

© Е.А.Корнева, Н.С.Новикова, Т.В.Абрамова, С.В.Перекрест, В.Роджерс, 2006
УДК 611.77:615.832.42]:611.814.1-092.4

Е.А. Корнева, Н.С. Новикова, Т.В. Абрамова, С.В. Перекрест, В. Роджерс

ВЛИЯНИЕ КВЧ-ОБЛУЧЕНИЯ КОЖИ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ АКТИВАЦИИ КЛЕТОК ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ СТРУКТУР, ИНДУЦИРОВАННУЮ ВВЕДЕНИЕМ ЦИКЛОФОСФАМИДА

E.A. Korneva, N.S. Novikova, T.V. Abramova, S.V. Perecrest, W. Rogers

EFFECTS OF EHF IRRADIATION OF THE SKIN ON INTENSITY OF ACTIVATION OF THE HYPOTHALAMIC STRUCTURE CELLS INDUCED BY ADMINISTRATION OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Отдел общей патологии и патофизиологии Научно-исследовательского института экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург; Россия, Институт биоинформационных исследований, Вэйн, Филадельфия, США

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬЮ ИССЛЕДОВАНИЯ являлось изучение интенсивности активации клеток гипоталамических структур (VMH и LHA) при введении циклофосфамида (ЦФ) и установлении возможности модулирующего эффекта КВЧ-облучения кожи на этот процесс. **МАТЕРИАЛИ МЕТОДЫ.** Работа выполнена на 18 крысах-самцах породы «Wistar» массой 250 г. Выявление активации клеток гипоталамуса (по экспрессии гена *c-fos*) после введения циклофосфамида в дозах 20 и 40 мг/кг веса животного и КВЧ-облучения кожи проводили непрямым иммуногистохимическим методом. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Показан различный паттерн активации зон VMH и LHA при введении разных доз ЦФ. Выявлены определенные зоны, клетки которых реагируют экспрессией *c-Fos* на введение 20 мг/кг ЦФ, в то время, как введение ЦФ в дозе 40 мг/кг приводит к активации клеток всех исследованных структур. Эффект КВЧ-облучения кожи проявлялся в снижении количества *c-Fos*-позитивных клеток только при введении 20 мг/кг ЦФ, при увеличении дозы нивелирующего действия КВЧ-облучения кожи не наблюдалось. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Выявлена активация клеток LHA и VMH, свидетельствующая в пользу возможного участия конкретных групп нейронов в процессах, развивающихся в мозге при введении ЦФ. Впервые показано модулирующее действие КВЧ-облучения кожи на степень активации клеток мозга, индуцированной введением ЦФ.

Ключевые слова: циклофосфамид, КВЧ-облучение, *c-Fos*, гипоталамус

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study the intensity of activation of the hypothalamic structure cells (VMH and LHA) after administration of cyclophosphamide (CPh) and attainment of possibility of a modulating effect of EHF irradiation of the skin on this process. **MATERIAL AND METHODS.** The work was carried out in 18 male Wistar rats weighing 250g. The detection of activation of the hypothalamus cells (by *c-fos* gene expression) following injection of CPh in dosage 20 and 40 mg/kg of body mass and EHF irradiation of the skin was made using an indirect immunohistochemical method. **RESULTS.** Different patterns of activation of VMH and LHA zones were shown after injections of different doses of CPh. Certain zones were established in which the cells reacted by *c-Fos* expression to the CPh dose of 20 mg/kg, while the dose 40 mg/kg resulted in activation of the cells of all the structures under investigation. The effect of EHF irradiation of the skin was observed as a decreased number of *c-Fos* positive cells but after 20 mg/kg of CPh. Greater doses had no grading effect of EHF irradiation of the skin. **CONCLUSION.** Activation of LHA and VMH cells was detected suggesting a possible participation of specific groups of neurons in the processes developing in the brain in response to administration of CPh. The modulating action of EHF irradiation of the skin was first shown on the degree of brain cell activation induced by administration of CPh.

Key words: cyclophosphamide, EHF irradiation, *c-Fos*, hypothalamus.

ВВЕДЕНИЕ

В комплексной терапии нефрологических заболеваний различной этиологии, в том числе аутоиммунных и онкологических, применяются цитостатики, в частности циклофосфамид (ЦФ) [1]. Этот препарат имеет низкую избирательность цитостатического эффекта и отрицательно влияет на функционирование кроветворной и иммунной систем [2]. Побочные эффекты действия цитостатических препаратов столь выражены, что часто обуславливают необходимость приостановки лечения [3].

Существуют единичные данные о воздействии сублетальных доз (100мг/кг) ЦФ на морфо-функциональные характеристики нейросекреторных клеток супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса и уровень нейросекрета в задней доле гипофиза крыс [4]. Современная литература содержит ограниченное количество данных о влиянии ЦФ на активность клеток гипоталамических структур, в том числе и участвующих в регуляции функций иммунной системы. Участие ЦНС в регуляции функций иммунной системы была ус-

тановлена в середине XX века. Е.А. Корневой и Л.М. Хай впервые было показано участие заднего гипоталамического поля в модуляции функций иммунной системы [5]. Позднее было определено, что такие структуры гипоталамуса, как вентромедиальное ядро (VMH) и латеральное гипоталамическое поле (LHA), участвуют в регуляции цитотоксической активности натуральных киллерных (НК) клеток [6,7]. С другой стороны, введение антигена приводит к активации этих же структур [8]. Повреждающее действие цитоксана на клетки гипоталамуса впервые показано Е.Г.Рыбакиной и соавт. в 2006 г. [9]. Не исключена возможность, что причиной появления морфологических изменений клеток VMH и LHA, описанных в этой работе, явилось сочетанное действие циклофосфамида и диуретика маннитола, входящих в состав этого препарата. Известно, что одним из свойств маннитола является нарушение гематоэнцефалического барьера [10,11], возникающее в результате апоптоза эндотелиальных клеток [12]. Таким образом, исследование действия только ЦФ на морфофункциональное состояние клеток гипоталамуса представляет существенный интерес, поскольку позволит выяснить эффекты действия ЦФ на процесс активации гипоталамических структур, в том числе и связанных с регуляцией функций иммунной системы, что особенно важно для понимания механизмов развития побочных эффектов при проведении терапии ЦФ-содержащими препаратами.

В современной физиологии для изучения активации нейрональных клеток при действии стимулов различной природы широко используется определение интенсивности экспрессии гена немедленного ответа – *c-fos*, как общепризнанного маркера активации нейронов. Количество *c-Fos*-позитивных клеток и их локализация в структурах мозга зависит от характера и интенсивности применяемого воздействия [13]. Анализ пространственного паттерна активации клеток гипоталамуса (по количеству *c-Fos*-позитивных клеток) позволяет судить о степени влияния различного рода внешних воздействий на активацию структур гипоталамуса [14].

Одним из способов нивелирования побочных эффектов химиотерапии является электромагнитное облучение кожи в диапазоне крайне высоких частот (КВЧ-облучение) [15]. Кроме того, КВЧ-облучение кожи влияет на функции иммунной системы [16]. Механизм этих эффектов не ясен, но известно, что КВЧ-облучение кожи активирует клетки определенных структур ЦНС [14]. Показано, что в результате КВЧ-облучения кожи происходит восстановление функциональной активности НК клеток селезенки, сниженной в результате элект-

роболевого раздражения, коррелирующее с динамикой изменения степени активации VMH и LHA [7].

Целью данного исследования являлось изучение интенсивности активации нейронов гипоталамических структур (VMH и LHA) при введении циклофосфамида и возможности модулирующего эффекта КВЧ-облучения кожи на этот процесс.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 18 крысах-самцах «Wistar» массой 250 г. Животных содержали в условиях вивария при комнатной температуре с 12-часовым циклом свет/темнота, свободным доступом к воде и пище, на стандартной диете в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. До введения в эксперимент всех животных, за исключением интактных, в течение 5 дней адаптировали к экспериментальной обстановке: крыс помещали в контейнеры, которые ограничивали движения животных. Через 5 дней крысы спокойно находились в этих контейнерах.

Животные, используемые в каждом эксперименте:

1. Контрольное животное 1 – адаптированное животное, подвергнутое однократной в/б инъекции физиологического раствора.
2. Животное, подвергнутое однократной в/б инъекции ЦФ в дозе 20 мг/кг веса животного.
3. Животное, подвергнутое однократной в/б инъекции ЦФ в дозе 40 мг/кг веса животного.
4. Контрольное животное 2 – животное, подвергнутое электромагнитному облучению кожи крайне высоких частот до и после в/б введения физиологического раствора.
5. Животное, получившее сочетанное воздействие – КВЧ-облучение кожи до и после в/б введения ЦФ в дозе 20 мг/кг веса животного.
6. Животное, получившее сочетанное воздействие – КВЧ-облучение кожи до и после введения ЦФ в дозе 40 мг/кг веса животного.

Введение препарата циклофосфамида

Циклофосфамид (Sigma) растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривенно (в/б) в дозе 20 или 40 мг/кг веса животного в объеме 1 мл.

Модель КВЧ-облучения кожи

Источником КВЧ-облучения служил генератор электромагнитного поля Г4-141 (Puschino, Russia), работающий в диапазоне частот 37-53 GHz, с длиной волны 7,1 мм и мощностью 20 мВт. Крысы были облучены в 3-х областях: обе голени в 3 мм ниже и 3 мм латеральнее от центра коленного сустава и задняя поверхность шеи на уровне 7-го шейного и 1-го грудного позвонков по срединной линии [7].

Извлечение и фиксация мозга

После эксперимента животных помещали в обычные клетки и через 120 мин наркотизировали фенобарбиталом (в/б 60мкг/кг веса животного). Интракардиальную перфузию проводили теплым физиологическим раствором, содержащим гепарин (10ед/мл.), и затем охлажденным фиксирующим раствором (100мл 4% параформальдегида на 0,1М фосфатно-солевом буфере (PBS) и 0,2% пикриновой кислоты, pH 7,4). Через 1 час после перфузии мозг извлекали и погружали в свежий фиксирующий раствор, не содержащий пикриновую кислоту, на 12 часов при температуре +4°С, с последующим заключением в парафин.

Иммуногистохимическое окрашивание

Серийные парафиновые фронтальные срезы толщиной 5 мкм монтировали на стекла. Обеспарафинивание срезов проводили в орто-ксилоле при температуре +56°С в течение 30 мин с последующей регидратацией в снижающемся градиенте этанола до 0,1 М фосфатно-солевого буфера (pH 7,4).

С-Fos-позитивные клетки были выявлены прямым иммуногистохимическим методом с использованием первичных антител к с-Fos белку 1:500 (Sigma) и Ig против первичных кроличьих антител, меченных пероксидазой, в качестве вторых антител 1:300 (Sigma), с последующей детекцией 3'3'-диаминобензидином.

Учитывая морфо-функциональную неоднородность исследуемых структур, мозг всех животных

после применения различных видов воздействий анализировали на 28-м уровне с разделением на зоны внутри каждой структуры, согласно атласу Swanson's [17]. С помощью программы Видео-Тест Мастер 4 были определены следующие показатели:

- 1) количество с-Fos позитивных клеток в структурах гипоталамуса на фронтальных срезах;
- 2) оптическая плотность (ОП) межклеточного вещества и с-Fos позитивных клеток;
- 3) площадь среза, на котором проводился подсчет клеток.

Количество активированных клеток после различного рода воздействий на животных определяли в следующих зонах LHA: juxtadorsomedial region (LHAjd), supraformical region (LHAs), dorsal region (LHA_d), lateral region (LHA_l) и basal region (LHA_{bas}), – и VMH: dorsomedial region (VMH_{dm}), central region (VMH_c) и ventrolateral region (VMH_{vl}), – с пересчетом для каждой зоны на площадь 10000 мкм².

Для проведения сравнительного анализа степени активации различных структур вычисляли относительный коэффициент активации по следующей формуле:

$$\text{ОКА} = \frac{\text{количество с-Fos-позитивных клеток после введения ЦФ}}{\text{количество с-Fos-позитивных клеток после введения физ. р-ра}}$$

Все морфометрические измерения проводили слепым методом.

Статистическую обработку данных экспериментов проводили с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В предыдущих исследованиях [9] выявлено, что после введения цитоксана – фармакологического препарата, состоящего из циклофосамида и манита, происходит активация клеток, интенсивность которой варьирует в различных зонах VMH и LHA. Эти структуры содержат клетки, различающиеся морфологически и функционально, что и обуславливает их разделение на несколько зон [17] (рис. 1).

В настоящем исследовании проведен морфометрический анализ клеток каждой зоны VMH: VMH_{dm}, VMH_c и VMH_{vl} (рис. 1А), согласно атласу Swanson's. В исследуемых зонах VMH ядра количество активированных клеток варьировало в зависимости от примененных воздействий (рис. 2). После в/б введения циклофосамида

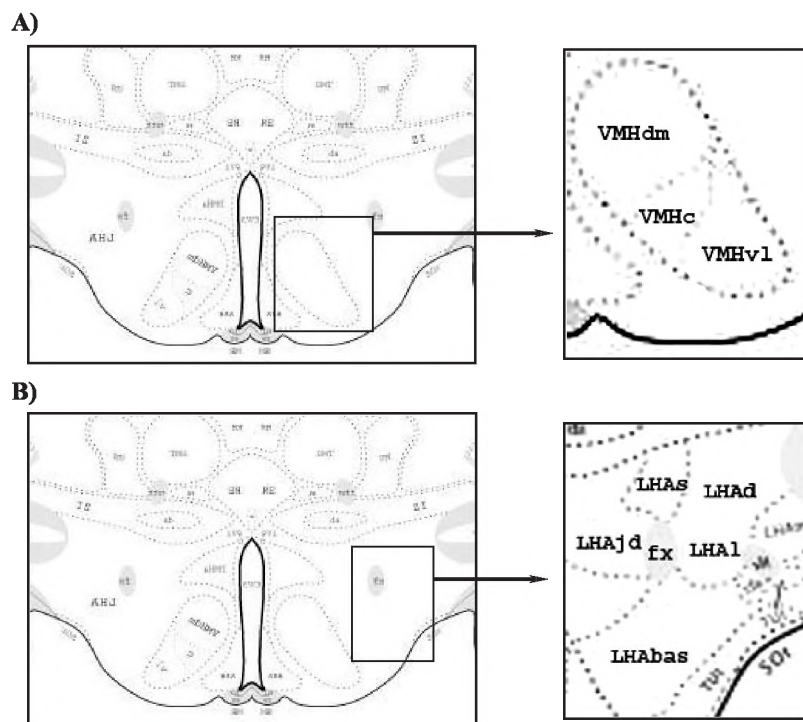


Рис. 1. Схема гипоталамических структур мозга крысы, уровень 28 (по атласу Swanson's): А – зоны вентромедиального ядра (VMH); В – зоны латерального гипоталамического поля (LHA).

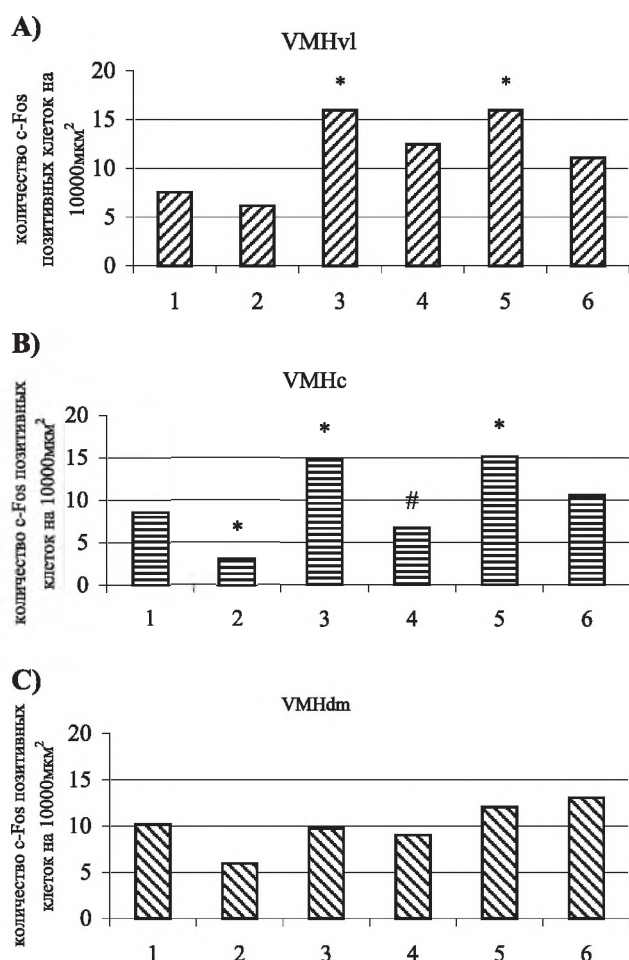


Рис. 2. Количество с-Fos-позитивных клеток в зонах VMH ядра после в/б введения ЦФ в дозах 20 и 40 мг/кг веса животного и КВЧ-облучения кожи. Ось Y – количество с-Fos позитивных клеток на 10 000 мкм²; Ось X – виды воздействия введение: 1 — физиологического раствора, 2 — физиологического раствора на фоне КВЧ-облучения кожи, 3 — циклофосамида в дозе 20 мг/кг, 4 — циклофосамида в дозе 20 мг/кг на фоне КВЧ-облучения кожи, 5 — циклофосамида в дозе 40 мг/кг, 6 — циклофосамида в дозе 40 мг/кг на фоне КВЧ-облучения кожи. * – $P < 0,05$ по сравнению с количеством с-Fos-позитивных клеток у животных после введения физиологического раствора, # – $P < 0,05$ по сравнению с количеством с-Fos-позитивных клеток у животных после введения физиологического раствора и КВЧ облучения кожи.

(рис.1B). После применяемых воздействий количество активированных клеток было различно в исследуемых зонах латерального гипоталамического поля (табл. 1).

Введения ЦФ в дозе 20 мг/кг массы животного приводило к увеличению количества с-Fos позитивных клеток только в зонах LHAs и LHAbas. Повышение дозы вводимого ЦФ (40 мг/кг массы животного) приводит к более интенсивной активации всех исследованных зон (табл. 1). Наиболее выраженный ответ (по величине относительного коэффициента активации) наблюдался в LHAbas, LHAd и LHAs (табл 2). Эффект КВЧ-облучения кожи выражался в снижении количества с-Fos позитивных клеток, активированных введением ЦФ, и проявлялся только в зоне LHAbas при введении ЦФ в дозе 20 мг/кг массы животного (табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Иммуногистохимическое выявление с-Fos белка является общепринятым методом определения активации клеток нервной системы. Использование данного метода позволило выявить различия в паттернах активации изученных структур гипоталамуса при введении ЦФ в дозах 20 и 40 мг/кг веса животного, КВЧ-облучении кожи и сочетанном применении этих воздействий. Показано, что через 2 часа после введения ЦФ в обеих использованных дозах, в клетках исследованных зон гипоталамических структур происходит активация экспрессии с-fos гена в различной степени, что может быть инициировано комплексом реакций, вызванных действием цитостатика или непосредственным его влиянием на ЦНС. Как известно, характер активации структур гипоталамуса зависит не только от природы, но и от интенсивности воздействия [13,14].

Таблица 1

Количество с-Fos-позитивных клеток в различных зонах латерального гипоталамического поля крыс Wistar после в/б введения циклофосамида и КВЧ-облучения кожи ($\bar{X} \pm m$)

Виды воздействий	Количество с-Fos позитивных клеток в LHA на площади среза 10000μм² в зонах латерального гипоталамического поля				
	LHAI	LHAbas	LHAd	LHAjd	LHAs
Инъекция физиологического раствора	9,57±2,89	6,29±2,12	9,00±2,09	8,65±2,52	7,47±1,68
Инъекция физиологического раствора на фоне КВЧ-облучения кожи	4,89±1,31	5,49±1,31	7,52±3,30	10,42±1,9	7,33±1,68
Инъекция ЦФ в дозе 20мг/кг массы	7,12±6,97	10,08±0,83	10,47±0,9	8,34±1,45	13,24±1,04#
Инъекция ЦФ в дозе 20мг/кг массы на фоне КВЧ-облучения кожи	6,97±1,03	5,53±0,86*	9,9±0,72	7,8±2,53	12,64±1,3
Инъекция ЦФ в дозе 40мг/кг массы	13,52±0,29*	14,69±1,21#*	20,7±4,36#	15,25±3,41	16,52±2,73#
Инъекция ЦФ в дозе 40мг/кг массы на фоне КВЧ-облучения кожи	11,69±3,41	10,35±6,47	13,66±3,66	11,61±2,94	17,29±4,32

* – $P < 0,05$ по сравнению с количеством с-Fos-позитивных после введения ЦФ в дозе 20 мг/кг массы животного, # – $P < 0,05$ по сравнению с количеством с-Fos-позитивных после введения физиологического раствора. В каждой группе $n = 3$.

Таблица 2

**Относительные коэффициенты активации клеток в зонах LHA
после введения ЦФ ($\bar{X} \pm m$)**

Виды воздействий	Относительный коэффициент активации клеток в зонах LHA				
	LHAi	LHAbas	LHA _d	LHA _d	LHAs
Инъекция ЦФ в дозе 20мг/кг массы	0,74±0,075	1,6±0,131*	1,16±0,099	1,0±0,140	1,77±0,139*
Инъекция ЦФ в дозе 40мг/кг массы	1,41±0,031	2,34±0,192*	2,3±0,485*	1,76±0,395	2,21±0,364*

* – $P < 0,05$ по отношению к количеству c-Fos-позитивных клеток после введения физиологического раствора.

При исследовании различных зон VMH после введения ЦФ также был выявлен дискретный характер активации клеток. Активация клеток была более выражена в VMHc. Данная зона характеризовалась не только интенсивной реакцией на действие ЦФ, но и снижением степени их выраженности при КВЧ-облучении кожи, сочетанном с в/б введением ЦФ в дозе 20 мг/кг веса животного. Клетки VMHv также активируются при в/б введении ЦФ. Однако КВЧ-облучение кожи не отменяет этого эффекта. Клетки VMHdm зоны не отвечали активацией на все примененные воздействия (по экспрессии в них c-Fos белка).

При сравнительном анализе степени активации клеток различных зон латерального гипоталамического поля показано, что в LHAs и LHAbas происходит увеличение количества c-Fos-позитивных клеток при введении ЦФ в дозе 20 мг/кг. Отмена эффекта действия ЦФ при воздействии КВЧ-облучения наблюдалась только в зоне LHAbas, что может свидетельствовать о функциональном различии исследованных зон LHA.

Увеличение дозы вводимого ЦФ (40 мг/кг) приводит к активации всех исследованных зон LHA, но модулирующее действие КВЧ-облучения кожи в этих условиях не проявляется.

Полученные данные позволяют сделать предположение о механизмах положительного влияния КВЧ-облучения на иммунную систему, описанного в современной литературе [15, 18]. По-видимому, центральные регуляторные системы вовлечены в механизмы регуляции эффектов действия КВЧ, о чем свидетельствует и наблюдаемая нами отмена активирующих эффектов циклофосамида на клетки VMH и LHA под влиянием КВЧ-облучения. Важно отметить и недавно установленный факт существования полисинаптической связи LHA и VMH с селезенкой и красным костным мозгом [19,20], что делает возможным участие LHA и VMH в регуляции функций указанных органов иммунной системы. Соответственно, модификация степени активации клеток этих структур гипоталамуса может сказываться на функциональной активности иммунной системы.

Кроме того, известно, что КВЧ-облучение влия-

ет на функциональное взаимодействие нервной, эндокринной и иммунной систем [21], и характер его эффекта зависит от физиологического состояния клеток [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые продемонстрировано изменение паттерна активации определенных зон LHA и VMH при введении ЦФ и КВЧ-облучении кожи. Полученные данные трудно интерпретировать, но очевидно, что наблюдаемые реакции связаны с функциональным различием зон LHA и VMH. Выявленная активация исследованных структур гипоталамуса свидетельствует в пользу возможного участия конкретных групп нейронов в процессах, развивающихся в мозге после применяемых воздействий, а также проливает свет на один из возможных механизмов позитивного действия КВЧ-облучения кожи на проявление побочных эффектов действия ЦФ.

Работа выполнена при поддержке Института Биоинформационных Исследований Ричарда Дж. Фокса, Вэйн, Филадельфия, США

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Donadio JV Jr, Glasscock RJ. Immunosuppressive drug therapy in lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1993; 21(3): 239-250
2. Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 225-266
3. Knight A, Askling J, Granath F et al. Urinary bladder cancer in Wegener's granulomatosis: risks and relation to cyclophosphamide. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1307-1311
4. Salzmann G. The effect of CY on the diencephalohypophyseal system of the rat. *Strahlentherapie* 1973; 145(3): 334-345
5. Корнева ЕА, Хай ЛМ. О влиянии раздражения различных структур промежуточного мозга на протекание иммунологических реакций. *Физиол журн СССР* 1967; 53 (1): 42-47
6. Wenner M, Kawamura N, Ishikawa T. Reward linked to increased natural killer cell activity in rats. *NeuroImmuno Modulation* 2000; (7): 1-5
7. Shanin SN, Rybakina EG, Novikova NN et al. Natural killer cell cytotoxic activity and c-Fos protein synthesis in rat hypothalamic cells after painful electric stimulation of the hind limbs and EHF irradiation of the skin. *Med Sci Monit* 2005; 11(9): BR309-315

8. Корнева ЕА, Казакова ТБ, Носов МА. Экспрессия с-fos мРНК и с-Fos-подобных белков в клетках гипоталамических структур при введении антигена. *Аллергология и Иммунология* 2001; (1): 37-44
9. Рыбакина ЕГ, Новикова НН, Абрамова ТВ и др. Экспрессия с-Fos-гена в клетках гипоталамических структур и цитотоксическая активность естественных клеток-киллеров селезенки крыс после введения цитоксана. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2006; 141(4): 375-378
10. Cosolo WC, Martinello P, Louis WG, Christophidis N. Blood-brain barrier disruption using mannitol: time course and electron microscopy studies. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1989; 256: 443
11. Chi OZ, Lee DI, Liu X, Weiss HR. The effects of morphine on blood-brain barrier disruption caused by intracarotid injection of hyperosmolar mannitol in rats. *Anesth Anal* 2000; 90(3): 603-608
12. Malek AM, Goss GG, Jiang L et al. Mannitol at clinical concentrations activates multiple signaling pathways and induces apoptosis in endothelial cells. *Stroke* 1998; 29: 2631-2640
13. Kova'cs K. C-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochem Int* 1998; 33: 287-297
14. Новикова НС, Казакова ТБ, Роджерс В, Корнева ЕА. Сравнительный анализ локализации и интенсивности экспресс с-fos гена в клетках определенных структур гипоталамуса при механическом и электрическом болевом раздражении. *Патогенез* 2004; 2 (2): 73-79
15. Makar VR, Logani MK, Bhanushall A et al. Effect of millimeter waves on natural killer cell activation. *Bioelectromagnetics* 2005; 26: 10-19
16. Logani MK, Ziskin MC Millimeter waves enhance delayed-type hypersensitivity in mouse skin. *Electro and magnetobiology* 1999; 18: 165-176
17. Swanson LW. *Brain maps III. Structure of the rat brain*, 3rd ed. Elsevier acad. press, San-Diego, Cal. USA, 2004; 72-73
18. Gapeyev AB, Yakushina VS, Chemeris NK, Fesenko EE. Modification of production of reactive oxygen species in mouse peritoneal neutrophils on exposure to low-intensity modulated millimetre wave radiation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998; 46: 267-272
19. Denes A, Boldogkoi Z, Uherczky G et al. Central autonomic control of the bone marrow: multisynaptic tract tracing by recombinant pseudorabies virus. *Neuroscience* 2005; 134: 947-963
20. Cano G, Sved AF, Rinamen L et al. Characterization of the central nervous system innervation of the rat spleen using viral transneuronal tracing. *J Comp Neurol* 2001; 439: 1-18
21. Лушников КВ, Гапеев АВ, Чемерис НК. Влияние электромагнитного излучения крайне высоких частот на иммунную систему и системную регуляцию гомеостаза. *Радиационная биология, радиозэкология* 2002; 42(5): 533-545
22. Гапеев АВ, Чемерис НК. Действие непрерывного и модулированного ЭМИ КВЧ на клетки животных. Часть III. Биологические эффекты непрерывного ЭМИ КВЧ. *Вестник новых медицинских технологий* 2000; VII: 20-25

Поступила в редакцию 22.05.2006 г.