

*На правах рукописи*



**ЧЕРЕНКОВ**  
Дмитрий Александрович

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

**03.01.02** Биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени доктора  
биологических наук

Воронеж – 2015

Работа выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» и в лаборатории механизмов рецепции (группа клеточной иммунологии) ФГБУН «Институт биофизики клетки РАН»

**Научный консультант:**

Доктор биологических наук, профессор **Корнеева Ольга Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ефременко Елена Николаевна**, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», лаборатория экобиокатализа, заведующая

**Рецкий Михаил Исаакович**, доктор биологических наук, профессор, ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии РАСХН», заместитель директора по научной работе

**Гудков Сергей Владимирович**, доктор биологических наук, ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВПО Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского

Защита состоится «18» декабря 2015 г. в 13.30 часов на заседании диссертационного совета Д 212.038.03 при ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», по адресу: 394006 г. Воронеж, Университетская пл, д.1, ауд. 59

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет» и на сайте <http://www.science.vsu.ru/disser>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета



Грабович М.Ю.

## 1. Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Одним из актуальных направлений в биофизике является изучение механизмов действия низкоинтенсивных электромагнитных излучений (ЭМИ) на иммунную систему организма и ее структурно-функциональное состояние. Постоянно возрастающий уровень «электромагнитного загрязнения» техногенного характера, развитие и распространение компьютеров, бытовой техники, средств связи подчеркивает необходимость и важность таких исследований. В проведенных ранее работах выявлено, что действие нетепловых ЭМИ проявляется на разных уровнях организации живой материи. ЭМИ существенно влияют на функционирование ключевых регуляторных систем, затрагивая как клетки и клеточные структуры, так и организм в целом (Бецкий и др., 1983; Григорьев, 1999). При этом понимание биологических механизмов влияния ЭМИ антропогенного происхождения на живые организмы на сегодняшний день остается недостаточным. Учеными доказано, что иммунная система обладает высокой чувствительностью к действию ЭМИ среди всех систем организма млекопитающих (Walleczek, 1992; Владимиров Ю.А., 1994; Klebanov et al., 1998; Артюхов и др., 2001;). В медицинскую практику прочно вошло применение низкоинтенсивных ЭМИ, при этом наиболее часто используются излучение крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ), излучение сверхвысоких частот (ЭМИ СВЧ) и низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) (Бецкий и др., 2000; Rojavin et al., 1998; Москвин и Буйлин, 2000). Однако механизм ответной реакции живой клетки, ткани и организма в целом, на различные дозы излучения, до сих пор остается недостаточно исследованным. Имеющиеся сведения о механизмах нетеплового воздействия электромагнитных волн на уровне организмов, клеток и молекулярных структур являются противоречивыми, что дает возможность лишь предполагать существование закономерностей биологических эффектов электромагнитных волн низкой интенсивности с малой энергией кванта. Недостаточно изученными в этом плане остаются эффекты малых доз ЭМИ

нетеплового уровня на состояние иммунной системы млекопитающих в нормальных условиях и при наличии патологии. Известно, что влиянию низкоинтенсивного электромагнитного излучения различной природы подвержена функциональная активность нейтрофилов и макрофагов, пролиферация и соотношение Т-клеток  $CD4^+/CD8^+$ . ЭМИ вызывает дегрануляцию тучных клеток кожи и активирует кератиноциты (Бецкий и Ильина, 1989; Запорожан и др., 1997; Szabo et al., 2001; Козель и Попов, 2000; Попов и др., 2001; Safronova et al., 2002). Это подчеркивает необходимость детальных и систематических исследований влияния ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ низкой интенсивности на функциональную активность иммунокомпетентных клеток животных, в частности, макрофагов, естественных киллерных клеток (ЕКК), В- и Т-лимфоцитов, осуществляющих эффекторные, регуляторные и надзорные функции, направленные на уничтожение чужеродных субстанций и поддержание целостности организма. Кроме того, несмотря на большое количество экспериментальных и теоретических данных, а также 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 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, закономерности воздействия низкоинтенсивных ЭМИ на разные составляющие гуморального и клеточного иммунитета, а также чувствительность различных звеньев иммунной системы в нормальном и при патологическом состояниях, представляют большой интерес для науки и практики.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы явилось выявление закономерностей и механизмов иммунного ответа млекопитающих на воздействие ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ в условиях крайне малой интенсивности излучения при различных физиологических состояниях организма.

В соответствии с выбранной целью, были поставлены следующие задачи:

1. Выявить значения интенсивности воздействия ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ *in vitro*, являющиеся пороговыми для чувствительности В- и Т-лимфоцитов, перитонеальных макрофагов и ЕКК.

2. Провести комплексное исследование эффектов, оказываемых однократным и длительным фракционированным облучением ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ низкой интенсивности на функциональную активность иммунокомпетентных клеток животных, находящихся в нормальном физиологическом состоянии,

3. Изучить зависимость эффектов ЭМИ от физиологического состояния организма с использованием в качестве модели зимнеящих животных в различных фазах годового цикла.

4. Провести исследование состояния иммунной системы в норме и при облучении ЭМИ в условиях применения диеты с повышенным содержанием антиоксидантов.

5. Выявить, каким закономерностям подчиняется ответ иммунокомпетентных клеток на действие ЭМИ низкой интенсивности в условиях длительного фракционированного облучения животных, используя модель патологических состояний (иммунный ответ на опухолевый рост и введение чужеродных белков).

6. Разработать гипотетический механизм активации сигнальных путей в клетках иммунной системы млекопитающих при воздействии низкоинтенсивных ЭМИ.

#### **Научная новизна.**

Впервые проведено комплексное исследование цитотоксической, пролиферативной и антителообразующей активности иммунокомпетентных клеток млекопитающих под

влиянием низкоинтенсивных электромагнитных излучений различной природы (ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ). Установлено, что электромагнитные излучения с разными несущими частотами в дозах излучения  $\sim 5 \times 10^{-2}$  Дж/см<sup>2</sup> активизируют клеточный иммунитет и угнетают его в дозах  $\sim 1,3 \times 10^{-1}$  Дж/см<sup>2</sup> *in vivo*. При воздействии *in vitro* дозы излучения на порядок ниже:  $\sim 6 \times 10^{-3}$  Дж/см<sup>2</sup> и  $\sim 7 \times 10^{-2}$  Дж/см<sup>2</sup> соответственно.

Впервые обнаружено значительное повышение продукции клетками иммунной системы стрессактивируемой протеинкиназы SAPK/JNK и белков теплового шока, относящихся к семейству БТШ70, в условиях облучения НИЛИ нетеплового уровня, что подтверждает стрессовый механизм ответа клеток на низкоинтенсивные неионизирующие излучения.

Установлено, что повышенная активность иммунокомпетентных клеток наблюдается в течение 24-96 часов после однократного облучения организма млекопитающих низкоинтенсивными электромагнитными излучениями, что свидетельствует об отдаленных эффектах их действия.

Показано, что пролонгированное (от 10 до 30 суток) фракционированное действие низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ индуцирует иммуносупрессию, снижая уровень антителообразования и противоопухолевую резистентность у мышей.

Установлена корректирующая зависимость чувствительности животных к облучению низкоинтенсивными ЭМИ от их физиологической активности.

Впервые обнаружено стимулирующее влияние диеты с антиоксидантами на биосинтез сиалированных цепей гликопротеинов, общий уровень содержания иммуноглобулинов в сыворотке крови в ходе развития иммунного ответа, секрецию ФНО лимфоцитами при действии ЭМИ СВЧ.

Разработан гипотетический механизм активации сигнальных путей в клетках иммунной системы млекопитающих при воздействии низкоинтенсивных ЭМИ, описывающий стрессовый механизм ответа клеток на излучения.

**Теоретическая и практическая ценность.** Полученные в данной работе сведения о влиянии *in vitro* и *in vivo* низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ на функциональную активность клеток иммунной системы являются важными при понимании закономерностей и механизмов, по которым взаимодействуют электромагнитное излучение и биологические объекты на клеточном уровне. Полученные в настоящей работе данные включены в курс лекций по дисциплине «Биофизика» для студентов специальности «Биоинженерия и биоинформатика» в ФГБОУ ВПО «ВГУИТ». Практический интерес обнаруженных эффектов воздействия ЭМИ низкой интенсивности обусловлен возможностью их использования при выработке новых терапевтических методов применения электромагнитных волн в медицине. Помимо того, данные, которые были получены при использовании крайне малых доз облучения, способны послужить для научного обоснования санитарных норм при решении проблемы электромагнитной безопасности населения.

**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» (Санкт-Петербург, 2004, 2005); конференции «Фундаментальные науки - медицине», (Москва, 2007); «8<sup>th</sup> John Humphrey advanced summer program in immunology» (Moscow, 2007); 8 - 14 Пущинских международных школах-конференциях молодых ученых «Биология наука 21 века» (Пушино, 2004 - 2012); XV международной конференции: «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Украина, Крым, 2007); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12 (Пушино, 2012); Международной научно-методической конференции

«Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано **36** работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе **16** в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК 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.

**Работа выполнялась в рамках проекта № 2295 государственного задания Министерства образования и науки РФ**

**Объём и структура диссертации** Диссертация изложена на 264 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, методической части, 5 разделов собственных исследований, заключения и выводов; содержит 58 рисунков, 10 таблиц. Библиографический указатель включает 572 источника, из которых 175 отечественных, иностранных 397.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Направленность эффектов ЭМИ различной природы низкой интенсивности (ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ) на цитотоксическую, пролиферативную и антителообразующую активности иммунокомпетентных клеток млекопитающих в диапазоне сверхмалых доз зависит от длительности воздействия.

2. Статистически значимое повышение продукции клетками иммунитета стрессактивируемой протеинкиназы SAPK/JNK и белков теплового шока, относящихся к семейству БТШ70, в условиях облучения НИЛИ нетеплового уровня подтверждает стрессовый механизм ответа клеток на низкоинтенсивные неионизирующие излучения.

3. Наблюдаемое в течение 24-96 часов после однократного облучения организма млекопитающих ЭМИ низкой интенсивности повышение активности иммунокомпетентных



клеток свидетельствует об отдаленных эффектах действия излучений.

4. Зависимость чувствительности животных к облучению низкоинтенсивными ЭМИ от их физиологической активности.

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

6. Гипотетический механизм активации сигнальных путей в клетках иммунной системы млекопитающих при воздействии низкоинтенсивных ЭМИ.

## 2. Основное содержание работы

### Материалы и методы

**Источники излучений.** Источником ЭМИ СВЧ служил генератор качающейся частоты Я2Р – 7612 (Россия) со следующими характеристиками: диапазон частот 8,15 – 18 ГГц, частота перестройки 1 Гц, режим качания. С целью регулировки выходной мощности было проведено оснащение генератора аттенюаторами. Величина средней плотности потока энергии – 1 мкВт/см<sup>2</sup>. Для проведения облучения использовалась камера из оргстекла с размерами (25×25×40 см), установленная так, что расстояние между объектом и основанием рупора антенны составляло 80 см. Применялась антенна “П6-23А”, апертура которой равна 25×34 см. В качестве источника ЭМИ КВЧ использовали генератор Г4-141 (Россия) со следующими характеристиками: несущая частота 42,2 ГГц, амплитудная модуляция (меандр) 10 Гц, средняя плотность энергии менее 1 мкВт/см<sup>2</sup>. Для облучения камеру с животными устанавливали на удалении 40 см от рупора антенны с апертурой (35×45 мм). Передвижение мышей по камере не было ничем ограничено, в течение всего времени облучения они получали пищу и воду *ad lib*. Гелий-неоновый лазер ЛГН – 111 служил источником НИЛИ ( $\lambda = 632,8$  нм). Значение плотности мощности падающего излучения было равно 0,2 мВт/см<sup>2</sup>. Проводили облучение *in vivo* разных участков кожи, с которых предварительно была выбрита шерсть, животных через световод. Для проведения облучения

НИЛИ предварительно проводили фиксацию тела животного и экранирование с помощью плотной белой бумаги, в которой имелось с отверстие ( $\varnothing = 1$  см) в экспонируемой зоне. Выделенные иммунокомпетентные клетки (перитонеальные макрофаги, Т- и В-лимфоциты, ЕКК) облучали в питательной среде RPMI-1640 (с 10% ЭТС) в чашках Петри (d 50, h 10 мм) и культуральных флаконах (10 мл, Corning, США).

**Животные.** Использовали мышей-самцов аутбредного стока NMRI, весом 20-25 г. Также в исследованиях были использованы зимнеящие якутские длиннохвостые суслики *Citellus Undulatus Pallas* как самцов, так и самок, вес которых составлял 300-450 г. Животные были отловлены в августе и содержались в виварии в стандартных условиях; в зимний период температура содержания составляла 4°C.

**Модель опухолевого роста.** Развитие солидной опухоли инициировали подкожным введением в область задней конечности  $2 \times 10^5$  клеток асцитной карциномы Эрлиха в 200 мкл физиологического раствора (0,87 % NaCl). Средняя продолжительность жизни животных после инъекции составляла 55 суток.

**Модель иммунного ответа.** Животных иммунизировали внутрибрюшинно аффинно-очищенной карбоангидразой из эритроцитов быка (Sigma, США), по 50 мкг белка с полным (первая иммунизация) и неполным (вторая иммунизация - через 14 суток) адьювантом Фрейнда (Sigma, США). Для измерения уровня продукции антител использовали свежеприготовленные образцы раствора плазмы крови животных в буфере PBS (pH 7,2).

**Диета с антиоксидантами.** Водорастворимые антиоксиданты (фукоза и манноза) были растворены в воде в концентрациях, обеспечивающих ежедневное потребление указанных доз (40 и 80 мг/кг/сутки). Раствор был предложен животным опытных групп вместо воды за 7 дней до первичной иммунизации и далее в течение всего эксперимента. Мыши контрольной группы получали воду. Жирорастворимые антиоксиданты в указанных дозах ( $\beta$ -каротин - 1 мг/кг/сутки,  $\alpha$ -токоферол - 1 мг/кг/сутки, убихинон-Q<sub>9</sub>- 4 мг/кг/сутки на 1 животное) замешивали в творог и порционно скармливали

животным. Мыши контрольной группы получали творог без добавок в таких же количествах. На всем протяжении эксперименты вода и пища предоставлялась животным *ad lib*.

**Иммунокомпетентные клетки.** Все операции по выделению клеток проводили на льду в стерильных условиях. Спленоциты выделяли из гомогената селезенки путем избирательного гемолиза с использованием изотонического раствора хлористого аммония. Фракции Т- и В-лимфоцитов получали методом положительной селекции на пластиковых чашках Петри, нагруженных кроличьими аффинно-очищенными антителами к IgG мыши (200 мкг/мл). Макрофаги выделяли методом перитонеального смыва с последующим разделением клеток избирательной адгезией к полистиролу, по описанному ранее методу. Выделенные клетки инкубировали в питательных средах DMEM, RPMI-1640, с добавлением 2мМ L-глутамина и 10 % ЭТС (Nuclease, США) при 37 °С, в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

**Измерение продукции цитокинов.** Концентрацию интерлейкинов (ИЛ) ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИФН-γ и фактора некроза опухоли 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 АВТС, измерение оптической плотности проводили при 405 нм на многолучевом спектрофотометре для 96-луночных планшет (Titertek Multiscan MCC/340, Flow Laboratories, Финляндия). Концентрацию ФНО-α параллельно оценивали методом цитотоксического теста с использованием ФНО-чувствительной линии клеток L-929.

**Измерение продукции NO** в сыворотке крови проводили по содержанию пероксинитрита, при помощи реактива Грисса.

**Измерение продукции БТШ70 и БТШ90, SAPK/JNK и NF-κB** в клеточных лизатах осуществляли методом иммуноблоттинга. Результаты детектировали с помощью системы реагентов ECL (GE Healthcare, Великобритания) и регистрировали на фотопленке (Kodak, США). Анализ полос флуоресценции проводили с использованием компьютерной программы QARA (ИТЭБ РАН, Пушкино).

**Измерение антиоксидантной активности** маннозы и фукозы проводили на анализаторе антиоксидантной активности «Цвет Яюза-01-АА» (Россия). В качестве стандарта использовали кверцетин.

**Измерение скорости пролиферации клеток** проводили по уровню включения в ДНК пролиферирующих клеток метил- $[^3\text{H}]$ -тимидина (2 мкКи/мл, удельная активность = 210 ГБк/мМ). Для измерения радиоактивности включенной метки применяли жидкостной сцинтилляционный счетчик “Beckman LS Analyzer”.

**Измерение цитотоксической активности ЕКК** осуществляли методом цитотоксического теста. Мишенями для ЕКК служили клетки миелолейкоза человека K562, предварительно меченные добавлением в питательную среду 10 мкКи/мл  $3[^3\text{H}]$ -уридина (с удельной активностью 0,85 пБк/моль). Для измерения радиоактивности клеток-мишеней применяли счетчик толуольного сцинтиллятора “Beckman LS Analyzer”.

### Результаты и обсуждение

**Действие ЭМИ СВЧ, ЭМИ КВЧ и НИЛИ на иммунокомпетентные клетки *in vitro*.** Для выяснения чувствительности иммунокомпетентных клеток к различным видам низкоинтенсивных ЭМИ эксперименты проводили на изолированных Т- и В-лимфоцитах, перитонеальных макрофагах, ЕК клетках, подвергая их воздействию ЭМИ в разных дозах *in vitro*. В качестве одного из показателей активности клеток измеряли продукцию некоторых цитокинов: ИЛ-2, ИЛ-3 и ФНО- $\alpha$ . Поскольку ФНО является уникальной молекулой, которая регулирует синтез почти всех известных цитокинов, уровень продукции ФНО можно считать показателем активности иммунокомпетентных клеток. При облучении ЭМИ КВЧ (1 мкВт/см<sup>2</sup>) 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 (рисунок 1).

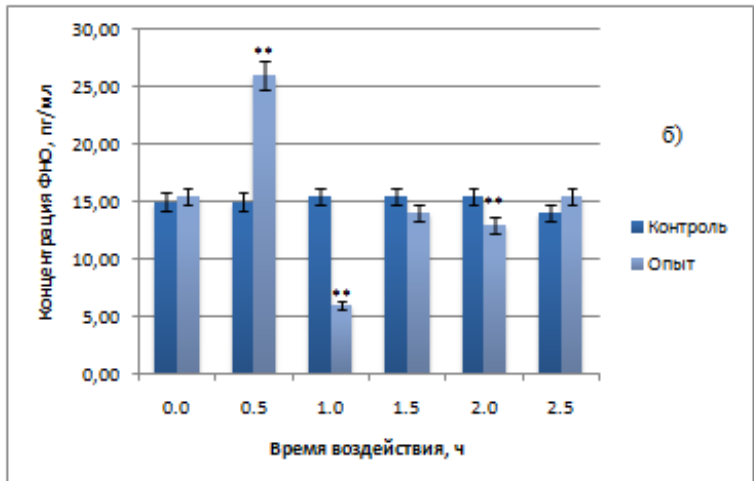
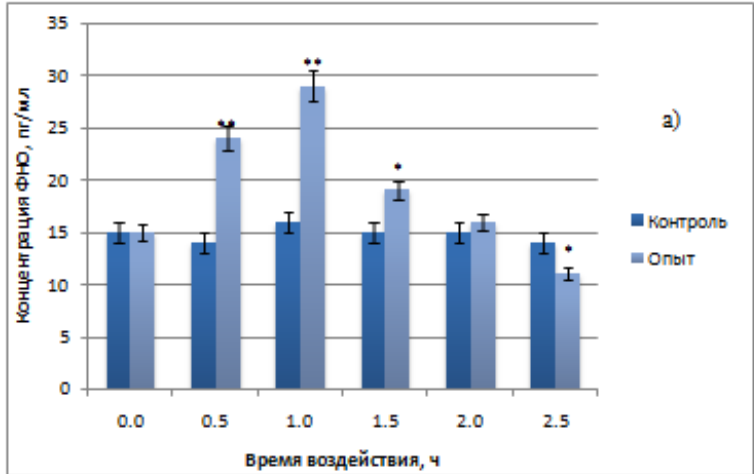


Рисунок 1 - Продукция ФНО-α спленоцитами мышей при действии ЭМИ КВЧ с частотой 40ГГц (а) и 42,2 ГГц (б)  
Достоверное отличие от контроля \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$

**При облучении перитонеальных макрофагов ЭМИ КВЧ** наблюдали 35-40% активацию продукции ФНО- $\alpha$  при воздействии  $>1$  ч (рисунок 2).

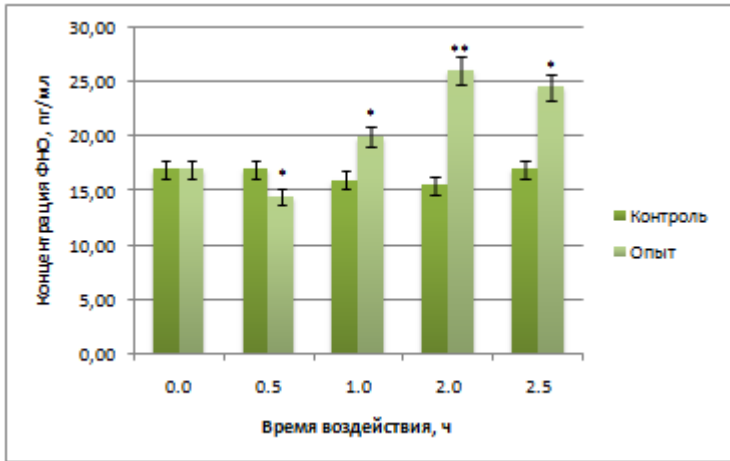


Рисунок 2 - Продукция ФНО- $\alpha$  макрофагами мышей при действии ЭМИ КВЧ с частотой 40ГГц  
 Достоверное отличие от контроля \*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$

**Облучение иммунокомпетентных клеток гибернантов *in vitro*.** Для выяснения роли функционального состояния клеток в их чувствительности к действию ЭМИ использовали клетки зимнеящих животных на разных стадиях годового цикла. Сохранность многих функций гематопозитической, эндокринной и центральной нервной (ЦНС) систем при глубоком охлаждении в природных условиях является свидетельством существования особых регуляторных механизмов, определяющих структурно-функциональную стабильность тканей зимнеящих. Эти свойства гибернантов дают основание считать, что они являются природной биологической моделью, которая удобна при изучении функциональной активности клеток и, как частный случай, при исследовании свойств системы клеточного иммунитета. Результаты показали, что эффект зависит от физиологического состояния организма животных, из которых

были получены клетки. Клетки, выделенные из животных, находящихся в состоянии глубокой гибернации, температура тела которых составляла 4 °С, не реагировали на СВЧ излучение.

Таблица 1

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

Концент рация ФНО, пг/мл	Время года							
	Зимний период (температура тела)			Март	Апрель	Май	Июнь	Октябрь
	4°С	26°С	34°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 ЭМИКВЧ (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,  $p < 0,05$

***Динамика развития ответа организма на однократное облучение низкоинтенсивными ЭМИ.*** На следующем этапе изучали эффекты ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ *in vivo* при однократной экспозиции животных. Одной из поставленных задач в этой серии экспериментов было изучение пролонгированных эффектов низкоинтенсивных электромагнитных излучений.

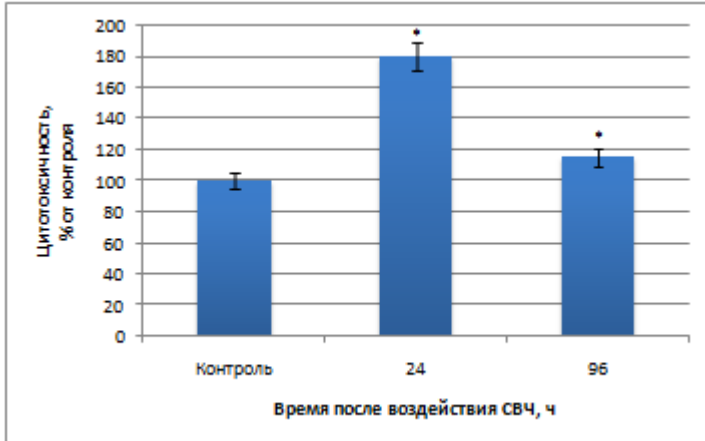


Рисунок 3 - Цитотоксическая активность ЕКК селезенки мышей в отдаленные периоды после облучения при воздействии *in vivo*  
 Достоверное отличие от контроля \*  $p < 0,05$

На рисунке 3 представлены изменения цитотоксической активности естественных киллерных клеток селезенки в отдаленные периоды после однократного воздействия ЭМИ СВЧ и ЭМИ КВЧ. Данные свидетельствуют о том, что ответ клеток на ЭМИ СВЧ сохранялся через 24 и даже через 96 часов. При том что через 24 часа после облучения ЭМИ КВЧ этот показатель не отличался от нормы (данные не представлены) Изучая изменения продукции фактора некроза опухолей спленоцитами под действием НИЛИ, мы обнаружили, что эффект облучения наблюдается через 12 часов и отсутствует в более поздние периоды после воздействия. Также нами было показано, что нормализация продукции ИЛ-2 спленоцитами происходит только к 48 часам после облучения зоны тимуса, но остается повышенной при облучении задней конечности животного. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными в отношении продукции БТШ70 спленоцитами (Черенков, 2006). Таким образом, было обнаружено, что последствия воздействия низкоинтенсивного СВЧ, КВЧ и НИЛИ на



иммунную систему могут быть заметны в организме в течение длительного времени: до четырех суток с момента воздействия.

**Влияние длительного (хронического) облучения животных низкоинтенсивными ЭМИ на систему клеточного иммунитета.** Следующим этапом наших исследований было изучение влияния длительного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения на иммунную систему животных. В этих экспериментах мы варьировали время воздействия ЭМИ СВЧ от 5 до 72 часов и показали, что цитотоксическая активность ЕКК возрастает на 30-40% при облучении в течение 24 часов и более (рисунок 4).

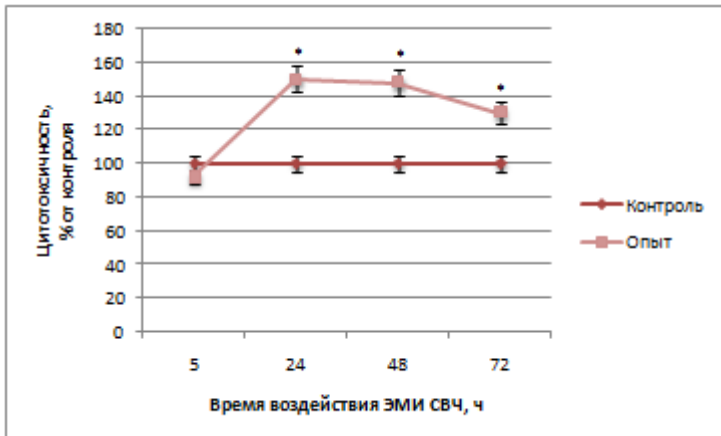


Рисунок 4 – Цитотоксическая активность ЕКК селезенки мышей при длительном воздействии ЭМИ СВЧ *in vivo*  
Достоверное отличие от контроля \*  $p < 0,05$

При исследованиях *in vivo* хронического действия НИЛИ использовали следующую схему облучения: воздействовали в течение 60 секунд на различные участки тела животного (область тимуса или задней лапы), повторяя облучение каждые 48 часов в течение 30 суток. Показатели состояния иммунной системы измеряли на 10-е 20-е и 30-е сутки с момента начала облучения.

Ключевым показателем состояния иммунного статуса организма являются изменения, происходящие со структурой лимфоидной ткани под действием внешних факторов. Нами было показано, что непрерывное длительное воздействие ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц) снижает на 55% количество макрофагов в перитонеальной полости, однако к 72 часам эксперимента этот показатель нормализуется, что свидетельствует об адаптации иммунной системы животных к длительному действию ЭМИ КВЧ. Количество спленоцитов изменялось аналогичным образом. Интересно, что при изменении частоты облучения (40 ГГц) не наблюдали изменений количества иммунокомпетентных клеток в сравнении с контрольной группой животных. Численность популяции перитонеальных макрофагов при действии НИЛИ на область тимуса была снижена в среднем на 45% на 10-й, 20-й и 30-й дни эксперимента. При действии НИЛИ на область задней лапы достоверных отличий количества макрофагов в перитонеальной полости не наблюдали (данные не представлены).

***Продукция ФНО спленоцитами.*** Разнонаправленные колебания продукции ФНО спленоцитами с последующей тенденцией к нормализации наблюдали при воздействии ЭМИ КВЧ, при сдвиге частоты излучения характер этих колебаний принципиально не изменялся (данные не показаны).

***Активность ЕКК при хроническом облучении НИЛИ*** возрастала до 120-145% на начальных этапах эксперимента, однако затем происходило снижение этого показателя, особенно выраженное при хроническом облучении (рисунок 5). Такая динамика изменения активности ЕКК свидетельствует о нарушении иммунного статуса организма при длительном фракционированном воздействии.



Рисунок 5—Влияние действия НИЛИ *in vivo* на цитотоксическую активность ЕКК спленцитов мышей

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

***Влияние низкоинтенсивных ЭМИ на развитие иммунного ответа.*** В связи с тем, что эффекты воздействия ЭМИ могут в значительной степени отличаться в зависимости от начального состояния облучаемого организма, мы провели серию экспериментов с использованием моделей патологических состояний. Одной из них стала модель развития иммунного ответа на введение чужеродного белка (иммунизация). Исследовали изменение скорости пролиферации Т-лимфоцитов и уровня образования антител при развитии первичного (7 суток) и вторичного (14 суток) иммунного ответа. Уровень пролиферации Т-клеток под действием ЭМИ СВЧ возрастал и по величине был сравним с эффектом от внутрибрюшинной инъекции конканавалина А (рисунок 6). При одновременной антигенной стимуляции и облучении скорость пролиферации Т-лимфоцитов возрастала, т.е. наблюдался аддитивный эффект этих двух факторов. Изучение эффектов воздействия ЭМИ КВЧ на иммунизированных животных вели с использованием режима фракционированного облучения, что является наиболее близким к применению в клинической практике миллиметровых (ММ)

волн. Животных ежедневно подвергали кратковременному облучению на протяжении 30-ти дней в утреннее время (с 8 ч до 9 ч 30 мин). Уровень содержания антител к чужеродному белку в сыворотке крови не изменялся под воздействием ЭМИ СВЧ при развитии первичного иммунного ответа (данные не представлены). Однако после повторной иммунизации наблюдали двукратное снижение продукции антител у облученных животных (рисунок 7). Эти данные свидетельствуют об угнетении процессов антителообразования при длительном действии ЭМИ СВЧ.

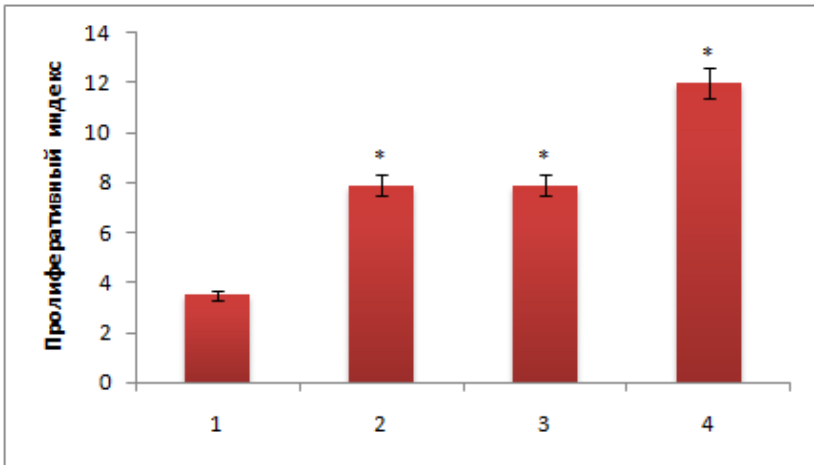


Рисунок 6 - Влияние низкоинтенсивных ЭМИ СВЧ на скорость пролиферации Т-лимфоцитов иммунизированных животных: 1 – контроль, 2 - воздействие ЭМИ СВЧ, 3 - иммунизация Кон А, 4 – иммунизация + ЭМИ СВЧ (5 часов)  
Достоверное отличие от контроля \*  $p < 0,05$



Рисунок 7 - Влияние низкоинтенсивных ЭМИ КВЧ (42,2 ГГц) на уровень антителообразования иммунизированных животных при развитии вторичного иммунного ответа

***Влияние низкоинтенсивных ЭМИ на иммунную систему при опухолевом росте.*** Одной из наиболее тяжелых патологий, которая может встретиться у млекопитающих, является канцерогенез. Состояние иммунной системы организма во многом определяет, каким будет клинический прогноз при раковом заболевании. 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 медиаторов. Однако на поздних стадиях развития опухоли наблюдается снижение защитного потенциала организма, выражающееся в уменьшении продукции противоопухолевых цитокинов (ФНО) и белков теплового шока. Данные измерения показателей активности иммунной системы при развитии солидной формы карциномы эрлиха у мышей представлены в таблице 2.

Таблица 2  
**Состояние иммунной системы мышей в процессе опухолевого роста**

Показатель	Объект	Время после инъекции клеток АКЭ, сутки		
		10	20	30
Количество ИКК, % от контроля	Мф	120	<b>210*</b>	<b>195*</b>
	Спл	110	<b>125*</b>	120
Концентрация ФНО, % от контроля	Мф	<b>115*</b>	<b>125*</b>	102
	Спл	<b>130*</b>	<b>178*</b>	<b>143*</b>
	Сыворотка крови	<b>159*</b>	<b>155*</b>	<b>115*</b>
Концентрация NO, мкМ/мл	Мф	27	24	82
Цитотоксическая активность, % от контроля	ЕКК	120	<b>213*</b>	<b>225*</b>
Экспрессия БПШ70,%	Спл	100	192	118
Экспрессия БПШ90,%	Спл	100	190	49

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

**Облучение опухоленосителей.** На данный момент обнаруженные иммуномодулирующие свойства ЭМИ, выступающего как основное или вспомогательное средство лечения раковых

заболеваний, обуславливают предложение использования низкоинтенсивного электромагнитного излучения. В литературе имеются доказательства успешного применения ЭМИ при таких методах лечения опухолей как фотодинамическая терапия и адоптивная иммунотерапия. Несмотря на вышесказанное, до настоящего времени не обоснован метод выбора индивидуальных параметров воздействия при проведении электромагнитной терапии. Целью следующего этапа исследований стало изучение влияния, которое оказывает действие низкоинтенсивного ЭМИ *in vivo* на животных с солидной формой карциномы Эрлиха. Данные, приведенные выше, подтверждают факт значительного (до 210 % от контроля) накопления клеток в лимфоидных тканях селезенки мышей при развитии опухоли. На этом фоне динамика изменения числа лимфоцитов селезенки в течение 30-ти дней воздействия на опухоленосителей фракционированного воздействия амплитудно-модулированного ЭМИ КВЧ не изменялась. В отличие от ЭМИ КВЧ, при использовании длительного фракционированного облучения НИЛИ наблюдали заметное уменьшение популяции иммунокомпетентных клеток. Так, количество макрофагов в перитонеальной полости животных-опухоленосителей было снижено как при облучении тимуса, так и при воздействии на область опухоли (данные не представлены). 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. В связи с этим, нами была изучена динамика изменения цитотоксической активности ЕКК опухоленосителей при действии низкоинтенсивных ЭМИ. Было обнаружено, что активность ЕКК снижается к 30-му дню фракционированного облучения опухоленосителей ЭМИ КВЧ. Аналогичный эффект наблюдали при длительном фракционированном воздействии НИЛИ на опухоленосителей. Активность ЕКК была значительно снижена уже на 10-й день эксперимента и лишь частично восстанавливалась к 30-му дню облучения. При этом характер ответа ЕКК на облучение не зависел от облучаемого участка тела

животного (рисунок 8). Результаты исследований свидетельствуют о снижении защитного потенциала клеток иммунной системы. Это подтверждает обнаруженное нами ранее снижение продукции ФНО как макрофагами, так и лимфоцитами на 30-45% от контроля (Черенков, 2006). Снижение количества перитонеальных макрофагов и спленоцитов также является показателем истощения иммунной системы под воздействием ЭМИ при онкозаболеваниях. Анализ полученных данных позволяет сделать предположение, что хроническое воздействие низкоинтенсивным ЭМИ при развитии новообразования будет являться неблагоприятным фактором, ослабляющим способность организма сопротивляться опухолевому росту, и может осложнять течение этой болезни.

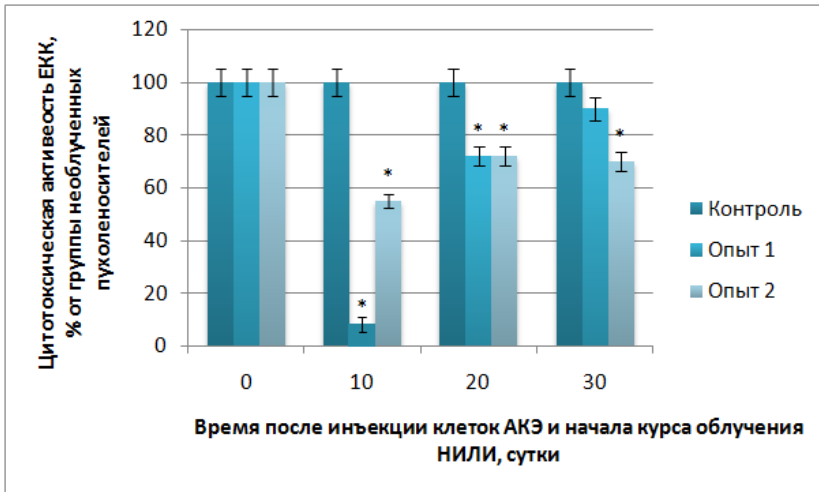


Рисунок 8 - Влияние НИЛИ на уровень цитотоксичности ЕКК селезенки опухоленосителей: контроль - необлученные опухоленосители, опыт 1 - облучение проекции тимуса, опыт 2- облучение задней лапы

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



Для проверки данной гипотезы нами был проведен ряд физиологических экспериментов, направленных на изучение продолжительности жизни животных-опухоленосителей, которых подвергали длительному фракционированному облучению низкоинтенсивными ЭМИ разных диапазонов. Кроме того, в процессе экспериментов нами было проведено измерение скорости роста солидной опухоли у облученных и контрольных животных. При использовании ЭМИ КВЧ достоверных отличий продолжительности жизни контрольных и опытных животных выявлено не было (данные не представлены). Однако при использовании НИЛИ. Была обнаружена тенденция к уменьшению средней продолжительности жизни животных при облучении и статистически достоверное увеличение скорости роста новообразования у животных.

***Стрессовый характер действия низкоинтенсивных ЭМИ.*** Несмотря на наличие широчайшего спектра биологических эффектов ЭМИ низкой интенсивности, затрагивающих различные уровни организации живой материи, вопрос о механизме их действия остается открытым. Исследования, проведенные в данной работе, указывают на стрессовый характер ответа клетки и организма на низкоинтенсивное электромагнитное излучение. Основанием для такого предположения послужило обнаружение значительного дозозависимого повышения продукции белков теплового шока семейства БТШ70 в клетках иммунной системы мышей при действии низкоинтенсивных ЭМИ. Кроме этого, нами было обнаружено повышение продукции некоторых цитокинов при действии излучений низкой интенсивности, а также определены дозы излучений, оказывающие максимальный эффект. 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. Как

было показано в работах Мозер с соавторами, основным антагонистом SAPK/JNK является индуцибельный БТШ70, защищающий клетку от стресс-индуцированного апоптоза. Таким образом, весьма вероятно, что обнаруженное нами повышение уровня продукции индуцибельного БТШ70 свидетельствует о развитии ответа клеток иммунной системы на низкоинтенсивные ЭМИ по пути, опосредованному стресс-активируемой протеинкиназой SAPK/JNK (рисунок 9). Отметим, что стимулирующий эффект ЭМИ СВЧ на продукцию Phospho-SAPK/JNK оказался гораздо более значительным, чем эффект, производимый НИЛИ, и составил до 600% от контроля.

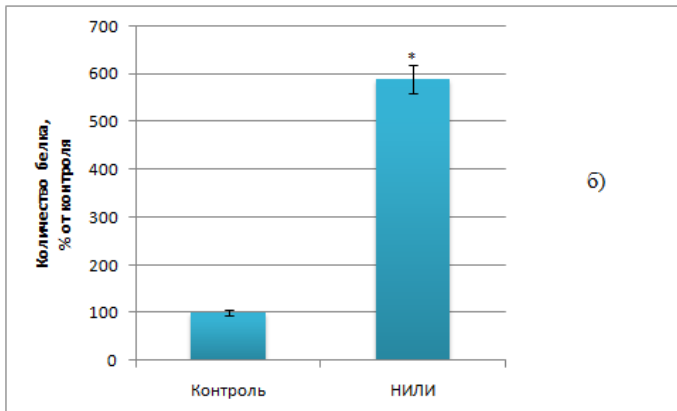
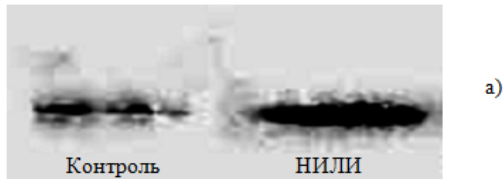


Рисунок 9 - Содержание Phospho-SAPK/JNK в спленocyтaх мышей под действием неионизирующих излучений низкой интенсивности: а) - фотографии иммуноблоттинга; б) - данные денситометрии белковых полос

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

Представленные в данной работе исследования позволяют заключить, что ряд биологических эффектов ЭМИ низкой интенсивности на клеточном уровне, возможно, опосредуются с помощью активации в клетках SAPK/JNK сигнального пути. Дополнительным аргументом в пользу данного утверждения является снижение количества иммунокомпетентных клеток при длительном хроническом облучении, возможно, это также является следствием активации SAPK/JNK и, соответственно, усиления апоптотических процессов в клетках. 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. 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>), активаторов протеинкиназы C, ультрафиолетового облучения. 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. 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 и ЭМИ СВЧ. Облучение спленцитов НИЛИ в течение 1 мин (доза падающего света составляла  $12 \times 10^{-3}$  Дж/см<sup>2</sup>)

приводило к значительному снижению количества NF-κB и IκB-α в клетках (рисунок 10).

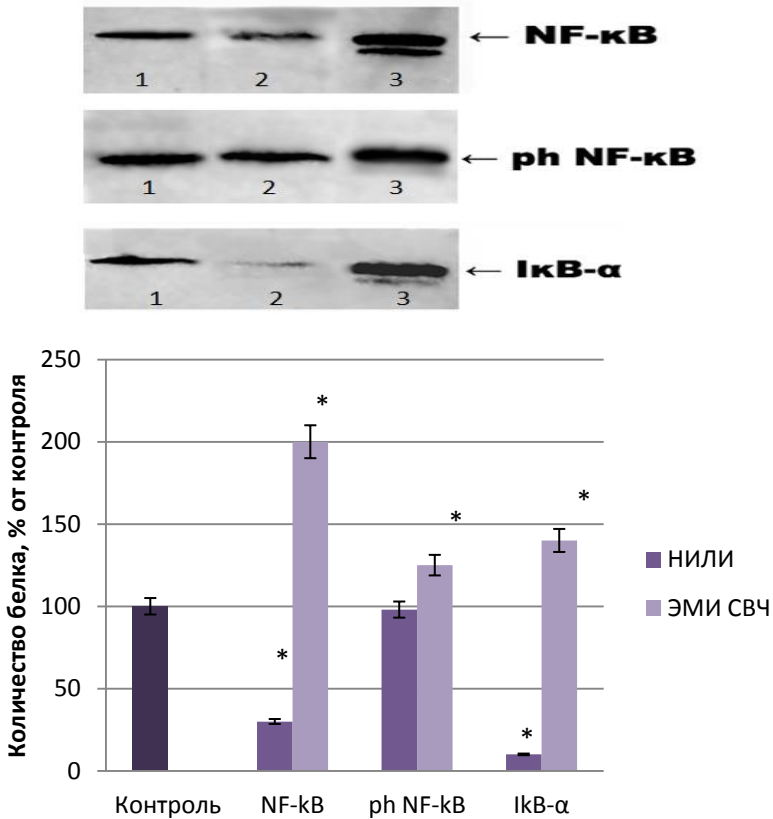


Рисунок 10 - Действие НИЛИ (633 нм, 200 мкВт/см<sup>2</sup>, 60 сек) и ЭМИ СВЧ (8,15-18 ГГц, 1 мкВт/см<sup>2</sup>, 60 мин) на количество NF-κB, фосфорилированной формы NF-κB и IκB-α в лимфоцитах селезенки

Представлены данные денситометрии, полученные с помощью программы Qara. Достоверное отличие от контроля \*  $p < 0,05$ . Вверху – фотография белковых полос, полученных после иммуноблота с антителами к NF-κB, фосфорилированной форме NF-κB и IκB-α

1 - контроль, 2 - НИЛИ, 3 - ЭМИ СВЧ.

При этом уровень фосфорилированного NF-κB практически не изменился. Таким образом, полученные результаты показывают, что в отличие от ЭМИ СВЧ при действии НИЛИ нетеплового уровня содержание в клетках ключевых компонентов изучаемого сигнального пути (NF-κB и IκB-α) снижается. Это, возможно, указывает на то, что в клетках не происходит активация NF-κB сигнального пути при воздействии малых доз низкоинтенсивного лазерного света, либо происходит ингибирование индуцибельным БТШ70, как было показано ранее. Ранее мы указывали на стрессовую реакцию клеток в случае действия сверхслабых электромагнитных волн, что проявлялось увеличением продукции NO и усилением экспрессии 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. В то же время индуцибельный БТШ70 подавляет действие NF-κB, препятствуя его активации и проникновению в ядро. Результаты нашего исследования также говорят о том, что белки, относящиеся к этому сигнальному пути, участвуют в формировании внутриклеточного ответа. Итак, полученные в настоящей работе результаты исследования механизма действия сверхслабых неионизирующих излучений на уровне белков сигнального каскада являются подтверждением правомерности более раннего заключения об индукции стрессового ответа клетки при воздействии амплитудно-модулированного ЭМИ СВЧ низкой интенсивности.

***Участие антиоксидантов в развитии иммунного ответа на низкоинтенсивные ЭМИ.*** Из ряда современных антиокислителей представляют интерес гидролизаты природных биополимеров – маннана и фукоидана, обладающие антиоксидантной активностью, которые могут быть использованы в качестве эффективных пищевых добавок. Природные биополимеры, основу которых составляют минорные сахара манноза и фукоза, а также их производные, широко используются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве. Показано, что фукоиданы и фукозосодержащие олигосахариды

обладают противовоспалительным, антикоагуляторным, противовирусным и апоптотическим действием. Маннаны и маннозосодержащие олигосахариды обладают иммуномодулирующим и гепатопротекторным действием. 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. Также зарубежными исследователями показана способность частично гидролизованных маннанов эффективно взаимодействовать с перекисью водорода и хлорноватистой кислотой. 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 Q<sub>9</sub>, митогенстимулированное включение меченного тимидина в Т-клетки было значительно увеличено (данные не показаны). 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. 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 (рисунок 13). При изучении влияния другого минорного углевода – маннозы, на структуру и синтез иммуноглобулинов обнаружены интересные

факты: так, в гидролизате образца от животных, получающих диету с маннозой, найдено 29 сиалированных гликопептидов с массами от 1000 до 5000 Да. Как было показано ранее, 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. 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.

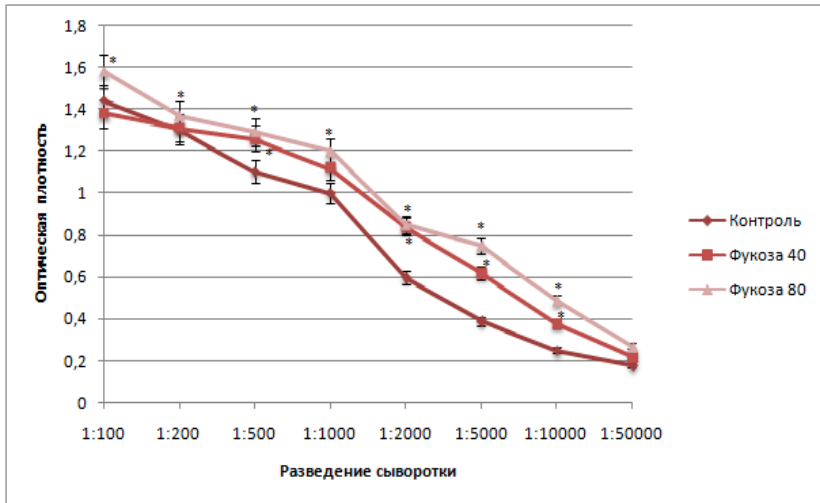


Рисунок 11 - Влияние диеты с фукозой в дозах 40 и 80 мг/кг/сутки на антителообразование при вторичном иммунном ответе у животных

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

С целью оценки динамики показателей состояния иммунной системы под влиянием антиоксидантов при облучении 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 пятичасовой экспозиции мышей ЭМИ СВЧ (8-18 ГГц; 1 мкВт/см<sup>2</sup>), наблюдали повышение продукции ФНО перитонеальными макрофагами и спленоцитами (таблица 3). Эффект повышенной продукции ФНО сохранялся в течение 72 часов с момента облучения. Диета с повышенным содержанием жирорастворимых антиоксидантов ( $\beta$ -каротина,  $\alpha$ -токоферола и убихинона Q<sub>9</sub>) способствовала повышению продукции ФНО, а также усилению стимулирующего эффекта ЭМИ СВЧ на поздних стадиях эксперимента. При этом диета, содержащая антиоксиданты, не влияла на пролиферативную активность Т-лимфоцитов селезенки в условиях облучения ЭМИ СВЧ (данные не представлены).

Эффект повышенной продукции ФНО сохранялся в течение 72 часов с момента облучения. Диета с повышенным содержанием жирорастворимых антиоксидантов ( $\beta$ -каротина,  $\alpha$ -токоферола и убихинона Q<sub>9</sub>) 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. При этом диета, содержащая антиоксиданты не влияла на пролиферативную активность Т-лимфоцитов селезенки в условиях облучения ЭМИ СВЧ. 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.



Таблица 3

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

Время после экспозиции, ч		6	24	48	72	
Концентрация ФНО, пкг/мл	Макрофаги	Контроль	12,8 ±0,9	13,1 ±1,1	12,8 ±0,8	13,2 ±1,2
		СВЧ	<b>24,6</b> ±2,0*	<b>43,5</b> ±3,6*	<b>32,8</b> ±0,8*	13,8 ±1,0
		АО	<b>24,0</b> ±2,3*	<b>25,3</b> ±2,6*	<b>22,8</b> ±1,9*	<b>24,5</b> ±1,5*
		АО+СВЧ	<b>24,2</b> ±1,9*	<b>32,8</b> ±2,6*	<b>25,6</b> ±1,9*	<b>35,2</b> ±3,4*
	Т-лимфоциты	Контроль	12,1 ±1,2	11,9 ±1,2	12,0 ±0,9	11,8 ±0,7
		СВЧ	<b>20,9</b> ±1,7*	<b>24,6</b> ±2,3*	<b>27,1</b> ±1,9*	<b>20,5</b> ±1,8*
		АО	<b>18,0</b> ±1,4*	<b>19,0</b> ±1,5*	<b>18,0</b> ±1,5*	<b>18,0</b> ±1,7*
		АО+СВЧ	<b>20,5</b> ±1,8*	<b>28,1</b> ±1,9*	<b>35,9</b> ±2,7*	<b>41,7</b> ±3,8*

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

**Механизм ответа клеток иммунной системы на низкоинтенсивные ЭМИ различной природы.** Для более полного анализа и обобщения полученных данных нами было рассмотрено действие низкоинтенсивных ЭМИ в зависимости от суммарной энергии падающего излучения, приходящейся на единицу площади облучаемого объекта. При этом были выделены дозы облучения, вызывающие активацию и угнетение системы клеточного иммунитета. Результаты представлены в таблице 3. Анализируя эти данные, можно сделать вывод о том, что дозы падающего излучения, вызывающие сходные эффекты *in vitro*, в основном, являются величинами одного порядка, независимо от физических параметров исследованных излучений. То же самое можно сказать и о действии низкоинтенсивных ЭМИ *in vivo*. Если предположить, что действие

данных типов излучений на клетку носит неспецифический характер, можно сформулировать общие правила действия низкоинтенсивных ЭМИ на иммунную систему (таблица 4):

1. Для активации системы клеточного иммунитета *in vivo* достаточно воздействие в дозах  $\sim 5 \times 10^{-2}$  Дж/см<sup>2</sup>, а для угнетения  $\sim 1,3 \times 10^{-1}$  Дж/см<sup>2</sup> падающего излучения.

2. При воздействии *in vitro* эти цифры на порядок меньше:  $\sim 6 \times 10^{-3}$  Дж/см<sup>2</sup> и  $\sim 7 \times 10^{-2}$  Дж/см<sup>2</sup> соответственно.

Следует отметить, что эти выводы носят приблизительный характер, поскольку они получены на основании ограниченного диапазона использованных параметров неионизирующих излучений крайне малой мощности. Тем не менее, даже ограниченное количество данных позволяет увидеть вполне определенную тенденцию.

На основании полученных данных можно составить примерную схему активации различных сигнальных путей в клетке под действием низкоинтенсивных неионизирующих ЭМИ (рисунок 14). 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 белков с нарушенной третичной структурой, приводит к тримеризации факторов теплового шока (HSF), при этом могут образовываться как гомо-, так и гетеротримеры. 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. 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.

Таблица 4  
**Действие различных доз низкоинтенсивных ЭМИ на систему клеточного иммунитета мышей**

СУММАРНАЯ ЭНЕРГИЯ ПАДАЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ, Дж/см <sup>2</sup>			ЭФФЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ НА СИСТЕМУ ИММУНИТЕТА
ЭМИ СВЧ	ЭМИ КВЧ	НИЛИ	
<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Иммунокомпетентные клетки: МФ, ЕКК, Т-лф, В-лф</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Синтез активных метаболитов: ФНОα, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИФНγ, NO</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Ускорение пролиферации ЛФ, повышение цитотоксичности ЕКК, активация МФ</div>
<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	
0,0036	0,036	0,01	<div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Снижение синтеза активных метаболитов, снижение активности клеток, усиление синтеза БТШ70, активация SAPK/JNK</div> <div style="text-align: center;">↓</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Иммуносупрессия</div>
0,086	0,0324	0,036	
0,090	0,072	0,036	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Иммуносупрессия</div>
> 0,1	0,132	0,120	

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. Известно также, что БТШ70 взаимодействует с комплексом киназ ИКК, вызывающим освобождение NFκB и его переход в ядро, и тем самым, препятствуют активации SAPK/JNK. 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. 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 того, 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 новой концепции электромагнитной безопасности.

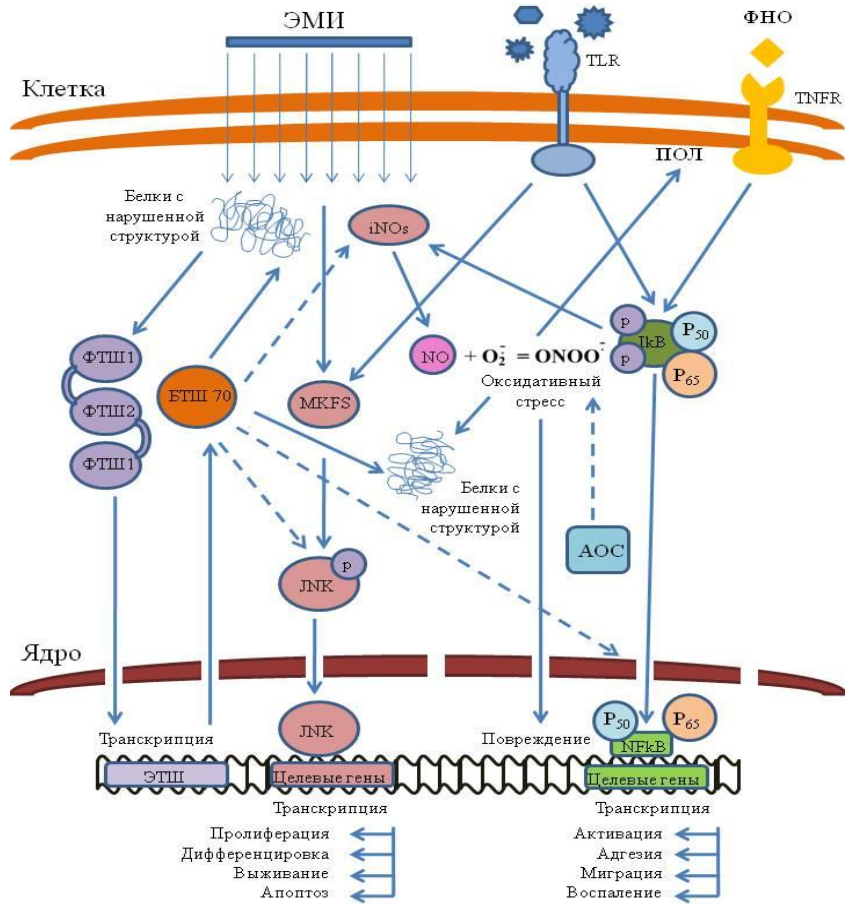


Рисунок 12 - Гипотетический механизм реализации клеточного ответа на низкоинтенсивные ЭМИ: TLR - Толл-подобный рецептор; TNFR - рецептор для ФНО; iNOs – индуцибельная NO-синтаза; ФТШ – фактор теплового шока; ЭТШ – элемент теплового шока; ПОЛ – перекисное окисление липидов; АОС – антиоксидантные системы.

### 3. Выводы

1. ЭМИ КВЧ, ЭМИ СВЧ и НИЛИ в дозах более  $0.0036 \text{ Дж/см}^2$  индуцируют повышение продукции цитокинов (ИФН- $\gamma$ ; интерлейкинов 2, 3, 6; ФНО- $\alpha$ ), 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 сialiрированных 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. Разработан гипотетический механизм активации сигнальных путей (БТШ, NO, NFκB, SAPK/JNK и др.) в клетках иммунной системы при воздействии низкоинтенсивных ЭМИ и описывающий стрессовый характер клеточного ответа на облучение.

#### **4. Список работ опубликованных по теме диссертации**

##### **Статьи:**

1 Черенков Д.А., Хренов М.О., Глушкова О.В., Лунин С.М., Новоселова Т.В., Лысенко Е.А., Парфенюк С.Б., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Роль протеинкиназы SAPK/JNK в ответах клетки на воздействие низкоинтенсивных неионизирующих излучений // Биофизика. – 2009. – Т. 54. - № 2. – С. 256-259. – 0,50 п.л.

2 Новоселова Т.В., Черенков Д.А., Хренов М.О., Глушкова О.В., Лунин С.М., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Влияние гелданамицина на экспрессию сигнальных белков и белков теплового шока в нормальных лимфоцитах мышей // Цитология. – 2008. – Т. 50. - № 7. – С. 629-636. – 1,00 п.л.

3 Новоселова Е.Г., Хренов М.О., Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Лысенко Е.А., Фесенко Е.Е. Участие рецептора TLR4 в формировании стрессового ответа лимфоцитов // Биофизика. – 2008. - Т. 53. - № 3. – С. 457-461. – 0,63 п.л.

4 Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Хренов М.О., Черенков Д.А., Лунин С.М., Новоселова Т.В., Чудновский В.М., Юсупов В.И., Фесенко Е.Е. Защитный эффект низкоинтенсивного лазерного излучения в условиях острого токсического стресса // Биофизика. – 2007. - Т. 52. – № 1. – С. 137-140. – 0,25 п.л.

5 Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Хренов М.О., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Черенков Д.А., Фесенко Е.Е. Гелданамицин снижает уровень стрессового ответа, индуцированного низкоинтенсивным лазерным излучением //

Доклады Академии Наук. – 2007. – Т. 413. – № 4. – С. 564-567. – 0,25 п.л.

6 Хренов М.О., Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Парфенюк С.Б., Лысенко Е.А., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е. Роль транскрипционных факторов в ответе лимфоцитов мышей на действие низкоинтенсивного электромагнитного и лазерного излучений. // Биофизика. – 2007. – Т. 52. – №5. – С. 888-892. – 0,63 п.л.

7 Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Черенков Д.А., Парфенюк С.Б., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Хренов М.О., Гужова И.В., Маргулис Б.А., Фесенко Е.Е. Продукция белков теплового шока и оксида азота при токсическом стрессе // Биохимия. – 2006. – Т. 4. – С. 232-237. – 0,75 п.л.

8 Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Лунин С.М., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Черенков Д.А., Фесенко Е.Е. Антиоксиданты и токсический стресс: участие белков теплового шока, цитокинов и оксида азота // Открытое образование. – 2006. – №3. – С. 408-410. – 0,38 п.л.

9 Куликов А.В., Новоселова Е.Г., Корыстов Ю.Н., Глушкова О.В., Черенков Д.А., Смирнова Г.Н., Архипова Л.В., Куликов Д.А. Возрастная инволюция тимуса: способы замедления // Успехи геронтологии. - 2005. - №17. – С. 82-86. – 0,63 п.л.

10 Новоселова Е.Г., Куликов А.В., Глушкова О.В., Черенков Д.А., Синотова О.А., Архипова Л.В. Влияние трансплантации тимуса зимнеспящих сусликов на возрастную инволюцию вилочковой железы стареющих крыс // Доклады академии наук. – 2004. – Т 397. – №2. – С. 279-280. – 0,25 п.л.

11 Огай В.Б., Новоселова Е.Г., Черенков Д.А., Фесенко Е.Е. Активация естественных киллерных клеток мышей под действием низкоинтенсивного электромагнитного излучения КВЧ диапазона // Радиационная биология. Радиоз экология. – 2003. – Т. 43. – №2. – С. 2-5. – 0,50 п.л.

12 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. – 0,38 п.л.



- 13 Черенков Д.А., Рыбаков Ю.А., Санина Т.В., Шкарин Н.Ю., Складнев Д.А., Корнеева О.С. Фукоза: биологическая роль, пути получения и применение // Биотехнология. – 2010. - №6. - С. 63-71. – 1,13 п.л.
- 14 Черенков Д.А., Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Новоселова Е.Г., Анохина Е.П., Глущенко А.С., Слепокуров А.А. β-Маннаназы различного происхождения: получение, характеристика и перспективы практического применения (Обзор) // Успехи современной биологии. – 2010. – Т. 130. - № 2. - С. 179-188. – 1,25 п.л.
- 15 Черемушкина И.В., Глущенко А.С., Анохина Е.П., Чигирин Н.А., Черенков Д.А., Слепокуров А.А., Корнеева О.С., Михайлова А.Н. Биотехнология маннозосодержащих гидролизатов и исследование пребиотических свойств маннозы // Биотехнология. – 2010. - № 5 – С. 56-61. – 0,75 п.л.
- 16 Пат. № 2392332, RU С13 К 13/00 Способ получения маннанов из растительного сырья / Корнеева О. С., Глущенко А. С., Черемушкина И. В., Черенков Д. А., Слепокуров А. А. № 2008149923/13; Заявл. 18.12.2008; Оpubл. 20.06.2010.
- 17 Кирьянова С.В., Самченко А.А., Кондратьев М.С., Черенков Д.А., Корнеева О.С. Сравнительный анализ альфа-фукозидаз с применением методов биоинформатики // Актуальная биотехнология. – 2012. - № 1. – С. 31-34. – 0,50 п.л.

**Материалы конференций:**

- 18 Черенков Д.А., Новоселова Е.Г., Фесенко Е.Е., Корнеева О.С. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на систему клеточного иммунитета млекопитающих (мышей) в норме и при опухолевом росте // Материалы международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы». – Воронеж, 2013. – С. 67. – 0,13 п.л.
- 19 Черенков Д.А., Корнеева О.С., Новоселова Е.Г. Влияние неионизирующих электромагнитных излучений низкой интенсивности на иммунную систему млекопитающих // Материалы международной конференции молодых ученых

- «Экспериментальная и теоретическая биофизика» 22-24 октября 2012 г. - Пущино, 2012. – С. 127-128. – 0,25 п.л.
- 20 Черенков Д.А., Корнеева О.С. Влияние минорных сахаров на иммунную систему млекопитающих // Материалы I отчетной научной конференции за 2011 год. - Воронеж: ВГУИТ, 2012. Ч. 1. – С. 141. – 0,13 п.л.
- 21 Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Черенков Д.А., Санина Т.В., Анохина Е.П., Глущенко А.С., Божко О.Ю. Биотехнология углеводов пребиотического и иммуностропного действия // Тезисы второго международного Конгресса «ЕвразияБио-2010». – Москва, 2010. – С. 99. – 0,13 п.л.
- 22 Кирьянова С. В., Черенков Д. А., Корнеева О. С. Получение рекомбинантной фукозидазы // Материалы научно-практической интернет-конференции «Биотехнология: наука и практика» 1-2 ноября 2012 г. Актуальная биотехнология. – 2012. - № 2. – С. 24. – 0,13 п.л.
- 23 Глушкова О.В., Новосёлова Е.Г., Черенков Д.А., Новосёлова Т.В., Фесенко Е.Е. Иммунные ответы организма при токсических стрессах // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. - № 2-3. – С. 219-220. -0,25 п.л.
- 24 Новоселова Е.Г., Лунин С.М., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Черенков Д.А. Исследование молекулярных механизмов функционирования защитных систем клетки при системном воспалительном синдроме и сепсисе у мышей. Поиск новых направлений лечения // Материалы конференции «Фундаментальные науки – медицине». – Москва, 2007. – С. 28-29. – 0,25 п.л.
- 25 Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Лунин С.М., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Черенков Д.А., Лысенко Е.А., Фесенко Е.Е. Участие гелданамицина в регуляции стрессового ответа клетки и в экспрессии некоторых сигнальных белков // Материалы XV международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». – Гурзуф, 2007. - С. 304-305. – 0,25 п.л.

- 26 Khrenov M.O., Cherenkov D.A., Novoselova T.V., Lysenko E.A., Lunin S.M., Novoselova E.G. Antibiotic geldanamycin, an Hsp90-binding agent, affects the expression of signal proteins and heat shock proteins in normal mice lymphocytes // Proceedings of 8th John Humphrey advanced summer program in immunology. - Moscow, 2007. - P. 22. – 0,13 p.sh.
- 27 Хренов М.О., Черенков Д.А., Глушкова О.В., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Новоселова Е.Г. Участие NF- $\kappa$ B И SAPK/JNK в ответе лимфоцитов мышей на действие низкоинтенсивного электромагнитного и лазерного излучений // Материалы 11-ой Пущинской международной конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. - С. 22. – 0,13 п.л.
- 28 Новоселова Т.В., Черенков Д.А., Хренов М.О., Глушкова О.В., Лунин С.М., Фесенко Е.Е., Новоселова Е.Г. Экспрессия белков теплового шока и сигнальных белков в лимфоцитах мышей при действии гелданамицина // Материалы 11-ой Пущинской международной конференции молодых ученых. – Пущино, 2007. - С. 153-154. – 0,25 п.л.
- 29 Новосёлова Е.Г., Глушкова О.В., Черенков Д.А., Новосёлова Т.В., Лунин С.М., Хренов М.О. Окислительный стресс при острых и хронических воспалениях: снижение токсического повреждения путём антиоксидантной защиты // Материалы второго Международного Междисциплинарного Конгресса «Наука для медицины и психологии» 10-21 июня 2006 г. - Судак, 2006. – С. 136-137. – 0,25 п.л.
- 30 Анохина Е.П., Черенков Д.А., Черемушкина И.В., Корнеева О.С. Биотехнология высокоактивной  $\beta$ -маннаназы с использованием генно-инженерного штамма *Bacillus subtilis* 168 // Материалы XLVIII научной конференции за 2009 год. – Воронеж: ВГТА, 2010. – Ч. 1. - С. 287. – 0,13 п.л.
- 31 Cherenkov D.A, Ogay V.B., Novoselova E.G. The activation of natural killer cells from mice subjected to low-intensity extremely high frequency electromagnetic irradiation // Proceedings of 17th international symposium and exhibition on electromagnetic compatibility 29 june – 1 july 2004. - Wroclaw, 2007. – P. 382-383. – 0,25 p.sh.

- 32 Куликов А.В., Новосёлова Е.Г., Воробьёв Н.А., Куликов Д.А., Глушкова О.В., Черенков Д.А. Торможение возрастной инволюции вилочковой железы у стареющих крыс после трансплантации им тимуса зимнеспящих сусликов // Материалы международного симпозиума «Биологические механизмы старения». - Харьков, 2004. – С. 35-36. – 0,25 п.л.
- 33 Синотова О.А., Глушкова О.В., Черенков Д.А. Дозовые зависимости изменений продукции оксида азота и фактора некроза опухолей в клетках мышцей под влиянием ЭМИ КВЧ низкой интенсивности // Материалы 8-ой международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века». - Пущино, 2004. – С. 94. – 0,13 п.л.
- 34 Глушкова О.В., Черенков Д.А., Куликов А.В., Новосёлова Е.Г. Физиологическая активность трансплантатов зимнеспящих сусликов // Материалы 8-ой международной Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века». - Пущино, 2004. – С. 106. -0,13 п.л.
- 35 Ogay V.B., Novoselova E.G., Cherenkov D.A., Fesenko E.E. Comparative study of the effects of low intensity millimeter and cytotoxic activity of lymphocytes in mice // Proceedings of the third international symposium on nonthermal medical/biological treatments using electromagnetics field and ionised gases, 11-13 june, 2003. - San Antonio, 2003. - P. 118-119. – 0,25 p.sh.
- 36 Огай В.Б., Черенков Д.А. Сравнение влияния низкоинтенсивного электромагнитного излучения сантиметрового и миллиметрового диапазонов на пролиферативную и цитотоксическую активность лимфоцитов мышцей // Материалы 7-ой Пущинской школы-конференции молодых учёных «Биология – наука 21 века». - Пущино, 2003. – С. 69. – 0,13 п.л.

Подписано в печать 11.09.2015 г . Формат 60 x 84 1/16  
Усл. печ. л. 2,00. Тираж 100 экз. Заказ № 98

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет  
инженерных технологий»  
(ФГБОУ ВПО «ВГУИТ»)  
Отдел полиграфии ФГБОУ ВПО «ВГУИТ»  
Адрес университета и отдела полиграфии:  
394036, Воронеж, пр. Революции, 19