развития заболевания. На начальной стадии роста опухоли отмечалась заметная «мобилизация» защитных сил организма, то есть значительно повышалась продукция ФНО макрофагами и спленоцитами и увеличивалась его концентрация в сыворотке крови (табл. 2). К тому же, наблюдался высокий уровень экспрессии БТШ70 и БТШ90 клетками селезенки опухоленосителей (табл. 2).

Отметим, что заметного изменения количества лимфоидных клеток на на первой стадии развития опухоли не наблюдалось (табл. 2). Далее, в процессе роста новообразования при повышенной концентрации фактора некроза опухоли в сыворотке крови и высокой продукции БТШ70 (табл. 2) отмечался рост числа перитонеальных макрофагов и спленоцитов мышей-опухоленосителей, увеличение активности ЕКК, повышение продукции ФНО в спленоцитах (табл. 2). Интересно, что продукция оксида азота макрофагами мышей-опухоленосителей на 20-ый день значительно отличалась от контроля в меньшую сторону (табл. 2).

Состояние иммунной системы мышей в процессе опухолевого роста

Показатель	Вид клеток	Время после инъекции клеток АКЭ, сутки		
		10	20	30
Количество иммунокомпетентных клеток, % от контроля	Макрофаги	120	210*	195*
	Спленоциты	110	125*	120
Концентрация ФНО, % от контроля	Макрофаги	115*	125*	102
	Спленоциты	130*	178*	143*
	Сыворотка крови	159*	155*	115*
Концентрация NO, мкМ/мл	Макрофаги	27	24	82*
Цитотоксическая активность, % от контроля	ЕКК	120	213*	225*
Экспрессия БТШ70, %	Клетки селезенки	100	192*	118
Экспрессия БТШ90, %	Клетки селезенки	100	190*	49

* достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

В итоге, спустя 30 дней прослеживалось «затухание» ответов организма на опухоль, которые осуществляли макрофаги, о чем свидетельствовало резкое падение продукции NO, уменьшение пиков концентрации фактора некроза опухоли в сыворотке крови и способности перитонеальных макрофагов опухоленосителей к его продукции, наблюдающихся в конечной стадии болезни. Замечено также уменьшение синтеза БТШ (табл. 2). В этот период, видимо, Т-клеточное звено осуществляло основной противоопухолевый контроль, активируя естественные киллерные клетки, увеличивая общее количество лимфоцитов селезенки и усиливая их способность к продукции ФНО на высоких

уровнях. Но невысокий уровень защитных ответов (относительно предыдущих стадий) и сниженная экспрессия БТШ иммунными клетками (табл. 2) говорили о падении противоопухолевого потенциала в ходе роста злокачественной опухоли.

Проанализировав сведения об изменении функций иммунокомпетентных клеток при росте опухоли, можно выделить ряд важнейших признаков иммунопатогенеза. В первую очередь, появляются синтезируемые опухолевыми клетками продуктами, в результате чего подавляются функции здоровых клеток, окружающих опухоль. Очевидно, что это защитный процесс, направленный на сохранение опухоли от отторжения организмом при помощи блокировки иммунного ответа. Во-вторых, при росте опухоли происходит реакция, аналогичная той, что происходит в ответ на любую чужеродную субстанцию в условиях антигенной стимуляции. Иммунная реактивность организма хозяина при этом растет, и мобилизуется весь набор направленных на отторжение опухоли средств: цитотоксические Т лимфоциты, ЕКК, усиление продукции провоспалительных и цитотоксических факторов (Lin et al., 1994; Kurosawa et al., 1995).

Облучение ЭМИ при опухолевом росте. В предшествующих исследованиях в нашей лаборатории выявлено, что ЭМИ СВЧ низкой интенсивности при ежедневной кратковременной экспозиции, но длительном периоде применения, стимулирует синтез ФНО в клетках мышей, с опухолями и без таковых (Глушкова и др., 2002). Обнаружено, что воздействие ЭМИ СВЧ-диапазона на организм интенсифицирует его адаптивный ответ на рост опухоли, дополнительно стимулируя продукции ФНО клетками облученных животных. Отмечено, что уровень синтеза ФНО коррелирует с его накоплением в периферической крови, а также с замедлением скорости развития новообразования, о чем судят по удлинению средней продолжительности жизни животных-опухоленосителей и редукции размеров опухолей (Глушкова и др., 2002). В задачу данной части работы входило исследование влияния низкочастотных ЭМИ КВЧ и НИЛИ на состояние иммунной системы мышей с опухолевым ростом. АМ ЭМИ КВЧ с частотой 42,2 ГГц применяли при каждодневной кратковременной экспозиции.

Использование фракционированного облучения в большей мере является соответствующим условиям применения электромагнитного излучения в медицине. Животных облучали в течение 30 суток по 1,5 ч ежедневно. НИЛИ использовали также фракционированно по разработанной ранее схеме: в течение 30 суток в течение 1 мин через каждые 36 часов облучали область проекции тимуса у одной группы животных и область задней лапы (место локализации опухоли) у другой группы. Для оценки эффектов ЭМИ мы исследовали динамику изменения продукции интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-3), ФНО, NO, БТШ клетками, а также концентрацию в плазме периферической крови фактора некроза опухоли. Помимо этого, была определена динамика концентрации иммунокомпетентных клеток при воздействии излучения и опухолевом росте, скорость роста опухоли и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Фракционированное облучение АМ ЭМИ КВЧ на 20-е сутки развития новообразования достоверно угнетало синтез ФНО спленоцитами. На 30-е сутки для макрофагов выявлено достоверное снижение продукции ФНО (до 70 % от контроля) (рис. 26). То есть, изучая динамику уровня синтеза ФНО макрофагами и спленоцитами, можно говорить об эффекте угнетения продукции ФНО иммунными клетками опухоленосителей, подверженных облучению в сравнении с неподверженными.

При сравнении рисунков 26 и 27 для облученных опухоленосителей можно обнаружить совпадения между изменением концентрации цитокина в плазме и динамикой синтеза ФНО макрофагами. Разница в том, что концентрация ФНО в плазме значительно снижалась, а продукция его макрофагами почти не изменялась в сравнении с контрольной группой необлученных мышей при облучении животных-опухоленосителей в течение 10-ти дней. В ходе изучения влияния НИЛИ на синтез фактора некроза опухоли макрофагами и Т-лимфоцитами выявлено угнетение продукции ФНО макрофагами при воздействии излучения на зону тимуса на 10-й и 20-й дни эксперимента, в то время как уровень синтеза ФНО Т-лимфоцитами селезенки мышей с экспериментальными опухолями оставался неизменным в сравнении с необлученными животными-опухоленосителями (рис. 28 а). Лазерный свет оказывал разнонаправленное

действие на продукцию ФНО макрофагами и спленоцитами мышей при облучении непосредственно зоны локализации опухоли. На 10 день эксперимента (при дозе 0,036 Дж/см²) происходило снижение продукции ФНО макрофагами и повышение синтеза того же цитокина спленоцитами.

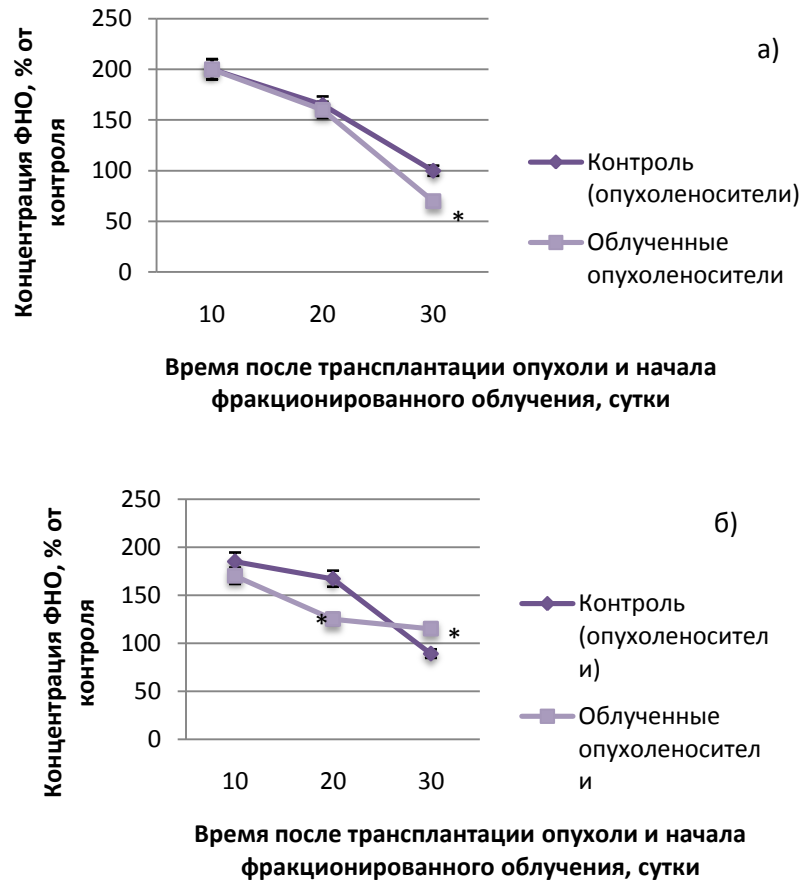


Рис. 26. Влияние АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) на продукцию ФНО клетками при фракционированном облучении мышей-опухоленосителей

а – макрофаги; б – спленоциты

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

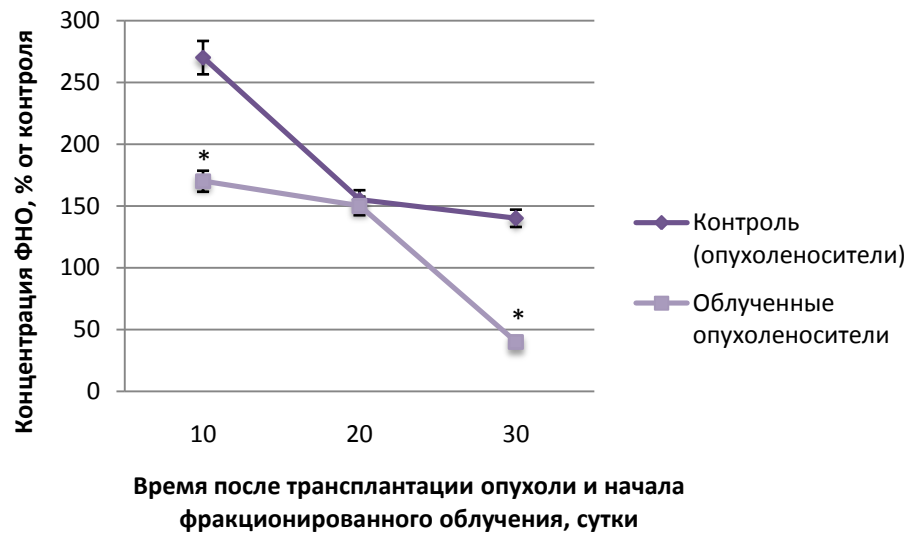


Рис. 27. Влияние АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) на концентрацию ФНО в плазме при фракционированном облучении мышей-опухоленосителей

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

На 30 день облучения ($0,1 \text{ Дж/см}^2$) снижалась ФНО-продуцирующая функция Т-лимфоцитов, а концентрация цитокина в макрофагах не изменялась (рис. 28 б). Облучение на протяжении 10 дней ($0,036 \text{ Дж/см}^2$) зон тимуса и опухоли мышей с привитой карциномой достоверно повышало концентрацию ФНО в сыворотке крови (рис. 28). Однако увеличение продолжительности курса облучения снижало уровень содержания этого цитокина в крови почти в два раза в случае с обеими моделями облучения. Интересен факт наличия сложной корреляции между способностью иммунокомпетентных клеток продуцировать ФНО и его общим содержанием в крови животных-опухоленосителей при применении лазерного света. Между динамикой содержания ФНО в крови была прямая корреляция изменением уровня его синтеза Т-лимфоцитами опытных животных (коэффициент корреляции $+0,773$) в модели облучения зоны опухоли, в то же время облучение зоны тимуса, приводило к обратной корреляции (коэффициент корреляции $-0,993$) между содержанием ФНО в сыворотке крови и его продукцией макрофагами мышей-опухоленосителей.

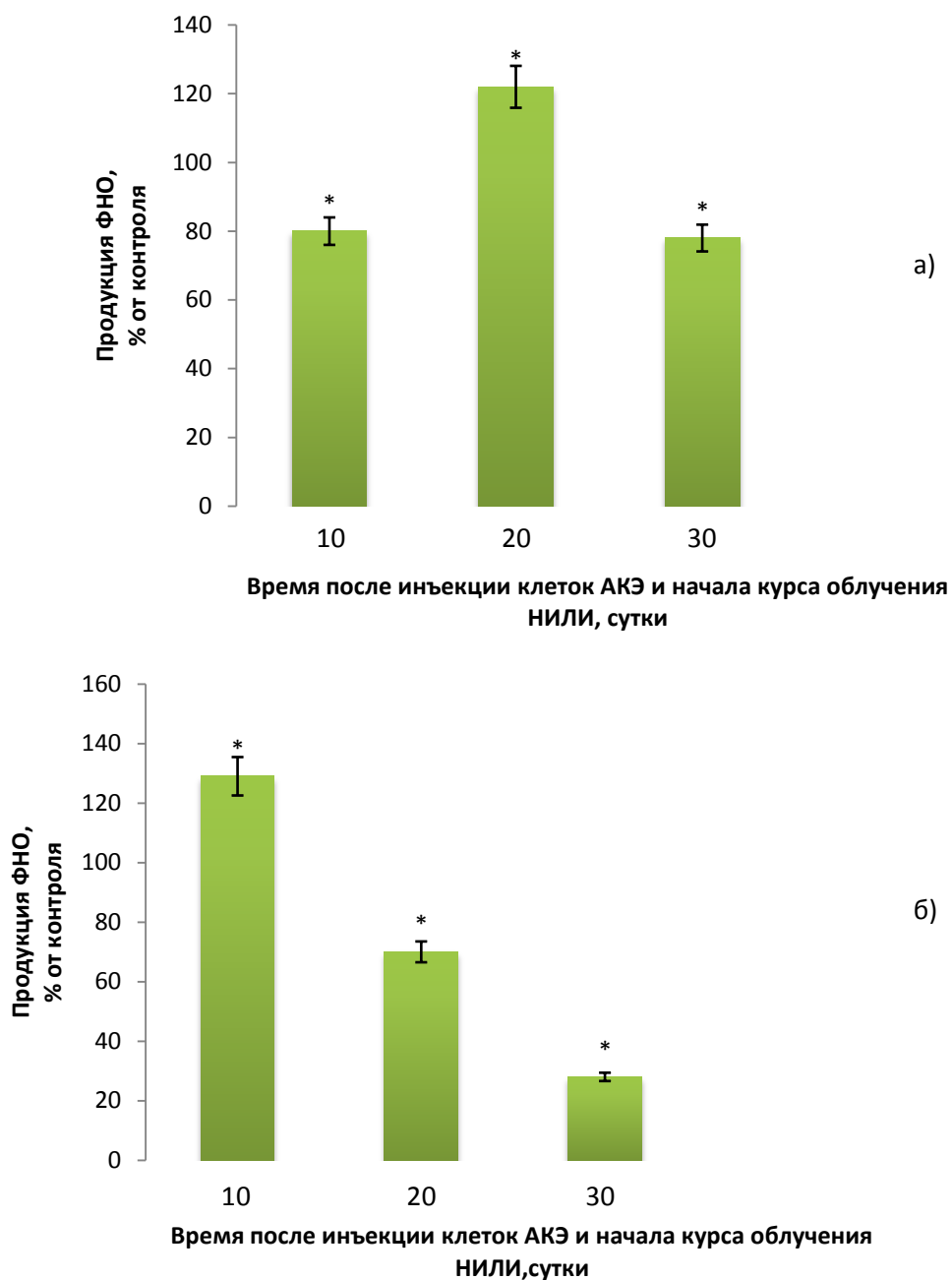


Рис. 28. Влияние НИЛИ на уровень продукции ФНО спленоцитами опухоленосителей

а) - облучение проекции тимуса, б) - облучение области опухоли.

Достоверное отличие от контроля (группы необлученных опухоленосителей) * $p < 0.05$

Продукция интерлейкинов. Полученные нами данные свидетельствуют, что воздействие АМ ЭМИ КВЧ не приводит к изменениям продукции изученных интерлейкинов, а именно ИЛ-2 и ИЛ-3 в течение всего периода наблюдений (10, 20 и 30 дней) (данные не приведены). Возможно, фракционированное облучение не вызвало достоверных изменений продукции интерлейкинов 2 и 3 их невовлеченности в совершение иммуотропных эффектов, обусловленных фракционированным облучением низкоинтенсивными АМ ЭМИ КВЧ при развитии онкологического заболевания. Отметим, что ранее также было исследовано иммуотропное влияние низкоинтенсивного ЧМ ЭМИ СВЧ (8,15-18,0 ГГц) и оно не обнаружило достоверных изменений концентрации интерлейкинов 2 и 3, при том что исследованию были подвержены как супернатанты клеток, так и плазма опухоленосителей после фракционированного облучения. В этом плане результаты более ранних исследований совпадают с результатами данной работы по изучению изменения продукции ИЛ спленоцитами облученных опухоленосителей (Глушкова, 2002). Воздействие НИЛИ на зоны тимуса и опухоли экспериментальных животных вело к росту содержания ИЛ-2 в сыворотке крови, но сохранение этого эффекта в течение всего эксперимента было отмечено лишь при облучении зоны, где была локализована опухоль (рис. 29). Стимулирующее действие низкоинтенсивного лазера в модели облучении тимуса проявлялось только после экспозиции в течение 10 дней, в то время как 30-ти дневная экспозиция приводила к значительному падению содержания ИЛ-2 в сыворотке крови опытных животных в сравнении с контролем. Интересен факт увеличения активности продукции ИЛ-2 Т-лимфоцитами только при хроническом облучении области опухоли. Повторяющееся же облучение зоны тимуса, снижало продукцию указанного провоспалительного цитокина.

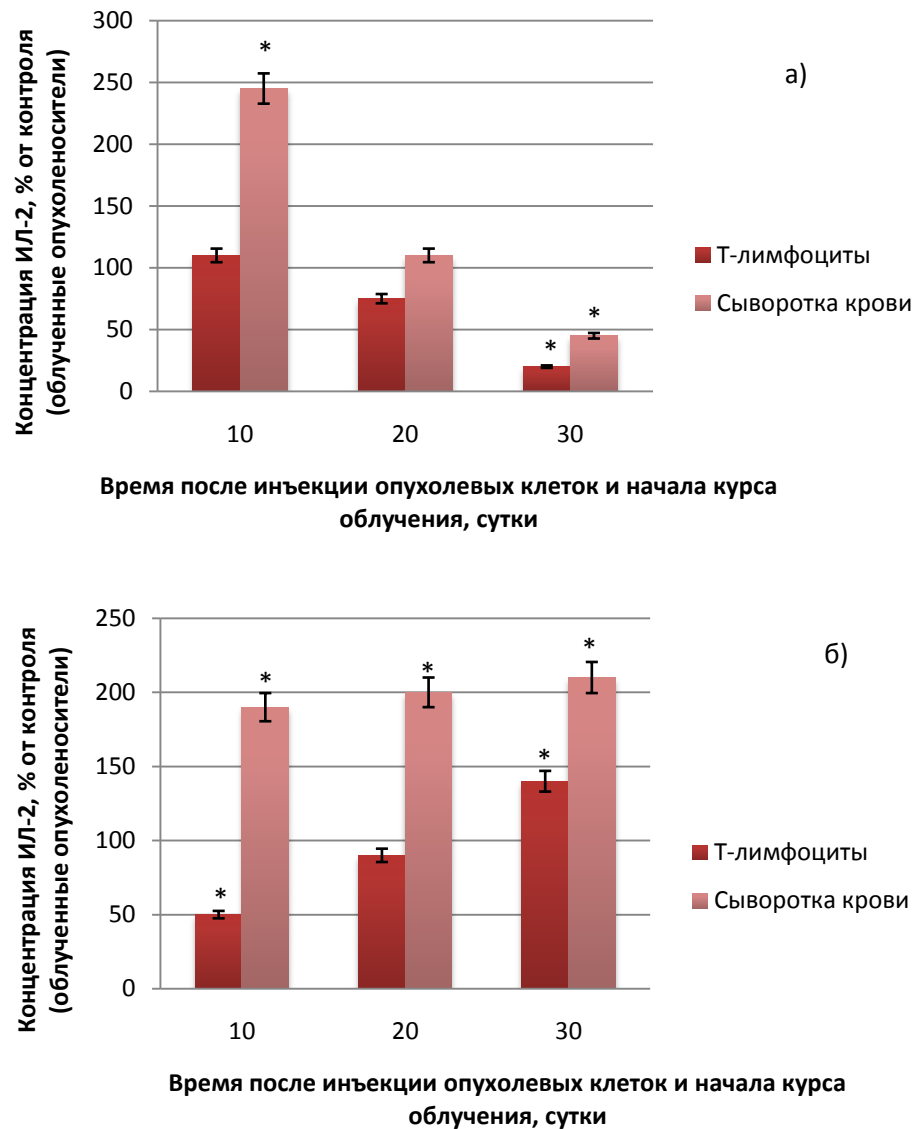


Рис. 29. Продукция ИЛ-2 Т-лимфоцитами селезенки и его концентрация в сыворотке крови мышей-опухоленосителей при облучении НИЛИ зоны тимуса (а) или зоны опухоли (б)

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$.

Продукция NO. Интересно отметить, что фракционированное облучение АМ ЭМИ КВЧ оказалось способным повысить продукцию NO только на начальной стадии развития рака. Так, 10-ти дневное фракционированное облучение животных-опухоленосителей вело к росту продукции NO макрофагами на 24 % по сравнению с необлученными опухоленосителями (рис. 30). При продлении периода фракционированного облучения до 20 дней заметных отличий продукции

NO у опухоленосителей не наблюдалось. А длительное (30 суток) воздействие приводило к значительному подавлению синтеза NO. Подавление продукции NO макрофагами животных-опухоленосителей, подвергнутых облучению, говорит о том, что при длительном воздействии АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) происходит угнетение противоопухолевой резистентности мышей с привитой карциномой.



Рис. 30. Влияние фракционированного облучения животных с экспериментальной опухолью АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) на продукцию NO ЛПС-стимулированными макрофагами
 Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Как показано на рисунке 31, облучение области тимуса мышей-опухоленосителей НИЛИ в течение 10 дней угнетало NO-продуцирующую активность макрофагов. Однако эффект менялся на противоположный на 20-й и 30-й дни с начала эксперимента. В частности, в более отсроченные периоды отмечалось стимулирующее действие на продукцию NO перитонеальными макрофагами животных-опухоленосителей, подвергнутых облучению зон тимуса и локализации солидной опухоли. Обратим внимание, что наблюдалась прямопропорциональная зависимость интенсивности стимуляции от полученной дозы при экспозиции зоны опухоли (рис. 31).

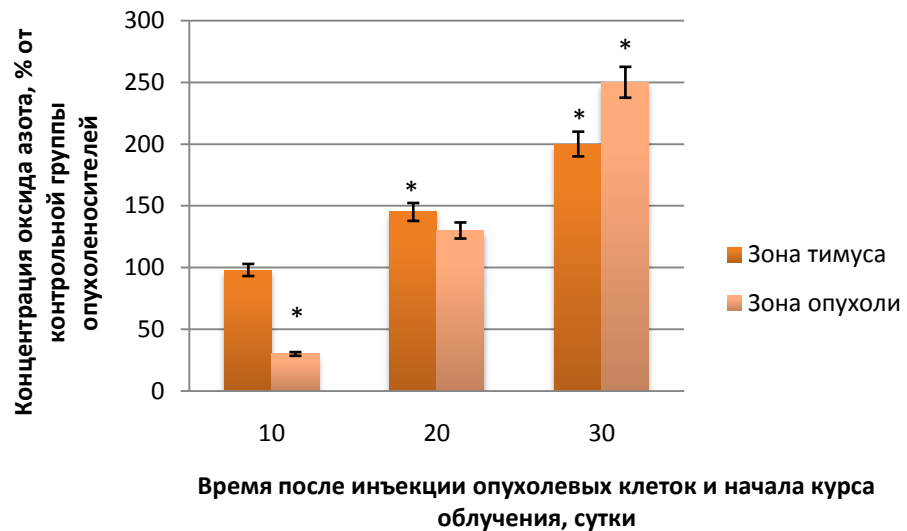


Рис. 31. Влияние НИЛИ на продукцию NO макрофагами животных-опухоленосителей при облучении областей тимуса или опухоли

Достоверное отличие * $p < 0,05$

Количество иммунных клеток. Сравнение уровня спленоцитов у здоровых мышей после облучения с контролем позволяет отметить не очень большой, но достоверной рост количества клеток на 20-й (126 %) и 30-й (136 %) дни после начала фракционированного облучения АМ ЭМИ КВЧ (рис. 32). Как описано выше, развитие опухоли провоцировало всплеск числа спленоцитов. Также немаловажно, что у всех мышей с экспериментальной опухолью визуально было заметно увеличение размеров селезенки. Как видно на рис. 32, изменение числа спленоцитов было одинаковым для опухоленосителей, подвергнутых и не подвергнутых облучению, при этом влияния ЭМИ КВЧ на количество клеток развитии опухоли не выявлено. В то время как количество спленоцитов изменялось, на число макрофагов в перитонеальном экссудате не влиял ни опухолевый рост, ни фракционированное облучение, ни совместное этих двух факторов (данные не показаны).

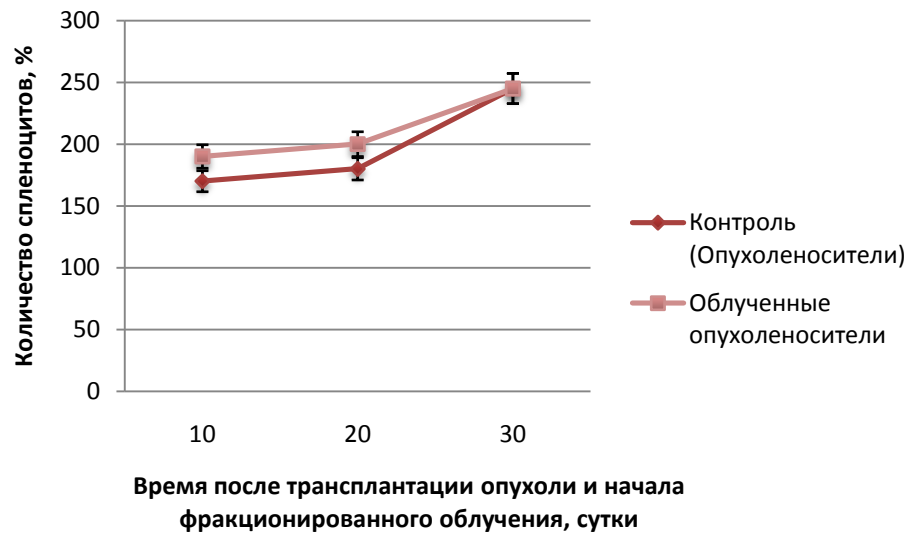


Рис. 32. Влияние длительного (фракционированного) облучения АМ ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц) на число спленоцитов у мышей с экспериментальной опухолью
За 100 % принято 120×10^6 клеток (на селезенку)
Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

При оценке влияния пролонгированного действия НИЛИ у всех исследованных групп обнаружена, в основном, депопуляция лимфоидной ткани (рис. 33). Наибольшую чувствительность при длительном действии лазерного излучения при суммарных дозах 0,072 и 0,1 Дж/см² (20-30 дни эксперимента) проявили макрофаги мышей с экспериментальными опухолями, так как количество макрофагов падало при облучении как области тимуса, так и области опухоли. Под действием лазерного света также снижалось количество клеток селезенки мышей-опухоленосителей. Облучение зоны проекции вилочковой железы вело к снижению числа спленоцитов на 20 дней экспозиции (суммарная доза 0,072 Дж/см²), а при воздействии на зону опухоли – уже на 10 день (0,036 Дж/см²).

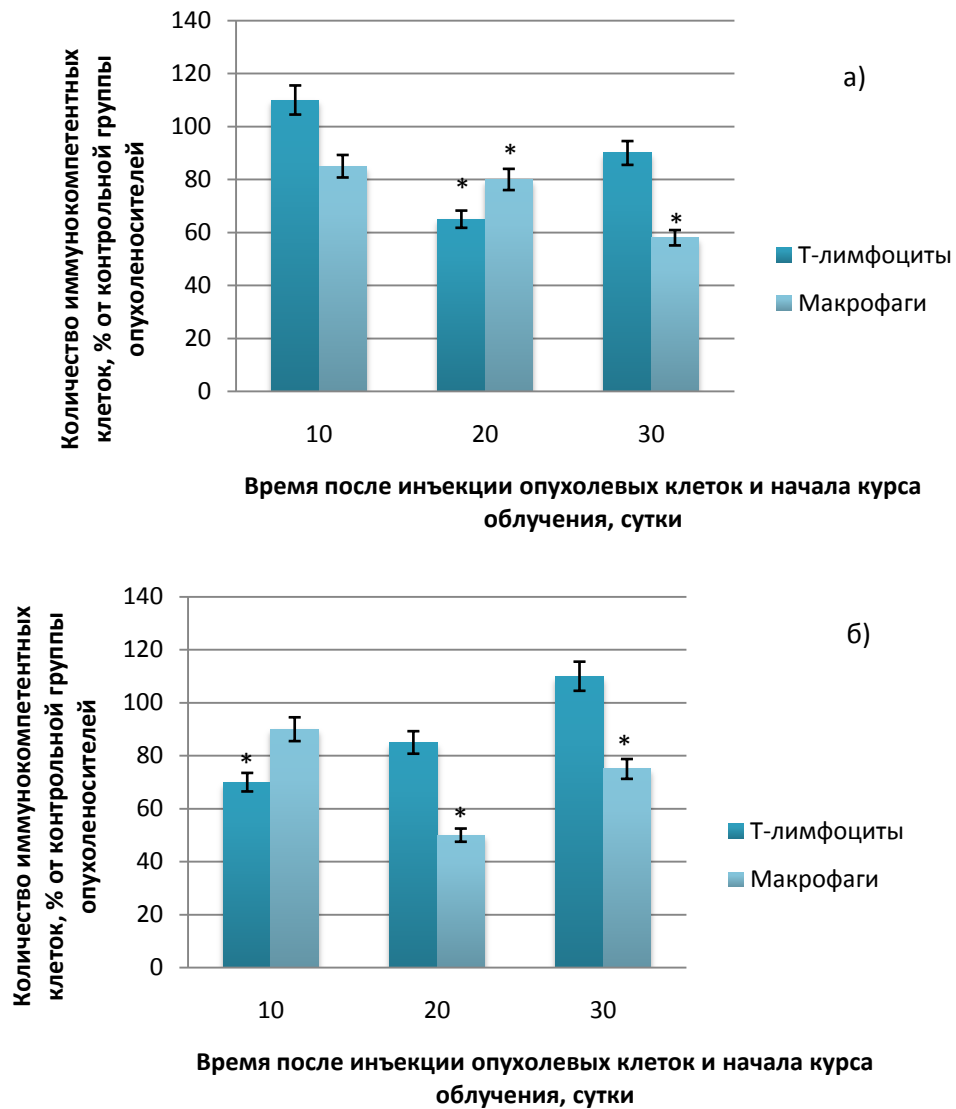


Рис. 33. Изменение количества иммунокомпетентных клеток при облучении НИЛИ областей тимуса (а) или опухоли (б) животных-опухоленосителей
 Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Пролиферация лимфоцитов. Функционирование Т- и В-лимфоцитов очень сильно влияет на ход иммунного ответа при патологиях организма. Т-клетки секретируют разнообразные цитокины, которые существенно влияют на активность пролиферации, а также на цитотоксическую активность различных субпопуляций ЕКК и лимфоцитов, опосредованно влияя тем самым на тип иммунного ответа. С учетом того, что для реакций клеточного и гуморального иммунитета млекопитающих большое значение имеет пролиферация, нами было исследовано влияние нетепловых ЭМИ на этот процесс у животных с опухолевым

ростом. На рис. 34 представлены данные, являющиеся свидетельством того, что 20-ти и 30-ти дневная экспозиция фракционированном облучением АМ ЭМИ КВЧ мышей-опухоленосителей угнетает пролиферативный ответа Кон-А-стимулированных Т-клеток. Вместе с тем максимальный супрессивный эффект электромагнитного излучения зафиксировали через 30 дней опухолевого роста. Отметим иную динамику изменения пролиферативной активности В-клеток селезенки мышей: на 30 сутки эксперимента пролиферативная активность В-лимфоцитов повышалась (рис. 35).

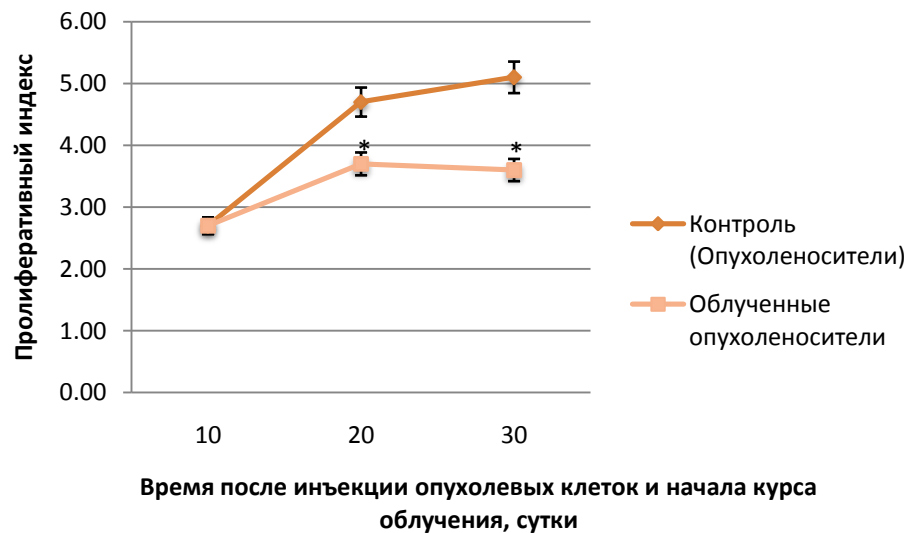


Рис. 34. Пролиферативный ответ Т лимфоцитов селезенки на воздействие ЭМИ КВЧ в условиях опухолевого роста

Каждое значение является средним для 3-5 мышей, для каждой из которых проводилось 6 повторов индивидуальных измерений

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$



Рис. 35. Проллиферативный ответ В-клеток селезенки на воздействие ЭМИ КВЧ в условиях опухолевого роста

Каждое значение является средним для 3-5 мышей, для каждой из которых проводилось 6 повторов индивидуальных измерений

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Продукция БТШ иммунокомпетентными клетками. В таблице 4 собраны результаты изучения воздействия НИЛИ на два разных участка кожи мышей с привитой карциномой Эрлиха на синтез БТШ70 и БТШ90 в лимфоцитах селезенки. Выявлено, что продолжительное повторяющееся действие излучения на зону тимуса или зону опухоли вызывало повышение экспрессии БТШ 70 и БТШ 90 в клетках селезенки мышей-опухоленосителей, подвергнутых облучению, в сравнении с не подвергнутыми (табл. 2). Выше показано, что при развитии опухоли наблюдали интенсификацию синтеза БТШ70/90 и дальнейшее снижение интенсивности на протяжении 30 суток (табл. 2). Применение пролонгированного воздействия НИЛИ на мышей не изменяло этой динамики, однако усиливало наблюдаемый эффект (табл. 3), что свидетельствует о дополнительном стрессирующем воздействии ЭМИ.

Таблица 3

Влияние облучения зон тимуса и опухоли в ходе опухолевого роста на динамику продукции БТШ90 и БТШ70 клетками селезенки мышей

Время после инъекции опухолевых клеток, сутки	Продукция белков теплового шока, % от контроля			
	Зона тимуса		Зона опухоли	
	БТШ90	БТШ70	БТШ90	БТШ70
10	100	100	100	100
20	276*	238*	317*	268*
30	177*	85	269*	221*

* достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Цитотоксическая активность ЕКК. Естественные киллерные клетки относят к популяции лимфоцитов, называемой резидентной. Указанные клетки участвуют почти во всех иммунных реакциях: регулируют процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, элиминируют опухолевые и вирусинфицированные клетки. Для противоопухолевого иммунитета имеют большое значение указанные регуляторные и эффекторные функции естественных киллерных клеток, а именно, они важны для предотвращения спонтанного образования опухолей и распространения метастаз в животном организме (Lanier, 2001; Berke, 1994). В связи с этим, была необходимость изучения динамики цитотоксической активности ЕКК в ходе опухолевого роста под действием низкоинтенсивного ЭМИ. Полученные нами результаты по цитотоксической активности естественных киллеров здоровых мышей согласуются с данными других исследователей. Сверх того, у интактных животных активность ЕКК селезенки практически не изменялась (23-26 %) на протяжении всего периода исследования. Это подтверждает высокую чувствительность радиоиммунологического метода, и указывает, что используемая линия мышей генетически однородна. В ходе развития иммунного ответа, который направлен на отторжение опухоли, резко повышается

цитотоксическая активность ЕКК (+ 43%), которые были получены из селезенок животных после 10 дней опухолевого роста. Интересен тот факт, что через 20 суток роста опухоли цитотоксическая активность ЕКК падала на 29%, при этом оставалась довольно высокой в сравнении с контролем. Действие АМ ЭМИ КВЧ заметно не изменяло цитотоксическую активность естественных киллеров, полученных из животных после 10 дней развития опухоли. С увеличением продолжительности облучения животных с экспериментальной опухолью отмечено угнетение повышенной цитотоксичности ЕКК, которые подверглись активации при развитии опухоли. Это было показано через 30 дней после начала экспозиции животных-опухоленосителей, когда активность естественных киллеров заметно падала с 43 до 28 % (рис 36).

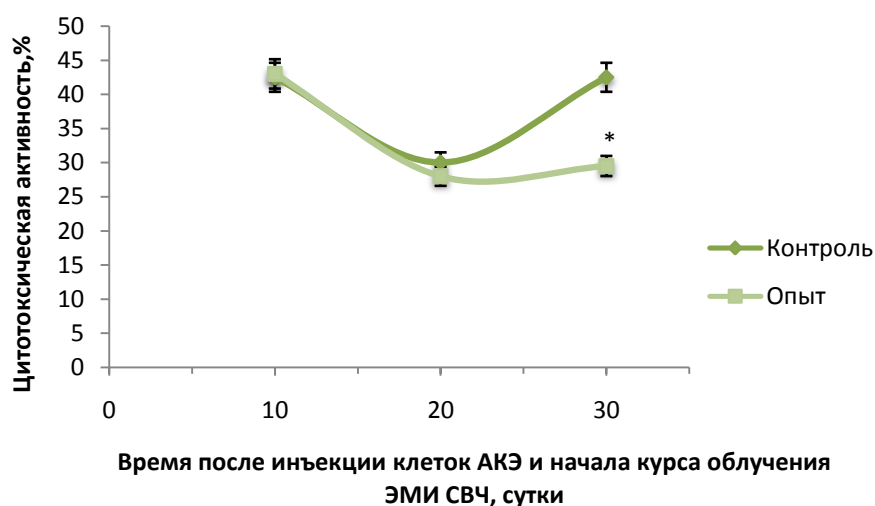


Рис. 36. Влияние низкоинтенсивного ЭМИ КВЧ на уровень цитотоксичности ЕКК селезенки опухоленосителей

Соотношение эффекторных клеток к мишеням 25:1

Достоверное отличие от контроля (группа необлученных опухоленосителей) * $p < 0,05$

То есть на протяжении всего периода исследований рост опухолей повышал активность ЕКК, что может быть рассмотрено в качестве адаптивного ответа организма, направленного на уничтожение клеток опухоли. Полученные

результаты свидетельствуют, что использование АМ ЭМИ КВЧ низкой интенсивности угнетает реакции клеточного иммунитета организма, направленные против развития опухоли, если в качестве критерия рассматривать активность естественных киллерных клеток. Как видно на рисунке 37, при действии излучения на тимус животных-опухоленосителей через 10 дней после начала эксперимента практически полностью была подавлена цитотоксическая активность естественных киллеров, на 20-й день она частично восстанавливалась, а уже к 30-му дню активность была равна контролю. Похожая динамика была отмечена при действии НИЛИ на зону задней конечности мышей с привитой карциномой Эрлиха, но активность ЕКК на 10-й день курса ЛТ снижалась не столь значительно, а через 30 дней индекс цитотоксичности естественных киллеров еще был достоверно снижен (рис. 37). На последующих стадиях опухолевого роста активность ЕКК животных, подверженных облучению, почти возвращалась к уровню активности естественных киллеров у необлученных опухоленосителей. Следует отметить, что длительное фракционированное облучение опухоленосителей вызывало истощение популяции перитонеальных макрофагов (рис. 38).

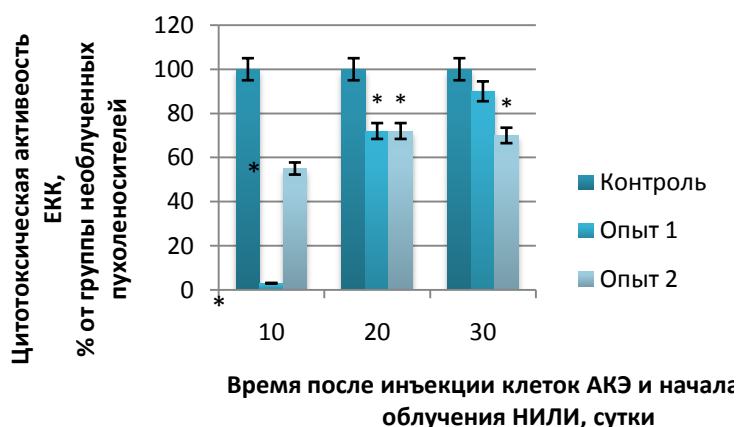


Рис. 37. Влияние НИЛИ на уровень цитотоксичности ЕКК селезенки опухоленосителей. Контроль - необлученные опухоленосители, опыт 1 - облучение проекции тимуса, опыт 2 - облучение области опухоли. Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

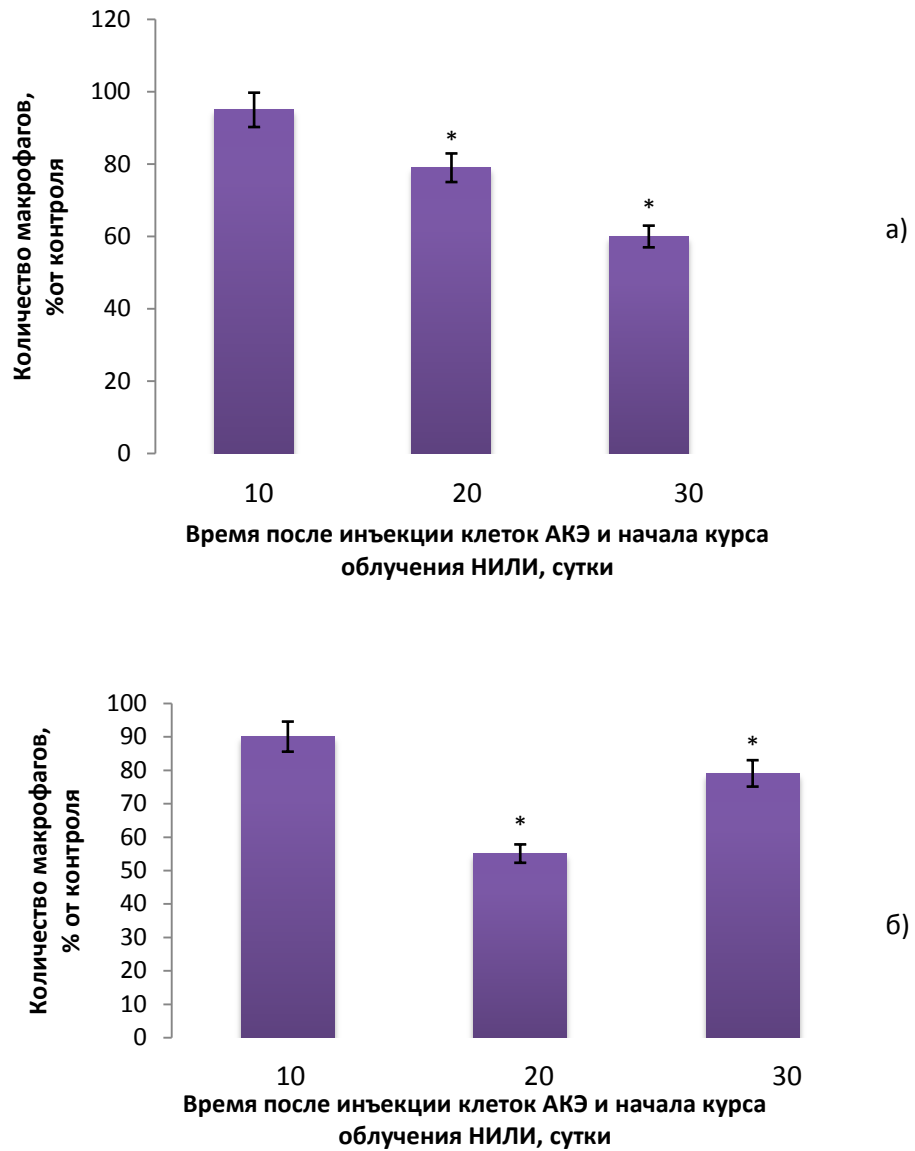


Рис. 38. Влияние НИЛИ на численность популяции перитонеальных макрофагов при опухолевом росте.

(а) – облучение области тимуса, (б) – облучение задней лапы
 Достоверное отличие от контроля (группы необлученных опухоленосителей) * $p < 0,05$

Динамика развития рака. Прямой критерий оценки влияния облучения низкоинтенсивным ЭМИ есть продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Нами показано отсутствие достоверного изменения продолжительности жизни при длительном фракционированном облучении АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) мышей с привитой карциномой Эрлиха.

Например, для не подвергнутых облучению животных средняя продолжительность жизни составила $49,6 \pm 5,8$, а для облученных опухоленосителей – $47,2 \pm 5,6$ дней. Подчеркнем, для указанной модели канцерогенеза примерное время начала гибели животных приходилось на 20-й день с момента введения клеток карциномы. Это позволяет предположить, что как минимум на протяжении первых 20-ти дней в организме животных с привитой карциномой происходили направленные на ее отторжение процессы. Действительно, продукция ФНО в клетках повышалась именно в этот период, также указанный цитокин активно накапливался в плазме крови. Увеличенная же продукция NO наблюдалась во время всего периода наблюдения. Необходимо отметить, что через 30 дней после трансплантации опухоли ФНО-продуцирующая активность в макрофагах падала до контрольных значений, а синтез макрофагами оксида азота был повышенным. Таким образом, основные клетки, продуцирующие антираковые гуморальные факторы, то есть неопухолевые макрофаги в начальный период роста опухоли отличались повышенным синтезом ФНО, а позднее они активнее секретировали NO. Ранее было проведено исследование влияния ЭМИ СВЧ (8,15-18,0 ГГц) низкой интенсивности на продолжительность жизни мышей с экспериментальной опухолью, которое выявило, что данное излучение оказывает значительное корректирующее действие. Фракционированное облучение животных с экспериментальными опухолями вызывало увеличение средней продолжительности жизни, которая составляла для облученных опухоленосителей $63 \pm 7,1$ день, в то время как для необлученных – $44 \pm 5,8$. Также наблюдалось продление периода, за который все мыши с привитой карциномой погибали, он составил 57 и 81 день для облученных и необлученных животных соответственно (Глушкова, 2002).

В таблицах 4 и 5 представлены полученные нами ранее данные о влиянии лазерного излучения низкой интенсивности на величину опухоли и продолжительность жизни животных-опухоленосителей при воздействии на области вилочковой железы или опухоли (Черенков и др., 2006). Отмечено, что при хроническом облучении зоны опухоли ускоряется рост опухолевой ткани.

Также замечена следующая тенденция: у животных, облученных в зоне опухоли, уменьшалась средняя продолжительность жизни в сравнении с необлученными опухоленосителями. При действии излучения на зону тимуса скорость роста опухоли и продолжительность жизни мышей-опухоленосителей не претерпевали достоверных изменений (табл. 5).

Таблица 4

Изменение скорости роста опухоли под действием НИЛИ

Время после трансплантации опухоли и начала курса облучения НИЛИ, сутки	Размер опухоли, см ³		
	Необлученные опухоленосители (контроль)	Облучение зоны тимуса	Облучение зоны опухоли
17	8,0	10,0*	12,5
22	11,0	13,0*	16,0
25	15,0	27,0*	23,0*
29	25,5	26,0	27,5
33	25,0	28,0	28,0
36	25,5	32,5*	31,0*
40	24,0	33,0*	36,0*
44	26,0	21,0*	35,5

* достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Таблица 5

Влияние НИЛИ на продолжительность жизни животных-опухоленосителей

	Группы животных-опухоленосителей		
	Необлученные опухоленосители (контроль)	Облучение зоны тимуса	Облучение зоны опухоли
Средняя продолжительность жизни, сутки	54,9±10	51,9±12,4	45,5±9,5*
Средняя продолжительность жизни, % от контроля	100,0	94,6	82,9*

* достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Имеются данные о стимулирующем действии НИЛИ на лимфатические узлы и вилочковую железу (Бугаева и др., 2003), несмотря на это, при действии излучения на зону тимуса нами 10-ый и 20-ый дни отмечено угнетение синтеза ФНО и активности естественных киллеров, а на 30-ый день снижалась концентрация ФНО в сыворотке крови и уменьшалась продукция ИЛ-2 у животных с экспериментальной опухолью, подвергнутых облучению. Даже учитывая некоторое стимулирующее действие на продукцию ФНО и активность ЕКК на поздних стадиях развития опухоли, организм животных с экспериментальной опухолью к этому моменту был столь ослаблен, что это не оказывало существенного влияния на эффективность противораковой защиты. Сверх того, облучение области опухоли приводило к серьезному угнетению почти каждое звено противоопухолевой защиты в начальный период канцерогенеза, когда адекватный противораковый ответ имеет наибольшее значение в устойчивости организма к патогенному действию злокачественного роста. Так, через 10 дней после начала эксперимента действие излучения на место локализации опухоли вызывало достоверное уменьшение продукции NO и фактора некроза опухоли макрофагами, снижению секреции ИЛ-2 и экспрессии белков теплового шока 70 и 90 в клетках селезенки, угнетение активности естественных киллеров и редукцию общего числа спленоцитов. Состояние противораковой защиты через 30 дней с момента начала облучения НИЛИ было не менее угнетенным: общая концентрация ФНО в сыворотке крови и его продукция клетками селезенки снижались, невысоким оставался и уровень активности ЕКК, при этом продукция NO макрофагами мышей резко усиливалась, что на поздних стадиях опухолевого роста есть один из факторов, стимулирующих прогрессию опухоли (Jekins et al., 1995; Зенков и др., 2001). В данных исследованиях показана различная динамика развития иммунных ответов и разная степень участия популяций клеток в формировании ответов на клетки опухоли и действие электромагнитного излучения. Видимо, основную биологическую роль в исследованных реакциях иммунитета в процессе роста опухоли и при действии ЭМИ играет популяция Т-хелперов (Th). Как известно, существует две субпопуляции Th-клеток CD4⁺,

различие которых заключается в профилях цитокинов, которые они синтезируют: Th1 и Th2 (Abbas et al., 1996). Связанные с воспалением цитокины (ИФ- γ и ФНО- α) секретируются Th1-клетками, стимулирующими клеточный иммунный ответ (Fearon et al., 1996). Напротив, Th2-клетки способствуют пролиферации В-лимфоцитов и их дифференцировке в антителообразующие клетки, а также синтезируют интерлейкины 4, 5, 6, 9, 10, 13. Можно сказать даже больше, отмечено, что выделяемые клетками Th1-типа цитокины, а именно ИФ- γ и ИЛ-12 способны угнетать активность Th2-клеток, так же, как цитокины Th2-клеток, в частности ИЛ-10, способствуют подавлению Th1-типа иммунного ответа (Akira et al., 1993; Constant et al., 1997; Matar et al., 2002). То есть преобладание в организме какого-то из этих иммунорегуляторных цитокинов может оказать значительное влияние на ход иммунного ответа. В данном исследовании нами выявлен существенный рост интенсивности пролиферации Т-лимфоцитов с одновременным угнетением активности В-лимфоцитов через 10 дней после начала облучения. Больше того, такая длительность экспозиции здоровых животных также подавляла цитотоксическую активность естественных киллеров. Предполагаем, что Th1-клетки, которые продуцируют некоторые способные подавлять пролиферацию В-клеток цитокины, опосредуют этот биологический эффект ЭМИ. В более ранних наших исследованиях выявлено, что АМ ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц, АМ 60 Гц, 31 мВт/см²) может оказывать стимулирующий эффект на пролиферацию и синтез ИФ- γ CD4⁺ Т-лимфоцитами, в то время как уровень ИЛ-10 оставался неизменным у животных, подвергнутых облучению (Makar et al., 2003). Показано также, что действие излучения в течение 3-х дней на иммуносупрессивных животных активирует экспрессию высокоаффинного рецептора к интерлейкину-2 (IL-2R, CD25) на CD4⁺ Т-лимфоцитах. Интересно отметить, что при экспозиции здоровых животных наблюдалось резкое падение пролиферативной активности Т-лимфоцитов и при этом усиление интенсивности иммунного ответа В-клеток. Вероятно, приблизительно через 20 дней после начала облучения здоровых животных АМ ЭМИ КВЧ в их организме иммунный ответ перестраивается с Th1-типа на Th2-тип, при котором подавляются реакции

клеточного иммунитета, а именно, угнетается цитотоксическая активность ЕКК. Это доказывает следующий факт: на 30-й день экспозиции отмечено мощное повышение активности пролиферации Т- и В-клеток, с одновременным падением активности естественных киллеров. Видимо, ЭМИ при длительном воздействии способствуют активации Th2-клеток, секретирующих различные цитокины, например, интерлейкины 10, 4, 13 и 14. Из литературных данных известно, что ИЛ-4 и ИЛ-10 присущи сильные регуляторные функции. Так, ИЛ-4 запускает пролиферацию Т-лимфоцитов, способствует дифференцировке Th2-клеток и тем самым активизирует рост В-лимфоцитов и образование антител (Пол и др. 1987). Существуют доказательства того, что ИЛ-4 совместно с ИЛ-10 являются ингибиторами синтеза провоспалительных цитокинов, например, ИЛ-1, ИФ- γ , ФНО- α , которые главным образом продуцируются макрофагами, Т-клетками и естественными киллерными клетками (Vassalli, 1992; Ройт и др. 2000). В конечном итоге в наших экспериментах функциональная активность ЕКК спленоцитов животных, подвергнутых облучению, была подавлена. К тому же значительно снижался уровень секреции ФНО- α в Т-лимфоцитах селезенки и перитонеальных макрофагах (Новоселова и др., 2002). Известно, что при подавлении активности естественных киллерных клеток перед трансплантацией опухолевых клеток отмечается угнетение синтеза NO в макрофагах животных с экспериментальной опухолью, которое ликвидируется при введении ИФ- γ (Abe et al., 1998). Из вышесказанного следует, что выявленные нами закономерности динамики синтеза NO и активности естественных киллерных клеток согласуются с ранее выявленными фактами и доказывают, что макрофаги, как и естественные киллеры – это важные компоненты, отвечающие за ранний ответ организма на развитие опухоли. При сравнении этих данных с пролиферацией лимфоцитов, обнаруживается обратная корреляция между активностью естественных киллеров и пролиферацией В-клеток. Эта корреляция напрямую была связана с активностью естественных киллерных клеток, так как известно, что ЕКК обладают способностью к секреции ИФ- γ , играющего значительную роль в иммунном ответе и его регуляции, так как в ходе его развития этот интерферон

является положительным сигналом регуляции по механизму обратной связи (Stark et al., 1998). ИФ- γ является активатором для макрофагов и ЕКК, но в то же время он ингибирует пролиферацию Th2-лимфоцитов и В-клеток. Наиболее явно эту корреляцию можно проследить через 20 и 30 дней с момента начала опухолевого роста. Например, в то время как через 20 дней после трансплантации опухоли активность естественных киллерных клеток падала, пролиферация В- и Т-лимфоцитов повышалась. Но при дальнейшем развитии опухоли наблюдался рост цитотоксической и пролиферативной активности ЕКК и Т-клеток и резкое снижение ниже нормы уровня бласттрансформации В-лимфоцитов. Отметим, что на 10-ый день опухолевого роста обнаружено, что пролиферация Т-лимфоцитов селезенки угнетается. Это соответствует данным Рейзера и сотрудников, которые выявили, что у мышей-опухоленосителей пролиферацию Т-клеток подавляется оксидом азота (Reizer et al. 1996). Также полученные в нашем исследовании результаты не находятся в противоречии с опубликованными ранее данными о том, что перитонеальными макрофагами животных с экспериментальными опухолями продуцируется NO в повышенных количествах, и именно оксид азота оказывает на пролиферацию Т-клеток подавляющее действие (Новоселова и др., 2002). Интересно, что на фоне снижения уровня пролиферации в селезенке мышей с трансплантированной опухолью на 10-й день росло число Т-клеток. Это явление находит объяснение в увеличении времени жизни Т-лимфоцитов, что ранее было продемонстрировано для Т-лимфоцитов инфильтрата (Reizer et al., 1996). К тому же, известно, что выживаемость Т-клеток повышается под влиянием ИЛ-9 – лимфокина, секретируемого Th2-клетками, активированными CD4⁺ (Cohen, 1991). Из вышесказанного можно сделать вывод, что в период опухолевого роста в животном организме, вероятно, происходят изменения в иммунном ответе, примечательно, что в начале развития опухоли, видимо, преимущество у гуморального иммунного ответа (Th2), а на последней стадии канцерогенеза преобладает иммунный ответ клеточного типа (Th1). С учетом распространения применения электромагнитных волн в клинической практике, в данной работе было проверено, насколько возможно использование этих частот

для изменения иммунных реакций клеток животных с экспериментальными опухолями. При выяснении чувствительности здорового организма на действие ЭМИ мы обнаружили признаки как стимулирующего эффекта излучения на клеточный иммунитет, так и угнетающее действие на иммунокомпетентные клетки. Необходимо заметить, что эти изменения часто зависели от длительности фракционированного воздействия. Предположительно активация В-клеточного иммунного ответа происходит по причине вызываемого излучением угнетения функциональной активности естественных киллерных клеток и Т-лимфоцитов. Значительное падение уровня Т-лимфоцитов на 20 и 30 день после начала курса облучения и, как следствие, характерное для иммунодепрессивных состояний уменьшение соотношения Т/В-клеток говорит о том, что клеточный иммунитет подавляется. Анализ результатов данной работы позволяет сделать вывод, что длительное применение низкоинтенсивного ЭМИ угнетает реакции антиракового иммунитета животных с трансплантированными опухолями. В частности, хотя однократное воздействие несколько активировало иммунную систему опухоленосителей, при хроническом облучении противоопухолевый потенциал организма не повышался. Важно, что при хронической экспозиции снижение сопротивляемости организма опухолевому росту приводило к ускорению роста опухолей и снижению продолжительности жизни опухоленосителей. Данные настоящего исследования не являются поводом для оптимистического прогноза использования ЭМИ в качестве противоопухолевого инструмента. Несмотря на это ЭМИ в сочетании и другими терапевтическими методами на практике ведет к неплохим результатам. Так, например, НИЛИ является инструментом фотодинамической терапии при лечении разных злокачественных болезней (Антонов и др., 1990; Mito, 1999; Chen et al., 1999, 2003), а также применяется в адоптивной лазерной иммунотерапии (Антонов и др., 1990; Головизин, 1995) или лазерном экстракорпоральном облучении крови пациентов. Тем не менее, в настоящей работе продемонстрировано, что воздействие длительного хронического облучение НИЛИ или ЭМИ КВЧ на мышей с солидными опухолями снижает естественный противоопухолевый потенциал, способствуя

развитию новообразования и вызывая тенденцию уменьшения средней продолжительности жизни животных с экспериментальными опухолями. Однако, ЭМИ на протяжении нескольких суток с момента воздействия излучения оказывает стимулирующее действие на звенья противоопухолевого иммунитета. Эти данные говорят о перспективности продолжения исследований в этой области, причем поиски должны быть проведены с точки зрения изучения как первичных механизмов взаимодействия ЭМИ с биологической системой, так и оптимизации условий и параметров электромагнитной терапии

3.4. Возможные механизмы действия низкоинтенсивных ЭМИ и регуляция ответа иммунной системы на ЭМИ

Несмотря на наличие широчайшего спектра биологических эффектов низкоинтенсивных электромагнитных излучений на различных уровнях организации живой материи, вопрос о механизме их действия остается открытым. Исследования, проведенные нами, указывают на стрессовый характер ответа клетки и организма на низкоинтенсивные ЭМИ. Основанием для такого предположения послужило обнаружение значительного дозозависимого повышения продукции белков теплового шока семейства Hsp70 в клетках иммунной системы мышей при действии НИЛИ и ЭМИ СВЧ. Кроме этого нами было обнаружено повышение продукции некоторых цитокинов при действии излучений низкой интенсивности, а также определены дозы излучений, оказывающие максимальный эффект. На следующем этапе работы мы попытались исследовать и проанализировать участие различных компонентов внутриклеточных сигнальных путей в ответах иммунной системы на ЭМИ, что может позволить определить механизмы клеточных реакций на исследуемые излучения.

3.4.1. Роль белков теплового шока БТШ70 и БТШ90 при воздействии ЭМИ нетеплового уровня

Возможным механизмом стимулирующего действия электромагнитных волн является усиление продукции стрессовых белков. Ранее было выявлено усиление экспрессии БТШ 70 Т-клетками селезенки животных, подвергнутых облучению ЧМ ЭМИ СВЧ, при проведении эксперимента *in vivo* и *in vitro*, при интенсивности излучения, составляющей 1 мкВт/см^2 , что ниже “теплового” уровня на несколько порядков (Глушкова, 2002). Гудманом с соавторами был обнаружен подобный эффект в опыте с низкочастотными магнитными полями (МП) с малой магнитной индукцией ($0,8 \text{ мТ} - 80 \text{ мТ}$) (Goodman et al., 1998). Показано, что непрерывное облучение в течение 20 минут клеток с мышами *in vitro* приводит к резкому увеличению уровня белков теплового шока 70 и постепенному снижению его до контрольного уровня спустя 3 часа после действия магнитного поля (Carmody et al., 2000). Помимо того, показано, что усиление экспрессии белков теплового шока вызывает повышенную противоопухолевую и противовирусную резистентность (Przepiorka., Srivastava, 1998; Naviv et al., 2001). Защитный механизм БТШ основывается на их шаперонной активности, проявляющейся в том, что они способны предотвращать деградацию и полипептидную адгезию функциональных белков. БТШ70, как и другие белки из семейства белков теплового шока, отличаются остальных шаперонов тем, что их экспрессия происходит в ситуациях стресса, при этом они осуществляют следующие функции: моторная функция при передвижении неправильно свернутых белков; облегчение свертывания белков; осуществление переноса белка внутри клетки между ее компонентами; участие в образовании белковых мультимеров, которые являются процессами, направленными на восстановление клеточной белковой компоненты. Скажем более, в последние десятилетия выяснено, белкам теплового шока отведена ключевая роль при возникновении иммунного ответа организма на антигены к вирусам, микроорганизмам и опухолям (Kumaraguru et al., 2002; Srivastava, 2002). Т-клетки, специфичные к БТШ могут принимать участие в регуляции иммунного

ответа по прямому и непрямому механизмам (рис. 39). Они могут непосредственно подавлять продукцию провоспалительных цитокинов, путем секреции ИЛ-10 и возможно фактора TGF (W. van Eden, R. van der Zee and B. Prakken, 2005). Непрямая регуляция иммунного ответа осуществляется путем влияния на антигенпрезентирующие клетки.

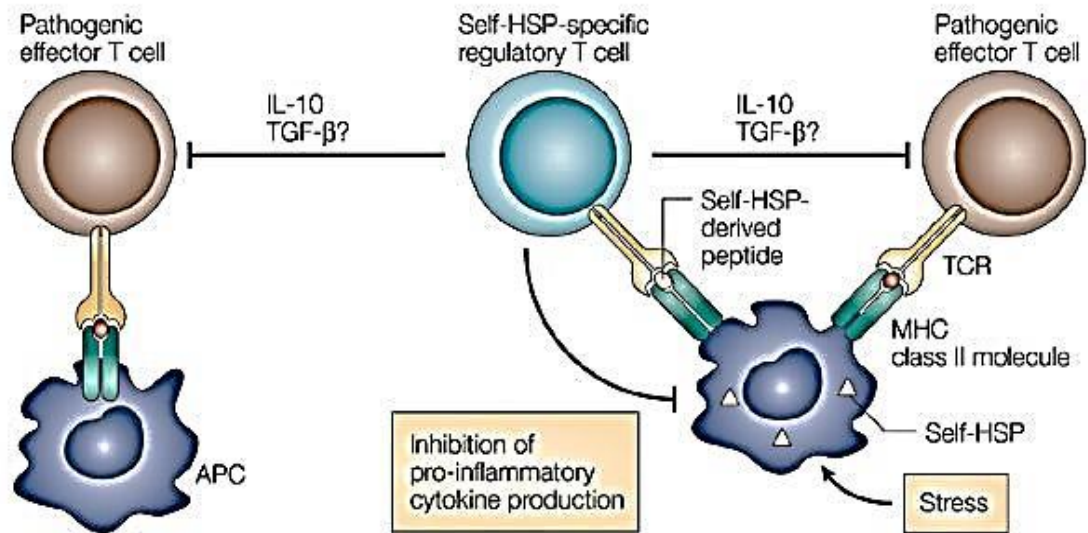


Рис. 39. Регуляция иммунного ответа белками теплового шока (по W. van Eden, R. van der Zee and B. Prakken, 2005)

Непосредственное участие БТШ в регуляции ответа иммунной системы на воздействие низкоинтенсивных ЭМИ подтверждается нашими экспериментами. Подчеркнем, что дозовые зависимости воздействия ЭМИ в настоящей работе измерялись в диапазоне сверхмалых доз, неспособных заметно повысить температуру облучаемых объектов. Между тем, в лимфоцитах, подвергнутых облучению НИЛИ была замечена экспрессия белка теплового шока 70 (рис. 40 а). Определено, что экспрессия БТШ70, являющегося индуцибельным, начиналась при каждой из четырех примененных нами доз, хотя наибольший уровень его продукции обнаружен при длительности экспозиции клеток, равной 180 с. При

этом лазерный свет не оказывал однозначных эффектов на интенсивность экспрессии белка теплового шока, относящегося к другому семейству, – БТШ90 (рис. 40).

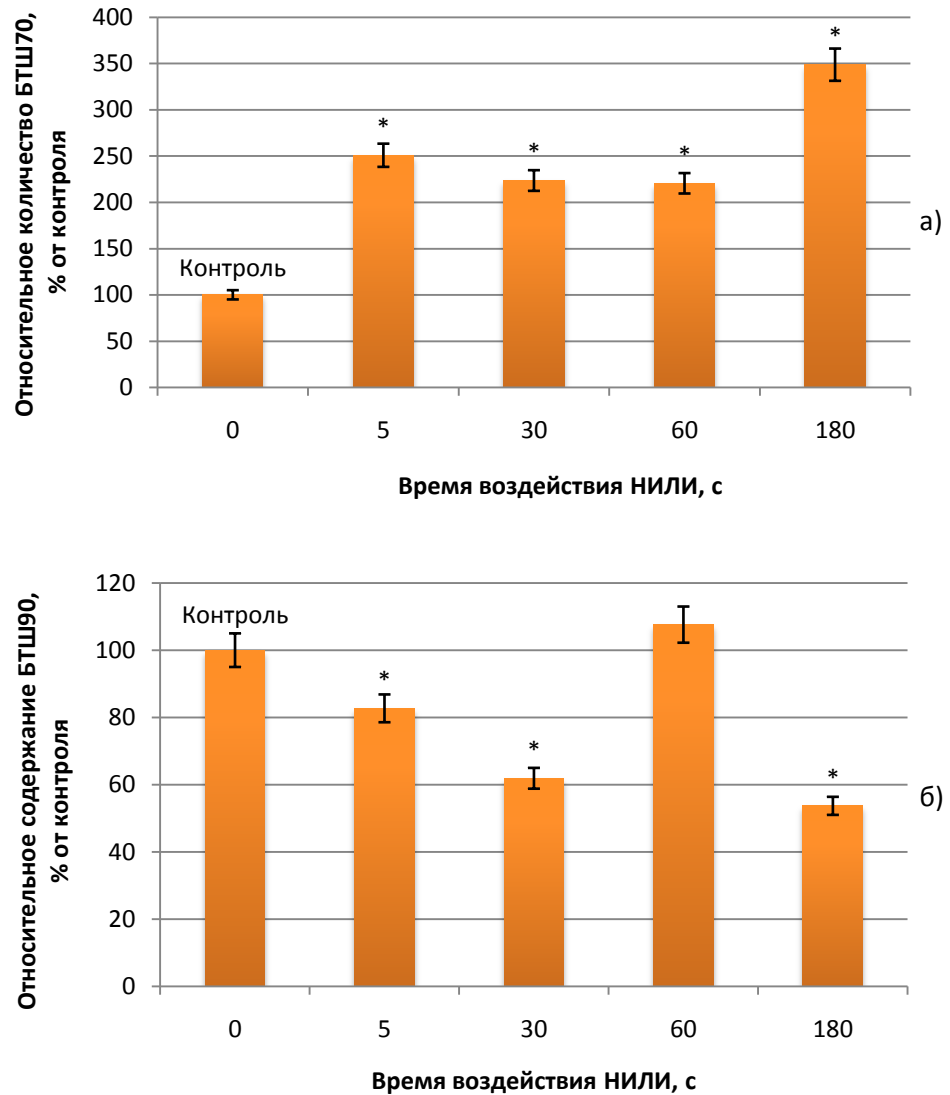


Рис. 40. Продукция белков теплового шока семейств БТШ70 (а) и БТШ90 (б) спленоцитами мышей при действии НИЛИ

Количество исследуемого белка в образце после Вестерн блот анализа вычислено при помощи программы QARA

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

После однократного облучения области тимуса животных через 12 часов наблюдался сильный рост уровня секреции БТШ70 лимфоцитами селезенки (рис. 41 а). Экспрессия этого белка плавно снижалась через 24 и 48 часов после воздействия лазерного излучения низкой интенсивности, но при этом существенно превышала контрольное значение. Облучение зоны задней лапы также привело к повышению продукции БТШ70, тем не менее, на разных сроках после облучения заметного различия в его содержании не отмечено (рис. 41 б).

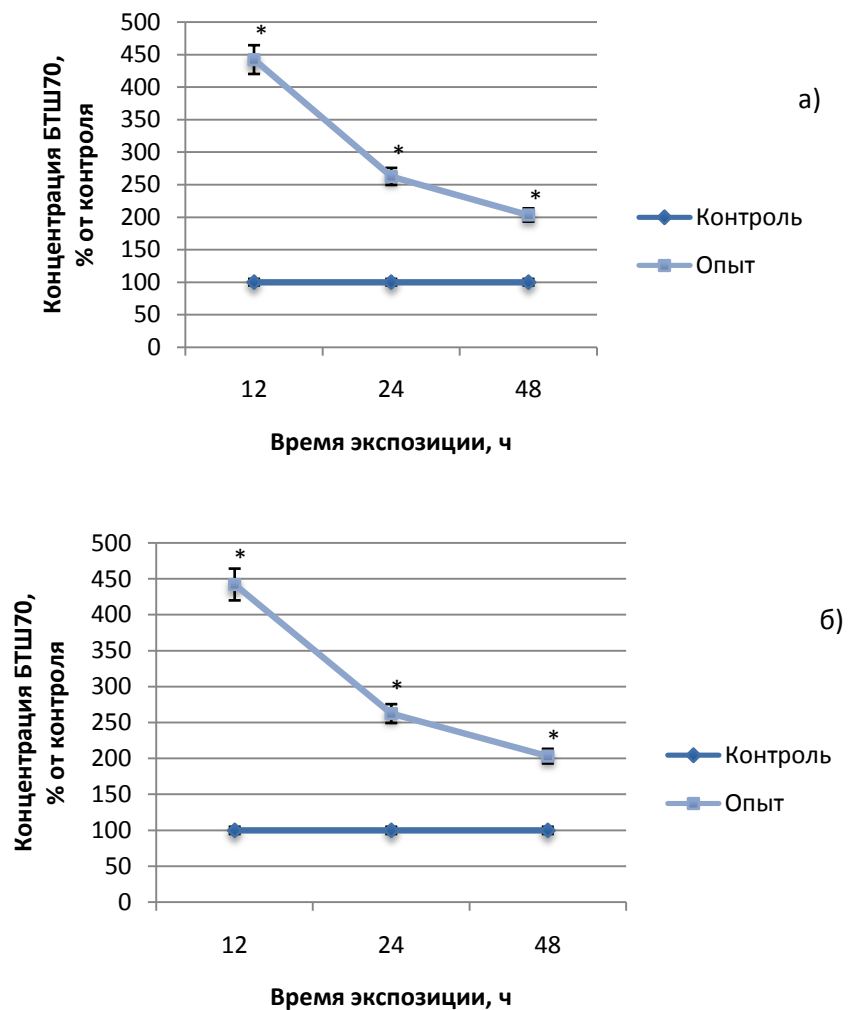


Рис. 41. Продукция белков теплового шока семейства БТШ70 спленоцитами мышей после однократного облучения НИЛИ (1 мин) зоны тимуса (а) и задней лапы (б). По оси ординат представлены данные денситометрии, полученные с помощью программы Qara. Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Таким образом, изучая динамику ответа организма при однократном облучении НИЛИ, мы обнаружили, что спустя 12 часов с момента воздействия происходит заметная стимуляция БТШ70, через 24 часа отмечено активированное состояние клеток. Однако уже через 48 часов с момента воздействия излучения проявляется тенденция к возвращению иммунокомпетентных клеток в нормальное функциональное состояние и снижению их активности. Ярче всего указанный эффект проявляется при облучении зоны тимуса. При действии же на область задней лапы ответ иммунокомпетентных клеток выражен не столь ярко и его развитие происходит медленнее. Таким образом, исследование, проведенное в данной работе, обнаружило до этого неизвестный факт вовлеченности БТШ70 в клеточный ответ на действие НИЛИ, не вызывающего тепловых эффектов. Интересно, что в нашей работе не было замечено существенных изменений экспрессии белка из другого семейства – индуцибельного БТШ90. Ранее уже было показано, что у БТШ90 есть высокое сродство лишь к определенным субстратам, которые в своем большинстве относятся к белкам системы сигнальной трансдукции, что принципиально отличает его от остальных молекулярных шаперонов. К субстратам для БТШ90 относятся рецепторы к стероидным гормонам и киназе из сигнального каскада (Craig et al., 1994). Тот факт, что облучение не ведет к увеличению экспрессии БТШ90, говорит об отсутствии активного участия сигнальных белков в ответе клетки на сверхслабое лазерное излучение. На рисунке 42 представлено влияние длительного фракционированного воздействия на здоровых мышей НИЛИ на экспрессию БТШ70 лимфоцитами селезенки. Выяснено, что длительное действие излучения на область тимуса у здоровых мышей также усиливает продукцию БТШ70, являющегося индуцибельным, при этом четко выявлено, что этот эффект является дозозависимым: экспрессия этого белка через 30 дней с начала облучения была гораздо выше, чем через 10 дней. Не столь яркая, но похожая картина наблюдалась при действии излучения на заднюю лапу. На рисунке 42 видно, что при 10-тидневном курсе происходила некоторая стимуляция экспрессии БТШ70, однако продолжение воздействия в течение 20 суток не оказывало влияния на

продукцию этого белка. В то же время при действии излучения на заднюю лапу на протяжении 30 дней вновь существенно усиливало экспрессию БТШ70.

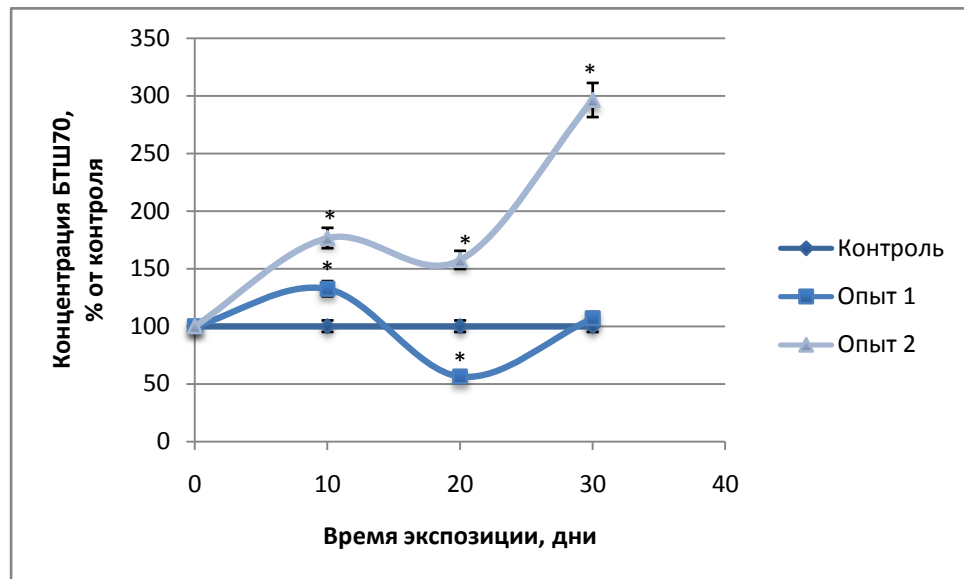


Рис. 42. Продукция белков теплового шока семейства БТШ70 спленocyтaми мышей при длительном фракционированном облучении НИЛИ

Опыт 1 - экспозиция задней лапы 10, 20 и 30 дней,

опыт 2 – экспозиция области тимуса 10, 20 и 30 дней

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Совокупность полученных данных и проведенных ранее исследований (Глушкова, 2002), указывает на способность низкоинтенсивных ЭМИ вызывать клеточные ответы стрессового типа. Обобщая результаты данной части настоящей работы, можно заключить, что продемонстрированное стимулирующее воздействие на ключевые звенья клеточного иммунитета при облучении сверхслабыми дозами НИЛИ и угнетающее действие при увеличении дозы, иллюстрирует механизм возникновения адаптивного ответа лимфоцитов и его дальнейшего снижения в случае пролонгирования воздействия. Таким образом, делаем вывод, что реакция клеток на сверхслабое ЭМИ является стрессовой. Прямым экспериментальным подтверждением этого вывода является впервые обнаруженное в ходе представленных исследований стимулирующее действие НИЛИ на экспрессию индуцибельного БТШ70 – главного маркера клеточного

стресс. Известен факт, что экспрессируемые при действии высоких температур, ионизирующей и неионизирующей ионизации, нейротоксинов, тяжелых металлов и других повреждающих факторов индуцибельные формы БТШ есть главный внутриклеточный фактор защиты от перечисленных воздействий. Так как реакция клеток относится к стрессовому типу, то адаптивный характер клеточного ответа на ЭМИ, то есть стимулирование клеточной активности, при увеличении продолжительности воздействия даже при условии сверхслабой интенсивности облучения может поменять свой знак на обратный, то есть оказывать угнетающее действие на функциональную активность. Это приводит к заключению о том, что активность основных систем регуляции в организме при облучении низкоинтенсивными ЭМИ нуждается в тщательном параллельном мониторинге.

3.4.2. Оксид азота (NO) как медиатор воздействия низкоинтенсивных ЭМИ

Под пристальным вниманием исследователей в последнее время находится оксид азота – важный физиологический агент, способный к модулированию иммунного статуса организма. NO является универсальным биологическим мессенджером, что определено его свойствами, присущими высоколабильному, короткоживущему реактивному свободному радикалу (Болдырев, 1985; Реутов, 1995). На данный момент выяснено, что по отношению к чужеродным клеткам (например, микробным) цитотоксическая и цитостатическая активность макрофагов и моноцитов обеспечивается молекулой NO. Также оксид азота действует активирующее на Т-лимфоциты и IgE (Al-Ramadi et al., 1992; Mills, 1991). NO, выделяемый эндотелиальными клетками, это фактор релаксации сосудов (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Al-Qattan et al., 2006), благодаря которому предотвращается агрегация тромбоцитов и адгезия нейтрофилов к эндотелию сосудов (Sneddon et al., 1988; Furlong et al., 1987; Lefer et al., 1991). NO является одним из ключевых медиаторов, участвующих в ответе клеток иммунной системы организма на стресс различной природы, в том числе на развитие

опухоли (Fukumura, Kashiwagi & Jain, 2006). Опухолевые клетки сами могут продуцировать NO-синтазу, наряду с фибробластами и другими иммунокомпетентными клетками. Механизм запуска экспрессии индуцибельной NO-синтазы в клетках регулируется продукцией воспалительных цитокинов, таких как ИЛ-1, ИФН и ФНО путем активации ядерного фактора NFκB (рис. 43).

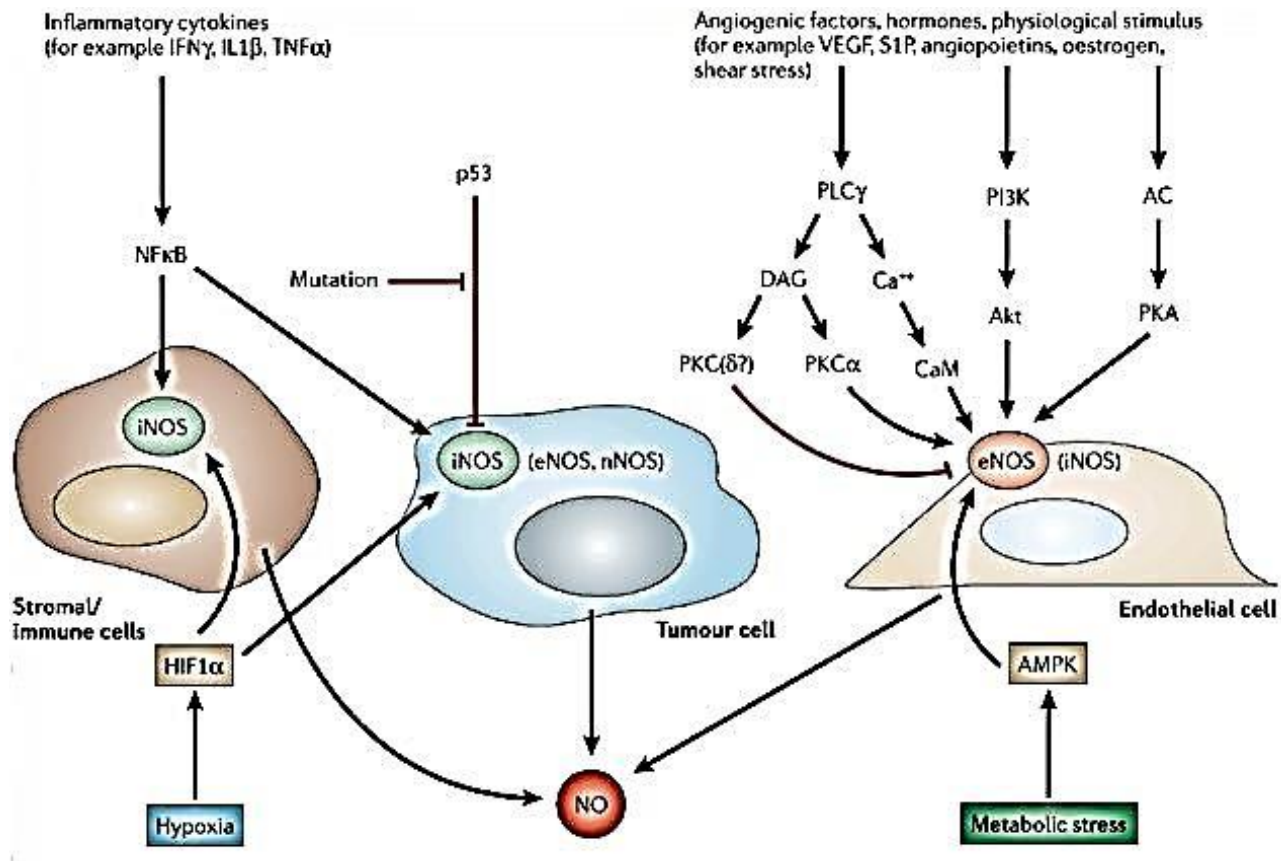


Рис. 43. Механизм продукции NO при стрессе и развитии опухоли (Fukumura, Kashiwagi&Jain, 2006)

Таким образом, продукция NO является важным механизмом регуляции системы клеточного иммунитета. Нами было обнаружено повышение продукции NO активированными макрофагами при однократном облучении мышей ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц), когда продолжительность экспозиции составляла от 36 до 96 ч (рис. 44). В случае более кратковременного действия излучения на животных, продолжительностью от 2 до 24 ч, уровень продукции NO не отличался от контроля.

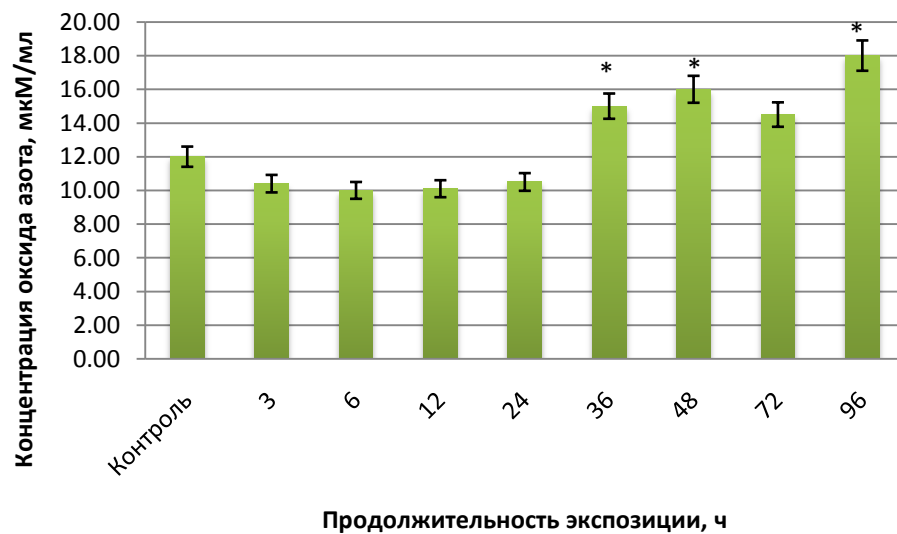


Рис. 44. Зависимость продукция NO макрофагами, простимулированными ЛПС, от времени действия АМ ЭМИ КВЧ (несущая частота 42,2 ГГц) на здоровых мышей

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

При облучении НИЛИ изолированных макрофагов перитонеального экссудата в течение 30 с и 60 наблюдали достоверно увеличение продукции NO. Однако продукция NO в макрофагах была понижена при увеличении времени экспозиции клеток до 180 с (рис. 45.). Хотя угнетающее действие на продукцию NO не было очень существенным, тенденция все же четко прослеживалась – в случае сравнительно меньшей дозы происходила стимуляция активности клеток, а в случае увеличения дозы лазерный свет действовал угнетающе.

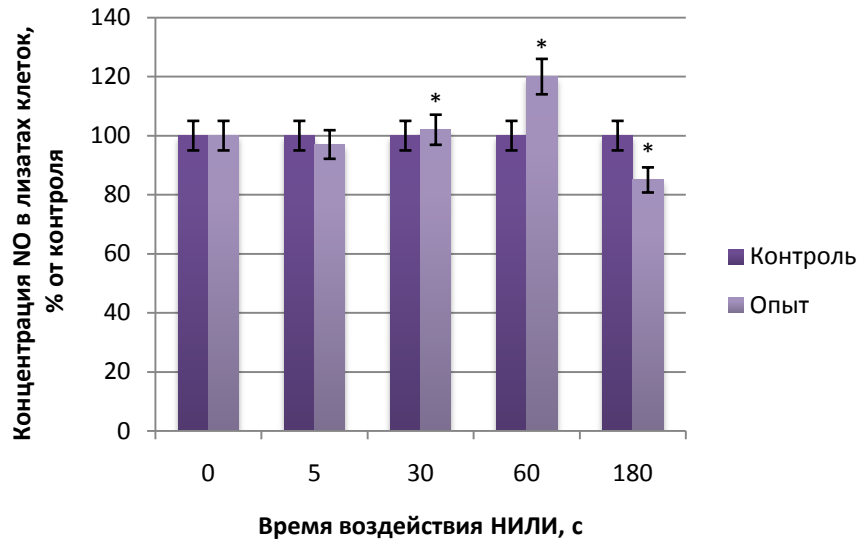


Рис. 45. Продукция NO макрофагами мышей при действии НИЛИ
Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

При облучении клеток здоровых животных продукция NO заметно возрастала лишь после 20 дней воздействия излучения на зону тимуса. Увеличение продолжительности фракционированного облучения области тимуса здоровых мышей вело к угнетению продукции NO (рис. 46).

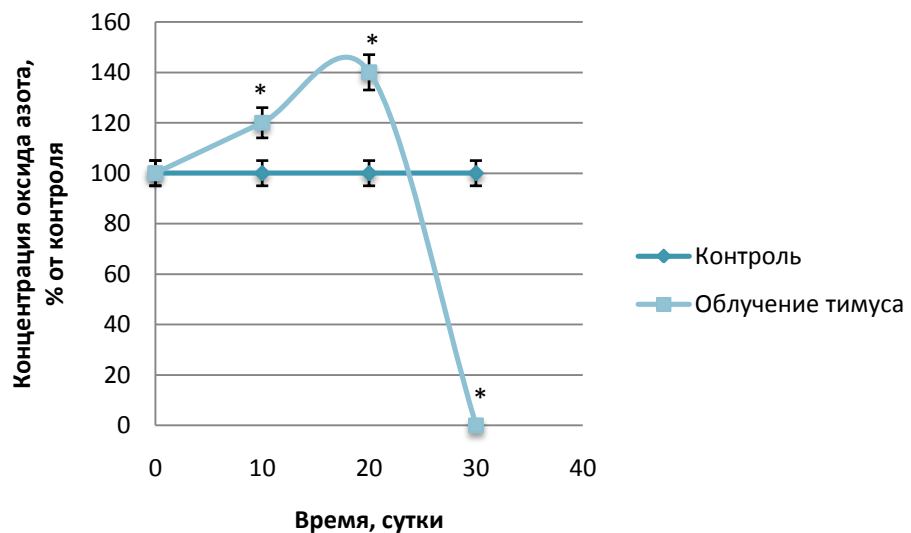


Рис. 46. Динамика продукции NO макрофагами при действии НИЛИ на здоровых животных в области тимуса
Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Развитие усиленных функций, например стимуляция продукции NO или цитокинов макрофагами, происходит по множеству различных путей, в том числе, взаимоисключающих: при росте компетенции одной функции часто угнетается другая (Суслов, 1990). Так как активация макрофагов может представлять опасность для организма, развитие этих функций находится под жестким многоуровневым контролем. Причин опасности состояния активации макрофагов несколько: 1) усиление одной функции часто вызывает дефицит других защитных и гомеостатических функций, являющихся необходимыми; 2) происходит развитие мощных деструктивных потенциалов макрофагов, которые касаются тканей, органов или организма в целом; 3) вследствие гиперпродукции монокинов, имеющих высокоэффективные иммунорегуляторные или гормональные свойства, возникают диспропорции в осуществлении ряда биологических функций в организме-хозяине (Суслов, 1990). Вероятно, что наблюдаемое усиление продукции NO при одновременном снижении уровня секреции ФНО, основного провоспалительного цитокина, является фактором, который компенсирует угнетение цитотоксической функции у макрофагов облученных животных. Интересно, что при указанных условиях воздействия излучения выявлена тенденция к росту уровня секреции спленоцитами облученных мышей ИЛ-2, тоже являющегося провоспалительным цитокином.

3.4.3. Участие транскрипционных факторов в реакции иммунной системы на действие ЭМИ

Существует комплекс взаимодействующих друг с другом молекул, с их помощью сигнал передается внутрь клетки и происходит формирование ответа, этим обеспечивается клеточный ответ на внешне факторы. Такие сигнальные белки, например, NF-κB (транскрипционный ядерный фактор), играют важную роль при регуляции метаболизма в клетке. Известно, что чаще всего NF-κB находится в цитоплазме в форме гетеродимера, состоящего из субъединиц Rel A (p65) и p50, образуя комплекс с белком-супрессором IκB-α, который препятствует переносу в ядро клетки транскрипционного ядерного фактора (Baldwin et

al., 1996; Luo, et al., 2005). Активация NF-κB происходит под действием провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-17, ИЛ-1β), вирусов (включая рино- и аденовирусы), бактериальных токсинов (ЛПС), активных форм кислорода (H₂O₂, O₃), активаторов протеинкиназы C, ультрафиолетового облучения (Barnes et al., 1997). Серия внутриклеточных взаимодействий приводит к фосфорилированию IκB-α специфическими киназами (ИКК), что вызывает его быстрое разрушение в протеосомах. Высвобожденный димер Rel A/p50 тоже фосфорилируется протеинкиназами, а далее происходит его проникновение в ядро, где он активирует широкий спектр генов, которыми обусловлена продукция цитокинов (ФНО-α, ИЛ-2, ИЛ-1), адгезивных молекул, хемокинов (ИЛ-8), анти- и проапоптозных белков (bcl-2), костимуляторных молекул, которые поддерживают в норме клеточную пролиферацию, апоптоз и функционирование врожденного и приобретенного иммунитета (рис. 47). До сих пор мало изучена роль транскрипционных белков, которые обеспечивают активацию генов, и, посредством этого, участвуют в формировании клеточного ответа. В некоторых работах говорится об как об активации, так и об угнетении сигнальных белков, при этом исследования проводились для разных типов клеток, находящихся как в норме, так и в патологических состояниях при действии ЭМИ различных частотных диапазонов и НИЛИ (Schulze-Osthoff, 1995; Haas, 1998; Natarajan, 2002; Rizzi, 2006).

Целью данного этапа работы было исследование содержания белков семейства NF-κB и IκB-α при воздействии *in vitro* на лимфоциты селезенки мышей сверхслабого лазерного света (0.2 мВт/см²) и ЭМИ СВЧ (8.15 – 18 ГГц, 1 мкВт/см²). Учитывая важную роль NF-κB для запуска ключевых внутриклеточных процессов, изучение его роли в клеточном ответе на воздействие лазерного света красного диапазона и сантиметровых электромагнитных волн низкой интенсивности дает возможность выяснить дополнительные данные о том, каким образом происходит взаимодействие живой клетки и этих физических факторов. Данные, демонстрирующие содержание исследуемых белков представлены на рисунках 48-49. Облучение спленоцитов

НИЛИ в течение 1 мин (доза падающего света составляла 12×10^{-3} Дж/см²) приводило к значительному снижению количества NF-κB и IκB-α в клетках, при этом уровень фосфорилированного NF-κB практически не изменился (рис. 48).

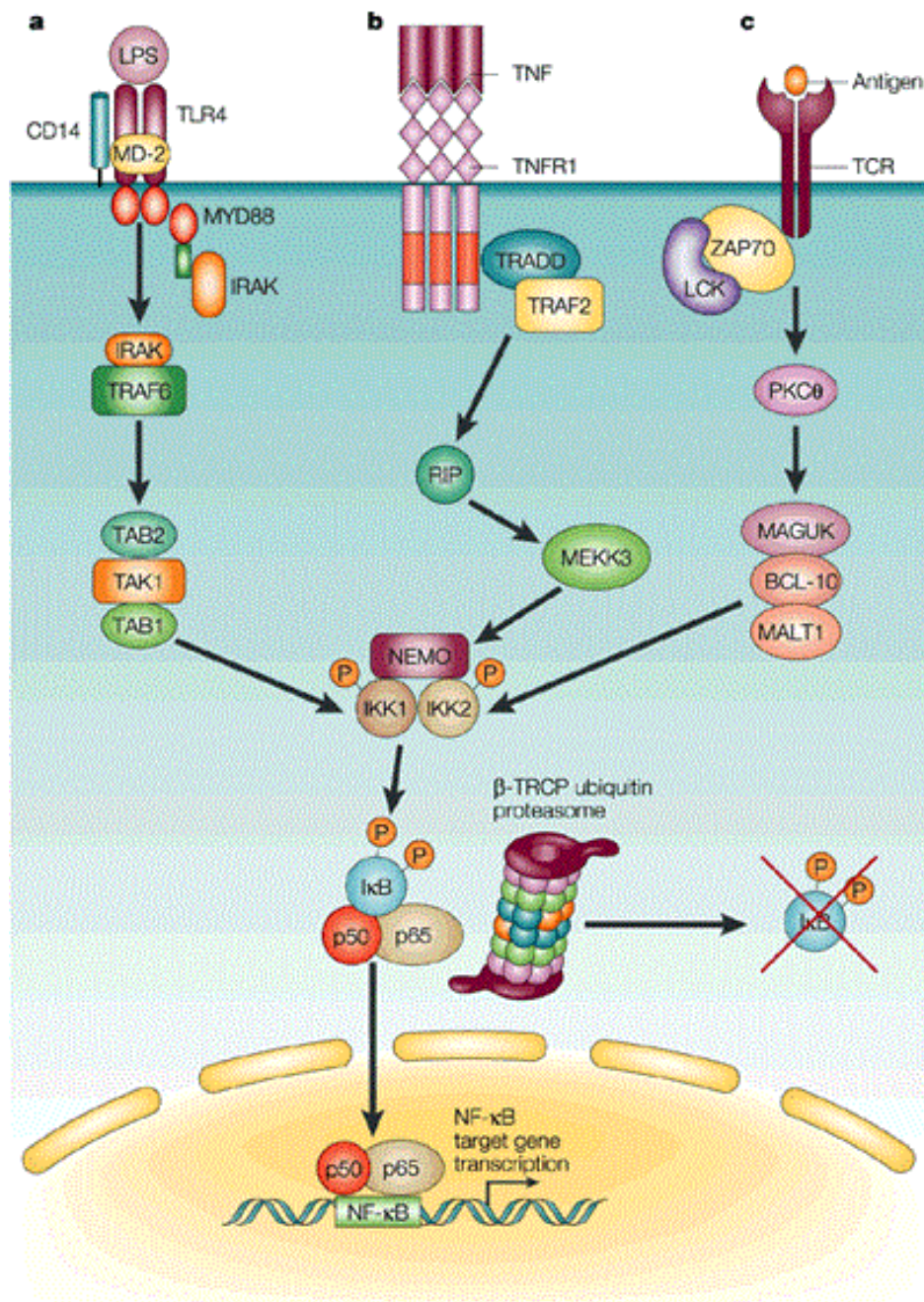


Рис. 47. Пути активации NF-κB (по Qiutang Li & Inder M. Verma, 2002)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрация фосфорилированного транскрипционного ядерного фактора, осуществляющего взаимодействия с генами внутри ядра, почти не изменялась (рис. 48). Данный факт свидетельствует об отсутствии активного участия данной формы NF-κB, обеспечивающей трансдукцию сигнала в ядре, в ответе клетки на действие НИЛИ. Из анализа полученных результатов следует, что облучение НИЛИ нетеплового уровня снижает содержание в клетках NF-κB и IκB-α, которые являются основными компонентами изучаемого сигнального пути. Данный факт говорит о том, что возможно NF-κB сигнальный путь не активируется в клетках при воздействии малых доз низкоинтенсивного лазерного света, либо ингибируется индуцибельным БТШ 72, как было показано ранее (Feinstein et al., 1996).

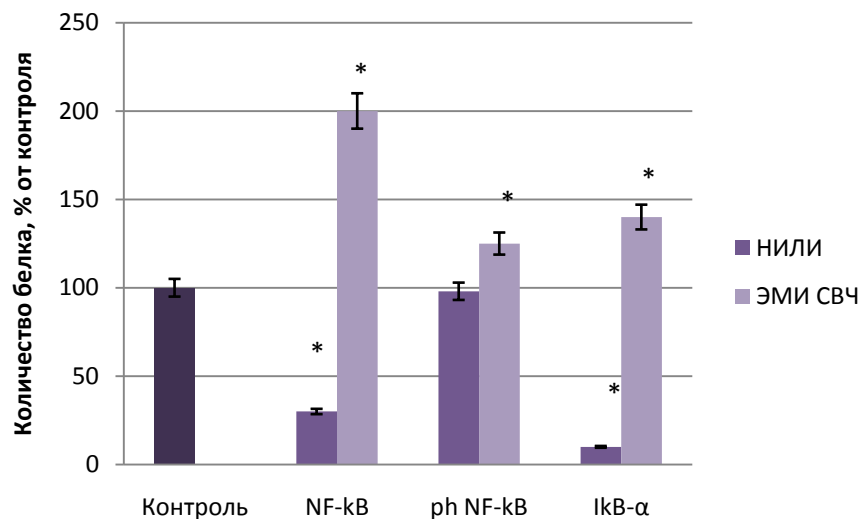


Рис. 48. Зависимость количества NF-κB, фосфорилированной формы NF-κB и IκB-α. в лимфоцитах селезенки от воздействия ЭМИ СВЧ (8.15-18 ГГц, 1 мВт/см², 1 ч) и НИЛИ (632.8 нм, 0.2 мВт/см², 1 мин) Представлены данные денситометрии, полученные с помощью программы Qara. Достоверное отличие от контроля * p<0,05

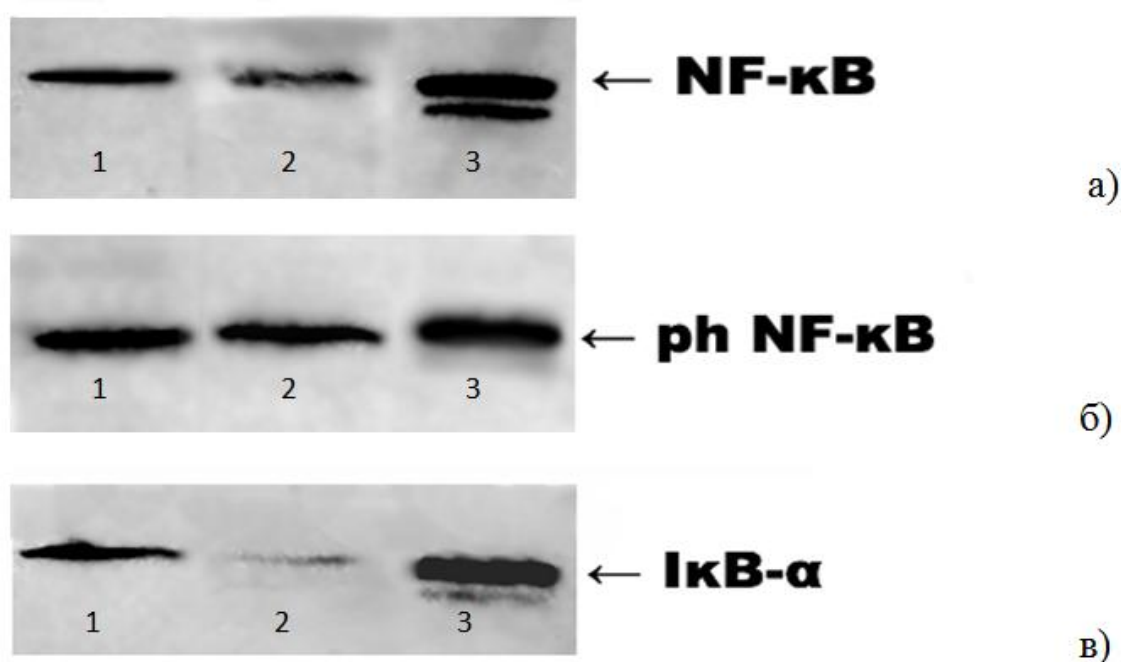


Рис. 49. Вверху – фотография белковых полос, полученных после иммуноблота с антителами к NF-κB (а), фосфорилированной формы NF-κB (б) и IκB-α (в): 1 - контроль, 2 - НИЛИ, 3 - ЭМИ СВЧ

При экспозиции клеток в течение 1 часа ЭМИ СВЧ происходило увеличение концентрации NF-κB в клетках в два раза, при этом количество других изученных белков (IκB-α и Phospho-NF-κB) тоже становилось больше в сравнении с контрольным значением (рис. 48). Эти факты иллюстрируют то, что нетепловое ЭМИ СВЧ способствовало накоплению в клетках исследуемых белков. Ранее нами указывалось, что когда сверхслабые электромагнитные волны действуют на клетку, происходит стрессовая реакция, что выражается увеличением продукции NO, а также повышением секреции ФНО-α и БТШ70. Следует отметить, что изменения продукции стрессовых белков и оксида азота при воздействии повреждающих факторов предположительно являются результатом активации фактора транскрипции NF-κB, как показано в ряде работ (Osborn et al., 1989; Guzhova et al., 1997; Karu, 1999). В то же время индуцибельный БТШ 70 подавляет действие NF-κB, препятствуя его активации и проникновению в ядро (Feinstein et al., 1996). В проведенных экспериментах наблюдали незначительное увеличение количества Phospho-NF-κB, что может

свидетельствовать лишь о некоторой дополнительной активации NF-κB под действием электромагнитных волн низкой интенсивности. Другой белок, входящий в систему сигнальной трансдукции - IκB-α был стимулирован ЭМИ СВЧ. Как известно, рост количества данного белка-супрессора индуцируется взаимодействием активированного NF-κB с геном, ответственным за продукцию IκB-α. Вновь образованный IκB-α выделяется в цитоплазму, где происходит инактивация NF-κB, посредством которой регулируется внутриклеточный гомеостаз. Результаты нашего исследования тоже говорят об участии белков, относящихся к этому сигнальному пути, в формировании внутриклеточного ответа. Итак, в настоящей работе получены результаты исследования механизма действия сверхслабых неионизирующих излучений на уровне белков сигнального каскада, подтверждающие правильность более ранних выводов об индукции стрессового клеточного ответа при воздействии амплитудно-модулированного ЭМИ СВЧ низкой интенсивности. Обладая весьма малой энергией, ЭМИ СВЧ оказалось способным вызывать значительную стимуляцию исследуемых сигнальных белков в лимфоцитах селезенки. Сравнение полученных нами результатов с данными других авторов представляется затруднительным, так как ранее практически не была исследована роль, которую играют транскрипционные факторы в ответе клетки при сверхслабом лазерном воздействии, а данные, которые имеются, являются немногочисленными и крайне противоречивыми. Например, иммунохимическими методами анализа выявлено, что под действием гелий-неонового лазера NF-κB умеренно активируется в кератиноцитах человека (Naas, 1998). В то же время есть данные о способности НИЛИ (904 нм, 5 Дж/см²) *in vivo* блокировать эффекты активации NF-κB и тормозить деградацию IκB-α в клетках скелетных мышц, вызванные предварительным травмирующим воздействием (Rizzi, 2006). Хотя в данной работе не было отмечено какого-либо роста концентрации транскрипционных факторов, но полученные данные, тем не менее, указывают, на изменение уровня экспрессии этих белков под влиянием НИЛИ. Направленность эффекта в данном случае может определяться дозой

падающего излучения, что также не противоречит предположению о стрессовом характере ответа данного типа клеток на воздействие электромагнитных волн.

3.4.4. Роль каскада внутриклеточной сигнализации SAPK/JNK в ответах на низкоинтенсивные электромагнитные волны

Чтобы и дальше развивать представления о механизмах действия излучений низкой интенсивности на животные клетки, мы изучили, как влияет НИЛИ и ЭМИ СВЧ на продукцию лимфоцитами мышей SAPK/JNK (стресс-активируемая протеинкиназа), которая относится к основным компонентам внутриклеточных сигнальных путей. Протеинкиназа SAPK/JNK играет ключевую роль в регуляции апоптоза, а также принимает определенное участие в регуляции иммунного ответа, органогенеза и клеточной пролиферации (рис. 50) Известно, что продукция многих сигнальных белков в клетке напрямую зависит от активности БТШ90 – шаперона, субстратом которого являются стероидные гормоны и сигнальные киназы. В качестве фактора, позволяющего блокировать внутриклеточные БТШ90, нами был использован гелданамицин (ГА), который является бензохиноном ансамицина, обладающим множеством фармакологических свойств, в том числе, являющимся блокатором тирозин-киназ и ингибитором белков теплового шока (БТШ90). Таким образом, целью данного этапа исследования явилось изучение влияния низкоинтенсивного лазерного излучения (632,8 нм, 0,2 мВт/см², экспозиция 1 мин) и электромагнитного излучения сверхвысокой частоты (8,15-18 ГГц, средняя мощность 1 мкВт/см², экспозиция 1 час) на активацию SAPK/JNK сигнального пути в изолированных лимфоцитах селезенки мышей, как в нормальных условиях, так и при блокировании активности БТШ90, являющегося частью мультишаперонной машины, функционирующей в клетках.

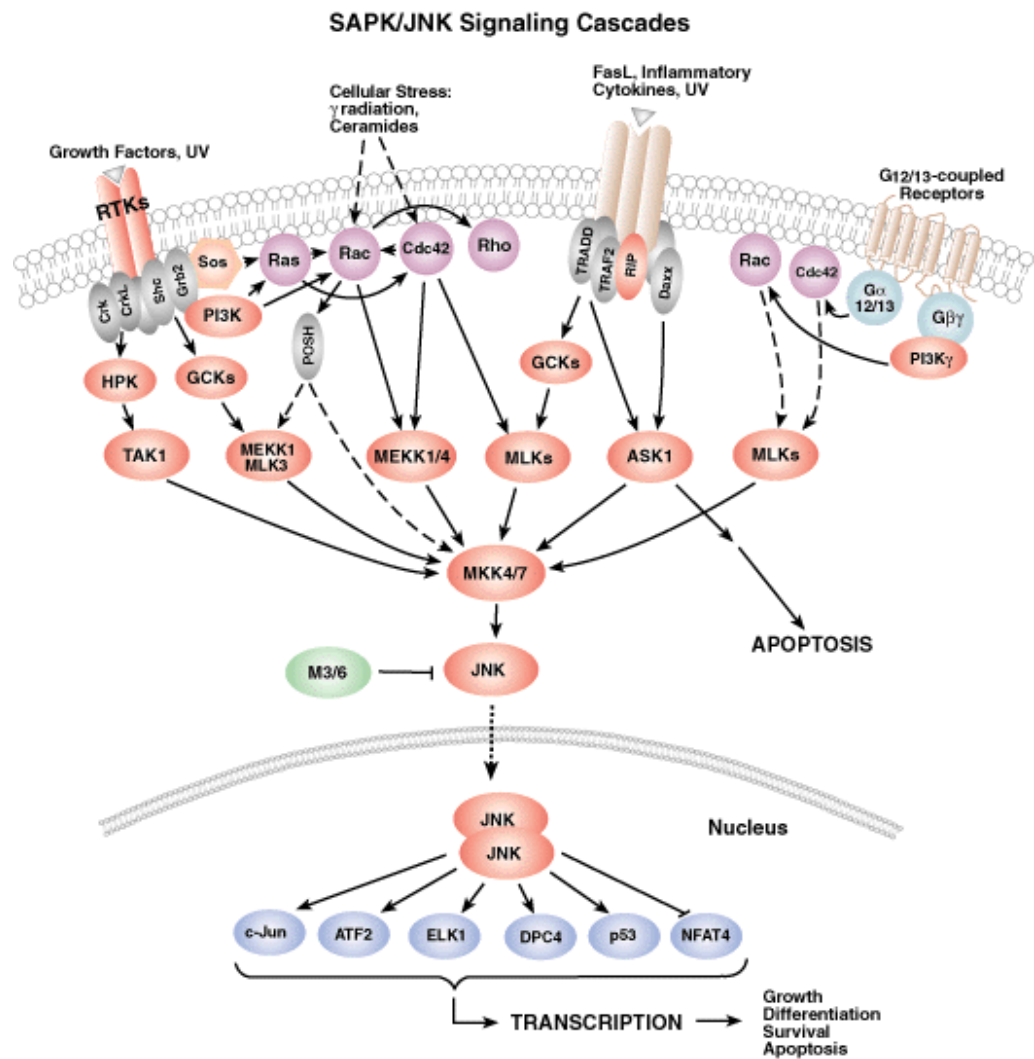


Рис. 50 SAPK/JNK сигнальные пути (по данным www.cellsignal.com)

При исследовании действия НИЛИ на суспензию лимфоцитов селезенки нами было обнаружено существенное увеличение содержания *Phospho-SAPK/JNK* в облученных клетках (рис. 51). Действие низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ на лимфоциты также вело к повышению содержания исследуемой протеинкиназы. Отметим, что ЭМИ СВЧ более значительно стимулировало продукцию *Phospho-SAPK/JNK* по сравнению с НИЛИ. (рис. 51).

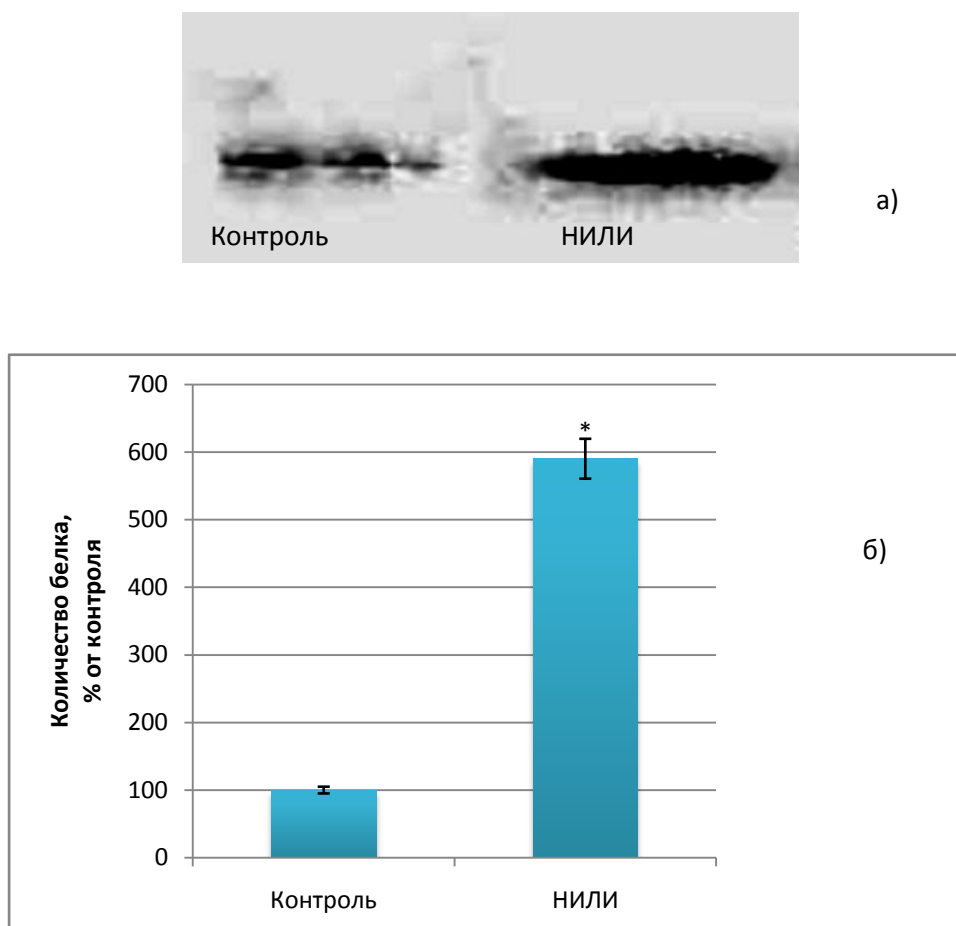


Рис. 51. Содержание Phospho-SAPK/JNK в спленоцитах мышей под действием неионизирующих излучений низкой интенсивности

а) - фотографии иммуноблоттинга;

б) - данные денситометрии белковых полос.

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Следующим этапом работы было изучение влияния облучения НИЛИ и ЭМИ СВЧ на клетки, предварительно инкубированные с гелданамицином. Обработка гелданамицином приводила к снижению содержания исследуемого белка в изолированных лимфоцитах, однако не изменяла характер ответа спленоцитов на облучение электромагнитными волнами. Действительно, облучение низкоинтенсивным лазерным светом или ЭМИ СВЧ предварительно обработанных гелданамицином спленоцитов также приводило к повышению содержания Phospho-SAPK/JNK (рис. 52). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о значительном повышении содержания Phospho-SAPK/JNK в

спленоцитах под действием электромагнитных излучений низкой интенсивности, причем как НИЛИ, так и ЭМИ СВЧ приводят к повышению содержания данной протеинкиназы также в клетках, предварительно обработанных гелданамицином.

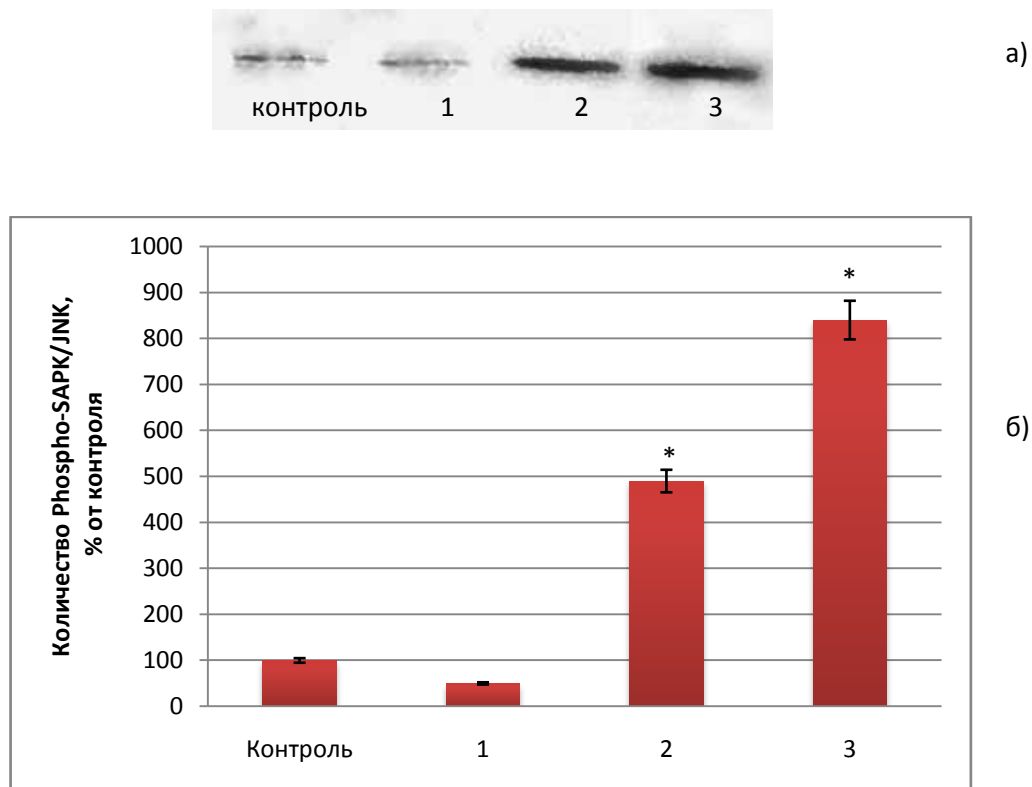


Рис. 52. Изменение содержания Phospho-SAPK/JNK под влиянием НИЛИ и ЭМИ СВЧ в спленоцитах, предварительно инкубированных в присутствии гелданамицина

(а) - фотографии иммуноблоттинга; (б) - данные денситометрии белковых полос, полученные с помощью программы QARA

1 – клетки, инкубированные в присутствии гелданамицина; 2 – клетки, инкубированные в присутствии гелданамицина, облученные НИЛИ; 3 - клетки, инкубированные в присутствии гелданамицина, облученные ЭМИ СВЧ

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

На данном этапе работы оценено действие малых доз НИЛИ и ЭМИ СВЧ на концентрацию *Phospho-SAPK/JNK* в изолированных иммунокомпетентных клетках. Ранее нами было показано, что облучение лазерным излучением низкой интенсивности или электромагнитным излучением сверхвысокой частоты клеток селезенки мышей в определенных условиях вызывает возникновение клеточных ответов стрессового типа. Нами также определены оптимальные дозы воздействия излучений для стимуляции секреции цитокинов, БТШ, ЕКК И NO (Новоселова и др., 2005, 2006). В данном эксперименте применялись именно определенные нами ранее условия и дозы облучения. По полученным результатам можно судить о значительной активации SAPK/JNK под влиянием НИЛИ. Известным является факт возможности активирования SAPK/JNK при действии ряда клеточных стрессов различного типа и экстраклеточных сигналов, к которым в том числе относят осмотический стресс, ультрафиолетовое и γ -излучение, токсины и антираковые препараты (цис-платина, адриамицин и др.), тепловой шок, стимуляцию T-клеточных рецепторов, церамиды, АФК, а также цитокины (TNF- α). В клетке SAPK/JNK активируется киназами SEK1 (MMK4) и SEK2 (MMK7), которые, действуя синергично, фосфорилируют SAPK/JNK по Thr69/71 и Ser63/73. Есть данные о фосфорилировании стресс-активируемой SAPK/JNK множества факторов, которое могут быть как транскрипционными (c-Jun, p53, ATF-2, ELK-1, c-Myc), так и нетранскрипционными (Bcl-2, paxillin, Bcl-xL, MAP-2) (Hiroshi Nishina et al., 2004). SAPK/JNK таким образом участвует в множестве сигнальных путей, под контролем которых находятся различные внутриклеточные процессы. Тот факт, что под влиянием НИЛИ в малых дозах происходит активация SAPK/JNK, является подтверждением нашей гипотезы о том, что клеточный ответ на действие НИЛИ носит стрессовый характер. Особенно подчеркнем, что здесь говорится о сверхмалых дозах, которые не вызывают повреждающие и тепловые эффекты. Интересно, что рост концентрации *Phospho-SAPK/JNK* в клетках, который был нами обнаружен, был достаточно существенным. Это согласуется с данными других авторов, утверждающих, что SAPK/JNK-сигнальный каскад во много раз усиливает

внешний сигнал и способен к функционированию по принципу «все или ничего» (Bagowski et al., 2003). Итак, НИЛИ и ЭМИ СВЧ обладают весьма малой энергией, но при этом могут привести к значительной активации SAPK/JNK сигнального пути. В современной литературе имеются данные о том, что ингибиторы синтеза белков, в частности анисомицин (anisomycin), также относятся к факторам, вызывающим активацию SAPK/JNK (Hiroshi Nishina, et al., 2004). Однако использованный в наших экспериментах ингибитор синтеза белков гелданамицин приводил к двукратному снижению содержания Phospho-SAPK/JNK в исследуемых клетках (рис. 52). Как известно, гелданамицин оказывает воздействие на систему сигнальной трансдукции в клетках, главным образом, ингибируя белки семейства БТШ90, которые выполняют функцию молекулярных шаперонов для многих сигнальных белков. Таким образом, гелданамицин способен приводить к угнетению продукции сигнальных белков в клетках, что подтверждают проведенные нами исследования. Использование гелданамицина, как ингибитора активности БТШ90, не приносило принципиальных изменений в наблюдаемую картину ответа клеток на сверхслабые неонизирующие излучения (рис. 52). Эксперименты, проведенные на клетках, обработанных гелданамицином показали, что ЭМИ СВЧ и НИЛИ способны вызывать активацию внутриклеточной SAPK/JNK, хотя и в несколько меньшей степени, что может быть обусловлено снижением общего содержания SAPK/JNK под действием гелданамицина. В целом, результаты, полученные с использованием нормальных и ГА-обработанных лимфоцитов, почти не отличались между собой. Это может свидетельствовать о том что, сверхслабые НИЛИ и ЭМИ СВЧ не влияют на синтез SAPK/JNK клетками *de novo*, а лишь способствуют активации уже имеющейся в клетках киназы. Полученные в результате представленных исследований данные позволяют заключить, что многие из биологических эффектов ЭМИ низкой интенсивности на клеточном уровне, возможно, опосредуются активацией SAPK/JNK сигнального пути в клетках.

3.4.5. Роль антиоксидантов: убихинонов Q, β -каротина и минорных углеводов, обладающих антиоксидантной активностью, в иммунном ответе клетки

Известно, что снижение функциональной активности иммунокомпетентных клеток может быть значительно уменьшено с помощью экзогенных антиоксидантов, что естественно вызывает большой интерес у исследователей. Уже известно, что для процессов Т-клеточной активации (Root, 1991), клеточной гибели по апоптозному типу (Bruhe et al., 1991; Buttke et al., 1994), секреции лимфокинов макрофагами (Hirose et al., 1993) регуляторным фактором является окислительно-восстановительный баланс. Ряд антиоксидантов, существующих в клетке, обладают способностью к детоксикации активных форм кислорода. К таким антиоксидантам относятся, в первую очередь, ферментные системы, в частности, каталазы, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза. Помимо ферментных систем, можно назвать следующие низкомолекулярные соединения: токоферолы, убихиноны, аскорбиновая кислота, каротиноиды. Применение антиоксидантов в диете может, таким образом, влиять на метаболизм клеток. Из ряда современных антиоксидантов представляют интерес гидролизаты природных биополимеров – маннана и фукоидана, обладающие антиоксидантной активностью, которые могут быть использованы в качестве эффективных пищевых добавок (Черенков и др., 2012). Природные биополимеры, основу которых составляют минорные сахара манноза и фукоза, а также их производные широко используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. В частности, такие вещества, как гуаровая камедь или камедь рожкового дерева, основу которой составляет маннан, сульфатированные гетерополисахариды водорослей (фукоиданы, каррагинаны), используют в качестве стабилизаторов и загустителей, применяют в виде пищевых и кормовых добавок. Наряду со способностью к гелеобразованию и улучшению реологических показателей пищевых продуктов, исследователи отмечают высокую степень биологической активности фукозо- и маннозосодержащих биополимеров. Показано, что фукоиданы и фукозосодержащие олигосахариды обладают

противовоспалительным, антикоагулянтным, противовирусным и апоптотическим действием (Kim et al., 2010; Jiao et al., 2011; Tutor et al., 2011). По современным данным, маннаны и маннозосодержащие олигосахариды обладают иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием (Gómez-Verduzco et al., 2009; Madrigal-Santillán et al., 2009). Исследователи частично объясняют высокую биологическую активность маннанов и фукоиданов их способностью нейтрализовать различные активные формы кислорода. Основанием для такого утверждения является обнаруженная способность фукоиданов, выделенных из морских водорослей, нейтрализовать супероксидный анион-радикал (Rocha de Souza et al., 2007). Также зарубежными исследователями показана способность частично гидролизованных маннанов эффективно взаимодействовать перекисью водорода и хлорноватистой кислотой (Kuo et al., 2009). Иммунный статус человека и животных активируется коферментами Q (убихинонов). Показано, что угнетение иммунной системы мышей адриамицином отчасти снижается инъекцией кофермента Q₁₀, показателем чего является редуцирование сокращения массы селезенки и тимуса. Применение кофермента Q₆, помимо Q₁₀, вызывает рост скорости фагоцитоза и усиливает антителообразующий гемолитический ответ (Bliznakov, 1997). Иммуностимулирующее влияние убихинонов Q заметили и при лечении ряда вирусных заболеваний, также известен их противоопухолевый эффект (Jayaraman et al., 1963; Halm et al., 2014). Ранее было обнаружено, при введении в питание кофермента Q₉ частично восстанавливается уровень иммунного ответа в Т- и В-лимфоцитах γ -облученных животных (Novoselova et al., 1995) Исследование влияния антиоксидантов на ключевые звенья клеточного и гуморального иммунитета, которые затрагивает воздействие неионизирующих ЭМИ низкой интенсивности, представляет большой интерес с точки зрения поиска эффективных средств профилактики и устранения последствий воздействия ЭМИ в быту, на производстве и при использовании электромагнитной терапии в медицинской практике. На данном этапе работы нами был проведен анализ влияния различных групп антиоксидантов, включенных в диету экспериментальных животных, на состояние

иммунной системы, а также уровень иммунного ответа при внешних воздействиях: облучении низкоинтенсивным ЭМИ СВЧ и введении антигенов. Оценивали также уровень пролиферативного ответа лимфоцитов на стимуляцию митогенами. После того, как животные получали диету с повышенным содержанием убихинона Q₉, митогенстимулированное включение меченного тимидина в Т-клетки было значительно увеличено (табл. 6). Величина иммуностимулирующего действия убихинона не зависела от длительности диеты с антиоксидантом, но достоверное увеличение числа лимфоцитов селезенки наблюдалось после 30-дневной, но не после 10-дневной нагрузки убихиноном. Эти результаты указывают на отсутствие строгой корреляции между клеточностью органа и функциональной активностью Т-лимфоцитов. По-видимому, определяющим фактором для повышения уровня иммунного ответа Т-клеток является обнаруженное нами увеличение концентрации убихинона в лимфоцитах селезенки (см. табл. 6). Эти данные отличаются от существующих представлений о том, что убихинон, поступающий с пищей, способен накапливаться только в клетках кишечника и печени (Jayaraman et al., 1963; Halm et al., 2014).

Активация пролиферативного ответа Т-лимфоцитов была показана при добавлении антиоксидантов (убихинонов и β-каротина) *in vitro* в среду культивирования этих клеток. При этом обнаружено стимулирующее действие не только эндогенного для крыс убихинона Q₉, но и полипреноидов с более короткой (Q₁ и Q₂) и длинной (Q₁₀) боковой цепью (рис. 53). При использовании этого ряда антиоксидантов показано, что их влияние *in vitro* на пролиферативный ответ Т-лимфоцитов не зависело от степени их гидрофобности, поскольку наименьшая активация выявлена при действии растворимой в воде молекулы убихинона Q₁ и водонерастворимого полипреноида β-каротина. Таким образом, присутствие убихинонов и β-каротина в инкубационной среде способствует увеличению иммунной реактивности, которая проявляется при митогенной стимуляции.

Таблица 6

Влияние диеты с убихиноном Q₉ на пролиферацию Т-лимфоцитов селезенки крыс

Показатель	Контроль	10 дней диеты	30 дней диеты
Включение ³ H-тимидина, имп/мин на 5·10 ⁵ клеток:			
Т-клетки	4794±251	5072±346	6428±500
Т-клетки+КонА	7191±538	19135±1248*	18374±1127*
Количество лимфоцитов селезенки (·10 ⁻⁶)	518±52	538±35	640±43*
Концентрация убихинона в лимфоцитах селезенки, пМ на 1 мг белка	160±12	490±35*	520±42*

достоверное отличие от контроля * p<0,05

Примечание. Концентрацию убихинона измеряли после экстракции липидов, разделения с помощью тонкослойной хроматографии и спектрофотометрирования (Новоселова, 1992).

В следующей серии экспериментов мы показали, что присутствие убихинонов в среде способно восполнить недостаточно эффективное действие митогена. Так, при использовании двух лектинов соответственно с высокой и низкой стимулирующей активностью влияние антиоксиданта было эффективнее во втором случае (табл. 7). Можно предположить, что уровень стимуляции Т-клеточных КонА-зависимых рецепторов находится в очевидной зависимости от липидного окружения рецепторных белков, а состояние липидной фазы плазматических мембран регулируется убихиноном, как было показано ранее (Новоселова, 1992). Кроме того, увеличение уровня антиоксидантов, поступающих в организм с пищей, может способствовать снижению интенсивности реакций перекисления липидов. Так, у здоровых людей, получающих диету с убихиноном Q₁₀, было обнаружено двукратное увеличение

концентрации убихинона, связанного с липопротеинами низкой плотности в крови, что приводило к повышению устойчивости всех фракций липопротеинов к окислительному стрессу (Alleva et al., 1995).

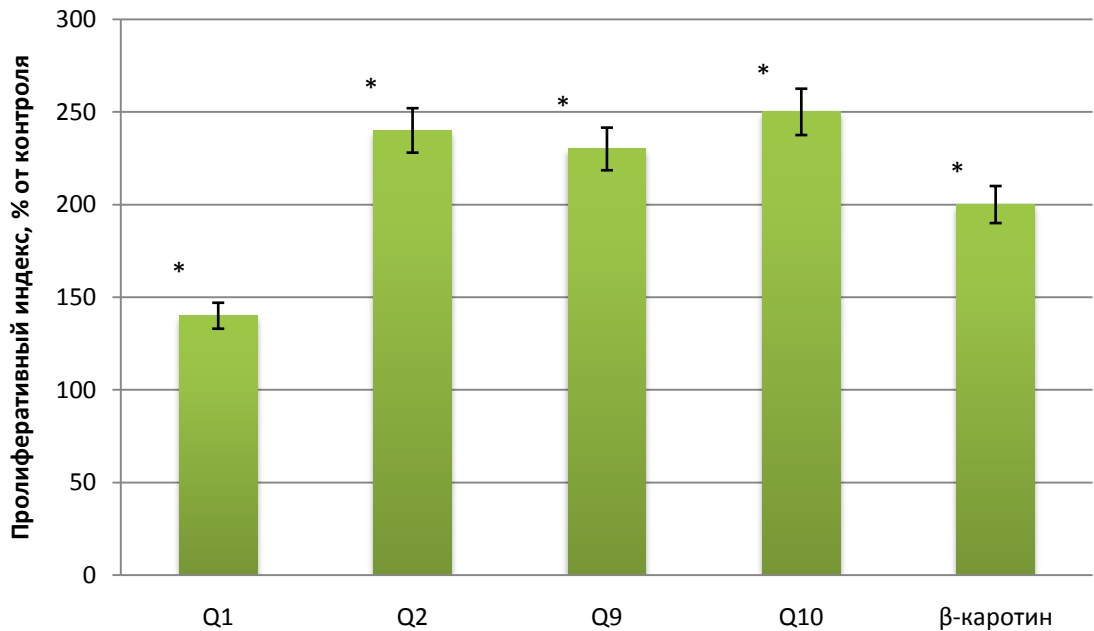


Рис. 53. Пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, культивируемых в присутствии антиоксидантов

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Пролиферативный индекс (в % от контроля) рассчитывали как отношение включения TdR в КонА-стимулированные клетки / включение TdR в нестимулированные клетки. Концентрация убихинонов Q – 50 мкМ, концентрация β-каротина – 10 мкМ в твин-85. Конечная концентрация твин не более 0,1%. Контроль – инкубация без антиоксидантов. Каждое значение – среднее для 4 животных, каждое измерение проводили в 6 повторах.

Таблица 7

Влияние убихинона Q₉ *in vitro* на уровень спонтанного и митогенстимулированного включения ³H-тимидина в Т-лимфоциты крыс

Концентрация КонА, мкг/мл	Контроль	50 мкМ Q ₉	Контроль	50 мкМ Q ₉
	А		Б	
0	21,5±1,9	25,6±2,1	21,5±1,9	22,0±3,0
1	127±10	134±12	79±6	98±10*
5	316±24	402±35*	114±12	351±29**
10	217±18	301±29*	41±5	297±31**

Достоверное отличие от контроля * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$. Примечание. Показатели представлены в импульсах 1 мин $5 \cdot 10^5$ клеток ($\cdot 10^{-2}$), каждый показатель – среднее для 4 крыс. Культивирование в планшетах проводилось в 9 повторах для каждой из использованных концентраций КонА. А – КонА фирма “Sigma”, Б – КонА фирмы “Chemapol”.

Заметное угнетение цитотоксичности макрофагов было обнаружено при добавлении убихинонов *in vitro* к культивируемым макрофагам, причем более значительное снижение цитолиза клеток L-929 макрофагальными лизатами показано при включении в среду убихинонов с длинной боковой цепью – Q₉ и Q₁₀ (см. рис. 54). Ранее прямыми экспериментами было доказано, что цитотоксическое действие ФНО на опухолевые фибробласты мыши LM сопровождается усиленным продуцированием окислительных радикальных продуктов и выход этих продуктов находится в прямой зависимости от концентрации ФНО в среде культивирования опухолевых клеток-мишеней (Yamauchi, 1989).

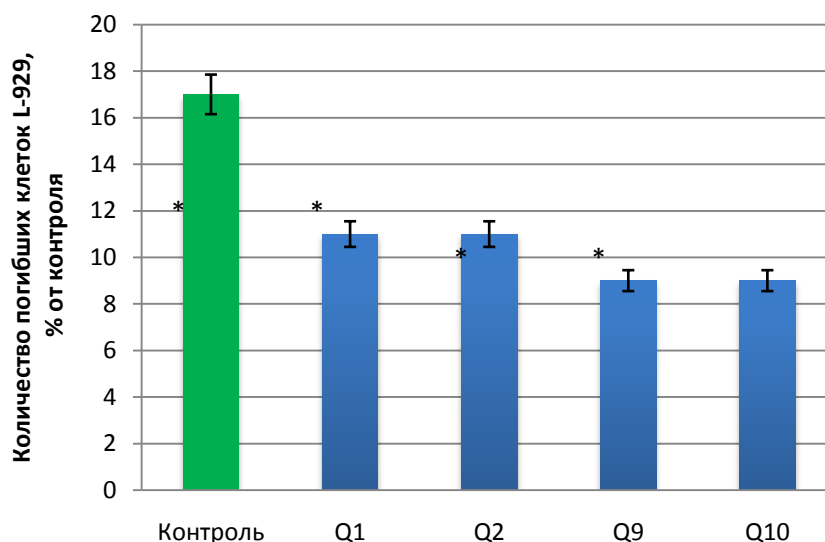


Рис. 54. Влияние убихинонов *in vitro* при добавлении в среду инкубации на цитотоксичность перитонеальных макрофагов мышей

Зеленый столбик – активность контрольных макрофагов, синие – активность макрофагов в присутствии убихинонов. Каждый показатель – среднее для 5 мышей, каждый макрофагальный лизат тестирован в 12 повторах.

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Снижение цитотоксичности макрофагов при обработке антиоксидантами *in vitro* доказывает регуляторную роль окислительно-восстановительного баланса в реализации киллерной активности макрофагов по отношению к опухолевым клеткам. Прямое подтверждение этого предположения мы получили, обнаружив достоверное уменьшение гибели клеток L-929 под действием ФНО при добавлении в среду 50 мкМ убихинона (табл. 8). Снижение цитотоксичности макрофагов, определяемое уровнем секреции лимфокинов, в частности ФНО, можно объяснить изменением скорости синтеза липидов при добавлении Q_9 к среде (Новоселова, 1989). Кроме того, для проявления киллерного действия ФНО важна способность клеток синтезировать в достаточном количестве полиненасыщенные жирные кислоты (Root, 1991) и сохранять асимметрию фосфолипидов в плазматических мембранах (Sambrano & Stleiberg, 1995).

Талица 8

Влияние *in vitro* убихинона Q₉ на цитолиз клеток линии L-929, инкубируемых в присутствии ФНО

Концентрация ФНО, нг/мл	156	312	1250	12500
Без Q ₉	17±0,9	46±5,1	68±3,0	80±7,5
Q ₉ в дозе 50 мкМ	12±1,4*	30±2,8*	56±4,9*	74±6,9

Достоверное отличие от контроля * p<0,05

Примечание. Каждый показатель – процент погибших клеток L-929 (среднее 6 измерений).

Можно предположить, что уменьшение цитолитической активности макрофагов при оральном введении убихинона не связано с супрессией генов, регулирующих индукцию цитокинов. По-видимому, в данном случае убихинон не только проявляет регуляторные функции, но и действует в качестве акцептора свободных радикалов и перекисей, имеющих в клетке, тем самым уменьшая цитолитическое действие макрофагов. Ранее было показано, что при довольно длительном применении диеты, содержащей комплекс антиоксидантов с микроэлементами, происходит экспрессия генов, отвечающих за продукцию БТШ (Ushakava, 1996). На следующем этапе работы мы изучали влияние проиридных биополимеров, обладающих антиоксидантной активностью на иммунный статус экспериментальных животных. Поскольку имеющиеся в научной литературе данные не позволяют провести сравнительную оценку антиоксидантной активности маннанов и фукоиданов, а также продуктов их неполного гидролиза, нами была проведена такая оценка самостоятельно. Результаты измерения уровня антиоксидантной активности гидролизатов фукоидана представлены в таблице 9. Как следует из графика, антиоксидантная активность гидролизатов фукоидана, полученных после 15 минут гидролиза составляла 0,104 мг/г и уменьшалась с увеличением продолжительности гидролиза. Уменьшение величины

антиоксидантной активности фукоидана в течение 60 минут гидролиза составило 27,9 % от величины активности первого образца.

Таблица 9

Антиоксидантная активность продуктов гидролиза природных биополимеров, мг/г

Биополимер	Продолжительность кислотного гидролиза, мин		
	15	40	60
Маннан	0,028	0,033	0,047
Фукоидан	0,0104	0,095	0,075
	Продолжительность ферментативного гидролиза, ч		
	1	3	5
Маннан	0,210	0,230	0,246

Антиоксидантная активность кислотных гидролизатов маннана оказалась ниже в сравнении с гидролизатами фукоидана, однако незначительно возрастала с увеличением продолжительности гидролиза. Уровни антиоксидантной активности кислотных гидролизатов маннана и фукоидана оказались величинами одного порядка, что свидетельствует об их одинаковой способности нейтрализовать свободные радикалы при использовании в качестве пищевых добавок.

Значительно более высокой антиоксидантной активностью обладали манноолигосахариды, полученные путем ферментативного гидролиза маннана (табл. 9). Причем, их антиоксидантная активность также возрастала с увеличением продолжительности гидролиза. Наибольшей антиоксидантной активности гидролизата удалось достигнуть путем инкубации маннана в растворе фермента в течение 5 часов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии антиоксидантной активности у исследуемых образцов в пределах от 0,028 до 0,246 мг/г, что согласуется с литературными данными (Rocha de Souza et al, 2007; Kuo et. al., 2009). Однако полученные нами данные позволяют сделать ряд новых выводов. Как видно из данных таблицы 9, увеличение продолжительности

кислотного гидролиза по-разному влияет на изменение антиоксидантной активности гидролизатов фукоиданов и маннанов. В первом случае наблюдается снижение, а во втором – увеличение активности продуктов гидролиза. По-видимому, это обусловлено структурными различиями в строении молекул этих биополимеров и химической структурой образующихся олигосахаридов. Очевидно, что эти данные необходимо учитывать при разработке пищевых и кормовых добавок на основе манно- и фукоолигосахаридов, для подбора оптимальных условий гидролиза сырья. Как видно из таблицы 9, наиболее эффективным способом получения высокоактивных манноолигосахаридов является ферментативный гидролиз. Следует отметить, что значительное преимущество расщепления молекул биополимеров с помощью гидролитических ферментов заключается в высокой специфичности, а, следовательно, состав получаемых продуктов является прогнозируемым и однотипным. Вместе с тем, применение ферментов требует тщательного соблюдения оптимальных физико-химических условий проведения гидролиза, что не всегда достижимо в условиях промышленного производства. Полученные данные позволяют заключить, что продукты частичного гидролиза маннана и фукоидана могут быть с успехом применены в качестве натуральных антиоксидантов в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Для оценки влияния природных антиоксидантов на иммунный статус нами было исследовано влияние маннозы в рационе экспериментальных животных на структуру углеводной составляющей иммуноглобулинов. Для решения поставленной задачи был использован метод идентификации смешанных углевод-пептидных структур (гликопептидов) с использованием данных масс-спектрометрии высокого разрешения о массе пептидных ионов и их фрагментов, полученных непосредственно в масс-спектрометре. В основу исследований была положена разработанная нами ранее схема анализа состава и структуры гликозилированных иммуноглобулинов, основанная на методах хроматографии и масс-спектрометрии: определение углеводного состава с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии смеси моносахаридов, полученной кислотным гидролизом образцов

иммуноглобулинов мыши определенного класса; дегликозилирование белка с помощью химического и ферментативного гидролиза и идентификация отщепленных гликанов по точным массам и массам их фрагментов, полученным с помощью тандемной масс-спектрометрии в комплексе ионная ловушка/масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье с ионизацией электрораспылением; идентификация сайтов гликозилирования иммуноглобулинов, представленных в каждом конкретном образце. Обнаружено, что введение в рацион питания опытных животных маннозы приводит к существенному изменению качественного состава структуры иммуноглобулинов. Установлено, что у мышей получающих диету с маннозой на 45 % увеличивается число сиалированных фрагментов в иммуноглобулиновой фракции (рис. 55).

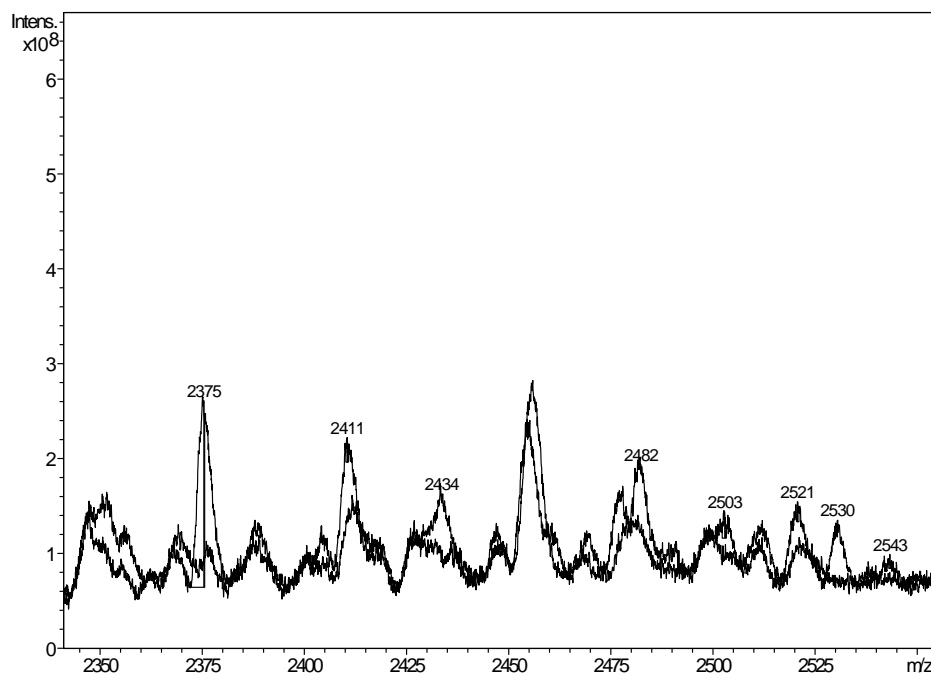


Рис. 55. Фрагмент спектров гидролизованного трипсином образца иммуноглобулинов мышей, получающих диету с маннозой, до и после обработки нейраминидазой (значения m/z указаны для пиков, появившихся в спектре десиалированного образца)

Анализируя спектры, можно также предположить, что некоторые гликопептиды присутствуют в исходных смесях в сиалированной и десиалированной форме. В гидролизате образца от животных, получающих диету с маннозой найдено 29 сиалированных гликопептидов с массами от 1000 до 5000 Да. Как было показано в работе (Ashwell, 1974), соотношение количества сиалированных и несиалированных концов углеводной цепи оказывает определяющее влияние на период полураспада гликопротеинов крови в печени. Так, например, гетерогенно сиалированные формы эритропоэтина характеризуются разными периодами полураспада *in vivo*, большими в случае более сиалированных форм (Morimoto, 1996). Таким образом, диета с антиоксидантами (маннозой) положительно влияет на биосинтез сиалированных гликопротеинов, в результате чего белки сыворотки, в частности иммуноглобулины, могут обладать большей устойчивостью и большим временем жизни, по сравнению с менее сиалированными аналогами, циркулирующими в крови. Нами было исследовано влияние диеты содержащей различные концентрации фукозы на процессы образования иммуноглобулинов G после первичной и вторичной иммунизации карбоангидразой. При первичном иммунном ответе синтез иммуноглобулинов не зависел от введения фукозы в рацион экспериментальных животных - уровень иммуноглобулинов G в сыворотке крови не отличался от контрольного (данные не показаны). Однако через 14 дней после вторичной иммунизации при развитии иммунного ответа на введение карбоангидразы наблюдали достоверное увеличение содержания иммуноглобулинов G в сыворотке животных, получавших с пищей фукозу в дозах 40 и 80 мг/кг веса в сутки (рис. 56).

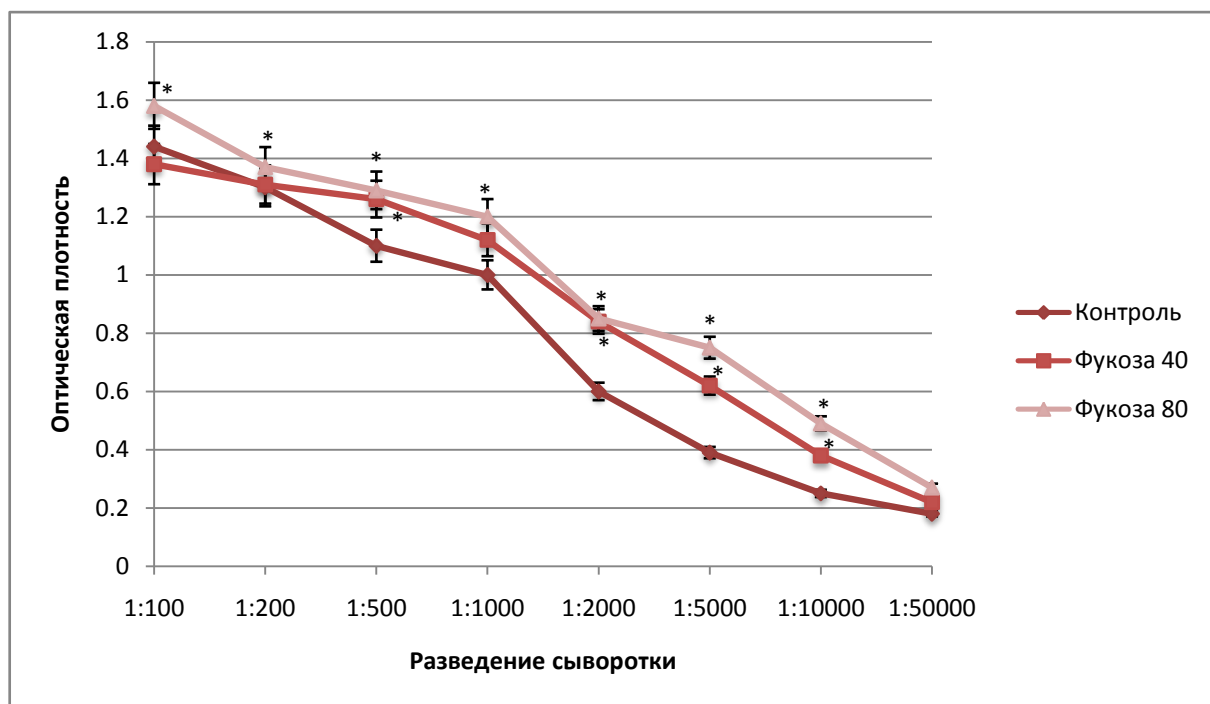


Рис. 56. Влияние диеты с фукозой в дозах 40 и 80 мг/кг/сутки на антителообразование при вторичном иммунном ответе у животных

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

С целью оценки влияния антиоксидантов на показатели состояния иммунной системы в условиях облучения низкоинтенсивными ЭМИ нами было проведено исследование влияния диеты с повышенным содержанием антиоксидантов на продукцию ФНО - ключевого цитокина, участвующего в развитии иммунных реакций в норме и при патологиях, таких как рак. Также оценивали влияние антиоксидантов на пролиферацию иммунокомпетентных клеток под действием митогенов. После 5 часовой экспозиции мышей ЭМИ СВЧ (8-18 ГГц; 1 мкВт/см²), наблюдали повышение продукции ФНО перитонеальными макрофагами и спленоцитами (табл. 10). Эффект повышенной продукции ФНО сохранялся в течение 72 часов с момента облучения. Диета с повышенным содержанием жирорастворимых антиоксидантов (β -каротина, α -токоферола и убихинона Q₉) способствовала повышению продукции ФНО, а также усилению стимулирующего эффекта ЭМИ СВЧ на поздних стадиях эксперимента. При пролиферативная активность Т-лимфоцитов селезенки не зависела от применяемой диеты в условиях облучения ЭМИ СВЧ (данные не показаны).

Таблица 10

Продукция ФНО иммунокомпетентными клетками после облучения
низкоинтенсивным ЭМИ СВЧ (5 часов) и при повышенном содержании
комплекса антиоксидантов в рационе животных

Группа	Макрофаги				Т-лимфоциты			
	6	24	48	72	6	24	48	72
Время после экспози								
Контроль	12.8±0.9	13.1±1.1	12.8±0.8	13.2±1.2	12.1±1.2	11.9±1.2	12.0±0.9	11.8±0.7
СВЧ	24.6 ±2.0*	43.5 ±3.6*	32.8 ±0.8*	13.8±1.0	20.9 ±1.7*	24.6 ±2.3*	27.1 ±1.9*	20.5 ±1.8*
АО	24.0 ±2.3*	25.3 ±2.6*	22.8 ±1.9*	24.5 ±1.5*	18.0 ±1.4*	19.0 ±1.5*	18.0 ±1.5*	18.0 ±1.7*
АО+СВЧ	24.2 ±1.9*	32.8 ±2.6*	25.6 ±1.9*	35.2 ±3.4*	20.5 ±1.8*	28.1 ±1.9*	35.9 ±2.7*	41.7 ±3.8*

Достоверное отличие от контроля * $p < 0,05$

Примечание: Концентрация ФНО указана в пкг/мл клеточного лизата.

Эффект повышенной продукции ФНО сохранялся в течение 72 часов с момента облучения. Диета с повышенным содержанием жирорастворимых антиоксидантов (β -каротина, α -токоферола и убихинона Q_9) способствовала повышению продукции ФНО, а также усилению стимулирующего эффекта ЭМИ СВЧ на поздних стадиях эксперимента. Увеличение продукции ФНО можно объяснить изменением липидного состава мембран лимфоидных клеток животных, получавших антиоксиданты, что было показано ранее (Новоселова и др., 1995). Полученные данные свидетельствуют о значительном влиянии антиоксидантов на компоненты иммунной системы, в том числе участвующие в ответах на низкоинтенсивные ЭМИ различной природы. Это открывает перспективы использования антиоксидантов для модулирования состояния иммунной системы в условиях воздействия электромагнитных волн.

3.5. Схема воздействия низкоинтенсивных ЭМИ различной природы на компоненты иммунной системы млекопитающих

В результате проведенных исследований нами было изучено действие низкоинтенсивных ЭМИ на биологические объекты разных уровней организации: от клеточных популяций до целого организма. В ходе работы применялось ЭМИ в различных режимах воздействия: как непрерывное однократное, так и фракционированное при кратковременной ежедневной экспозиции. Кроме использования здоровых животных, мы применяли различные физиологические модели: животных с патологией (опухоленосители) и с активированным иммунитетом (иммунизированные мыши), животных со сниженной физиологической активностью (в состоянии гибернации). Все вышеуказанные подходы, примененные при выполнении этой работы, дали возможность прояснить целый спектр важных закономерностей формирования ответов на уровне целого организма и изолированных клеток. Обобщение всех полученных по результатам эксперимента данных привело к основному выводу: примененные низкоинтенсивные излучения различной природы могут оказывать разнонаправленные эффекты на систему клеточного иммунитета, чувствительную к внешним воздействиям, а также вызывают нестабильность функциональной активности клеток. Эффекты воздействия низкоинтенсивных ЭМИ могут проявляться как на молекулярно-клеточном, так и на организменном уровне, их амплитуда является дозозависимой, а направленность может определяться физиологическим состоянием объекта. Если допустить неспецифический характер взаимодействия рассмотренных в данной работе ЭМИ, то можно попытаться определить диапазон доз падающего излучения, способных вызывать активацию или подавление основных звеньев клеточного иммунитета как при длительном, так и при фракционированном воздействии на живые объекты. Описывая действие на иммунную систему низкоинтенсивных ЭМИ различной природы в зависимости от дозы излучения, можно заключить, что однонаправленные эффекты во многих случаях возникают при использовании доз одного порядка

(рис. 57). Пороговым значением стимулирующего эффекта низкоинтенсивных ЭМИ следует считать дозу падающего излучения до $0,1 \text{ Дж/см}^2$. При использовании более высоких доз ЭМИ наступает угнетение реакций иммунной системы. Таким образом, приведение полученных данных к общему знаменателю свидетельствует о неспецифическом, стрессовом характере ответа иммунной системы организма на низкоинтенсивные ЭМИ различной природы.

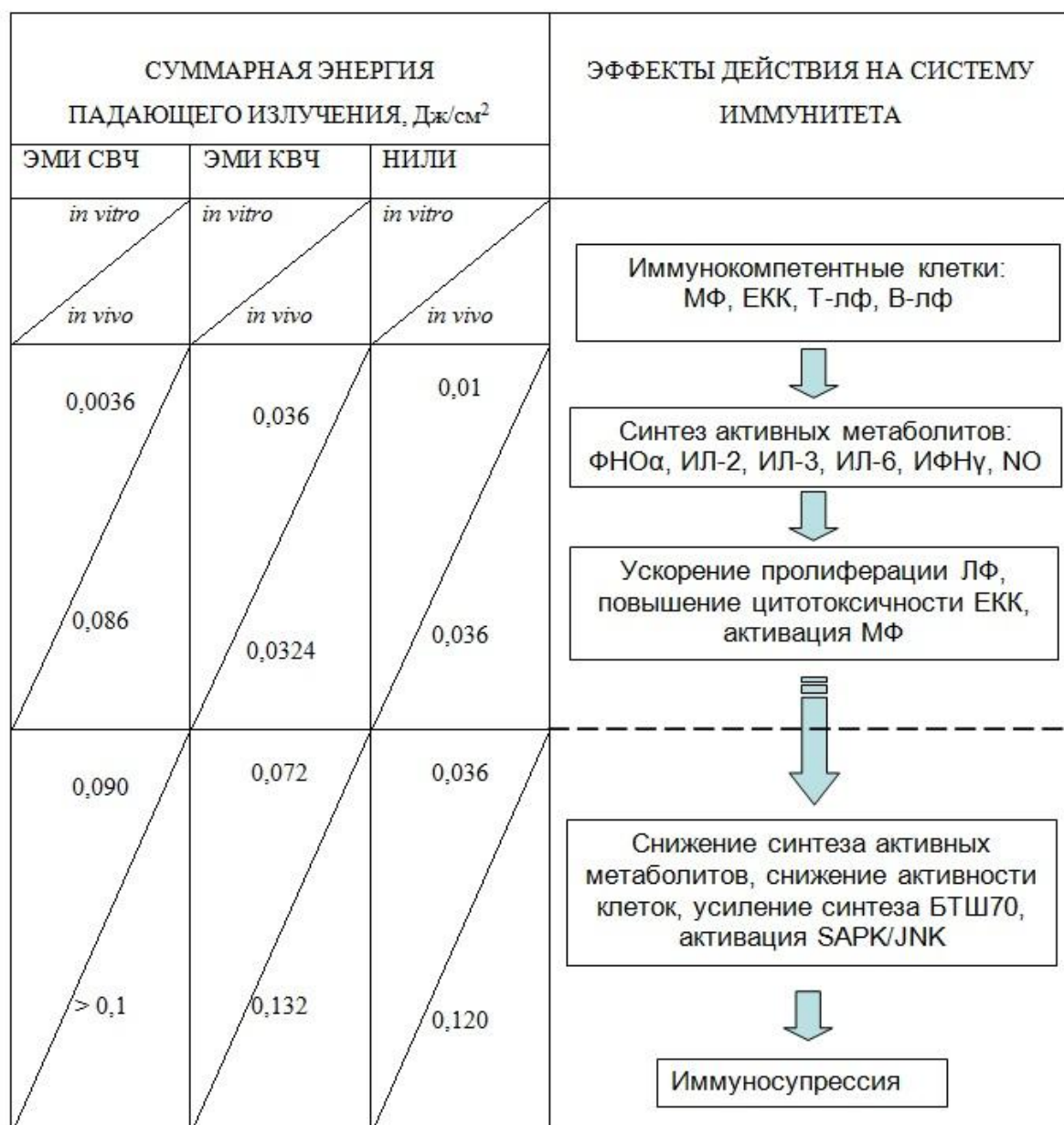


Рис. 57. Схема действия низкоинтенсивных ЭМИ различной природы на компоненты иммунной системы млекопитающих

Основанием такого заключения служат данные экспериментов по измерению продукции цитокинов важнейшими иммунокомпетентными клетками – макрофагами и лимфоцитами. Действительно, при использовании однократной экспозиции животных становилось очевидным, что дозовая кривая имеет колебательный характер, то есть сменяют друг друга активация и угнетение продукции ФНО. Такой характер кривых доза-эффект при однократном облучении был отмечен и при облучении отдельных клеточных популяций. В то же время дозовые кривые для активности макрофагов и лимфоцитов несколько отличались развитием клеточного ответа на действие слабых электромагнитных волн. Судя по несинхронным ответам макрофагов и спленоцитов, можно сделать вывод о различной чувствительности к ЭМИ отдельных популяций клеток. Аналогичные результаты были получены и при измерении цитотоксической активности естественных киллерных клеток, которые являются одной из основных составляющих неспецифического иммунитета. В качестве примера – изменением дозы облучения низкоинтенсивным красным светом можно регулировать активность ЕКК. Также изменение активности ЕКК наблюдается при варьировании локализации участка тела, подвергающегося облучению: при фракционированном облучении задней лапы малой дозой активность ЕКК повышалась, а облучение зоны тимуса в том же режиме вызывало угнетение активности этих клеток. Проводя пролонгированное фракционированное облучение, воздействуя каждые третьи сутки, на здоровых животных излучением ГНЛ, мы обнаружили схожие с вышеуказанными закономерности для продукции БТШ, NO и цитокинов. Зависимости продукции ФНО и оксида азота от дозы облучения также были обнаружены при фракционированном режиме облучения. Для этого здоровых мышей ежедневно подвергали кратковременной экспозиции на протяжении 30-ти дней. Исследование эффектов электромагнитного излучения при фракционированном режиме облучения проводилось и на животных, у которых путем трансплантации злокачественных клеток было инициировано развитие раковых новообразований, а также после проведения иммунизации животных чужеродным белком (антигенной стимуляции). Полученные в результате исследований данные показали, что низкоинтенсивное ЭМИ при длительном применении оказывает негативное влияние на ряд показателей иммунного статуса животных с

экспериментальными опухолями. Дополнительным подтверждением гипотезы о неспецифическом, стрессовом характере действия низкоинтенсивных ЭМИ является активация синтеза маркеров клеточного стресса: БТШ и стресс-активируемой протеинкиназы (SAPK/JNK) при длительном воздействии ЭМИ. Известным является факт, что индуцибельные формы БТШ – главный внутриклеточный фактор защиты от повреждающих воздействий, в ответ на которые белки теплового шока и продуцируются. К таким повреждающим факторам относятся: нейротоксины; высокая температура; тяжелые металлы; радиация как ионизирующая, так и неионизирующая. Активация SAPK/JNK тоже провоцируется действием различных стрессовых факторов на клетку, а также экстраклеточных сигналов, а именно, стимуляции T-клеточных рецепторов, токсинов, ультрафиолетового и γ -излучения, осмотического стресса, цитокинов (ФНО- α), теплового шока, АФК, антираковых препаратов (цис-платина, адриамицин и др.), церамидов. Следует отметить, что мы обнаружили весьма значительный рост содержания Phospho-SAPK/JNK в клетках, что согласуется с результатами других исследований, в ходе которых сделан вывод, что принцип функционирования SAPK/JNK-сигнального каскада – это «все или ничего», то есть он во много раз усиливает внешний сигнал (Bagowski et al., 2003). Необходимо еще раз подчеркнуть, что здесь ведется речь о сверхмалых дозах, которые не обладают тепловыми или повреждающими эффектами. Таким образом, обладая весьма малой энергией, ЭМИ могут вызывать значительную активацию сигнальных путей организма. На основании полученных данных и можно составить схему активации различных сигнальных путей в клетке под действием низкоинтенсивных неионизирующих ЭМИ (рис. 58) Основными путями, участвующими в ответе клетки на воздействие низкоинтенсивного ЭМИ, могут быть активация индуцибельной NO-синтазы, системы БТШ, и стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK. Появление в клетке в результате стресса плохо свернутых белков, то есть белков с нарушенной третичной структурой, приводит к тримеризации факторов теплового шока (HSF), при этом существует вероятность образования гетеро- и гомотримеров. Дальнейшее фосфорилирование тримеров факторов теплового шока происходит одновременно с активацией транскрипции генов теплового шока и ростом концентрации БТШ (HSP), что

приводит к появлению комплексов HSF-HSP. После прекращения стресса тримеры HSF отсоединяются от ДНК, вновь становясь неактивными мономерами, при этом происходит возврат клетки к нормальному синтезу белков (Anskar et al., 2007). Существует предположение, что БТШ способны к регуляции экспрессии собственных генов с помощью "петли авторегуляции". Белки теплового шока регулируют уровень реакции на стресс, не позволяя клеткам реагировать на такие воспалительные цитокины, как ФНО и ИЛ-1. Под воздействием ЭМИ может активироваться индуцируемая форма NO-синтазы (iNOS), за счет чего происходит образование активных форм кислорода. Синтезируемый индуцируемой NO-синтазой оксид азота вступает в реакцию с супероксидом, при этом образуется окислитель пероксинитрит, отличающийся высокой токсичностью. Под действием БТШ72 экспрессия iNOS ингибируется и снижается активация NFκB (Feinstein et al., 1996). Помимо этого, БТШ уменьшают активность NADPH-оксидазы в нейтрофилах, при этом активируя фагоцитарную супероксиддисмутазу. Также белки теплового шока в астроцитах отвечают за регуляцию активности матричных металлопротеиназ. Факторы транскрипции БТШ – основные участники активации воспалительной реакции, поэтому ряд внутриклеточных эффектов белков этого семейства имеет отношение к регуляции ими пути ядерного фактора NFκB. БТШ, воздействуя на NFκB напрямую или на его сигнальные пути, ингибируют транслокацию составляющих ядерный фактор димеров в ядро, где они вызывают экспрессию целого спектра воспалительных генов (Giffard et al., 2008). Известно также, что БТШ72 путем взаимодействия с комплексом ИКК препятствуют активации SAPK/JNK, поскольку ИКК необходимым для освобождения ядерного фактора и его переноса в ядро. Таким образом, белки класса БТШ70 используют несколько путей для предотвращения развития индуцированных стрессом процессов в организме. Итогом активации описанных выше сигнальных путей могут являться такие процессы, как дифференцировка, пролиферация, адгезия, миграция и активация клеток, развитие воспаления, а при определенных условиях – апоптоза. Конечный результат воздействия на клетку низкоинтенсивных ЭМИ может зависеть как от силы и продолжительности воздействия, так и от физиологического состояния облучаемой клетки. Эти условия следует учитывать при разработке стратегии применения низкоинтенсивных

электромагнитных волн в медицине и определении нормативов электромагнитной безопасности в быту и на производстве.

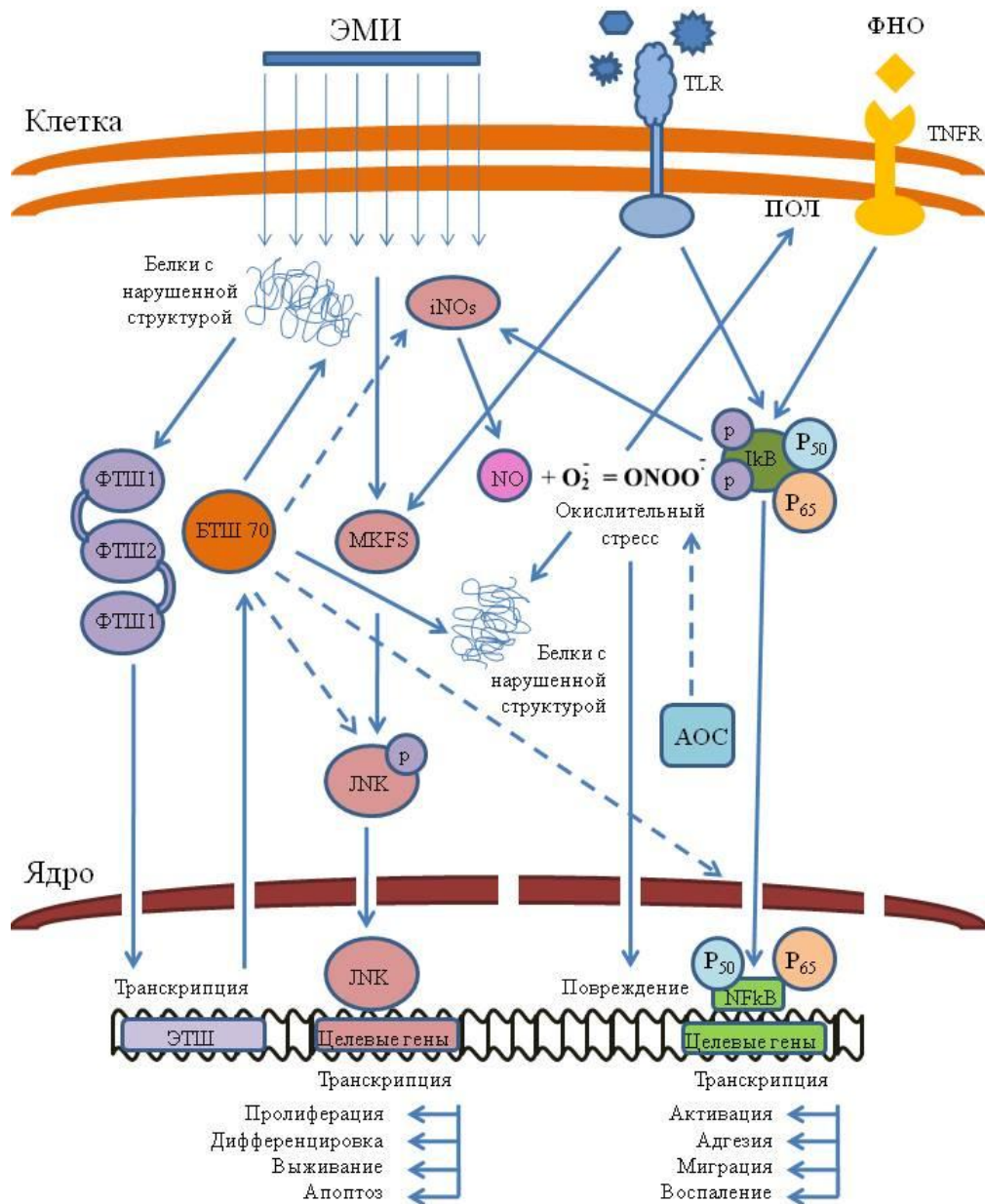


Рис. 58. Гипотетический механизм реализации клеточного ответа на низкоинтенсивные ЭМИ

TLR - Толл-подобный рецептор; TNFR - рецептор для ФНО; iNOs – индуцибельная NO-синтаза; ФТШ – фактор теплового шока; ЭТШ - элемент теплового шока; ПОЛ – перекисное окисление липидов; АОС – антиоксидантные системы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

До настоящего времени в результатах исследований влияния низкоинтенсивных ЭМИ различной природы на иммунную систему млекопитающих сохраняются явные противоречия. Понятно, что это вызвано как вариабельностью объектов исследования и многообразием параметров воздействия, так и методологией проведения экспериментальных исследований и последующей интерпретацией результатов. В данной работе мы попытались, с одной стороны, стандартизировать условия экспериментов с точки зрения используемых источников и параметров излучений, а также измеряемых показателей, а с другой стороны максимально широко охватить спектр физиологических состояний объектов исследования. Основной целью, которую пытались достигнуть при такой постановке задачи, было получение объективной информации о зависимости реакций иммунной системы млекопитающих не только от параметров и условий воздействия ЭМИ, но и от состояния облучаемого объекта. Такой подход был необходим по причине многообразия и сложности биологических объектов, что в значительной степени затрудняет стандартизацию, анализ и интерпретацию полученных данных. В качестве объектов исследования нами были использованы как изолированные иммунокомпетентные клетки различных популяций, так и представители различных видов млекопитающих (мыши *Mus musculus* NMRI, суслики *Citellus undulatus pallas*). Использовали различные модели физиологических состояний: модель гибернации, иммунного ответа на введение антигена и модель опухолевого роста. Нами были выбраны три типа электромагнитных излучений: ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ. Интенсивность излучений выбирали с учетом того, чтобы минимизировать нагрев облучаемых объектов и тем самым, исключить тепловые эффекты рассматриваемых излучений. В качестве параметров определения функционального состояния иммунной системы млекопитающих измеряли уровень продукции ряда цитокинов (ФНО, ИЛ-2, ИЛ-3), а также показатели физиологической активности иммунокомпетентных

клеток: скорость пролиферации Т- и В- лимфоцитов, цитотоксичность ЕКК, уровень антителообразования. Оценивали уровень содержания в клетках ключевых компонентов сигнальных путей: NFκB, SAPK/JNK, NO и БТШ. В качестве средства модуляции эффектов ЭМИ на иммунную систему рассматривали антиоксиданты (убихинон Q, β-каротин, гидролизаты маннана и фукоидана). В результате проведенных исследований показана высокая чувствительность клеток иммунной системы млекопитающих к действию низкоинтенсивных ЭМИ разной природы. Значительные изменения измеряемых параметров наблюдали при использовании доз падающего излучения в диапазоне 0,036-0,132 Дж/см². При этом более чувствительными к облучению были изолированные клетки в сравнении с целым организмом. Наблюдаемые эффекты были дозозависимыми и проявлялись при использовании доз излучения примерно одного порядка, независимо от типа излучения. При использовании здоровых животных в качестве объектов исследования можно было наблюдать дозозависимую активацию компонентов иммунной системы, при использовании малых доз падающего излучения или облучения в режиме кратковременной периодической экспозиции. Облучение в верхнем диапазоне используемых доз преимущественно приводило к иммуносупрессии. Длительная периодическая экспозиция животных также способствовала снижению ключевых показателей иммунного статуса. Облучение животных, находящихся в тяжелом патологическом состоянии – при развитии опухоли, могло вызвать дополнительную активацию иммунной системы только на ранних стадиях заболевания. Воздействие на поздних сроках не способствовало улучшению показателей иммунной системы, а зачастую напротив – вызывало дополнительное угнетение организма. Полученные результаты свидетельствуют о возможности активации имеющегося в клетке ресурса под действием низкоинтенсивных ЭМИ, но не о дополнительном потенцировании иммунной системы. Подтверждением этого служат эксперименты на животных-гибернантах: например, клетки, выделенные из животных в состоянии умеренной гибернации, оказались способными к более сильному повышению продукции ФНО в ответ на облучение,

чем клетки, выделенные из животных, находящихся в активном состоянии. Вопрос о механизмах реализации ответа клетки на воздействие ЭМИ остается открытым, но может быть частично прояснен при анализе результатов влияния ЭМИ на продукцию сигнальных молекул: БТШ, NF κ B, SAPK/JNK, NO. Полученные данные подтверждают сделанное ранее нами предположение о развитии ответа клетки на низкоинтенсивное ЭМИ по стрессовому типу. В данном случае, результат воздействия ЭМИ может определяться балансом между активацией рассматриваемых сигнальных путей и подавлением их в результате действия БТШ по типу отрицательной обратной связи (см. рис. 58). Применение диеты, обогащенной антиоксидантами, способно влиять на состояние иммунной системы и тем самым потенцировать эффекты низкоинтенсивных ЭМИ. Таким образом, конечный эффект воздействия, его амплитуда и направленность зависят как от физических параметров излучения, так и от физиологического состояния клеток и облучаемого организма. Результаты проведенных исследований напрямую относятся к теме безопасности электромагнитной терапии, при использовании которой следует учитывать, что незначительное изменение дозы излучения способно поменять вектор воздействия и вместо положительного эффекта будет достигнут отрицательный. Зависимость эффектов от физиологического состояния живого объекта говорит о важности параллельного мониторинга активности иммунной системы и других основных регуляторных систем организма в ходе электромагнитной терапии. Помимо этого, результаты работы указывают на необходимость дальнейших исследований по уточнению норм безопасности при использовании излучений в быту, на производстве, а также при строительстве объектов, излучающих электромагнитные волны: приемо-передающих антенн сотовой связи, телевизионных ретрансляторов, линий электропередач. Представленные в настоящей работе данные могут послужить научной основой для разработки концепции электромагнитной безопасности.

ВЫВОДЫ

1. ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ в дозах более 0.0036 Дж/см^2 индуцируют повышение продукции цитокинов (ИФН- γ ; интерлейкинов 2, 3, 6; ФНО- α), NO и экспрессии БТШ70 и БТШ90 в макрофагах и лимфоцитах, что свидетельствует о высокой чувствительности клеток иммунной системы млекопитающих к низкоинтенсивным электромагнитным излучениям различных частотных диапазонов как при воздействии *in vitro*, так и *in vivo*.

2. Показаны отдаленные эффекты однократного облучения организма млекопитающих низкоинтенсивными ЭМИ. Повышенная активность иммунокомпетентных клеток может наблюдаться в течение 24-96 часов после воздействия.

3. Эффекты низкоинтенсивных электромагнитных излучений зависят от функционального состояния облучаемых живых систем: клетки, выделенные из зимнеящих животных в состоянии гибернации, нечувствительны к воздействию малых доз низкоинтенсивных ЭМИ, в то время как продукция ФНО и пролиферативная активность лимфоцитов, выделенных из активных животных, возрастает более чем на 120% от контрольных значений после облучения.

4. Кратковременное фракционированное (до 10 суток) действие низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ на здоровых животных в диапазоне сверхмалых доз вызывает, в основном, стимуляцию иммунной системы, тогда как пролонгированное (до 30 суток) фракционированное облучение индуцирует иммуносупрессию, снижая уровень антителообразования и противоопухолевую резистентность у мышей.

5. Обнаружено, что воздействие НИЛИ вызывает 3-6 кратную активацию продукции белков сигнального каскада стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK, что подтверждает стрессовый механизм ответа клеток на низкоинтенсивные неионизирующие излучения.

6. Применение маннозы и фукозы в качестве антиоксидантов вызывает статистически значимое (до 30 %) повышение содержания иммуноглобулинов в

сыворотке крови и количество сиаированных цепей гликопротеинов в молекулах антител животных при иммунизации и облучении ЭМИ СВЧ, что указывает на возможность модуляции физиологического состояния иммунокомпетентных клеток и способность антиоксидантов потенцировать эффекты низкоинтенсивных ЭМИ.

7. Разработана схема, отражающая связь различных механизмов активации сигнальных путей (БТШ, NO, NFkB, SAPK/JNK и др.) в клетках иммунной системы при воздействии низкоинтенсивных ЭМИ и описывающая стрессовый характер клеточного ответа на облучение.

8. Результаты настоящей работы могут послужить научным обоснованием для разработки рекомендаций по использованию электромагнитных излучений в медицинской практике и уточнения правил электромагнитной безопасности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbud-Filho M., Kupiec-Weglinski J.W., Araujo J.L. et al. Cyclosporine therapy of rat heart allograft recipients and release of interleukins (IL 1, IL 2, IL 3): a role for IL 3 in graft tolerance? // J. Immunol. 1984. Vol. 133 (5). P. 2582-2586.
2. Adamson G.M., Billings R.E. Cytokine toxicity and induction of NO synthase activity in cultured mouse hepatocytes // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1993. Vol. 119. P. 100-107.
3. Adey R. Jim Henry's world revisited – enviromental «stress» at the psychophysiological and the molecular levels // Acta Physiol. Scand. 1997. Vol. 640. Suppl. P. 176-179.
4. Adey W.R. Biological effects of electromagnetic fields // J. Cell. Biochem. 1993. Vol. 51 (4). P.410-416.
5. Adey W.R. Frequency and power window in tissue interactions with weak electromagnetic fields // Proc. IEEE, 1980. Vol. 68 (1). P.119.
6. Adey W.R. Introduction: Effects of electromagnetic radiation on the nervous system // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1975. Vol. 247. P. 15-20.
7. Adey W.R. Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields // Physiol. Rev. 1981. Vol. 61 (2). P.435-514.
8. Aggarwal B.B., Natarajan K. TNF: Developments during the last decade. // Eur. Cytokine Netw. 1996. Vol. 7 (2). P. 93-124.
9. Aglietta M., Pasquino P., Sanavio F. et al. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 3: target cells and kinetics of response in vivo // Stem Cells. 1993. Vol. 11. Suppl. 2. P. 83-87.
10. Ahmad H., Srivastova R.C., Agarwal R., Mukhtar H. Nitric oxide synthase and skin tumor promotion // Biochem and Biophys. Res. Communs. 1997. V. 232. P. 328.
11. Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy // Clin. Dermatol. 2006. V. 24(1). P. 16-25.

12. Alleva R., Tomasetti M., Battino M. et al. The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoprotein subfractions // Proc. nat. Acad. Sci. USA. 1995. V. 32. P. 267-281.
13. Al-Qattan K.K., Thomson M., Al-Mutawa'a S., Al-Hajeri D. et. al. Nitric oxide mediates the blood-pressure lowering effect of garlic in the rat two-kidney, one-clip model of hypertension // J. Nutr. 2006. V. 136(3). P. 774S-776S.
14. Al-Ramadi B.K., Meissler J.J.Jr., Huang D., Eisenstein T.K. Immunosuppression induced by nitric oxide and its inhibition by interleukin-4 // Eur. J. Immunol. 1992. Vol. 22. P. 2249-2254.
15. Amento E.P., Ehsani N., Palmer H., Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells // Arterioscl. Thromb. 1991. Vol. 11 (5). P. 1223-1230.
16. Anckar J., Sistonen L. Heat shock factor 1 as a coordinator of stress and developmental pathways // Adv. Exp. Med. Biol. 2007. Vol. 594. P.78-88.
17. Andre P., Spertini O., Guia S., Rihet P. et al. Modification of P-selectin glycoprotein ligand 1 with a natural-kille-cell restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000. Vol. 97. P. 3400-3405.
18. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3203.
19. Arpin C., Dechanet J., Van Kooten C., Merville P. et al. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro // Science. 1995. Vol. 268. P. 720-722.
20. Arzt E., Stalla G.K. Cytokines: autocrine and paracrine roles in the anterior pituitary // Neuroimmunomodulation. 1996. Vol. 3. P. 28-34.
21. Ashwell G., Morell A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1974. Vol. 41. P. 99-128.

22. Aste-Amezaga M. et al. Cooperation of natural-killer-cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells // *Cell. Immunol.* 1994. Vol. 156. P. 480-492.
23. Auclair S.R., Roth K.E., Saunders B.L., Ogborn K.M. et al. Interleukin-3-deficient mice have increased resistance to blood-stage malaria // *Infect. Immun.* 2014. Vol. 82(3). P. 1308-1314.
24. Azem A., Oppliger W., Lustig A. et al. The mitochondrial hsp70 chaperone system. Effect of adenine nucleotides, peptide substrate, and mGrpE on the oligomeric state of mhsp70 // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 20901-20906.
25. Bagowski C.P., Besser J., Frey C.R., Ferrell, J.E. The JNK Cascade as a Biochemical Switch in Mammalian Cells. Ultrasensitive and All-or-None Responses // *Curr. Biol.* 2003. Vol. 13. P. 315-320.
26. Bajgar R., Kolarova H., Bolek L., Binder S. et al. High oxygen partial pressure increases photodynamic effect on HeLa cell lines in the presence of chloraluminium phthalocyanine // *Anticancer. Res.* 2014. Vol. 34(8). P. 4095-4099.
27. Bajaj M.S., Kew R.R., Webster R.O., Hyers T.M. Priming of human neutrophil functions by tumor necrosis factor: enhancement of superoxide anion generation, degranulation, and chemotaxis to chemoattractants C5a and F-Met-Leu-Phe // *Inflammation.* 1992. Vol. 16. P. 241-250.
28. Baldwin A.S. Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights // *Ann. Rev. Immunol.* 1996. Vol. 14. P. 649-683.
29. Banchereau J., de Paoli P., Valle A., Garsia E. et al. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40 // *Science.* 1991. Vol. 251. P. 70-72.
30. Banchereau J., Rousset F. Growing human B lymphocytes in the CD40 system // *Nature.* 1991. Vol. 353. P. 678-679.

31. Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor-kb – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases // *New England J. Med.* 1997. Vol. 336. № 15. P. 1066-1071.
32. Basford J.R. Low-energy laser therapy: controversies and new research findings // *Lasers Surg. Med.* 1989. № 1. P. 1-5.
33. Becher B., Dodelet V., Fedorowicz V., Antel J.P. Soluble tumor necrosis factor receptor inhibits interleukin-12 production by stimulated human adult microglial cells in vitro // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 98. P. 1539-1543.
34. Bell G.B., Marino A.A., Chesson A.L. Frequency-specific responses in the human brain caused by electromagnetic fields // *J. Neurol. Sci.* 1994. Vol. 123 (1). P. 26-32.
35. Bergui L., Schena M., Gaidano G. et al. Interleukin 3 and interleukin 6 synergistically promote the proliferation and differentiation of malignant plasma cell precursors in multiple myeloma // *J. Exp. Med.* 1989. Vol. 170 (2). P. 613-618.
36. Berk B.C., Abe J.I., Min W. et al. Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001. Vol. 947. P. 93-109.
37. Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. Vol. 12. P. 735-773.
38. Bernard N., Jacquemont C., Devevy L., Chretien P. Development of a lymphoblastic leukemia animal model for investigation of potential leukemogenic effects of electromagnetic fields in children // *Proceedings of 5th International congress of EBEA, Helsinki.* 2001. P. 244-245.
39. Bernardy P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V. et al. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues // *Eur. Journ. Biochem.* 1999. Vol. 264. №3. P. 687-701.
40. Berridge M.J. The AM and FM of calcium signaling. // *Nature.* 1999. Vol. 386. P. 759-760.
41. Blalock J.E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems // *Physiol. Rev.* 1989. Vol. 69. P. 1-32.

42. Blank M., Goodman R. Electromagnetic initiation of transcription at specific DNA sites // *J Cell Biochem.* 2001. Vol. 81. P. 689-692.
43. Bliznakov E., Folkers K., Yamamura Y. Coenzyme Q in experimental infections and neoplasia // *Biomedical and clinical aspects of CoQ.* 1997. P. 73-83.
44. Bose M., Farnia P. Proinflammatory cytokines can significantly induce human mononuclear phagocytes to produce nitric oxide by a cell maturation-dependent process // *Immunol. Lett.* 1995. Vol. 48. P. 59-64.
45. Bredt D.S., Snyder S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule // *Annu. Rev. Biochem.* 1994. Vol. 63. P. 175-195.
46. Brennan F.M., Maini R.N., Feldmann M. TNF alpha - a pivotal role in rheumatoid arthritis? // *Br. J. Rheumatol.* 1992. Vol. 31(5). P. 293-298.
47. Britch M.A. Mathematical modelling of intracellular calcium signal transduction // *Nonlinear phenomena in complex systems.* 1999. Vol. 2 (4). P. 89-92.
48. Brooks C.G., Kuribayashi K., Sale G.E., Henney C.S. Characterization of five cloned murine cell lines showing high cytolytic activity against YAC-1 cells // *J. Immunol.* 1982. Vol. 128. P. 2326.
49. Brosseau L., Welch V., Wells G., Tugwell P. et al. Low level laser therapy for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a metaanalysis // *J. Rheumatol.* 2000. Vol. 27(8). 1961-1969.
50. Brown C.R., Martin R.L., Hansen W.J., Beckman R.P. et al. The constitutive and stress-inducible forms of hsp70 exhibit functional similarities and interact with one another in an ATP-dependent fashion // *J. Cell. Biol.* 1993. Vol. 120 P. 1101-1112.
51. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 351-369.
52. Bruhe B., Hartzell P., Nicotera P., Orrenius S. Spermine prevents endonuclease activation and apoptosis in thymocytes // *Exp. Cell. Res.* 1991. Vol. 195. P. 323-329.

53. Burduli N.M., Gutnova S.K. State of humoral immunity and phagocytic activity of neutrophils in patients with ulcer and effect of low-intensity laser therapy // *Eksp Klin Gastroenterol.* 2004. Vol. (4). P. 29-32.
54. Burgess A.W., Metcalf D., Russell S.H., Nicola N.A. Granulocyte/macrophage-, megakaryocyte-, eosinophil- and erythroid-colony-stimulating factors produced by mouse spleen cells // *Biochem. J.* 1980. Vol. 185 (2). P. 301-314.
55. Busse R., Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation // *Ann. Med.* 1995. Vol. 27. P. 331-340.
56. Buttke T.M., Sadstorm P.A. // *Immunol. today.* 1994. Vol. 15. P. 7-10.
57. Caetano Reis e Sousa Dendritic cells in a mature age // *Nature Reviews Immunology.* 2006. Vol. 6. P. 476-483.
58. Calza L., Giardino L., Cecatelli S. // *Neuro Report.* 1993. Vol. 4. P. 627-630.
59. Carson W.E., Haldar S, Baiocchi R.A., Croce C.M. et al. // The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the up-regulation of bcl-2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Vol. 91. P. 7553-7557.
60. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L. et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72 (9). P. 3666-3670.
61. Carville A., Evans T.I., Reeves R.K. Characterization of circulating natural killer cells in neotropical primates // *PLoS. One.* 2013. Vol. 8(11). P. e78793.
62. Castro D.J., Saxton R.E., Soudant J. The concept of laser phototherapy // *Otolaringol. Clin. North. Am.* 1996. Vol. 29. № 6. P. 1011-1029.
63. Caux C., Vanbervliet B., Massacrier C. et al. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells // *Blood.* 1996. Vol. 87 (6). P. 2376-2385.
64. Chen S., Smith D.F. Hop as an adaptor protein in the Hsp70 and Hsp90 machinery // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 35194-35200.
65. Chhatwal V.J.S., Ngoi S.S., Chan S.T.F., Chia Y.W. // *Carcinogenesis.* 1994. Vol. 15. P. 2081.

66. Chiang C.S., Powell H.C., Gold L.H. et al. Macrophage/microglial-mediated primary demyelination and motor disease induced by the central nervous system production of interleukin-3 in transgenic mice // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97(6). P. 1512-1524.
67. Choi M.S.K., Boise L.H., Gottschalk A. R., Quintans J. et al. The role of bcl-XL in CD40-mediated rescue from anti- μ -induced apoptosis in WEHI-231 B lymphoma cells // *Eur. J. Immunol.* 1995. Vol. 25. P. 1352-1357.
68. Cohen L., David B., Cavaillon J.M. Interleukin 3 enhances cytokine production by LPS-stimulated macrophages // *Immunol. Lett.* 1991. Vol. 28. P. 121-126.
69. Coleman M. P., Bell C. M. J., Taylor H.-L., Primic-Zakelj M. Leukemia and residence near powerlines: A case-control study // *Br. J. Cancer.* 1989. Vol. 60. P. 793-798
70. Coligan J.E., Kruisbeck A.M., Margulies D.H. et al. // *Current Protocols in Immunology.* 1991.
71. Colotta F., Re F., Polentarutti N. et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products // *Blood.* 1992. Vol. 80. P. 2012-2020.
72. Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., Chen K.S. et al. // Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56^{bright} subset. *Blood.* 2001. Vol. 97. P. 3146-3151.
73. Cooper M.D. Pre-B cells: Normal and abnormal development // *J. Clin. Immunol.* 1981. Vol. 1. P. 81.
74. Cosentino K., Beneduci A., Ramundo-Orlando A., Chidichimo G. The influence of millimeter waves on the physical properties of large and giant unilamellar vesicles // *J. Biol. Phys.* 2013. Vol. 39(3). P. 395-410.
75. Coutier S., Bezdetnaya L., Marchal S. et. al. Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of phagocytosis, nitric oxide release and tumor necrosis factor-alpha mediated cytolytic activity // *Br. J. Cancer.* 1999. Vol. 81. №1. P. 37-42.

76. Crapper R.M., Schrader J.W. Frequency of mast cell precursors in normal tissues determined by an in vitro assay: antigen induces parallel increases in the frequency of P cell precursors and mast cells // *J. Immunol.* 1983. Vol. 131 (2). P. 923-928.
77. Curtsinger J.M., Fan D.P. Interleukin 3 augments the murine primary cytolytic T lymphocyte response to allogeneic tumor cells // *J. Immunol.* 1984. Vol. 133 (1). P. 267-272.
78. Daien C.I., Gailhac S., Audo R., Mura T. et al. High levels of natural killer cells are associated with response to tocilizumab in patients with severe rheumatoid arthritis // *Rheumatology (Oxford)*. 2014.
79. Dardenne M., Savino W. The interdependence of the endocrine and immune systems // *Advances Neuroimmunol.* 1996. Vol. 6
80. De Iuliis G.N., Newey R.J., King B.V., Aitken R.J. Mobile phone radiation induces reactive oxygen species production and DNA damage in human spermatozoa in vitro // *PLoS One*. 2009. Vol. 31. P. 6446.
81. De Vree W.J., Essers M.C., De Bruijn H.S., Star W.M. et al. Evidence for an important role of neutrophils in efficiency of photodynamic therapy in vivo // *Cancer Res.* 1996. Vol. 56. №13. P. 2908-2911.
82. Dempsey L.A. Interferons in the brain // *Nat. Immunol.* 2014. Vol.18; 15(10). P. 909
83. Defino D., Adanrio F.D. // *Int. J. Immunopharmacol.* 1991. Vol. 13. № 7. P. 943-954.
84. Di Donato L., Cataldo M., Stano P., Massa R. et al. Permeability changes of cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase induced by millimeter waves radiation // *Radiat Res.* 2012. Vol. 178(5). P. 437-446.
85. Dinapoli M.R., Calderon C.L., Lopez D.M. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduced expression of the inducible nitric oxide synthase gene // *J. Exptl Med.* 1996. Vol. 183. P. 1323.

86. Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production // *J. Immunol.* 1988. Vol. 141. P. 2407.
87. Dionetto P., D'Ovido M., Franz S. Treatment of Herpes Zoster with LLLT and magneto therapy // *Laser therapy.* 1994. Vol. 6. № 1. P. 35.
88. Doherty T.M., Seder R.A., Sher A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages // *J. Immunol.* 1996. Vol. 156 (2). P. 735-741.
89. Dokhnadze T.D. The effect of rehabilitation with therapeutic Akhtala muds and electromagnetic radiation of millimeter range on biochemical indices in patients with post discectomy syndrome // *Georgian. Med. News.* 2011. Vol. 195. P. 65-70.
90. Dong Z., Staroselsky A.H., Qi X., Xie K. et al. Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54. P. 789.
91. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G. et al. Photodynamic therapy // *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. Vol. 90. №12. P. 889-905.
92. Doyama K., Fujiwara H., Fukumoto M. et al. Tumor necrosis factor is expressed in cardiac tissue of patients with heart failure // *Int. J. Cardiol.* 1996. Vol. 54. P.217-225.
93. Drapier J.C., Pellat C., Henry Y. Generation of EPRdetectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 10162.
94. Dube A., Bansal H., Gupta P.K. Modulation of macrophage structure and function by low level He-Ne laser irradiation // *Photochem Photobiol Sci.* 2003. Vol. 2(8). P. 851-855.
95. Elekes E., Thuroczy G., Szabo L.D. Effect on the immune system of mice exposed chronically to 50 Hz amplitude-modulated 2.45 GHz microwaves // *Bioelectromagnetics.* 1996. Vol. 17(3). P. 246-248.

96. Eser O., Songur A., Aktas C., Karavelioglu E. et al. The effect of electromagnetic radiation on the rat brain: an experimental study // Turk. Neurosurg. 2013. Vol. 23(6). P. 707-715.
97. Evans S., Matthews W., Perry R., Fracker D. et al. Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages // J. Natl. Cancer Inst. 1990. Vol. 82. №1. P. 34-39.
98. Farago K. Low power laser in dermatology // Laser Therapy. 1994. Vol. 6. № 1.
99. Fast D.J., Lynch R.C., Leu R.W. Interferon-gamma, but not interferon-alpha beta, synergizes with tumor necrosis factor-alpha and lipid A in the induction of nitric oxide production by murine L929 cells // J. Interferon Res. 1993. Vol.13. P. 271-278.
100. Fehniger T.A., Shah M.H., Turner M.J., VanDeusen J.B. et al. // Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune responses // J. Immunol. 1999. Vol. 162. P. 4511-4520.
101. Feinstein D.L., Galea E., Aquino D.A., Li G.C. et al. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271(30). P. 17724-32.
102. Ferencik M. Handbook of Immunochemistry. New York; Chapman and Hall, 1993. 519 p.
103. Ferrante A. Activation of neutrophils by interleukins-1 and -2 and tumor necrosis factors // Immunol. Ser. 1992. Vol.57. P.417-436.
104. Fesenko E.E., Geletyuk V.I., Kazachenko V.N., Chemeris N.K. Preliminary microwave irradiation of water solutions changes their channel-modifying activity // FEBS letters. 1995. Vol. 366. P. 49-52.
105. Fesenko E.E., Makar V.R., Novoselova E.G., Sadovnikov V.B. Microwaves and cellular immunity. I. Effect of whole body microwave irradiation on tumor necrosis factor production in mouse cells // Bioelectrochem. Bioenerg. 1999. Vol. 49(1). P. 29-35.

106. Fingar V.H., Wieman T.J., Doak K.W. Role of thromboxane and prostaglandin release on photodynamic therapy induced tumor destruction // *Cancer Research*. 1990. Vol. 50. №9. P. 2599-2603.
107. Fink A.L. Chaperone-mediated protein folding // *Physiol. Rev.* 1999. Vol. 79. P. 425-449.
108. Fisher A.M., Murphree A.L., Gomer C.J. Clinical and preclinical photodynamic therapy // *Lasers Surg. Med.* 1995. Vol. 17. №1. P. 2-31.
109. Flaherty K.M., Deluca-Flaherty C., McKay D.B. Three-dimensional structure of the ATP-ase fragment of a 70 K heat-shock cognate protein // *Nature*. 1990. Vol. 346. P. 623-628.
110. Fong Y., Tracey K.J., Moldawer L.L. et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia // *J. Exp. Med.* 1989. Vol. 170. P. 1627-1633.
111. Frenzl G., Beller D.I. Regulation of macrophage activation by IL-3. I. IL-3 functions as a macrophage-activating factor with unique properties, inducing Ia and lymphocyte function-associated antigen-1 but not cytotoxicity // *J. Immunol.* 1990. Vol. 144 (9). P. 3392-3399.
112. Friedman R.M. // *Bact. Rev.* 1977. Vol. 41. P. 543.
113. Fritz J.M., Weaver T.E. The BiP Cochaperone ERdj4 Is Required for B Cell Development and Function // *PLoS. One.* 2014. Vol. 15(9). P. e107473.
114. Froelich C.J., Dixit V.M., Yang X. Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases // *Immunol. today.* 1998. Vol. 19. P. 30-36.
115. Fukumura D., Kashiwagi S., Jain R. K. The role of nitric oxide in tumour progression // *Nature Reviews Cancer.* 2006. Vol. 6. P. 521-534.
116. Fulton J.P., Cobb S., Preble L., Leone L. et al. Electrical wiring configurations and childhood leukemia in Rhode island // *Am. J. Epidemiol.* 1980. Vol. 111. P. 292-296.

117. Furchgott R.F., Zavadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // *Nature*. 1980. Vol. 288. P. 373.
118. Furtado-Filho O.V., Borba J.B., Dallegrave A., Pizzolato T.M. et al. Effect of 950 MHz UHF electromagnetic radiation on biomarkers of oxidative damage, metabolism of UFA and antioxidants in the livers of young rats of different ages // *Int. J. Radiat. Biol.* 2014. Vol. 90 (2). P. 159-168.
119. Galabru J., Hovanessian A.G. // *Bull. Inst. Pasteur*. 1984. Vol. 82. P. 283.
120. Gandhi O.P. Some basic properties of biological tissues for potential applications of millimeter waves // *J. Microwave Power*. 1983. Vol. 18. P. 295-304.
121. Garcia-Barcina M., Lukomska B., Gawron W., Winnock M. et al. Expression of cell adhesion molecules on liver-associated lymphocytes and their counter-receptors on sinusoidal lining cells in patients with benign or malignant liver disease // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 146. P. 1406-1413.
122. Geletyuk V.I., Kazachenko V.N., Chemeris N.K., Fesenko E.E. Dual effects of microwaves on single Ca^{2+} -activated K^{+} channels in cultured kidney cells Vero // *FEBS letters*. 1995. Vol. 359. P. 85-88.
123. Giese A.C., Hillenkamp F., Pratesi R., Sacchi C. Photosensitization of organisms with special reference to natural photosensitizers // *Lasers in Biology and Medicine*. 1980. P. 299-314.
124. Giffard R.G., Han R.Q., Emery J.F., Duan M. et al. Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia: the complex roles of heat shock protein 70 // *Anesthesiology*. 2008. Vol. 109(2). P. 339-348.
125. Girotti A. Lipid hydroperoxide generation, turnover and effector action in biological systems // *J. Lipid Res.* 1998. Vol. 39. №8. P. 1529-1542.
126. Goldsby et al. *Immunology: 5-edition*, 2002. 553 p.

127. Gollnick S.O., Liu X., Owczarczak B., Musser D.A. et al. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo // *Cancer Res.* 1997. Vol. 57. №18. P. 3904-3909.
128. Gollnick S.O., Vaughan L., Henderson B.W. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62. № 6. P. 1604-1608.
129. Gomer C.J., Luna M., Ferrario A., Wong S. et al. Cellular targets and molecular responses associated with photodynamic therapy // *J. Clin. laser Med. Surg.* 1996. Vol. 14. №5. P. 315-321.
130. Gómez-Verduzco G., Cortes-Cuevas A., López-Coello C., Ávila-González E. et al. Dietary supplementation of mannan-oligosaccharide enhances neonatal immune responses in chickens during natural exposure to *Eimeria* spp. // *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2009. Vol. 51(11).
131. Graier W.F., Sturek M., Kukovetz W.R. Ca^{2+} Regulation and endothelial vascular function // *Endothelium.* 1994. Vol. 1. P. 126-132.
132. Grenert J. P., Sullivan W.P., Fadden P. et al. The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (HSP90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates HSP90 conformation // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 23843-23850.
133. Griffiths G.M. Protein sorting and secretion during CTL killing // *Semin. Immunol.* 1997. Vol. 9. P. 109-115.
134. Grigor'ev Iu.G., Shafirkin A.V., Vasin A.L. Biological effects of microwave radiation of low nonthermal intensity (regarding the maximal admissible values) // *Aviakosm. Ekolog. Med.* 2005. Vol. 39(4). P. 3-18.
135. Grimm E.A., Mazumder A., Zhang H.Z., Rosenberg S.A. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes // *J. Exp. Med.* 1982. Vol. 155. P. 1823-1841.
136. Grundler W., Keilmann F. Sharp resonances in yeast grows prove nonthermal sensitivity to microwaves // *Phys. Rev. Lett.* 1983. Vol. 51 (13). P.1214–1216.

137. Gunter E., Walter L. Genetic aspects of the Hsp70 multigene family in vertebrates // *Experientia*. 1994. Vol. 50. P. 987-1001.
138. Guzhova I.V., Darieva Z.A., Rocha Melo A., Margulis B.A. Major stress protein Hsp70 interacts with NF- κ B regulatory complex in human T-lymphoma cells // *Cell Stress Chap*. 1997. Vol. 2. № 2. P. 132-139.
139. Haas A.F., Wong J.W., Iwahashi C.K., Halliwell B. et al. // *Free Radic. Biol. Med*. 1998. Vol. 25. № 9. P. 998-1005.
140. Hallahan D.E., Viradachalam S., Kuchibhotla J. et al. Membrane-derived second messenger regulates x-ray mediated tumor necrosis factor α gene induction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. Vol. 91. P. 4897-4901.
141. Halm B.M., Lai J.F., Morrison C.M., Pagano I. et al. In vivo changes in plasma coenzyme Q10, carotenoid, tocopherol, and retinol levels in children after computer tomography // *Arch. Biochem. Biophys*. 2014. Vol. 547. P. 37-43.
142. Hamblin M.R., Newman E.L. On the mechanism of the tumor-localising effect in photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol*. 1994. Vol. 23. №1. P. 3-8.
143. Hammerich L., Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models // *Clin. Exp. Gastroenterol*. 2014. Vol. 7. P. 297-306.
144. Hancock G.N, Kaplan G., Cohn Z.A. Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells // *J. Exp. Med*. 1988. Vol. 168 (4). P. 1395-1402.
145. Hapel A.J., Lee J.C., Farrar W.L., Ihle J.N. Establishment of continuous cultures of thy1.2+, Lyt1+, 2-T cells with purified interleukin 3 // *Cell*. 1981. Vol. 25 (1). P. 179-186.
146. Hashizume H., Hansen A., Poulsen L.K., Thomsen A.R. et al. In vitro propagation and dynamics of T cells from skin biopsies by methods using interleukins-2 and -4 or anti-CD3/CD28 antibody-coated microbeads // *Acta. Derm. Venereol*. 2010. Vol. 90(5). P. 468-473.
147. Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? // *Photochem. Photobiol*. 1992. Vol. 55. №1. P. 145-147.

148. Henderson B.W., Sitnik-Busch T.M., Vaughan L.A. Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent // *Photochem. Photobiol.* 1999. Vol. 70. №1. P. 64-71.
149. Henkart P.A. Mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity // *Annu. Rev. Immunol.* 1985. Vol. 3. P. 31-58.
150. Henney S.C., Kuribayashi K., Kern D.E., Gillis S. Interleukin-2 augment natural killer activity // *Nature.* 1981. Vol. 291. P. 335-338.
151. Herman S., Kalechman Y., Gafter U., Sredni B., Malik Z. Photofrin 2 induces cytokine secretion by mouse spleen cells and human peripheral mononuclear cells // *Immunopharmacology.* 1996. Vol. 31. № 2-3. P. 195-204.
152. Hermes B., Prochazka A.-K., Haas N. et al. Upregulation of TNF-alpha and IL-3 expression in lesional and uninvolved skin in different types of urticaria // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. Vol. 103. №2 (1). P. 307-314.
153. Hesla J.S., Preutthipan S., Maguire M.P., Chang T.S.K. et al. Nitric oxide modulates hCG-induced ovulation in the rabbit // *Fertil. Steril.* 1997. Vol. 67. P. 548.
154. Heusel J.W., Wesselschmidt R., Shresta S., Russell J. et al. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells // *Cell.* 1994. Vol. 76. P. 977-987.
155. Hibbs J.B.J., Westenfelder C., Taintor R. et al. // *J. Clin. Invest.* 1992. Vol. 89. P. 867-877.
156. Hirose K., Longo D.L., Oppenheim J.J., Marsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation // *FASEB J.* 1993. Vol. 7. P. 361-368.
157. Hiroshi N., Teiji W., Toshiaki K. // *J. Biochem.* 2004. Vol. 136. P. 123-126.
158. Hoos A., Levey D.L. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: from basic science to clinical applications // *Expert Rev. Vaccines.* 2003. Vol. 2(3). P. 369-379.

159. Hou Q., Wang M., Wu S., Ma X. et al. Oxidative changes and apoptosis induced by 1800-MHz electromagnetic radiation in NIH/3T3 cells // *Electromagn. Biol. Med.* 2014 [Epub. ahead of print].
160. Hussain N., Das T., Ram L.S., Sumasri K. Persistent choroidal thickening despite photodynamic therapy for circumscribed choroidal hemangioma // *Ophthalmic Surg Lasers Imaging.* 2006. Vol. 37(1). P. 76-78.
161. Ignarro L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties // *FASEB Journal.* 1989. Vol. 3. P. 31-36.
162. Ignarro L.J., Buga G.V., Wood K.S. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. Vol. 84 (24). P. 9265-9269.
163. Ignarro L.J., Wood K.S., Byrns R.E. // *Circulation.* 1986. Vol. 74. P. 287.
164. Ihle J.N., Keller J., Henderson L. et al. Procedures for the purification of interleukin-3 to homogeneity // *J. Immunol.* 1982. Vol. 129 (6). P. 2431-2436.
165. Ivancsits S., Diem E., Pilger A., Rudiger H. et al. Induction of DNA strand breaks by intermittent exposure to extremely-low-frequency electromagnetic fields in human diploid fibroblasts // *Mutat Res.* 2002. Vol. 519. P. 1.
166. Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards // *Ann. Med.* 1999. Vol. 31. P. 261-271.
167. Jayaraman J., Joshi V.C., Ramasarma T. // *Biochem. J.* 1963. Vol. 88. P. 369-373.
168. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae // *Marine Drugs.* 2011. № 9. P. 196-223.
169. Jin B., Lopez A.F., Gillis S., Juttner C.A. et al. Human interleukin 4 regulates the phenotype of lymphocytes generated during mixed lymphocyte culture and inhibits the IL-2-induced development of LAK function in normal and leukaemic cells // *Leukemia Res.* 1989. Vol. 13. № 4. P. 297-305.

170. Jordan M.L., Rominski B., Jaquins-Gerstl A. et al. // *Surgery*. 1995. Vol. 118. P. 138-146.
171. Jori G. Photosensitized processes in vivo: proposed phototherapeutic applications // *Photochem. Photobiol.* 1990. Vol. 52. № 2. P. 49-43.
172. Juretic A., Sragoli G.C., Horig H. et al. Tyrosine kinase-dependent and -independent events induced by interleukin-2 stimulation: interleukin-2-mediated NO production required for the induction of lymphokine-activated killer cell activity in rat splenocytes is tyrosine kinase independent // *Immunology*. 1995. Vol. 85 (2). P. 325-330.
173. Kagi D., Lederman B., Burki K., Seiler P. et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice // *Nature*. 1994. Vol. 369. P. 331-37.
174. Kalantaryan V.P., Babayan Y.S., Gevorgyan E.S., Hakobyan S.N. et al. Influence of low intensity coherent electromagnetic millimeter radiation (EMR) on aqua solution of DNA // *Progress In Electromagnetics Research Letters*. 2010. Vol. 13. P. 1-9.
175. Kandolf-Sekulovic L., Kataranovski M., Pavlovic M.D. Immunomodulatory effects of low-intensity near-infrared laser irradiation on contact hypersensitivity reaction // *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2003. Vol. 19(4). P. 203-212.
176. Karabakbisian R., Broude N., Shalis N., Kochlatvi S. Calcium is necessary in the cell response to EM fields // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 349 (1). P. 1-6.
177. Karu T. // *J. Photochem. Photobiol.* 1999. Vol. 49. № 1. P. 1-17.
178. Karu T.I., Kalendo G.S., Letorhov V.S. Control of RNA synthesis rate in tumor cells HeLa by action of low-intensity visible light of copper laser // *Lett. II NuovoCimento*. 1981. Vol. 32. P. 55-59.
179. Karu T.I. *Photobiology of low-power laser therapy*. London: Harwood Acad. Publ. Chur., 1989.

180. Karu T.I., Pyatibrat L.V., Afanasyeva N.I. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide // *Lasers Surg. Med.* 2005 Vol. 36(4). P. 307-314.
181. Kato K., Hasegawa K., Goto S., Inaguma Y. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27 // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 11274-11278.
182. Kawabe T., Naka T., Yoshida K., Tanaka T. et al. // The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation // *Immunity.* 1994. Vol. 1. P. 167-178.
183. Keerthy H.K., Mohan C.D., Siveen K.S., Fuchs J.E. et al. Novel synthetic biscoumarins target tumor necrosis factor- α in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 17.
184. Kemmotsu O., Saito Y., Enya T. et al. He-Ne-laser irradiation accelerates healing and reduces pain in the acute phase of Herpes Zoster // *Laser Therapy.* 1994. Vol. 6. № 1. P. 44.
185. Khizhnyak E.P., Ziskin M.C. Temperature oscillations in liquid media caused by continuous (nonmodulated) millimeter wavelength electromagnetic irradiation // *Bioelectromagnetics.* 1996. Vol. 17. P. 223-229.
186. Khurgin Yu.I., Kudryashova V.A., Zavizion V.A., Betskii O.V. Millimeter absorption spectroscopy of agues systems // *Relaxation Phenomena in Condensed Matter*, Ed. W. Coffey. *Advances in Chemical Physics.* Vol. LXXXVII. Wiley & Sons Inc. N.Y. Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 1994. P.483-543.
187. Kim E. J., Park S.U., Lee J.-Y., Yoon J.H. Park Fucoïdan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells // *BMC Gastroenterology.* Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/10/96>.
188. Kintzel P.E., Calis K.A. Recombinant interleukin-2: a biological response modifier // *Clin. Pharm.* 1991. Vol. 10 (2). P.110-128.
189. Kirichuk V.F., Mareev O.V., Diudina O.Iu. Changes in platelet function in children with acute or chronic tonsillitis // *Vestn. Otorinolaringol.* 2004. Vol. (5). P. 13-16.

190. Kishimoto T. The biology of IL-6 // *Blood*. 1989. Vol. 74. №1. P. 1-10.
191. Kitagawa S., Yuo A., Yagisawa M. et al. Activation of human monocyte functions by tumor necrosis factor: rapid priming for enhanced release of superoxide and erythrophagocytosis, but no direct triggering of superoxide release // *Exp. Hematol*. 1996. Vol. 24. P. 559-567.
192. Klebanoff S.I., Evers J., Evers K.E., Grisham M.B. Peroxidases in chemistry and biology. Boston: CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, 1991.
193. Klebanov G.I., Teselkin Yu.O., Babenkova I.V. et al. Low power laser irradiation induces leukocyte priming // *Gen. Physiol. Biophys.* 1998. Vol. 17. P. 365-376.
194. Knowles R.G. Moncada S. // *Nat. Med.* 1994. Vol. 298. Pt. 2. P. 249-258.
195. Kobayashi D., Watanabe N., Yamauchi N. et al. Protein kinase C inhibitors augment tumor-necrosis-factor-induced apoptosis in normal human diploid cells // *Chemotherapy*. 1997. Vol. 43 (6). P. 415-423.
196. Koca O., Gökçe A.M., Öztürk M.I., Ercan F. et al. Effects of intensive cell phone (Philips Genic 900) use on the rat kidney tissue // *Urol. J.* 2013. Vol. 10(2). P. 886-891.
197. Kolb H., Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity // *Immunol. Today*. 1992. Vol. 13. P. 157-160.
198. Korbelyk M., Cecic I. Contribution of mieloid and lymphoid host cells curative outcome of mouse sarcoma tratement by photodynamic therapy // *Cancer Lett.* 1999. Vol. 137. №1. P. 91-98.
199. Korbelyk M., Krosi G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with phptodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* 1994. Vol. 60. P. 497-502.
200. Korbelyk M., Parkins C., Shilbuya H., CecicI. et al. Nitryc oxide production by tumor tissue: impact on the response to photodynamic therapy // *Br.J. Cancer*. 2000. Vol. 82. №11. P. 1835-1843.
201. Kovacheva S., Ribarov S.R. // *Lung*. 1995. Vol. 173. P. 255-263.

202. Kritas S.K., Saggini A., Cerulli G., Caraffa A. et al. Interrelationship between IL-3 and mast cells // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 2014. Vol. 28(1). P. 17-21.
203. Kroncke K. D., Fehsel K., Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 1995. Vol. 376. P. 327-343.
204. Krosil G., Korbelik M., Dougherty G.J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumor photoforin-based photodynamic therapy. // *Br. J. Cancer*. 1995. Vol. 71. №3. P. 549-555.
205. Kumaraguru U., Gierynska M, Norman S., Bruce B.D., Rouse B.T. // *J. Virol*. 2002. Vol. 76. 136–141.
206. Kuo D.C., Hsu S.P., Chien C.T. Partially hydrolyzed guar gum supplement reduces high-fat diet increased blood lipids and oxidative stress and ameliorates FeCl₃-induced acute arterial injury in hamsters // *Journal of Biomedical Science*. 2009. Vol. 16:15
207. Lanier L.L. NK cell receptors // *Annu. Rev. Immunol*. 1998. Vol. 16. P. 359-393.
208. Lanier L.L. On guard-activating NK cell receptors // *Nat. Immunol*. 2001. Vol. 2. P. 23-27.
209. Lanier L.L. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes // *J. Immunol*. 1986. Vol. 136. P. 4480-4486.
210. Lantz C.S., Boesiger J., Song C.H. et al. Role for interleukin-3 in mast cell and basophil development and in immunity to parasites // *Nature*. 1998. Vol. 392. №6671. P. 90-93.
211. Laster S.M., Wood J.G., Gooding L.R. Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis // *J. Immunol*. 1988. Vol. 141(8). P. 2629-2634.
212. Lazutka J.R. Genetic toxicity of cytokines // *Mutat. Res*. 1996. Vol. 361 (2-3). P. 95-105.

213. Lechner M., Lirk P., Rieder J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin // *Semin. Cancer Biol.* 2005. Vol. 15(4). P.277-89.
214. Lefer A.M., Lefer D.J. Endothelial dysfunction in myocardial ischemia and reperfusion: role of oxygen-derived free radicals // *Basic Res. Cardiol.* 1991. Vol. 86. Suppl. 2. P. 109-116.
215. Leibson P.J. Signal transduction during natural-killer-cell activation: inside the mind of a killer // *Immunity.* Vol. 1997. P. 655-661.
216. Lemoli R.M., Fogli M., Fortuna A. et al. Interleukin 11 stimulates the proliferation of human hematopoietic CD34+ and CD34+CD33-DR- cells and synergises with stem cell factor, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor // *Exp. Hematol.* 1993. Vol. 21. P. 1668-1672.
217. Leskovar P., Zanon R., Nachabor F. et al. // *Dtsch. Z. Onkol.* 1993. Vol. 25. № 1. P. 12-18.
218. Levitt L.J., Nagler A., Lee F., Abrams J. et al. Production of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor by human natural killer cells. Modulation by the p75 subunit of the interleukin 2 receptor and by the CD2 receptor // *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 88. № 1. P. 67-75.
219. Liddle C.G., Putnam J.P., Lewter O.H., West M. et al. Circulating antibody response of mice exposed to 9-GHz pulsed microwave radiation. *Bioelectromagnetics.* 1986. Vol. 7(1). P. 91-94.
220. Lindemann A., Mertelsmann R. Interleukin-3: structure and function // *Cancer Invest.* 1993. Vol. 11(5). P. 609-623.
221. Lindquist S., Craig E.A. The heat shock proteins // *Annu. Rev. Genet.* 1988. Vol. 22. P. 631-677.
222. Liu J., Marino M.W., Wong G. et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination // *Nat. Med.* 1998. Vol. 4. P.78-83.

223. Lloyds D., Brindle N.P.J., Hallett M.B. Priming of human neutrophils by tumour necrosis factor- α and substance P is associated with tyrosine phosphorylation // *Immunology*. 1995. Vol. 84. P. 220-226.
224. Lodish H.L., Arnold B.S., Zipursky L. et al. *Molecular Cell Biology* (4th ed.). N.Y.: W.H. Freeman and Co, 2000. 1084 p.
225. Logani M.K., Anga A., Szabo I. et al. Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced suppression of the immune system // *Bioelectromagnetics*. 2002. Vol. 23(8). P.614-621.
226. Lowin B., Beermann F., Schmidt A., Tshopp J. A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity // *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Vol. 91. P. 11571-11575.
227. Luger T.A., Schwarz T. Therapeutic use of cytokines in dermatology // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1991. Vol. 24. №6 (Part I). P. 915-926.
228. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment // *Medicina (Kaunas)*. 2003. Vol. 39(12). P. 1137-50.
229. Luo J-L., Kamata H., Karin M. IKK/NF-kappa B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115. № 10. P. 2625-2632.
230. Luo X.J., Li M., Huang L., Nho K. et al. The interleukin 3 gene (IL3) contributes to human brain volume variation by regulating proliferation and survival of neural progenitors // *PLoS. One*. 2012. Vol. 7(11). P. e50375.
231. Lynch D.H., Haddad S., King V.G., Ott M.J. et al. Systemic immunosuppression induced by photodynamic therapy (PDT) is adoptively transferred by macrophages // *Photochem. Photobiol.* 1989. Vol. 49. P. 453-458.
232. Lysov N.A. Intravascular laser therapy of acute thrombophlebitis of lower extremities // *Proceedings of first world congress for electricity and magnetism in biology and medicine, Florida*. 1992. P. 89.
233. Mach N., Lantz C.S., Galli S.J. et al. Involvement of interleukin-3 in delayed-type hypersensitivity // *Blood*. 1998. Vol. 91. P. 778-783.

234. Madrigal-Santillán E., Morales-González J. A., Sánchez-Gutiérrez M., Reyes-Arellano A. et al. Investigation on the Protective Effect of α -Mannan against the DNA Damage Induced by Aflatoxin B1 in Mouse Hepatocytes // *Int. J. Mol. Sci.* 2009. № 10. P. 395-406.
235. Magyari L., Varszegi D., Kovesdi E., Sarlos P. et al. Interleukins and interleukin receptors in rheumatoid arthritis: Research, diagnostics and clinical implications // *World J. Orthop.* 2014. Vol. 18;5(4). P. 516-536.
236. Makar V., Logani M., Szabo I., Ziskin M. Effect of millimeter waves on cyclophosphamide induced suppression of T cell functions // *Bioelectromagnetics.* 2003. Vol. 24 (5). P. 356-365.
237. Malkovsky M., Sondel P.M., Strober W., Dalglish A.G. The interleukins in acquires diseases // *Clin. Exp. Immunol.* 1988. Vol. 74. P. 151-161.
238. Mann-Chandler M.N., Kashyap M., Wright H.V., Norozian F. et al. IFN-gamma induces apoptosis in developing mast cells // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175(5). P. 3000-3005.
239. Marcinkiewicz J., Radziszewski W., Chain B.M. Prostaglandin E₂ (PGE₂) differentially regulates the production of IL-2 and IL-3 by murine immune T-cells // *Folia Histochem. Cytobiol.* 1992. Vol. 30(1). P. 1-4.
240. Marjanovic A.M., Pavicic I., Trosic I. Cell oxidation-reduction imbalance after modulated radiofrequency radiation // *Electromagn. Biol. Med.* 2014. Vol. 13. P. 1-6.
241. Marino C., Antonini F., Avella B. // *Abstract Book. BEMS. 18th Annual Meeting, Canada, Victoria, BC, 1996.* P. 191.
242. Marletta M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 12231-12234.
243. Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R. et al. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27 (24). P. 8706-8711.

244. Martínez I., Fernández L., Valentín J., Castillo C. et al. Natural killer cell cytotoxic activity in critical pediatric patients with suspected hemophagocytic syndrome // *Med. Intensiva*. 2014. P. S0210.
245. Mayers C. P., Habeshaw J. A. Depression of phagocytosis: A normal effect of microwave radiation as a potential hazard to health // *Int J. Radiat. Biol.* 1973. Vol. 24. P. 449-461.
246. McCann S., Kimura M., Karanth S. et al. Role of nitric oxide in the neuroendocrine responses to cytokines // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 840. P. 174-184.
247. McKelvey T.G., Hollwarth M.E., Granger D.N. et al. Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney // *Am. J. Physiol.* 1988. Vol. 254. Pt. 1. P. G753-G760.
248. McLean J. R. N., Stuchy M. A., Mitchel R. E. J. Cancer promotion in a mouse-skin model by a 60-Hz magnetic field // *Bioelectromagnetics*. 1991. Vol. 12. P. 273-287.
249. Mehlen P., Hikey E., Weber L.A., Arrigo A.P. Large unphosphorilated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive species and glutathione levels and generates a protection against TNF-alpha in NIH-3T3-ras cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. Vol. 241. P. 187-192.
250. Milani V., Noessner E., Ghose S., Kuppner M. et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation // *Int. J. Hyperthermia*. 2002. Vol. 18(6). P. 563-575.
251. Mills C.D. Molecular basis of "suppressor" macrophages. Arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway // *J. Immunol.* 1991. Vol. 146 (8). P. 2719-2723.
252. Milojevic M., Kuruc V. Low power laser biostimulation in the treatment of bronchial asthma // *Med Pregl.* 2003. Vol. 56(9-10). P. 413-418.
253. Minamikawa T., Sriratana A. Chloromethyl-X-rosamine (Mito Tracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells // *J. Cell. Sci.* 1999. Vol. 112. Pt 4. P. 2419-2430.

254. Mittal C.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 193. P. 126-132.
255. Moore J.V., West C.M., Whitehurst C. The biology of photodynamic therapy // *Phys. Med. Biol.* 1997. Vol. 42. №5. P. 913-935.
256. Moore K.C. Laser therapy in post herpetic neuralgia // *Laser Therapy.* 1996. Vol. 8. № 1. P. 48.
257. Moretta A., Biassoni R., Bottino C., Mingari M.C. et al. // Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity // *Immunol. Today.* 2000. Vol. 21. № 5. P. 228-234.
258. Morgan D.A., Ruscetti F.W., Gallo R. Selective in vitro growth of T-lymphocytes from normal human bone marrow // *Science.* 1976. Vol. 193. P. 1007-1008.
259. Morimoto K., Tsuda E., Said A.A., Uchida E. et al. Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase // *Glycoconjugate J.* 1996. Vol. 13. P. 1013–1020.
260. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. ColdSpringHarbor Lab. Press, 1994. 610 p.
261. Morris C.F., Young I.G., Hapel A.J. Molecular and cellular biology of interleukin-3 // *Immunol. Ser.* 1990. Vol. 49. P. 177-214.
262. Mui A.L., Kay R.J., Humphries R.K., Krystal G. Ligand-induced phosphorylation of the murine interleukin 3 receptor signals its cleavage // *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* 1992. Vol. 89. P. 10812-10816.
263. Murell A.C., Francis M.J.O., Bromely L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals // *Biochem. J.* 1990. Vol. 265. P. 659-665.
264. Murray J., Barbara J.A.J., Dunkley S.A. et al. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro // *Blood.* 1997. Vol. 90. P. 2772-2783.

265. Myint Y.Y., Miyakawa K., Naito M. et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 correct osteopetrosis in mice with osteopetrosis mutation // *Amer. J. Pathol.* 1999. Vol.154 (2). P. 553-566.
266. Natarajan M., Vijayalaxmi, Szzliagyl M., Roldan F.N. et al. NF-kappaB DNA-binding activity after high peak power pulsed microwave (8.2 GHz) exposure of normal human monocytes // *Bioelectromagnetics.* 2002. Vol. 23. № 4. P. 271-277.
267. Naziroglu M., Tokat S., Demirci S. Role of melatonin on electromagnetic radiation-induced oxidative stress and Ca²⁺ signaling molecular pathways in breast cancer // *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 2012. Vol. 32(6). P. 290-297.
268. Nemoto T., Sato N., Iwanari H. et al. Domain structure and immunogenetic regins of the 90-kDa heat shock protein (HSP 90) have been investigated with a library of anti-HSP90 monoklonal antibodies and by limited proteolysis // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. P. 26179-26187.
269. Neta R., Oppengeim J. Radioprotection with cytokine-learning from nature to cope with radiation damage // *Cancer Cells.* 1991. Vol. 3. P. 391-396.
270. Nishinakamura R., Miyajima A., Mee P.J. et al. Hematopoiesis in mice lacking the entire granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3/interleukin-5 functions // *Blood.* 1996. Vol. 88 (7). P. 2458-2464.
271. Novoselova E.G. // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 249. P. 371-374.
272. Novoselova E.G., Fesenko E.E., Makar V.R., Sadovnikov V.B. Microwaves and cellular immunity. II. Immunostimulating effects of microwaves and naturally occurring antioxidant nutrients // *Bioelectrochem Bioenerg.* 1999. Vol. 49(1). P. 37-41.
273. Novoselova E.G., Safonova M.V., Gordon R. Ya., Semiletova N.V. Immune functions of spleen lymphocytes of rats subjected to chronic irradiation and antioxidant (ubiquinone q-9) diet // *Int. J. Radiat. Biol.* 1995. Vol. 67. P. 469-476.

274. Obermann W.M., Sondermann H., Russo A.A. et al. In vivo function of Hsp90 is dependent of ATP binding and ATP hydrolysis // *J. Cell. Biol.* 1998. Vol. 143. P. 901-910.
275. Omori-Miyake M., Yamashita M., Tsunemi Y., Kawashima M. et al. In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans // *J. Invest. Dermatol.* 2014. Vol. 134(5). P. 1342-1350.
276. Osborn L., Kunkel S., Nabel G.J. Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor κ B // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. № 7. P. 2336-2340.
277. Osmond D.G., Battisto J.R., Knight K.L. Production and differentiation of B lymphocytes in the bone marrow. In: *Immunoglobulin genes and B cell differentiation.* New York: Elsevier/ North-Holland, 1980. 135 p.
278. Page G.G., Ben-Eliyahu S. The immune-suppressive nature of pain // *Semin. Oncol. Nurs.* 1997. Vol. 13 (1). P. 10-15.
279. Pakhomov A. G., Akyel Y. Nonthermal physiological effects of microwave // *Int. Cong. of Physiol. Scien. Proceedings, St. Petersburg.* 1997. P. 98.
280. Pakhomov A. G., Prol H., Mathur S., Akyel Y. et al. Search for frequency-specific effects of millimeter-wave radiation on isolated nerve function // *Bioelectromagnetics.* 1997. Vol. 18. P.324–334.
281. Palacios R., Garland J. Distinct mechanisms may account for the growth-promoting activity of interleukin 3 on cells of lymphoid and myeloid origin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. Vol. 81(4). P. 1208-1211.
282. Palacios R., Henson G., Steinmetz M., McKearn J.P. Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro // *Nature.* 1984. Vol. 309 (5964). P. 126-131.
283. Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // *Nature.* 1987. Vol. 327 (6122). P. 524-526.

284. Parker D.C. T cell-dependent B cell activation // *Annu. Rev. Immunol.* 1993. Vol. 11. P. 331-360.
285. Pastore D., Petragallo V.A., Greco M. et al. The effect of He-Ne-laser light on the mitochondrial cytochrome-c-oxydase // *Laser Application in Medicine and Surgery.* 1992. P. 259-263.
286. Pelham H.R.B. Speculations on the function of major heat shock and glucose-regulated proteins // *Cell.* 1986. Vol. 46. P. 959-961.
287. Petrek M., Hubacek J., Ordeltova M. Immunomodulatory effects of laser therapy in the treatment of chronic tonsillitis // *Acta. Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med.* 1991. Vol. 129. P. 119-126.
288. Petrov A.V. Effect of low intensity helium-neon laser and decimeter electromagnetic irradiation on functional indices of immune cells in patients with rheumatoid arthritis // *Lik Sprava.* 2004. Vol. 2. P. 30-35.
289. Pirozhkov A., Dozmorov I., Petrov R. The growth of hemopoietic stem cells is inhibited by natural killers only in the nonsyngeneic microenvironment // *Transplantation.* 1995. Vol. 58. № 3. P. 345-349.
290. Ponomarenko G.N., Obrezan A.G., Iakovlev A.F., Shneider O.A. et al. Role of genetic factors in responses to low-level magnetic and laser therapy in patients with cardiac diseases // *Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* 2003. Vol. (4). P. 13-20.
291. Ponomarenko G.N., Obrezan A.G., Stupnitskii A.A., Tishakov A.Y. et al. Genetic determinants of efficiency of magnetic laser therapy of essential hypertension // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005. Vol. 139(3). P. 300-304.
292. Przepiora D., Srivastava P.K. Heat shock protein-peptide complexes as immunotherapy for human cancer // *Mol. Med. Today.* 1998. Vol. 11. P. 478-484.
293. Puggioni A., Kalra M., Carmo M., Mozes G. et al. Endovenous laser therapy and radiofrequency ablation of the great saphenous vein: analysis of early efficacy and complications // *J. Vasc. Surg.* 2005. Vol 42(3). P. 488-493.
294. Qiutang L., Inder M. Verma NF-kappaB regulation in the immune system // *Nature Reviews Immunology.* 2002. Vol. 2. P. 725-734.

295. Quin B., Selman S.H., Payene K.M., Keck R.W. et al. Enhanced skin allograft survival after photodynamic therapy. Association with lymphocyte inactivation and macrophage stimulation // *Transplantation*. 1993. Vol. 56. №6 P. 1481-1486.
296. Quintero M., Brennan P.A., Thomas G.J., Moncada S. Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation // *Cancer Res*. 2006. Vol. 66(2). P. 770-774.
297. Rajaram N., Tataka R.J., Advani S.H., Gandal S.G. Natural killer and lymphokine activated killer cell functions in Hodgkin's disease // *Cancer Immunol. Immunother*. 1990. Vol. 31. P. 44-48.
298. Raulet D.H. Development and tolerance of natural killer cells // *Current Opinion in Immunology*. 1999. Vol. 11. P. 129-134.
299. Reiter I., Schwamberger G., Krammer B. Activation of macrophage tumoricidal activity by photodynamic treatment in vitro-indirect activation of macrophages by photodynamically killed tumor cells // *J. Photochem. Photobiol*. 1999. Vol. 50. № 2-3. P. 99-107.
300. Repacholi M.H., Basten A., Gebiski V., Noonan D. et al. Lymphomas in E mu-Pim1 transgenic mice exposed to pulsed 900 MHz electromagnetic fields // *Radiat Res*. 1997. Vol. 147 (5). P. 631-640.
301. Riedy M.C., Stewart C.C. Inhibitory role of interleukin-6 in macrophage proliferation // *J. Leukoc. Biol*. 1992. Vol. 52. P.125-127.
302. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila* // *Experientia*. 1962. Vol. 18. P. 571-573.
303. Rizzi C.F., Mauriz J.L., Freitas Correa D.S., Moreira A.J. et al. Effects of lowlevel laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle // *Lasers Surg. Med*. 2006. Vol. 38. № 7. P. 704-713.
304. Robb R.J. Interleukin-2: the molecule and its function // *Immunol. Today*. 1984. Vol. 5. P. 203-209.

305. Rocha de Souza M. C., Marques C.T., Guerra Dore C.M., Ferreira da Silva F.R. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds // *J. Appl. Phycol.* 2007. № 19. P. 153-160.
306. Rojavin M.A., Ziskin M.C. Medical application of millimetre waves // *Q J Med.* 1998. Vol. 91. P. 57-66.
307. Romangani S. Cytokine production by human T cells in disease state // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. Vol. 12. P. 227-257.
308. Root M. // *Mutat. Res.* 1991. Vol. 256. P.177-189.
309. Rosenberg S., Spiess P., Lufreniere R. A new approach to the adoptive immuno-therapy of cancer with tumor infiltrating lymphocytes // *Science.* 1986. Vol. 233. P. 1318-1321.
310. Rosenberg S.A. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192(12). P. 5451-5458.
311. Safronova V.G., Gabdoulkhakova A.G., Santalov B.F. Immunomodulating action of low intensity millimeter waves on primed neutrophils // *Bioelectromagnetics.* 2002. Vol. 23. P. 599-606.
312. Sambrano G.R., Steiberg D. // *Proc. nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 1396-1400.
313. Samelson L.E., Germain R.N., Schwartz R.H. Monoclonal antibodies against the antigen receptor on a cloned T-cell hybrid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. Vol. 80 (22). P. 6972-6976.
314. Sanchez-Garcia J., Torres A., Herrera C., Alvarez M.A. Cell cycle kinetic changes induced by interleukin-3 and interleukin-6 during ex vivo expansion of mobilized peripheral blood CD34 cells // *Haematologica.* 2006. Vol. 91(1). P. 121-124.
315. Sasser L.B., Anderson L.E., Morris J.E., Miller D.L. et al. Lack of a co-promoting effect of a 60 Hz magnetic field on skin tumorigenesis in SENCAR mice // *Carcinogenesis.* 1998. Vol. 19 (9). P. 1617-1621.

316. Savitz D. A., Wachtel H., Barnes F. A., John E. M. et al. Case control study of childhood cancer and exposure to 60 Hz magnetic fields // *Am. J. Epidemiol.* 1988. Vol.128. P. 21–38.
317. Schrader J.W., Crapper R.M. Autogenous production of a hemopoietic growth factor, persisting-cell-stimulating factor, as a mechanism for transformation of bone-marrow-derived cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983. Vol. 80 (22). P. 6892-6896.
318. Schrader J.W. The panspecific hemopoietin of activated T lymphocytes // *Annu. Rev. Immunol.* 1986. Vol. 4. P. 205-230.
319. Schulze-Osthoff K., Bakker A.C., Vanhaesebroeck B. et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267(8). P. 5317-5323.
320. Schulze-Osthoff K., Los M., Bauerle P.A. Redox signaling by transcription NF-kB and AP-1 in lymphocytes // *Biochem. Pharmacol.* 1995. Vol. 50. № 6. P. 735-741.
321. Shahin S., Mishra V., Singh S.P., Chaturvedi C.M. 2.45-GHz microwave irradiation adversely affects reproductive function in male mouse, *Mus musculus* by inducing oxidative and nitrosative stress // *Free Radic. Res.* 2014. Vol. 48(5). P. 511-525.
322. Sharp F.R., Massa S.M., Swanson R.A. Heat-shock protein protection // *Trends Neurosci.* 1999. Vol. 22. P. 97-99.
323. Shen W.Q., Zhang X.P., Zhao G. Wolin M.S. et al. Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise // *Med. Sci. Sports Exer.* 1995. Vol. 27. P. 1125-1134.
324. Shi L., Kan C-M., Powers J.C., Aebersold R. et al. Purification of three cytotoxic lymphocytes granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions // *J. Exp. Med.* 1992. Vol. 176. P. 1521-1529.

325. Shresta S., MacIvor D.M., Heusel J.W., Russell J.H. et al. Natural killer and lymphokine-activated-killer cells require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in susceptible target cells // Proc. Natl. Acad. Sci. 1995. Vol. 92. P. 5679-5683.
326. Shresta S., Pham C.T.N., Thomas D.A., Graubert T.A. et al. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? // Current Opinion in Immunology. 1998. Vol. 10. P. 581-587.
327. Shuvalova I.N., Klimenko I.T., Svinina N.G., Tsereteli M.V. et al. The efficiency of low-intensity laser radiation in the treatment of arterial hypertension complicated by ischemic heart disease // Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult. 2001. Vol. 4. P. 3-6.
328. Simkin G.O. Tao J.S., Levy J.G. Hunt D.W. IL-10 contributes to inhibition of contact hypersensitivity in mice treated with photodynamic therapy // J. Immunol. 2000. Vol. 164. №5. P. 2457-2462.
329. Simmer S., Braksma Y., Kleinman Y. Low power laser therapy in cutaneous immunological disorders // Laser Therapy. 1994. Vol. 8. № 1. P. 69-70.
330. Skurkovich B., Skurkovich S. Inhibition of IFN-gamma as a method of treatment of various autoimmune diseases, including skin diseases // Ernst. Schering Res. Found Workshop. 2006. Vol. 56. P. 1-27.
331. Smialowicz R.T. Hematologic and immunologic effects of nonionizing electromagnetic radiation // BullNY Acad Med. 1979. Vol. 55. P. 1094-1118.
332. Smith K.A. Interleukin 2: Inception, impact, and implication // Science. 1988. Vol. 240. P. 31169-1176.
333. Sneddon J.M., Vane J.R. Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85 (8). P. 2800-2804.
334. Snyder S.H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters // Science. 1992. Vol. 257 (5069). P. 494-496.

335. Spikes J.D., Smith K.S. Photosensitization // The science of photobiology. 1989. P. 79-111.
336. Sriram M., Osipiuk J., Freeman B., Morimoto R. et al. Human Hsp70 molecular chaperone binds two calcium ions withing the ATP-ase domain // Structure. 1997. Vol. 5. P. 403-414.
337. Srivastava P.K. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity // Nat. Rev. Immunol. 2002. Vol. 2. 185–194.
338. Stevens R.G., Davis S., Thomas D.B., Anderson L.E. et al. Electric power, pineal function, and the risk of breast cancer // FASEB J. 1992. Vol. 6(3). P. 853-860.
339. Stoeckle C., Simon H.U. CD8(+) T cells producing IL-3 and IL-5 in non-IgE-mediated eosinophilic diseases // Allergy. 2013. Vol. 68(12). P. 1622-1625.
340. Stratakis C.A., Chrousos G.P. Transient elevation of serum thyroid hormone levels following lithium discontinuation // Ann.N.Y. Acad. Sci. 1996. Vol. 771. P. 1-18.
341. Strehl B., Seifert U., Kruger E., Heink S. et al. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing // Immunol. Rev. 2005. Vol. 207. P. 19-30.
342. Sugita Y., Zhao B., Shankar P. et al. CNS interleukin-3 (IL-3) expression and neurological syndrome in antisense-IL-3 transgenic mice // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. Vol. 58(5).P.480-488.
343. Szabo I., Rojavin M.A., Rogers T.J., Ziskin M.C. Reactions of keratinocytes to in vitro millimeter wave exposure // Bioelectromagnetics. 2001. Vol. 22(5). P.358-364.
344. Szmigielski S., Jainiak J., Hryniewicz W., Jeljaaszewicz J. et al. Local microwave hypothermia (43°C) and stimulation of macrophage and T-lymphocytes systems in treatment of Guerin epithelioma in rats // Z Krebsforsch. 1978. Vol. 91. P. 35-48.

345. Tadevosian A., Trchunian A. Effect of coherent extremely high-frequency and low-intensity electromagnetic radiation on the activity of membrane systems in *Escherichia coli* // *Biofizika*. 2009. Vol. 54(6). P. 1055-1059.
346. Tadmori W., Lee H.-K., Clark S.C., Choi Y.S. Human B cell proliferation in response to IL-4 is associated with enhanced production of B cell-derived growth factors // *J. Immunol.* 1989. Vol. 112(3). P. 826-832.
347. Taglibue A., Befus A.D., Clark A.A., Bienenstock J. Characterization of natural killer cells in the murine intestinal epithelium and lamina propria // *J. Exp. Med.* 1982. Vol. 155. P. 1785-1796.
348. Takac B., Mihaljević S., Stefanić M., Glavas-Obrovac L. et al. Importance of interleukin 6 in pathogenesis of inflammatory bowel disease // *Coll. Antropol.* 2014. Vol. 38(2). P. 659-64.
349. Takahashi G.W., Andrews D.F., Lilly M.B. et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes // *Blood*. 1993. Vol. 81 (2). P. 357-364.
350. Tarrío M.L., Lee S.H., Fragosó M.F., Sun H.W. et al. Proliferation conditions promote intrinsic changes in NK cells for an IL-10 response // *J. Immunol.* 2014. Vol. 193(1). P. 354-363.
351. Teksheva L.M., Barsukova N.K., Chumicheva O.A., Khatit Z.Kh. Hygienic aspects of cellular communication in school age // *Gig Sanit.* 2014. Vol. 2. P. 60-65.
352. Titheradge A.M. Nitric oxide in septic shock // *Biochem. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 1411. P. 437-455.
353. Togashi H., Uehara M., Ikeda H., Inokuchi T. Fractionated photodynamic therapy for a human oral squamous cell carcinoma xenograft // *Oral Oncol.* 2006. Vol. 42. P. 526-532.
354. Toler J. C., Shelton W. W., Frei M. R., Merritt J. H. et al. Long-term, low-level exposure of mice Prone to mammary tumors to 435 MHz radiofrequency radiation // *Rad. Res.* 1997. Vol. 148. P. 227-233.

355. Trosic I. Multinucleated giant cell appearance after whole body microwave irradiation of rats // *Int J Hyg Environ Health*. 2001. Vol. 204. P. 133-138.
356. Tudan C., Jackson J.K., Blanis L. et al. Inhibition of TNF-alpha-induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate is mediated by the extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways up-stream of caspase 3 // *J. Immunol*. 2000. Vol. 165. P. 5798-5806.
357. Tutor Ale M., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds // *Marine Drugs*. 2011. № 9. P. 2106-2130.
358. Ushakava T., Melkonyan A. Nikonova L. et al. The effect of dietary antioxidant supplements on gene expression in mice tissues // *Free Radic. Biol. Med*. 1996. Vol. 20. P. 279-284.
359. Utsumi T., Klostergaard J., Akimaru K. et al. Modulation of TNF-alpha-priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors // *Arch. Biochem. Biophys*. 1992. P. 271-278.
360. Valone T.F. *Bioelectromagnetic Healing, its History and a Rationale for its Use*. Washington DC, 2007. 128 p.
361. Van der Bruggen T., Kok P.T., Blom M. et al. Transient exposure of human eosinophils to the protein kinase C inhibitors CGP39-360, CGP41-251, and CGP44-800 leads to priming of the respiratory burst induced by opsonized particles // *J. Leukoc. Biol*. 1993. Vol. 54 (6). P. 552-557.
362. Van Eden W., Van der Zee R., Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation // *Nature Reviews Immunology*. 2005. Vol. 5. P. 318-330.
363. Vanhatalo S., Soinila S. // *J. Chem. Neuroanat*. 1995. Vol. 8. P. 165-173.
364. Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair // *Adv. Immunol*. 1996. Vol. 61. P. 1-77.

365. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors // *Annu. Rev. Immunol.* 1992. Vol. 10. P. 411-452.
366. Veyret B., Bouthet C., Deschaux P. A. et al. Antibody responses of mice exposed to low-power microwaves under combined, pulse-and-amplitude modulation // *Bioelectromagnetics.* 1991. Vol. 12(1). P.47-56.
367. Veyret B., Bouthet C., Deschaux P. A. et al. Antibody responses of mice exposed to low-power microwaves under combined, pulse-and-amplitude modulation // *Bioelectromagnetics.* 1991. Vol. 12(1). P.47-56.
368. Vigh L., Literati P.N., Nolwerda D.A. et al. Bimoclomol: a nontoxic hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects // *Nat. Med.* 1997. Vol. 3. P. 1150-1154.
369. Vijayalaxmi M.R., Frei S.J., Dusch S.J., Guel V. et al. Frequency of micronuclei in the peripheral blood and bone marrow of cancer-prone mice chronically exposed to 2450 MHz radiofrequency radiation // *Radiation Research.* 1997. Vol. 147. P. 495-500.
370. Voss S.D., Daley J., Ritz J., Robertson M.J. Participation of the CD94 receptor complex in costimulation of human natural killer cells // *J. Immunol.* 1998. Vol. 160. P. 1618-1626.
371. Walleczek J. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling // *FASEB J.* 1992. Vol. 6(13). P.3177-3185.
372. Walleczek J. Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling // *FASEB J.* 1992. Vol. 6(13). P. 3177-3185.
373. Walsh C.M., Maltoubian M., Liu C-C., Ueda R. et al. Immune function in mice lacking the perforine gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. Vol. 91. P. 10854-10858.
374. Wang H.-B., Zheng Q.-Y. Effects of phytolaccaacinososa polysaccharides-I with different schedules on its antitumor efficiency in tumor bearing mice and production of Il-1, Il-2, Il-6, TNF, CSF // *Immunopharmacology & Immunotoxicology.* 1997. Vol. 19(2). P. 197-213.

375. Wanidworanun G., Strober W. Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis // *J. Immunol.* 1993. Vol. 151 (12). P. 6853-6861.
376. Ward C., Chilvers E.R., Lawson M.F. et al. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 4309-4318.
377. Wearsh P.A., Voglino L., Nicchitta C.V. Structural transitions accompanying the activation of peptide binding to the endoplasmic reticulum Hsp90 chaperone GRP94 // *Biochemistry.* 1994. Vol. 37. P. 5709-5719.
378. Wiersinga W.M. Thyroid autoimmunity // *Endocr. Dev.* 2014. Vol. 26. P. 139-157.
379. Whetton A.D., Dexter T.M. The mode of action of interleukin 3 in promoting survival, proliferation, and differentiation of hemopoietic progenitor cells // *Lymphokines.* 1988. Vol. 15. P. 355-374.
380. Whiteside T.L., Herberman R.B. Characteristics of natural killer cells and lymphokine-activated killer cells. Their role the biology and treatment of human cancer // *Human Cancer Immunol.* 1990. Vol. 10. P. 663-704.
381. Wilder L.S. Neuroendocrine-immune system interaction and autoimmunity // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 307-338.
382. Williams E.L., Djamgoz M.B. Nitric oxide and metastatic cell behavior // *Bioassays.* 2005. Vol. 27(12). P.1228-38.
383. Wilson M.T., Torres J., Cooper C.E., Sharpe M.A. Interactions of cytochrome-c-oxidase with nitric oxide: reactions of the 'turnover' intermediates // *Biochem. Soc. transaction.* 1997. Vol. 25. P. 905-909.
384. Woo K.Y., Chakravarthy D. A laboratory comparison between two liquid skin barrier products // *Int. Wound. J.* 2014. Jul 8.
385. Wysocki L.J., Sato V.L. "Panning" for Lymphocytes: a method for cell selection // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. Vol. 75. P. 2844-2848.

386. Yamamoto M., Nagano T., Okura I., Arakane K. et al. Production of singlet oxygen on irradiation of a photodynamic therapy agent, zinc-coproporphyrin III, with low host toxicity // *Biometals*. 2003. Vol. 16(4). P. 591-597.
387. Yamashita K., Takahashi A., Kobayashi S. et al. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production // *Blood*. 1999. Vol. 93. P. 674-685.
388. Yamauchi N., Kuriyama H., Watanabe N. et al. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro // *Cancer Res*. 1989. Vol. 49. P. 1671-1675.
389. Yang H.K., Cain C.A., Lockwood J., Tompkins W.A. Effects of microwave exposure on the hamster immune system. I. Natural killer cell activity // *Bioelectromagnetics*. 1983. Vol. 4(2). P. 123-139.
390. Yenari M.A., Giffard R.M., Sapolsky R.M., Steinberg G.K. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP 70) // *Mol. Med. Today*. 1999. Vol. 5. P. 525-531.
391. Yoshikawa T., Tanigawa M., Tanigawa T. et al. Enhancement of nitric oxide generation by low frequency electromagnetic field // *Pathophysiol*. 2000. Vol. 7 (2). P. 131-135.
392. Youn D.H. Differential roles of signal transduction mechanisms in long-term potentiation of excitatory synaptic transmission induced by activation of group I mGluRs in the spinal trigeminal subnucleus oralis // *Brain. Res. Bull*. 2014. Vol. 19 (108C). P. 37-43.
393. Young J.C., Shneider C., Harti F.U. In vitro evidence that hsp90 contains two independent chaperone sites // *FEBS Lett*. 1997. Vol. 418. P. 139-143.
394. Yuo A., Kitagawa S., Suzuki I. et al. Tumor necrosis factor as an activator of human granulocytes. Potentiation of the metabolisms triggered by the Ca²⁺ mobilizing agonists // *J. Immunol*. 1989. Vol. 142. P. 1678-1684.
395. Yuo A., Kitagawa S., Motoyoshi K. et al. Rapid priming of human monocytes by human hematopoietic growth factors: granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor (CSF), macrophage-CSF, and interleukin-3 selectively enhance superoxide release triggered by receptor-mediated agonists // *Blood*. 1992. Vol.79 (6). P.1553-1557.
396. Zhang M., Tracey K.J. Tumor necrosis factor. The cytokine handbook, 3rd ed. New York: Academic press, 1998. P. 515-548.
397. Zmyslony M. Palus J., Jajte J., Dziubaltowska E. et al. DNA damage in rat lymphocytes treated in vitro with iron cations and exposed to 7 mT magnetic fields (static or 50 Hz) // *Mutat Res*. 2000. Vol. 453 (1). P. 89-96.
398. Акоев И.Г., Кожокару А.Ф., Мельников В.М., Усачев А.В. Влияние длительного низкоинтенсивного воздействия радиочастотного излучения сантиметрового диапазона на подкожно привитую аденокарциному Эрлиха // *Рад.биол. радиоэкол*. 1995. Т. 35. №1. С. 23-27.
399. Акоев И.Г., Мельников В.М., Усачев А.В., Кожокару А.Ф. Модификация летального радиационного поражения мышей пострadiационным низкоинтенсивным радиочастотным излучением сантиметрового диапазона // *Рад.биол. радиоэкол*. 1994. Т. 34. № 4-5. С. 671-674.
400. Александрова О.Ю., Михайлов В.А. Опыт использования иммуномодулирующего воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения при лечении больных аутоиммунными заболеваниями // *Актуальные вопросы физиотерапии: Тез.докл*. 1998. С. 28-30.
401. Алексеев С.И., Зискин М.С., Кочеткова Н.В. Электрофизиологическое исследование влияния миллиметровых волн на нервные клетки // *Миллиметр. волны в биол. и мед*. 1997. №9-10. С.34-38.
402. Андреев В.Е., Бецкий О.В., Казаринов К.Д. и др. Нетепловые эффекты миллиметрового излучения. М.: ИРЭ АН СССР, 1981. С.167-176.
403. Анищенко В.С., Нейман А.Б., Мосс Ф., Шимански-Гайер Л. Стохастический резонанс как индуцированный шумом эффект увеличения степени порядка // *Усп. физ. наук*. 1999. Т.169(1). С.7-38.

404. Артюхов В.Г., Башарина О.В., Зон Б.А., Рязанцева Л.Т. Влияние лазерного облучения на функциональную активность нейтрофилов человека: активация молекул миелопероксидазы в присутствии гематопорфирина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2001. № 4. С.457-460.
405. Афанасьева Н.И., Кару Т.Й., Тифлова О.А. Оксидазы bdbo в качестве первичных фотоакцепторов при воздействии низкоинтенсивного видимого (лазерного) излучения на клетку *Escherichiacoli* // Докл. АН. 1995. № 345. С. 404-406.
406. Баджинян С.А., Меликсетян А.М., Малакян М.Г., Григорян Д.С. Фосфолипидный состав и активность процессов перекисного окисления липидов в мембранах эритроцитов и плазме крови животных при воздействии когерентных электромагнитных волн ММ-диапазона // Миллиметр.волны в биол. и мед. 2003. №4 (32). С.12-19.
407. Байбеков И.М., Касымов А.Х., Козлов В.И. и др. Морфологические основы низкоинтенсивной лазеротерапии. Ташкент: Изд-во им. Ибн Сины, 1991. 223 с.
408. Байбеков И.М., Мавлян-Ходжаев Р.Ш. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процессы фагоцитоза // Новые достижения лазерной медицины: Тез.докл. 1993. С. 238 - 239.
409. Белецкая О.М., Макаренко Б.И., Лысенко Н.А., Бедносенко Б.И. Результаты использования электромагнитных СВЧ-излучений для лечения онкологических больных // Зарубежная радиоэлектроника. 1996. Т. 12(б). С. 25-28.
410. Берснев В.П., Яковенко И.В., Кокин Г.С. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения для лечения повреждённых нервов // Низкоинтенсивное лазерное излучение в медицинской практике: Тез. докл. 1990. С. 31.

411. Бецкий О.В., Девятков Н.Д. Механизмы взаимодействия электромагнитных волн с биологическими объектами // Радиотехника. 1996. Т.41 (9). С. 4-11.
412. Бецкий О.В., Ильина С.А. Кожа и проблема взаимодействия миллиметровых волн с биологическими объектами // Миллиметровые волны в медицине и биологии. М.: ИРЭ АН СССР, 1989. С.296-302.
413. Бецкий О.В., Лебедева Н.Н. Современные представления о механизмах воздействия низкоинтенсивных миллиметровых волн на биологические объекты // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2001. №3(24). С. 5-18.
414. Бецкий О.В., Путвинский А.В. Биологические эффекты миллиметрового излучения низкой интенсивности // Изв. ВУЗов. Радиоэлектроника. Электрон. приборы СВЧ. 1986. Т. 29. №10. С.4-10.
415. Бецкий О.В. Миллиметровые волны в биологии и медицине (Обзор) // Радиотехника и электроника. Т.38 (10). 1993. С.1760-1782.
416. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Лебедева Н.Н. Лечение электромагнитными полями. Часть 1. Источники и свойства электромагнитных волн // Биомедицинская радиоэлектроника. 2000. № 7. С. 3-9.
417. Бецкий О.В., Казаринов К.Д., Путвинский А.В. и др. Конвективный перенос растворенных в воде веществ как возможный механизм ускорения мембранных процессов под действием миллиметрового излучения // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. М.: ИРЭ АН СССР, 1983. С.97-114.
418. Богдашин И.В., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.Ю. и др. Роль тимуса в регуляции синтеза цитокинов клетками костного мозга при стрессе // Иммунология. 1991. №5. С. 30-32.
419. Бородин Ю.И., Асташов В.В., Майоров А.П., Казаков О.В. Морфофункциональные преобразования в тимусе и лимфатических узлах при различных способах облучения гелий-неоновым лазером // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1997. Т. 123. №5. С. 588-590.

420. Бриль Г.Е. Бриль А.Г. Гуанилатциклаза и Ю-синтетаза – возможные первичные акцепторы энергии низкоинтенсивного лазерного излучения. 1997. Т.1. № 1. С. 39-42.
421. Бриль Г.Е., Петросян В.И., Сеницын Н.И. Поддержание структуры водного матрикса – один из ключевых механизмов действия низкоинтенсивного лазерного излучения // Лазеры в медицине и экологии: Тез.докл. 1998. С. 13 - 14.
422. Буйлин В.А. Низкоинтенсивная лазеротерапия в оториноларингологии // Информационно-методический сборник. М. ТОО «Фирма «Техника». 1996. 104 с.
423. Василенко А.М., Захарова Л.А. Цитокины в сочетанной регуляции боли и иммунитета // Успехи современной биологии. 2000. Т. 120(2). С. 174-189.
424. Васильев Н.Е., Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д. Иммунологические аспекты фотодинамической терапии // Медицинская иммунология. 2003. Т. 5. № 5-6. С. 507-518.
425. Витрещак Т.В., Михайлова В.В., Пирадов М.А., Полещук В.В. и др. Лазерная модификация крови *invitro* и *invivo* у пациентов с болезнью Паркинсона // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2003. Т. 3. №5. С. 508-511.
426. Владимиров Ю.А. Три гипотезы о механизме действия красного (лазерного) света // Эфферентная медицина. 1994. С. 23-25.
427. Волегов А.И., Клевцов В.А., Смирнов В.М. Эффект торможения химического канцерогенеза при использовании низкоэнергетического лазерного излучения в сочетании с интерфероном // Вопросы онкологии. 2001. Т. 47. № 1. С. 73 – 77.
428. Волобуев А.Н., Овчинников Е.Л., Бакуцкий В.Н., Труфанов Л.А. Биологические аспекты взаимодействия магнитного поля и лазерного излучения с биологической тканью // Лазеры в клинике и эксперименте. 1990. С. 13-16.

429. Ганди О.П. Современные представления о поглощаемых человеком и животными дозах электромагнитного излучения // ТИИЭР. 1980. Т. 68. № 1. С. 31.
430. Гапеев А.Б., Якушина В.С., Чемерис Н.К., Фесенко Е.Е. Модулированное электромагнитное излучение крайне высоких частот низкой интенсивности активирует или ингибирует респираторный взрыв нейтрофилов в зависимости от частоты модуляции // Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 5. С. 1125-1134.
431. Гапеев А.Б., Сафронова В.Г., Чемерис Н.К., Фесенко Е.Е. Модификация активности перитонеальных нейтрофилов мыши при воздействии миллиметровых волн в ближней и дальней зонах излучателя // Биофизика. 1996. Т. 41. Вып. 1. С.205-219.
432. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Королев А.Ф., Рощин А.В. и др. Механизмы функционирования водных биосенсоров электромагнитного излучения // Биомед. радиоэлектроника. 2000. Т. 3. С. 48-55.
433. Гапочка Л.Д., Гапочка М.Г., Королев А.Ф. и др. Воздействие электромагнитного излучения КВЧ и СВЧ диапазонов на жидкую воду // Вестн. Моск. ун-та. Сер.3. Физика. Астрономия. 1994. Т. 35. № 4.
434. Глушкова О.В. Иммуномодулирующие эффекты низкоинтенсивных электромагнитных волн СВЧ-диапазона. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Пущино, 2002. 22 с.
435. Глушкова О.В., Новоселова Е.Г., Огай В.Б., Синотова О.А. и др. Влияние низкоинтенсивных электромагнитных волн сантиметрового диапазона на уровень антителообразования у мышей // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып.1. С. 126-130.
436. Глушкова О.В., Новоселова Е.Г., Синотова О.А., Фесенко Е.Е. Иммунокорректирующее действие низкоинтенсивного СВЧ-излучения при канцерогенезе у мышей // Биофизика. 2003. Т. 48. Вып 2. С.281-288.

437. Голант М.Б. Биологические и физические факторы, обуславливающие влияние монохроматического электромагнитного излучения ММ диапазона малой мощности на жизнедеятельность // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. 1985. С. 21-36.
438. Голант М.Б., Виленская Р.Л. Зюлина Е.А. и др. Серия широкодиапазонных генераторов малой мощности ММ и СбММ диапазоне / ПТЭ. 1965. №4. С. 136 -139.
439. Грибковский В.П. Полупроводниковые лазеры. Минск: Университетское, 1988. 304 с.
440. Григорьев И.С., Мейлихов Е.З. Физические величины (справочник). М.: Энергоатомиздат, 1991. 895 с.
441. Григорьев Ю.Г. Отдаленные последствия биологического действия электромагнитных полей // Рад. Биол. Радиоэкол. 2000. Т. 40. С. 217-225.
442. Григорьев Ю.Г. Роль модуляции в биологическом действии электромагнитного излучения // Рад. биол. радиоэкол. 1996. Т. 36 (5). С. 659-670.
443. Давыдов Б. И., Тихончук В. С., Антипов В. В. Биологическое действие, нормирование и защита от электромагнитных излучений. М.: Энергоатомиздат, 1984. 176 с.
444. Девятков Н.Д., Бецкий О.В. Особенности взаимодействия ММ-излучения низкой интенсивности с биологическими объектами // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. 1985. С. 6-20.
445. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности // Радио и Связь. 1991. 169 с.
446. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. 2003. №3. С. 20-35.
447. Диденко Н.П., Зеленцов В.Т., Ча В.А. О конформационных изменениях биомолекул при взаимодействии с электромагнитным излучением //

Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. 1983. С.63-77.

448. Душкин И.Ф., Ежов В.В. Дозозависимые эффекты лазеротерапии в практике курортного лечения рецидивирующего бронхита у детей // Применение лазеров в медицине и биологии: Тез.докл. 1998. С. 71.
449. Жуков Б.Н., Лысов Н.А. Лазерное излучение в экспериментальной и клинической ангиологии. Самара, 1996. 168 с.
450. Жукова Г.В., Гаркави Л.Х., Рубцов В.Р. и др. О влиянии низкочастотной модуляции на антистрессорные эффекты миллиметровых волн // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2002. №3(27). С.55-64.
451. Залюбовская Н.П. Биологические реакции как основа гигиенической оценки электромагнитных волн миллиметрового диапазона. Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук, Харьков, 1979. 325 с.
452. Запорожан В., Беспоясная В., Соболев Р. Влияние миллиметрового излучения на состояние эндокринной, иммунной и пищеварительной систем у пациентов после хирургического удаления доброкачественной опухоли яичников // 11-й Российский Симпозиум с международным участием. “Миллиметровые волны в Медицине и Биологии”. 1997. С. 36-38.
453. Запорожан В.Н., Беспоясная В.В., Соболев Р.В. Влияние электромагнитного излучения крайне высокой частоты на состояние эндокринной, иммунной и протеолитической систем у больных после хирургического удаления доброкачественных опухолей яичников // 11-й Российский Симпозиум с международным участием. “Миллиметровые волны в Медицине и Биологии”. 1997. С. 38-40.
454. Зверева К.В., Грунина Е.А., Отрицательные эффекты низкоинтенсивной лазерной терапии при ревматоидном артрите // Тер. арх. 1996. № 5. С.22-24.

455. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука/Интерпериодика», 2001. 343 с.
456. И. В. Черемушкина, Д. А. Черенков, Е. П. Анохина, Ю.А. Рыбаков и др. Получение рекомбинантного штамма *Bacillus subtilis* – продуцента β -маннаназы // Биотехнология. 2011. № 5. С. 32-37.
457. Иванов О.Л., Антонюк В.А. Воронцова Г.М. Лазерное излучение малой мощности в терапии нейродерматозов // 4-й Всероссийский съезд дерматовенерологов: Тез.докл. 1976. С. 184-186.
458. Иванова В.Ю., Краснощекова Е.И., Мартынова О.В., Черенкова Л.В и др. Комплексное исследование действия ЭМИ СВЧ на ЦНС // Вторая международная конференция "Электромагнитные поля и здоровье человека". Тез.докл. 1999. С. 60.
459. Иванова В.Ю., Мартынова О.В. Изменение спектральных характеристик ЭЭГ бодрствующих животных при действии слабого электромагнитного СВЧ поля // Международное совещание «Электромагнитные поля. Биологическое действие и гигиеническое нормирование». Тез.докл. 1998. С. 429-442.
460. Иванов-Муромский К.А. Электромагнитная биология. Киев: Наукова думка, 1977. 77 с.
461. Ильина С.А., Бакаушина Г.Ф., Гайдук В.И. и др. О возможной роли воды в передаче воздействия излучения миллиметрового диапазона на биологические объекты // Биофизика. 1979. Т.24. Вып. 3. С. 513–518.
462. Исмаилов Э.Ш. Биофизические действия СВЧ-излучений. М.: Энергоиздат, 1985. 156 с.
463. Кабисов Р.К. Миллиметровые волны в системе реабилитации онкологических больных // 11-й Российский Симпозиум с международным участием. “Миллиметровые волны в Медицине и Биологии”. 1997. С. 13-14.
464. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология. 2003. Т. 4. № 3. С.131-139.

465. Казаринов К.В., Шаров В.С., Путвинский А.Р., Бецкий О.В. Влияние непрерывного миллиметрового излучения низкой интенсивности на транспорт ионов Na^+ в коже лягушки // Биофизика. 1984. Т. 29. № 3. С. 480-482.
466. Каменев Ю.Ф. Применение электромагнитного излучения в травматологии и ортопедии // Миллиметр. волны в биол. и мед. 1999. №2(14). С.20-24.
467. Карабаев Х.Э., Насретдинов Т.Х., Купин В.И. и др. Применение гелий-неонового лазера при рецидивирующих гнойных средних отитах // Межд. симп. по лазерной хирургии и медицине. Ч. 2. 1988. С. 231-233.
468. Карагезян М.А., Комисарова Н.Г., Климова Л.И. Дискретно-динамический анализ иммунного статуса больных нейродермитом, получавших лазеротерапию // Вестн. дерматол. 1988. № 3. С. 44-51.
469. Кару Т.Й., Афанасьева Н.И. Цитохром-с-оксидаза как первичный фотоакцептор при лазерном воздействии света видимого и ближнего ИК-диапазона на культуру клеток // Докл. АН. 1995. Вып. 342. С. 693-695.
470. Катаев А.А., Александров А.А., Тихонова Л.И., Берестовский Г.Н. Частотнозависимое влияние миллиметровых электромагнитных волн на ионные токи водоросли *Nitellopsis*. Нетепловые эффекты // Биофизика. 1993. Т. 38. Вып. 3. С.446-462.
471. Кац В.А., Литвин Г.Д., Назаров Ш.Б., Ряжский Г.Г. и др. Фотодинамическая терапия // Вопр. Онкол. 1992. Т. 38. № 12. С. 1403-1412.
472. Киричук В.Ф., Махова Г.Е. Состояние сосудисто-тромбоцитарного звена системы гемостаза и его коррекция с помощью электромагнитного излучения миллиметрового диапазона // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2000. №1 (17). С.8-17.
473. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы. М.: Мир, 1990. 395 с.
474. Клебанов Г.И., Максина А.Г., Крейнина М.В., Дайняк Б.А. и др. Изменение физического состояния мембран в процессе стимуляции

- полиморфноядерных лейкоцитов крови // Биол. мембраны. 1990. Т. 7. № 3. С. 281-286.
475. Клебанов Г.И., Полтанов Е.А., Долгина Е.Н., Никанкина Л.А. и др. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на продукцию оксида азота и цитокинов лейкоцитами // Биол. мембраны. 2002. Т. 19. № 5. С. 391-402
476. Коган А.Х. Фагоцитозависимые кислородные свободнорадикальные механизмы аутоагрессии в патогенезе внутренних болезней // Вести Росс. АМН. 1999. №2. С. 3-10.
477. Козарь А.В., Королев А.Ф., Шевелева Е.Н. и др. Формирование интерференционной картины при моделировании воздействия ММ облучения на многослойную кожную ткань // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2002. С. 12-19.
478. Козель А.И., Попов Г.К. Механизм действия лазерного облучения на тканевом и клеточном уровнях // Вестник РАН. 2000. №2. С. 41 - 43.
479. Коломиец Л.А., Щепеткин И.А. Механизмы терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения // Сибирский медицинский журнал. 1996. № 1. С. 49 - 51.
480. Коляда Т.В., Никитина В.Н. Медико-биологические аспекты воздействия модулированных высокочастотных излучений // Гигиена и санитария. 1989. №10. С. 39-41.
481. Коновалов В.Ф., Сериков И.С. Отдаленные последствия действия модулированного и немодулированного электромагнитного поля на эпилептиформную активность крыс // Рад. Биол. Радиоэкол. 2001. Т. 41(2). С. 207-209.
482. Конопляников А.Г., Ключ В.Е., Каплан В.П., Штейн Л.В. и др. Коканцерогенное действие СВЧ-излучения нетепловой мощности и новые методы модификации этого эффекта // Международное совещание "Электромагнитные поля. Биологическое действие и гигиеническое нормирование". Тез. докл. 1998. С. 367-371.

483. Крюк А.С., Мостовников В.А., Хохлов И.В., Сердеченко Н.С. Терапевтическая эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения. Минск: Наука и техника. 1986. 231 с.
484. Кузнецов В.П. Интерфероны как средство иммуномодуляции // Иммунология. 1987. №4. С. 30-34.
485. Кузнецова Н.А., Калия О.Л. Фотокаталитическая генерация активных форм кислорода в биологических средах в методе фотодинамической терапии // Российский химический журнал. 1998. Т. 42. № 5. С. 36-49.
486. Купин В.И., Сорокин А.М. Влияние лазерного излучения неповреждающей интенсивности на систему иммунитета // Советская медицина. 1985. № 7. С. 8 - 12.
487. Курочкин А.А., Аникин В.В., Соболева Н.П. Эффективность низкоинтенсивного лазерного излучения в лечении ринокардиального синдрома у детей с хроническим аденоидитом // Лазерная медицина. 1997. Т. 1. Вып. 2. С. 15-18.
488. Лапченко А.С., Пальчун В.Т. Наш опыт применения высоко- и низкоинтенсивных лазеров в оториноларингологии // Новое в лазерной медицине и хирургии. Тез. докл. 1991. Вып. 2. С. 176-179.
489. Лебедева А.Ю., Люсов В.А., Волов Н.А., Щелкунова И.Г. Динамика процессов перекисного окисления липидов у больных нестабильной стенокардией при проведении ММ-терапии // Миллиметр. волны в биол. и мед. 1995. №5. С.18-20.
490. Лебедева Н.Н., Котровская Т.И. Экспериментально-клинические исследования в области биологических эффектов миллиметровых волн // Миллиметр. волны в биол. и мед. 1999. Т. 15(3). С. 3-14.
491. Лукьянова С.Н. Реакция центральной нервной системы на низкоинтенсивное СВЧ облучение // Электромагнитные поля и здоровье человека. Сб. ст. под ред. М. Репачоли. 1998. С. 401-408.
492. Луцкевич Э.В., Урбанович А.С., Грибков Ю.И. и др. Некоторые аспекты клинического использования неразрушающего импульсного

- лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона // Материалы междунар. конф. «Лазеры и медицина». 1989. С. 143-144.
493. Мажуль В.М., Зайцева Д.Г., Щербин Д.Г. Внутримолекулярная динамика и функциональная активность белков // Биофизика. 2000. Т. 45. Вып. 6. С. 965 - 989.
494. Мазо Е.Б., Маати М., Розанов В.В. Иммунодефицит и лазеро-магнитная терапия // Применение лазеров в медицине и биологии. Тез. докл. Харьков. 1998. С. 87.
495. Макаренко В.Д., Макаренко А.И. Применение лазерной рефлексотерапии в лечении atopического дерматита у детей // Всесоюзн. конф. по применению лазеров в медицине. Тез. докл. 1984. С. 153-154.
496. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология. 2000. Т. 42. № 4. С. 323-339.
497. Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А. Роль перекисного окисления липидов и тиол-дисульфидного обмена в механизмах антистрессорного действия электромагнитного излучения крайне высокой частоты // Миллиметр. волны в биол. и мед. 1995. Т. 5. С. 6-9.
498. Медуницын Н.В. Цитокины и аллергия // Иммунология. 1999. №5. С. 5-9.
499. Медуницын Н.В., Литвинов В.И., Мороз А.М. Медиаторы клеточного и межклеточного иммунитета. М.: Медицина, 1980. 348 с.
500. Мидленко В.И., Архипов Т.С., Ибрагимов Е.К. Лазерное облучение селезенки и тимуса у больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Новое в лазерной медицине и хирургии. Тез. докл. 1990. Ч. 1. С. 214 - 215.
501. Миненков А.А., Кончугова Т.В., Кульчицакя Д.Б. Клинико-экспериментальные предпосылки физиотерапевтического использования лазерного излучения // Вопросы курортологии. 1992. № 2. С. 11-14.
502. Минц Р.И., Скопинов С.А. Структурная альтерация биологических жидкостей и их моделей при информационных воздействиях // Действие

- электромагнитного излучения на биологические объекты и лазерная медицина. Тез.докл. 1989. С. 6 - 41.
503. Мишенькин Н.В., Кротов Ю.А. «Закрытая» saniрующая хирургия с лазерной терапией в раннем послеоперационном периоде у больных хроническим гнойным эпимезотимпанитом // Вестн. оторинолар. 1991. № 5. С. 31-36.
504. Москвин С.В., Буйлин В.А. Низкоинтенсивная лазерная терапия. М.: ТОО «Фирма «Техника», 2000. 724 с.
505. Наседкин А.Н. Экспериментально-клиническое обоснование применения различных видов лазерных излучений в оториноларингологии. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. 2000.
506. Насонов Е.Л., Самсонов М.Ю., Беленков Ю.Н., Фукс Д. Иммунопатология застойной сердечной недостаточности: роль цитокинов // Кардиология. 1999. №3. С.66-73.
507. Новоселова Е.Г. Липидный обмен в тканях крыс при хроническом действии гамма-облучения и убихинона Q-9 // Биохимия. 1992. Т. 57. С. 531-538.
508. Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Стимуляция продукции ФНО макрофагами мышей в условиях действия *in vivo* и *in vitro* слабых электромагнитных волн сантиметрового диапазона // Биофизика. 1998. Т. 43 (6). С.1132.
509. Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Синотова О.А., Фесенко Е.Е. Стрессовый ответ клетки на воздействие сверхслабого электромагнитного излучения // Доклады академии наук. 2005. Т. 401. №1. С. 117-119.
510. Новоселова Е.Г., Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новоселова Т.В. и др. Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на изолированные клетки иммунной системы мышей // Биофизика. 2006. Т. 51. С. 509-518
511. Огай В.Б. Функциональная активность иммунокомпетентных клеток животных в норме и патологии: эффекты низкоинтенсивных

- электромагнитных излучений. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. 2003. 116 с.
512. Осина Т.Д. Лазерная коррекция нарушений местной клеточной защиты при бронхиальной астме у детей // Новые направления лазерной медицины. Тез. докл. 1996. С. 193.
513. Палеев И.Р., Ильченко В.А. Карандашов В.Н. и др. Лечение гормонорезистентной бронхиальной астмы экстракорпоральным облучением крови гелий-неоновым лазером // Новые достижения лазерной медицины. Тез. докл.. 1993.
514. Перов Ю.Ф., Рубин А.Б., Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика: радиочастотные и микроволновые электромагнитные излучения. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2008. 184 с.
515. Плетнев С.Д. Лазеры в клинической медицине. М.: Медицина, 1996. 432 с.
516. Плужников М.С. Лазерная медицина и оториноларингология // Актуальные проблемы современной ринологии. Тез. докл. 1997. С. 25-28.
517. Плужников М.С., Лопотко А.И. Низкоэнергетическое лазерное излучение в ринологии // Российская ринология. 1995. №3-4. С. 42-48.
518. Пономарёв О.А., Фесенко Е.Е. Свойства жидкой воды в электрических и магнитных полях // Биофизика. 2000. Т. 45. Вып. 3. С. 389 - 398.
519. Попов В.В., Мамедов А.Ф. Клинико-экспериментальное обоснование доз магнитолазерного излучения при лечении хронического экссудативного гайморита и вазомоторного ринита // Разработка и применение лазеров в медицине. Тез. докл. 1991. С. 16-17.
520. Попов В.И., Рогачевский В.В., Гапеев А.Б., Храмов Р.Н. и др. // Дегрануляция тучных клеток кожи под действием низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты // Биофизика. 2001. Т. 46. Вып. 6. С. 1096-1102.

521. Преображенский Н.А., Климова Л.А., Безчинская М.Я. и др. Применение низкоинтенсивного лазерного излучения для лечения хронического тонзиллита, хронического фарингита и ринита. Методические рекомендации. 1988. 24 с.
522. Пресман А.С., Левитина Н.А. Влияние нетеплового микроволнового облучения на резистентность животных к γ -облучению // Радиобиология. 1962. Т. 2. Вып.1. С.170-171.
523. Пресман А.С. Электромагнитная сигнализация в живой природе. М.: Сов. Радио, 1974.
524. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. М.: Наука, 1968. 186 с.
525. Проскуряков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. Биология окиси азота. // Усп. совр. биол. 1999. Т. 119. № 4. С. 380-395
526. Прохончуков А.А., Жижина Н.А. Лазеры в стоматологии // Лазеры в клинической медицине. Руководство для врачей. 1996. С. 283-303.
527. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицын Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. М.: Наука, 1997. 156 с.
528. Родштат И.В. Биоритмологические аспекты КВЧ воздействия низкой интенсивности // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2001. №2 (26). С.52-56.
529. Родштат И.В. Физиологические аспекты КВЧ-диагностики органических и функциональных заболеваний человека // Миллиметр. волны в биол. и мед. 1999. №3 (15). С. 15-21.
530. Родштат И.В. Физиологические аспекты рецепции миллиметровых радиоволн биологическими объектами // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. 1985. С.132-146.

531. Рыжова Е.Г. Оценка терапевтической эффективности превентивной лазеротерапии детей с поллинозами // Актуальные вопросы лазерной медицины и операционной эндоскопии. 1994. С. 346-347.
532. Савула М.М., Кравченко Н.С. Применение микроволновой терапии сантиметрового диапазона в комплексном лечении больных деструктивным туберкулезом легких // Пробл. туберк. 1997. Т. 6. С. 50-53.
533. Сафронова В.Г., Гапеев А.Б., Аловская А.А., Габдулхакова А.Г. и др. Миллиметровые волны ингибируют синергический эффект кальциевого ионофора А23187 и форболового эфира в активации респираторного взрыва нейтрофилов // Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 6. С. 1267-1273.
534. Севастьянова Л.А. Биологическое действие радиоволн миллиметрового диапазона на нормальные ткани и злокачественные новообразования // Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. 1983. С. 48-62.
535. Севастьянова Л.А., Голант М.Б., Зубенкова Э.С. и др. Действие радиоволн миллиметрового диапазона на нормальные ткани и злокачественные новообразования // Применение миллиметрового излучения низкой интенсивности в биологии и медицине. 1985. С. 37-49.
536. Севастьянова Л.А., Потапов С.Л., Адаменко В.Г. Комбинированное воздействие рентгеновского и сверхвысокочастотного излучения на костный мозг // Науч. Докл. Высш. Шк., Сер. Биофиз. Биол. науки. 1969. № 6, С. 46.
537. Севастьянова Л.А., Потапов С.Л., Адаменко В.Г. Изменение гемопоза под влиянием СВЧ и рентгеновского излучения // Вопросы радиобиологии и биологического действия цитотоксических препаратов. Доклады 5 конференции ЦНИЛ. 1970. Т. 2.
538. Семионкин Е. И., Куликов Е.П., Трушин С.Н. Использование низкоинтенсивного лазерного излучения в хирургии и онкологии. Обзор литературы // Паллиативная медицина и реабилитация. 2011. № 4. С. 56-58.

539. Сидоренко А.В. Влияние низкоинтенсивного электромагнитного излучения миллиметрового диапазона на физиологические показатели организма // Зарубеж. радиоэлектроника. 1996. №12. С.57-61.
540. Сидоренко А.В. Динамика нейронной сети при действии микроволнового излучения // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2002. №3 (27). С.20-27.
541. Симбирцев А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета // Иммунология. 1998. № 6. С. 3-8.
542. Сеницын Н.И., Петросян В.И., Елкин В.А. и др. Особая роль системы "миллиметровые волны - водная среда" в природе // Биомед. Радиоэлектрон. 1998. №1. С. 5-23.
543. Скобелкин О.К. Достижения лазерной хирургии и проблемы лазерной медицины. Ч.1. // Применение лазеров в хирургии и медицине. 1989. С 3-5.
544. Скупченко В.В. Фазотонный гомеостаз и врачевание. Самара, 1994. 256 с.
545. Слугин В.И., Котровская Т.И., Слугина М.А., Алешина Л.И. Применение КВЧ-терапии при функциональной реабилитации детей с поражением нервной системы // Миллиметр. волны в биол. и мед. 2000. №4 (20). С.44-48.
546. Соколов В.В., Кабисов Р.К., Поддубный Б.К., Барчук А.С. Новые физические методы в лечении злокачественных опухолей основных локализаций // Росс.онколог. журн. 1996. №3. С.35-41.
547. Спасиченко П.В., Олейник Г.М. и др. Модулирующий эффект внутрисосудистого лазерного облучения крови на показатели гомеостаза у нейрохирургических больных // Низкоинтенсивное лазерное излучение в медицинской практике. Тез. докл. 1990. С. 203-205.
548. Спасов А.А., Негода В.В., Островский О.В., Конан К. Мембранотропное действие низкоэнергетического лазерного облучения крови // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1998. Т. 126. № 10. С. 412 - 416.

549. Стефанов В.Е., Шафран М.Г. Исследование кинетических свойств и теплоустойчивости миелопероксидазы лейкоцитов белых мышей // Биохимия. 1976. Т. 41. № 9. С. 1609-1614.
550. Суслов А.П. Макрофаги и противоопухолевый иммунитет // Итоги науки и техники. Сер. Онкология. 1990. Т. 19. С. 1-168.
551. Талалаев В.Н. Лазеротерапия при заболеваниях полости носа и околоносовых пазух // Российская ринология. 1998. № 2. С. 28.
552. Титов В.И., Степанова Т.В. Влияние внутривенного облучения крови гелий-неоновым лазером на микроциркуляцию и уровень артериального давления у больных гипертонической болезнью // Клиническое и экспериментальное применение новых лазерных технологий. Тез. докл. 1995. С. 414-415.
553. Токмачев Ю.К., Тупикин Г.В., Алиханов Б.А., Киценко Л.С. Синдром вторичного обострения («Лазерная болезнь») – проблема лазерной медицины // Новые достижения лазерной медицины. Тез. докл. 1993. С. 549-550.
554. Тупицын Н.Н. Роль рецептора цитокинов gp130 в росте и дифференцировке нормальных и опухолевых гемопоэтических клеток // Гематол. и трансфузиол. 2001. Т. 46. С. 9-14.
555. Фесенко Е.Е., Новоселова Е.Г., Семилетова Н.В., Агафонова Т.А. и др. Стимуляция естественных киллерных клеток мышей, подвергнутых действию слабых электромагнитных волн сантиметрового диапазона // Биофизика. 1999. Т. 44 (4). С. 737-741.
556. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю. А. Эндотелиальные клетки и цитокины // Мед. иммунология. 2001. Т.3. №4. С.499-514.
557. Фролов Е.П. Кожа: строение, функции, общая патология и терапия. М.: Медицина, 1982. 335 с.
558. Хаитов Р.М., Чувиров Г.Н., Маркова Т.П. Роль макрофагов в патогенезе ВИЧ-инфекции // Иммунология. 1995. №3. С. 10-17.

559. Хорошилова Н.В., Борисова А.М., Иванов А.В. и др. Клинико-экспериментальное обоснование иммунокорректирующего действия облучения крови гелий-неоновым лазером у больных хроническим бронхитом // Новые достижения лазерной медицины. Тез. докл. 1993. С. 564 - 565.
560. Чекмарев В.М., Александров М.Т., Бажанов Н.Н. и др. Иммуномодулирующее действие низкоинтенсивного лазерного воздействия при лечении гнойных заболеваний у детей // Новые направления лазерной медицины. Тез. докл. 1996. С. 341 - 342.
561. Черенков Д.А., Анохина Е.П., Кирьянова С.В., Корнеева О.С. Антиоксидантная активность продуктов гидролиза природных полимеров (маннана и фукоидана) // Вестник ВГУИТ. 2012. №1. С. 151-153.
562. Чернопятков В.Б., Корольчук И.Э. Сочетанные методические подходы лечения низкоинтенсивным лазерным излучением в кардиологии // Перспективные направления лазерной медицины. Тез. докл. 1992. С. 392-394.
563. Чканников А. Н., Зенгер В.Г., Исаев В.М. и др. Лазеротерапия и лазерохирургия при болезни Меньера: метод рекомендации. М.: МОНИКИ, 1996. 7 с.
564. Чудновский В.М., Леонова Г.Н., Дроздов А.Л., Юсупов В.Н. Биологические модели и физические механизмы лазерной терапии. Владивосток: Дальнаука, 2002. 157 с.
565. Шабанов В.А., Костров В.А., Китаева Н.Д. и др. Сравнительное влияние на гемореологию наружной и внутренней ГНЛ – терапии у больных гипертонической болезнью // Новое в лазерной медицине и хирургии. Тез. докл. 1990. С. 135-136.
566. Шаров В.С., Казаринов К.Д., Андреев В.Е. и др. Ускорение перекисного окисления липидов под действием электромагнитного излучения миллиметрового диапазона // Биофизика. 1983. Т. 28 (1). С.146-147.

567. Шван Х. П., Фостер К. Р. Воздействие высокочастотных полей на биологические системы: Электрические свойства и биофизические механизмы // ТИИЭР. 1980. Т. 68(1). С. 55.
568. Шеин А.Г. Некоторые аспекты воздействия СВЧ-излучения сантиметрового диапазона на зерно // Биомедицинская радиоэлектроника. 2001. Т. 1. С. 5-9.
569. Штемлер В.М., Колесников С.В. Особенности взаимодействия электромагнитных полей с биообъектами. Биологическое действие электромагнитных излучений // Итоги науки и техники. Серия «Физиология человека и животных». 1978. Т. 22. С. 9.
570. Шустер А.М., Шендалев В.Н., Наседкин А.Н. Применение гелий-неонового лазера в детской ларингологии // Междунар. симпозиум по лазерной хирургии и медицине. Тез. докл. 1988. С. 239.
571. Щепеткин И.А., Удут В.В., Карпов А.Б. Влияние излучения He-Ne лазера на хемиллюминесценцию нейтрофилов человека // Радиобиология. 1993. Т. 33. № 3. С. 377 - 382.
572. Ярилин А.А. Радиация и иммунитет. Современный взгляд на старые проблемы // Радиобиология. 1997. Т. 37. Вып. 4. С. 597-603.