

РОЛЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ p38 В ОТВЕТАХ МЫШЕЙ НА НИЗКОИНТЕНСИВНОЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ САНТИМЕТРОВОГО ДИАПАЗОНА

© 2016 г. О.В. Глушкова*, М.О. Хренов*, Е.В. Виноградова* **, С.М. Лунин*,
Е.Е. Фесенко*, Е.Г. Новоселова*

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Пуцинский государственный естественно-научный институт,
142290, Пущино Московской области, просп. Науки, 3

E-mail: glushckova@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.16 г.

Изучена роль митоген-активируемой протеинкиназы p38 в регуляции ответа на воздействие сверхслабых электромагнитных сантиметровых волн (8,15–18,0 ГГц, 1 мкВт/см², 1 ч) у мыш-ей-самцов линии Balb/C. Оценены уровень фосфорилирования сигнальных белков каскадов NF-κB (p65, IKK), JNK, IRF3, экспрессия рецептора TLR4, стресс-индуцибельных белков теплового шока Hsp72 и Hsp90 в клетках селезенки, а также содержание провоспалительных цитокинов и IL-10 в сыворотке крови мышей. Показано, что применение ингибитора сигнального пути p38 (p38 Inhibitor XI) приводит к снижению чувствительности организма к действию сверхслабого электромагнитного излучения сверхвысоких частот. Это проявлялось в снижении вызванной излучением активации сигнального пути NF-κB, экспрессии стресс-индуцибельных белков теплового шока Hsp70 и Hsp90 в спленocyтaх и в накоплении провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-17, TNF-α, IFN-γ) в сыворотке крови облученных мышей при использовании ингибитора p38. Тем не менее применение ингибитора не снижает активацию сигнальных путей p38 и IRF3 и гиперэкспрессию TLR4 в клетках селезенки облученных мышей. Таким образом, митоген-активируемая протеинкиназа p38 участвует в регуляции неспецифических защитных ответов, но не определяет чувствительность организма мышей к действию сверхслабого электромагнитного излучения сверхвысоких частот.

Ключевые слова: низкоинтенсивное электромагнитное излучение сверхвысоких частот, p38, NF-κB, IRF3, JNK, TLR4, цитокины, белки теплового шока, мышцы.

Высокочастотные электромагнитные излучения радиочастотного спектра (9 кГц – 300 ГГц) используются в области радиокommunikаций и радиолокации, что и определило их название – «радиоволны». К радиоволновому спектру относится и излучение с частотами 3–30 ГГц, которое принято называть электромагнитными излучениями сверхвысоких частот (ЭМИ СВЧ). Существует большое количество источников ЭМИ СВЧ, с которыми человек имеет дело в повседневной жизни. Наиболее распространенными из них являются мобильные телефоны, микроволновые печи, радары, спутниковые системы связи, системы радиорелейной связи и солнечные излучения [1]. Несмотря на то, что интенсивности промышлен-

ных излучений чаще всего не превышают допустимых санитарных норм, в соответствии с «Критериями санитарного состояния окружающей среды» Всемирной организации здравоохранения (WHO Environmental Health Criteria (1993)), ЭМИ СВЧ даже с нетепловыми интенсивностями принято считать слабыми биотропными факторами.

В настоящее время предложены многочисленные модели для объяснения механизмов взаимодействия слабых электромагнитных полей с биологическими системами. В качестве первичных мишеней низкоинтенсивных высокочастотных волн в разных публикациях рассматриваются мембраны, ионные каналы и мембранные белки, металлопротеины, микротрубочки цитоскелета, меланин, участники сигнальных путей NF-κB, p53, белки теплового шока, а также молекула ДНК [2]. Биотропные эффекты радиоволн являются стрессовыми и

Сокращения: ЭМИ СВЧ – электромагнитное излучение сверхвысоких частот, IRF – интерферонрегулирующий фактор, JNK – c-Jun NH2-терминальная киназа, p38 – стресс-активируемая протеинкиназа-2.

опосредованы активацией сигнальных путей неспецифической защиты, важнейшими из которых являются NF-κB, митоген-активируемые протеинкиназы и интерферонрегулирующие факторы (IRF's). Среди внутриклеточных сигнальных путей основным кандидатом на роль мишени для электромагнитного излучения является семейство митоген-активируемых протеинкиназ [3], к которым относятся сигнальные пути внеклеточной регулируемой киназы (ERK), c-Jun NH₂-терминальной киназы (JNK) и стресс-активируемой протеинкиназы-2 (p38) [4]. Члены этого семейства играют важную роль в патофизиологических процессах, в регуляции неспецифической защиты и поддержании гомеостаза клеток. Так, митоген-активируемая протеинкиназа p38 контролирует экспрессию провоспалительных цитокинов и апоптоз, участвует в клеточной пролиферации и дифференцировке, в регуляции воспалительных и аутоиммунных заболеваний [5–7]. Тем не менее вопрос об участии протеинкиназы p38 в реализации биотропных эффектов ЭМИ СВЧ остается открытым в силу противоречивости имеющихся экспериментальных данных.

Неоднозначность сведений о биотропных эффектах ЭМИ СВЧ обусловлена сложностью постановки эксперимента вследствие необходимости учета большого числа параметров излучений, а также зависимостью эффектов от физиологического состояния облучаемого объекта [8]. Однако уже накопленный экспериментальный материал позволяет сделать вывод о несомненном биотропном и стрессовом действии низкоинтенсивных электромагнитных излучений, что на клеточном уровне проявляется в активации неспецифических защитных сигнальных путей. Действительно, ранее нами было обнаружено, что электромагнитное низкоинтенсивное излучение сантиметрового диапазона (8,15–18 ГГц, 1 мкВт/см²) обладает способностью активировать ответы неспецифического иммунитета как при экспозиции здоровых млекопитающих и иммунных клеток, так и при воздействии на животных с иммунопатологиями [9–12]. При изучении молекулярных механизмов взаимодействия ЭМИ СВЧ с живыми системами мы установили участие сигнальных путей NF-κB и JNK, белка теплового шока 72 (Hsp72), а также рецепторного белка TLR4 в реализации биотропного действия ЭМИ СВЧ в иммунных клетках.

Целью настоящей работы было изучение роли митоген-активируемой протеинкиназы p38 в регуляции неспецифических иммунных ответов при облучении мышей-самцов линии Balb/C сверхслабыми электромагнитными сантиметро-

выми волнами (8,15–18 ГГц, 1 мкВт/см², 1 ч). Для этого было проведено сравнение биотропного действия ЭМИ СВЧ на здоровых мышах и на животных с заблокированной активностью p38 после внутривентриальной инъекции специфического ингибитора (p38 Inhibitor XI). Оценивали уровень фосфорилирования сигнальных белков из каскадов NF-κB (p65, IKK), JNK, IRF3, экспрессию рецептора TLR4, стресс-индуцибельных белков теплового шока Hsp72 и Hsp90 в клетках селезенки, а также содержание ключевых провоспалительных цитокинов в сыворотке крови мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В работе использовали половозрелых мышей-самцов аутбредной линии Balb/C массой 20–25 г (линия была подарена ФИБХ РАН фирмой «Charles River Laboratories» (США) и поддерживается в его питомнике). В течение всего срока экспозиции животные получали пищу и воду *ad lib*. Все измерения проведены индивидуально для каждой мыши.

В работе были использованы четыре группы мышей по пять особей в каждой группе: «Контроль» – ложноэкспонированные мыши; «ЭМИ СВЧ» – животные, облученные электромагнитными волнами; «Ингибитор» – мыши после внутривентриальной инъекции раствора специфического ингибитора p38 – p38 Inhibitor XI (Merck (США), 0,68 мкМ на кг массы) в 0,9% NaCl; «Ингибитор + ЭМИ СВЧ» – животные, облученные через час после инъекции раствора p38 Inhibitor XI.

Условия облучения электромагнитными волнами. Источником ЭМИ СВЧ служил генератор Я2Р-76/2 с диапазоном частот 8,15–18 ГГц, использовали режим качающейся частоты с периодом перестройки 1 с, средняя плотность потока энергии – 1 мкВт/см². Распределение плотности потока мощности было измерено с помощью устройства, состоящего из приемной антенны Р6-23А (Россия) в сочетании с агрегатной головкой термисторного типа Р3-18 (Россия). Подробный порядок измерения плотности потока мощности описан ранее [10]. На расстоянии локализации облучаемого объекта (80 см) распределение плотности потока мощности имело форму колокола с центральным максимумом 1,6 мкВт/см². Однократное облучение проводили в течение 1 ч (животных помещали в камеру из оргстекла размером 25 × 25 × 40 см) через рупор антенны (25 × 34 см) на расстоянии 80 см от объекта до основания рупора. Повышения температуры после воздействия ЭМИ СВЧ не было обнаружено.

Выделение клеток и сыворотки крови. Через 6 ч после облучения животные были декапированы. Выделение лимфоцитов селезенки и получение сыворотки крови описано нами ранее [13].

Измерение концентрации цитокинов в сыворотке крови. Концентрацию цитокинов в образцах сыворотки крови мышей определяли с помощью иммуноферментного анализа. В качестве первичных антител использовали поликлональные кроличьи антитела к TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ мыши, все антитела и белки-цитокينات были получены от PeproTech (США). В качестве вторичных антител были использованы козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с биотином (StressGen, Канада), затем проводили инкубацию с комплексом, содержащим стрептавидин, конъюгированный пероксидазой хрена (ИМТЕК, Россия). Окрасивание производили с использованием зеленого красителя ABTS (Sigma, США), в 0,05 М цитратном буфере, pH 5,0, с 0,01% H₂O₂, реакцию останавливали добавлением 1,5 мМ NaN₃, растворенного в 50 мМ цитратном буфере, pH 5,0. Оптическую плотность измеряли при 405 нм на спектрофотометре для планшетов Titertek Multiskan MCC/340 (Thermo Electron Corp., Финляндия). Каждый этап иммуноферментного анализа сопровождался многократным промыванием лунок фосфатно-солевым буфером с 0,05% Твин-20.

Измерение уровня фосфорилирования сигнальных белков, экспрессии белков теплового шока Hsp72 и Hsp90 и рецепторного белка TLR4. Активацию (фосфорилирование) сигнальных белков в спленocyтaх мышей определяли с помощью электрофореза, переноса белков и иммуноблоттинга, подробно все процедуры описаны нами ранее [13]. Использовали поликлональные антитела кролика к GAPDH, ph-NF- κ B, ph-SAPK/JNK, ph-IKK, ph-p38, ph-IRF3 (все антитела фирмы Cell Signaling, США). Идентификацию белков теплового шока в образцах определяли с использованием поликлональных антител к Hsp72 (индуцибельная форма) и Hsp90 α (Enzo Life Sciences, США), а TLR4 – с помощью поликлональных антител к TLR4 (Santa Cruz Biotechnology, США). Количественную оценку содержания белков в образцах проводили с использованием программы Qara.

Статистический анализ проводили с использованием критерия Стьюдента при помощи стандартного программного пакета Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ЭМИ СВЧ вызывает активацию неспецифических иммунных ответов у мышей. На рис. 1 представлены данные, характеризующие активность основных сигнальных путей неспецифической защиты в клетках селезенки мышей после одночасовой экспозиции ЭМИ СВЧ.

Показано, что облучение мышей ЭМИ СВЧ вызывает достоверное увеличение фосфорилирования как транскрипционного фактора NF- κ B, так и ключевой киназы этого сигнального пути – IKK. Кроме того, показана активация сигнальных путей p38 и IRF3, о чем свидетельствует повышение фосфорилирования p38 и IRF3 в группе «ЭМИ СВЧ» по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1). При этом не было обнаружено статистически достоверного изменения уровня фосфорилирования JNK в спленocyтaх мышей, облученных в течение часа ЭМИ СВЧ.

Как видно из рис. 2, биотропные эффекты ЭМИ СВЧ наблюдали и на уровне продукции известных маркеров стресса – индуцибельных форм белков теплового шока Hsp72 и Hsp90 и рецепторного белка TLR4. В спленocyтaх облученных животных (группа «ЭМИ СВЧ») обнаружили достоверное повышение экспрессии и белков теплового шока (Hsp72 и Hsp90), и рецептора TLR4.

Представленные на рис. 3 данные о влиянии ЭМИ СВЧ на содержание цитокинов в сыворотке крови мышей показывают, что облучение вызывает достоверное увеличение концентрации провоспалительных цитокинов IL-6, TNF- α , IFN- γ , но не IL-1, IL-10 и IL-17.

Роль p38 в регуляции неспецифических защитных ответов у мышей, облученных ЭМИ СВЧ. Влияние ингибитора p38 на неспецифические защитные ответы организма. Для изучения роли митоген-индуцибельного члена семейства MAPK – p38 – в формировании ответов иммунных клеток на ЭМИ СВЧ использовали специфический ингибитор активности этого белка – p38 Inhibitor XI. Этот ингибитор – 4-(2,4-дифторфенил)-8-(2-метилфенил)-1,7-нафтиридин-7-оксид, 4-(2,4-дифторфенил)-8-о-толил-1,7-нафтиридин-7-оксид – является малой молекулой, способной проникать через клеточную мембрану. Он обратимо связывается с АТФ-связывающим сайтом и с соседним гидрофобным карманом p38, ингибируя АТФ-зависимую активность этой киназы [14]. В наших экспериментах инъекция этого ингибитора в концентрации 0,68 мкМ/кг приводила к достоверному снижению активности протеинкиназы p38 (рис. 1, группа «Ингибитор») по сравнению с

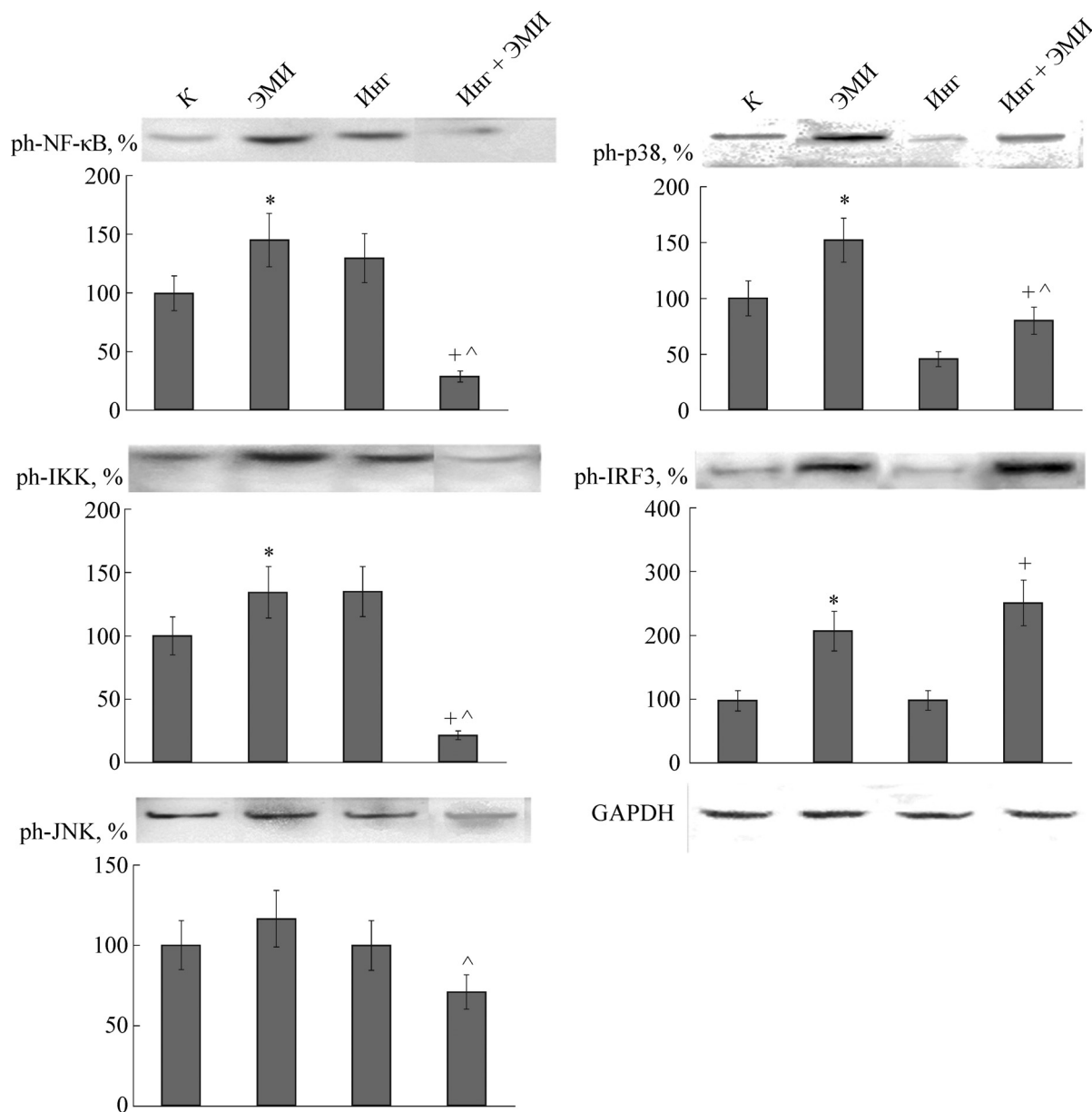


Рис. 1. Влияние ЭМИ СВЧ (8,15–18 ГГц, 1 мкВт/см², 1 ч) на фосфорилирование NF-κB, IKK, JNK, p38 и IRF3 в клетках селезенки здоровых мышей и животных с предварительно заблокированной активностью протеинкиназы p38 с помощью внутрибрюшинной инъекции p38 Inhibitor XI (0,68 мкМ/кг). Для каждого белка представлены: сверху – фотография белковых полос, полученных после иммуноблоттинга, внизу – данные денситометрии, полученные с помощью программы Qara, в % от контроля. Условные обозначения: К – «Контроль», ложноэкспонированные мыши; ЭМИ – животные, облученные электромагнитными волнами в течение 1 ч; Инг – мыши после внутрибрюшинной инъекции раствора специфического ингибитора p38 – p38 Inhibitor XI (Merck, 0,68 мкМ на кг массы) в 0,9% NaCl; Инг + ЭМИ – животные, облученные ЭМИ СВЧ через час после инъекции раствора p38 Inhibitor XI, $n = 5$. * – Различия достоверны по сравнению с группой «Контроль», $p < 0,05$; + – различия достоверны по сравнению с группой «Ингибитор», $p < 0,05$; ^ – различия достоверны по сравнению с группой «ЭМИ СВЧ», $p < 0,05$.

контрольным уровнем. Тем не менее не обнаружено токсическое действие p38 Inhibitor XI ни на уровне концентрации цитокинов в сыворотке крови мышей (рис. 3), ни на уровне продукции белков Hsp72, Hsp90, TLR4 (рис. 2),

ни при исследовании активности сигнальных путей NF-κB, JNK и IRF3 (рис. 1).

Ингибитор p38 снижает чувствительность организма мышей к действию ЭМИ СВЧ на уровне неспецифических защитных сигнальных

путей. Облучение сантиметровыми волнами животных с предварительно заблокированной активностью p38 приводило к существенному снижению СВЧ-вызванной активности сигнального каскада NF-κB. Как показано на рис. 1, группа «Ингибитор + ЭМИ СВЧ» характеризуется достоверно сниженным уровнем фосфорилирования NF-κB и IKK в спленоцитах мышей как по сравнению с группой «Ингибитор», так и по сравнению с группой «ЭМИ СВЧ». Тем не менее животные с заблокированной активностью p38 проявляли чувствительность к действию электромагнитных волн: уровень фосфорилирования p38 и IRF3 в клетках селезенки мышей группы «Ингибитор + ЭМИ СВЧ» был достоверно повышен по сравнению с необлученными животными с заблокированной активностью p38.

Экспрессия TLR4 и индуцибельных белков теплового шока в спленоцитах облученных мышей со сниженной активностью p38 MAPK. Показано, что уровень продукции рецепторного белка TLR4 в клетках селезенки облученных мышей со сниженной активностью протеинкиназы p38 был достоверно повышен по сравнению с группой «Ингибитор» (рис. 2). Тем не менее электромагнитные волны не вызывали усиления экспрессии стресс-индуцибельных белков Hsp90 и Hsp72 в спленоцитах мышей после инъекции p38 Inhibitor XI: в группах «Ингибитор» и «Ингибитор + ЭМИ СВЧ» не было выявлено отличий в уровнях экспрессии этих белков. Более того, как видно из рис. 2, продукция Hsp90 и Hsp72 в спленоцитах облученных животных с заблокированной активностью p38 была существенно ниже, чем у облученных мышей без использования ингибитора (группы «ЭМИ СВЧ» и «Ингибитор + ЭМИ СВЧ»).

Влияние ЭМИ СВЧ на концентрацию цитокинов в крови облученных мышей с редуцированной активностью p38. Как показано на рис. 3, облучение мышей ЭМИ СВЧ через час после инъекции p38 Inhibitor XI (группа «Ингибитор + ЭМИ СВЧ») не вызывало изменения концентрации ни одного из исследованных цитокинов – ни по сравнению с группой «Контроль», ни по сравнению с группой «Ингибитор». Более того, при облучении животных с редуцированной активностью p38 мы наблюдали достоверное снижение содержания в сыворотке крови IL-17, TNF-α и IFN-γ (сравним группу «Ингибитор + ЭМИ СВЧ» и группу «ЭМИ СВЧ»).

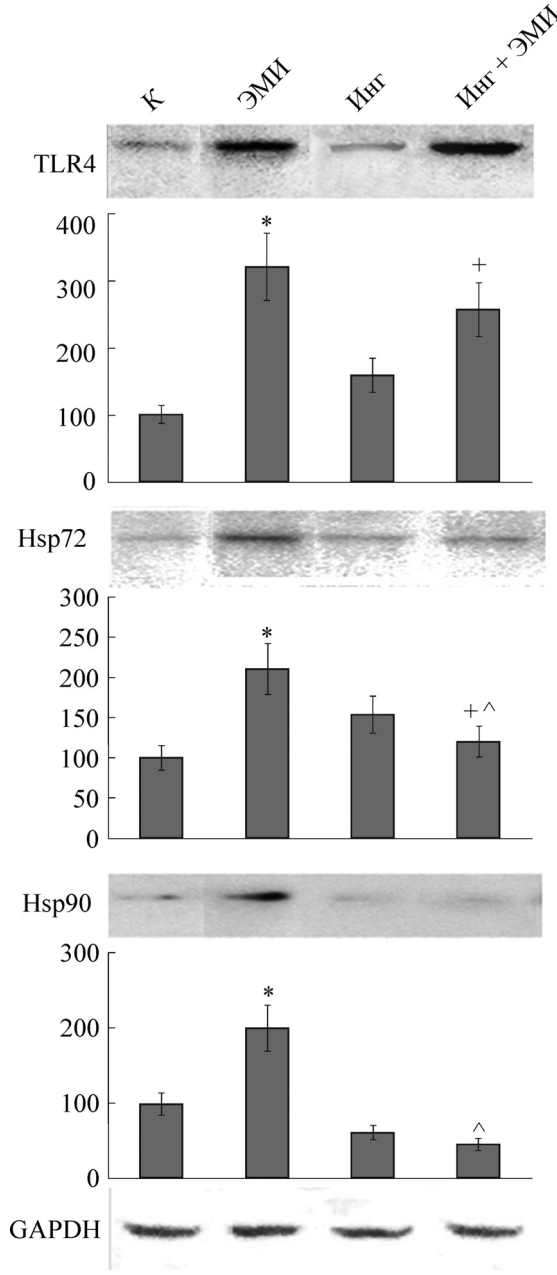


Рис. 2. Продукция рецепторного белка TLR4 и стресс-индуцибельных белков теплового шока Hsp72 и Hsp90 в спленоцитах мышей. Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Различные стрессовые факторы окружающей среды, такие как гипоксия, окислительный стресс, осмотический шок, ультрафиолет, а также действие провоспалительных цитокинов приводит к активации протеинкиназы p38, в частности, ее фосфорилированию в области треонина/тирозина [15,16]. В результате наблюдаются конформационные изменения структуры

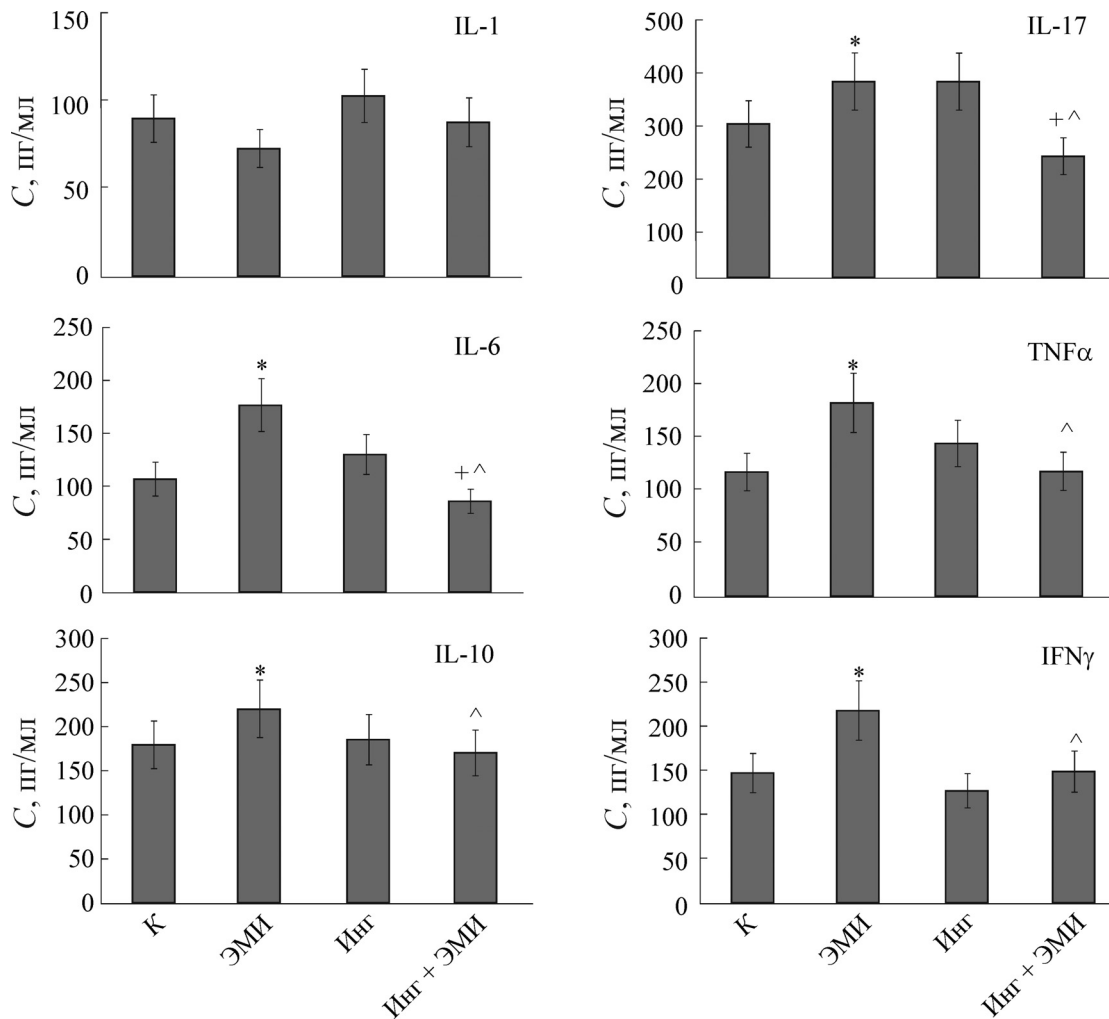


Рис. 3. Концентрация цитокинов IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α , IFN- γ в сыворотке крови мышей, облученных ЭМИ СВЧ, получивших инъекцию р38 Inhibitor XI, а также при совместном действии этих факторов. По оси абсцисс – название групп, по оси ординат – концентрация цитокинов, в пг/мл. Условные обозначения те же, что на рис. 1.

молекулы и модификации каталитической активности и сродства к субстрату р38 [17]. В нормальных условиях протеинкиназа может локализоваться как в ядре, так и в цитоплазме, а в условиях стресса характерна ядерная локализация р38 [18]. Эта киназа управляет экспрессией генов таких цитокинов, как IL-1, IL-6, TNF- α , с помощью различных сигнальных путей, в том числе через регуляцию стабильности мРНК и процессов трансляции. Исследование роли этой митоген-активируемой протеинкиназы в патофизиологических процессах, происходящих в организме млекопитающих, является сложной задачей, поскольку животные с нокаутом гена р38 погибают на стадии эмбриона вследствие сосудистых и плацентарных дефектов [19,20]. Подобные исследования проводятся либо с применением моделей животных с но-

каутом гена р38 в определенных типах клеток, либо с применением специфических ингибиторов активности этой киназы, что было использовано в настоящей работе. Известно, что практически для всех исследованных типов клеток с нокаутом гена р38 характерно снижение чувствительности к апоптогенным и стрессовым стимулам по сравнению с нормальными клетками [21].

В настоящее время существуют доказательства того, что сигнальные пути митоген-активируемых протеинкиназ могут быть активированы в ответ на воздействие ЭМИ разных частотных диапазонов. Так, было обнаружено, что низкоинтенсивные радиоволны вызывают активацию стрессового пути белка теплового шока 27 (Hsp27)/р38 в эндотелиальных клетках человека [22], внеклеточной регулируемой киназы,

JNK и p38 в эмбриональных стволовых клетках [23] и в некоторых других не-эндотелиальных клетках [24]. В более поздних работах было показано, что низкоинтенсивные радиоволны неспособны усиливать активацию p38 в изолированных эндотелиальных клетках млекопитающих [25,26]. Вероятно, под действием радиоволн эта протеинкиназа активируется в клетках наиболее чувствительных систем организма – нервной и иммунной. Действительно, недавно было показано, что радиочастотное излучение 3G-телефонов приводит к усилению фосфорилирования Hsp27, Hsp70 и p38 в клетках мозга крыс [27], причем электромагнитные волны активируют микроглию мозга за счет сигнального пути p38 митоген-активируемой протеинкиназы [28]. Результаты настоящей работы подтверждают способность низкоинтенсивных радиоволн усиливать активацию p38 в клетках одного из основных органов иммунной системы млекопитающих – селезенки. Более того, установлено, что p38 митоген-активируемой протеинкиназы играет важную роль в чувствительности организма мышей к электромагнитным волнам. В отличие от животных с нормальным уровнем активности этой протеинкиназы, облучение ЭМИ СВЧ мышей с заблокированной активностью p38 не вызывало активации сигнального пути NF-κB, универсального фактора транскрипции, контролирующего экспрессию генов иммунного ответа.

Транскрипционный фактор NF-κB регулирует экспрессию более 500 генов, в том числе генов цитокинов, хемокинов, ростовых факторов, иммунорегуляторных молекул, молекул клеточной адгезии, белков острой фазы, генов стрессового ответа, рецепторов клеточной поверхности, регуляторов апоптоза вирусов, транскрипционных факторов и факторов, регулирующих рост, ферментов, гормонов и некоторых других [29]. При активации классического сигнального пути NF-κB происходит модификация активности гетеродимерного комплекса, состоящего из субъединиц p50, которая определяет ДНК-связывающую активность, и p65, выполняющей трансактивирующую функцию [30]. В нормальных условиях NF-κB находится в цитоплазме и связан с ингибиторной молекулой IκB. Под действием различных стрессов обычно происходит активация IKK-комплекса, что приводит к фосфорилированию серинов 32 и 36 белка IκB. Затем происходит деградация IκB-альфа, что способствует освобождению NF-κB в состоянии p50/p65 комплекса и его переносу в ядро. В дополнение к IKK-опосредованной деградации IκB, для канонической ак-

тивации NF-κB важны и другие события. Наиболее охарактеризованным из них является фосфорилирование NF-κB субъединицы p65. Как было показано, некоторые киназы, такие как PKA, PKC, SKI, GSK-3β, T2K, PI3K, Akt, p38, NIK, регулируют фосфорилирование p65 напрямую или косвенно [30–32]. Например, казеинкиназа 2 влияет не только на фосфорилирование IκB, но и на активацию IKK-α/IKKβ [33], а также непосредственно на фосфорилирование NF-κB p65 [34,35]. Ранее нами было показано, что казеинкиназа 2 участвует в ответах иммунных клеток на ЭМИ СВЧ: в условиях облучения активация транскрипционного фактора NF-κB происходила не только по классическому пути, но и по альтернативному сигнальному пути с участием казеинкиназы 2 [36]. Очевидно, что p38 – фактор, способствующий NF-κB активации под действием физических факторов [37,38], также участвует в регуляции эффектов ЭМИ СВЧ, обусловленных активацией NF-κB сигнализации [12,39]. Действительно, в настоящей работе было обнаружено, что у облученных мышей с заблокированной активностью p38, кроме снижения фосфорилирования NF-κB в спленоцитах, не наблюдалось изменений содержания индуцибельных белков теплового шока (Hsp72 и Hsp90α) в клетках селезенки и провоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Это отличается от результатов по исследованию эффектов ЭМИ СВЧ у животных с нормальной активностью p38, для которых было показано стрессовое действие ЭМИ СВЧ. В настоящей работе показано, что при реализации неспецифических защитных ответов организма мышей на действие ЭМИ СВЧ важную роль играет митоген-активируемая протеинкиназа p38, причем это происходит через регуляцию активности ключевого сигнального пути – NF-κB. Тем не менее результаты настоящей работы доказывают, что применение p38 Inhibitor XI неспособно полностью устранить активацию сигнальных путей p38 и IPF3 и гиперэкспрессию TLR4 в клетках селезенки мышей, облученных ЭМИ СВЧ.

Таким образом, митоген-активируемая протеинкиназа p38 участвует в регуляции неспецифических защитных ответов иммунной системы мышей на ЭМИ СВЧ, но не определяет чувствительность организма к действию сверхслабых электромагнитных волн сантиметрового диапазона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 14-44-03558 и 16-34-00231).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Gherardini, G. Ciuti, S. Tognarelli, and C. Cinti, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (4), 5366 (2014).
2. О. В. Глушкова, Дис. ... д-ра биол. наук (Институт биофизики клетки РАН, Пущино, 2015).
3. R. Seger and E. G. Krebs, *FASEB J.* **9** (9), 726 (1995).
4. Y. L. Hu, S. Li, J. Y. Shyu, and S. Chien, *Am. J. Physiol.* **277**, 1593 (1999).
5. Y. Yang, S. C. Kim, T. Yu, et al., *Mediators Inflamm.* 352371 (2014). DOI: 10.1155/2014/352371.
6. O. Ananieva, J. Darragh, C. Johansen, et al., *Nat. Immunol.* **9** (9), 1028 (2008).
7. A. Risco, C. del Fresno, A. Mambol, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (28), 11200 (2012).
8. I. Belyaev, in *Non-thermal effects and mechanisms of interaction between electromagnetic fields and living matter*, Ed. by L. Giuliani and M. Soffritti (Ramazzini institute Bologna, Italy, 2010), pp. 187–218.
9. E. G. Novoselova, E. E. Fesenko, V. R. Makar, and V. B. Sadovnikov, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **49**, 37 (1999).
10. E. E. Fesenko, V. R. Makar, E. G. Novoselova, and V. B. Sadovnikov, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **49**, 29 (1999).
11. О. В. Глушкова, Е. Г. Новоселова, М. О. Хренов и др., *Биофизика* **53** (1), 93 (2008).
12. O. V. Glushkova, M. O. Khrenov, T. V. Novoselova, et al., *Int. J. Radiat. Biol.* **91** (4), 321 (2015).
13. Е. Г. Новоселова, О. В. Глушкова, Д. А. Черенков и др., *Биохимия.* **71** (4), 471 (2006).
14. W. Lumeras, L. Vidal, B. Vidal, et al., *J. Med. Chem.* **54** (22), 7899 (2011).
15. J. D. Ashwell, *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 53 (2006).
16. P. P. Roux and J. Blenis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320 (2004).
17. A. Cuadrado and A. R. Nebreda, *Biochem. J.* **429** (3), 403 (2010).
18. T. Zarubin and J. Han, *Cell Res.* **15**, 11 (2005).
19. R. H. Adams, A. Porras, G. Alonso, et al., *Mol. Cell* **6**, 109 (2000).
20. M. Allen, L. Svensson, M. Roach, et al., *J. Exp. Med.* **191**, 859 (2000).
21. A. Porras, S. Zuluaga, E. Black, et al., *Mol. Biol. Cell* **15**, 922 (2004).
22. D. Leszczynski, S. Joenvaara, J. Reivinen, and R. Kuokka, *Differentiation* **70**, 120 (2002).
23. H. Sauer, M. M. Bekhite, J. Hescheler, and M. Wartenberg, *Exp. Cell Res.* **304**, 380 (2005).
24. K. Nie and A. Henderson, *J. Cell. Biochem.* **90**, 1197 (2003).
25. J. Friedman, S. Kraus, Y. Hauptman, et al., *Biochem. J.* **405**, 559 (2007).
26. A. Q. Sheikh, T. Taghian, B. Hemingway, et al., *J. Roy. Soc. Interface* **10**, 201205 (2013).
27. K. K. Kesari, R. Meena, J. Nirala, et al., *Cell Biochem. Biophys.* **68** (2), 347 (2014).
28. L. L. Yang, Y. Zhou, W. D. Tian, et al., *Neurotoxicology* **52**, 144 (2016).
29. A. Kumar, Y. Takada, A. M. Boriek, and B. B. Aggarwal, *J. Mol. Med.* **82**, 434 (2004).
30. S. Ghosh and M. Karin, *Cell* **109**, 81 (2002).
31. N. Silverman and T. Maniatis, *Genes Dev.* **15**, 2321 (2001).
32. S. C. Sun and G. Xiao, *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 405 (2003).
33. S. F. Eddy, S. Guo, E. G. Demicco, et al., *Cancer Res.* **65**, 11375 (2005).
34. I. Dominguez, G. E. Sonenshein, and D. C. Seldin, *Cell Mol. Life Sci.* **66** (11–12), 1850 (2009).
35. Ю. Л. Володина и А. А. Штиль, *Молекуляр. биология* **46** (3), 423 (2012).
36. О. В. Глушкова, М. О. Хренов, Т. В. Новоселова и др., *Докл. АН* **464**, 260 (2015).
37. L. Vermeulen, G. De Wilde, P. Van Damme, et al., *EMBO J.* **22**, 1313 (2003).
38. S. Terazawa, S. Mori, H. Nakajima, et al., *PLoS One* **10** (8), e0136311 (2015).
39. E. G. Novoselova, M. O. Khrenov, O. V. Glushkova, et al., *Mediators of Inflammation*, 724838 (2014). DOI: 10.1155/2014/724838.

The Role of p38 Protein Kinase in Mice Responses to Low-Intensity Electromagnetic Radiation in Centimeter Range

O.V. Glushkova*, M.O. Khrenov*, E.V. Vinogradova* **, S.M. Lunin*,
E.E. Fesenko*, and E.G. Novoselova*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The study was aimed at investigating the role of the p38 mitogen-activated protein kinase in the regulation of cell responses to ultralow centimeter microwaves (8.15–18.0 GHz, 1 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, 1 h) (EMI SHF) in male Balb/c mice. The level of phosphorylation of proteins in signaling cascades NF- κB (p65, IKK), JNK, and IRF3 was estimated as well as expression of TLR4 receptor, stress-inducible heat-shock proteins Hsp72 and Hsp90 in splenic lymphocytes, and blood serum pro- and anti-inflammatory IL-10 cytokines were measured. The inhibitor of p38 signaling pathway (p38 Inhibitor XI) was shown to reduce susceptibility to ultralow ultrahigh frequency electromagnetic radiation. It was evidenced by the decreases in radiation-induced NF- κB signaling pathway activation, expression of stress-inducible heat-shock proteins Hsp72 and Hsp90 in splenic cells, and accumulation of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α , IFN- γ) in blood serum from irradiated mice pretreated with the p38 Inhibitor XI. However, p38 Inhibitor XI did not attenuate activation of p38 and IRF3 signaling pathways and overexpression of TLR4 in splenic cells from irradiated mice. Therefore, p38 mitogen-activated protein kinase is involved in the regulation of non-specific defense responses, but have no influence on sensitivity of mice to ultralow ultrahigh frequency electromagnetic radiation.

Key words: low intensity ultrahigh frequency electromagnetic radiation, p38, NF- κB , IRF3, JNK, TLR4, cytokines, heat shock proteins, mice