

НЕИОНИЗИРУЮЩИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ

УДК 577.1:599.323.4:537.8:611.08:611.81

ОЦЕНКА РЕАКЦИИ МОЗГА МЫШЕЙ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ
НАНОСЕКУНДНЫХ МИКРОВОЛНОВЫХ ИМПУЛЬСОВ
ПО ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА C-FOS

© 2017 г. А. В. Керей^{1,2,*}, М. А. Большаков^{1,3}, М. Ю. Ходанович³, Н. М. Немирович-Данченко³,
О. П. Кутенков¹, В. В. Ростов¹

¹Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск, Россия

²Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*e-mail: kereya21@mail.ru

Поступила в редакцию 23.05.2016 г.

Исследовали влияние наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения (ИПМИ, частоты повторения 6, 13 и 16 Гц, пиковая интенсивность 1500 Вт/см²) на головной мозг мышей. Эффект воздействия оценивали по уровню нейрональной активности в структурах головного мозга мышей с помощью маркера нейрональной активности — белка раннего ответа c-fos. Выявлено, что после облучения уровень нейрональной активности в гипоталамусе и ретикулярной формации увеличивается, а в моторной коре не меняется. Эффект повышения уровня нейрональной активности зависит от частоты повторения импульсов.

Ключевые слова: импульсно-периодическое микроволновое излучение, наносекундные импульсы, мозг мышей, нейрональная активность, белок c-fos

DOI: 10.7868/S0869803117020072

Предыдущими экспериментами было продемонстрировано [1, 2], что наносекундное импульсно-периодическое микроволновое излучение (ИПМИ) влияет на деятельность головного мозга мышей. В результате облучения головы животных (по 4000 импульсов однократно в течение 10 дней) ИПМИ с высокой пиковой интенсивностью — 1500 Вт/см² наблюдалось разнонаправленное изменение целого ряда физиологических показателей: поведенческих реакций в “открытом поле”, динамики общей двигательной активности, потребления корма, массы тела животных и массы внутренних органов [1, 2]. Эффекты изменения показателей зависели от частоты повторения импульсов и наиболее эффективными оказались воздействия ИПМИ с частотами повторения 6, 13, 16 и 22 Гц.

Прямая регистрация электрической активности мозга во время воздействия электромагнитных излучений не всегда возможна или существенно затруднена [3]. Поэтому для изучения деятельности мозга в таких условиях удобнее использовать поведенческие тесты, которые дополняются идентификацией мозговых структур, ответственных за наблюдаемые эффекты. В связи с этим распространение получило изучение экспрессии белка раннего

реагирования c-fos как маркера нейрональной активности в структурах мозга при воздействии на организм различных факторов [4]. Этот белок активируется при самых разнообразных влияниях на нервную клетку, в том числе и в ответ на увеличение электрической активности самих нейронов [5]. В спокойном состоянии клетки он показывает небольшой фоновый уровень активности, но она повышается в ответ на какие-либо новые информационные процессы, причем экспрессия c-fos наблюдается в разных отделах центральной нервной системы [6, 7]. У животных, предрасположенных к эмоциональному стрессу, максимальная экспрессия белка c-fos отмечена в коре полушарий, миндалине, обонятельных структурах гипоталамуса и стволовом отделе мозга [8]. Например, после воздействия 900 МГц микроволновым излучением на лабораторных животных наблюдали увеличение экспрессии белка c-fos в области нео- и палеокортекса [9]. После длительного воздействия ослабленным геомагнитным полем на крыс было обнаружено повышение агрессивности животных на фоне снижения экспрессии белка c-fos в опиоидергических нейронах [10]. Таким образом, использование белка раннего реагирования c-fos как маркера нейрональной активности в структурах мозга при воздействии на него какого-либо

фактора может способствовать выявлению зон в головном мозге, ответственных за реакцию на электромагнитные воздействия, в том числе на импульсно-периодическое микроволновое излучение.

Исходя из вышеизложенного, цель данной работы заключалась в исследовании уровня белка раннего ответа *c-fos* и оценке нейрональной активности в некоторых структурах облученного наносекундным ИПМИ головного мозга мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Эксперименты выполнены на половозрелых белых мышах самцах массой 25–30 г. Животных содержали при комнатной температуре и постоянной влажности, в клетках при световом режиме освещения 12 : 12, на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Исследование проводили в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными и санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник [11]. Мыши были разделены на облученных и ложнооблученных (ЛО, контроль), по шесть животных для каждого из использованных режимов воздействия. В ходе исследования контрольных мышей подвергали всем аналогичным манипуляциям, что и облученных, но без включения микроволнового генератора. Процедуры облучения проводили в одно и то же время суток (с 9.00 до 11.00 ч). Для обеспечения локального воздействия на головной мозг и устранения возможности облучения всего организма тело животных (кроме головы) на время облучения покрывали радиопоглощающим материалом. Голова животного в течение 10 дней подвергалась ежедневному однократному воздействию ИПМИ (4000 импульсов за сеанс) с частотами повторения 6, 13 и 16 Гц. Эти частоты по результатам ранее проведенных исследований показали наибольшую биологическую эффективность. Кроме того, они соответствуют основным частотам спектра электроэнцефалограмм мозга, и, как полагают некоторые авторы [12], воздействие с такими частотами может наиболее эффективно влиять на деятельность мозга. Продолжительность облучения варьировала от 3 до 9 мин в зависимости от частоты повторения импульсов. В качестве источника ИПМИ использовали лабораторный импульсный генератор на основе магнетрона МИ-505 (изделие серийного производства ОАО “Тантал”, Россия). Несущая частота генератора составляла 10 ГГц, выходная пиковая мощность 180 кВт, длительность импульсов на половинном уровне мощности 100 нс, частота повторения – до 25 Гц. Пиковую интенсивность, составившая во всех экспериментах 1500 Вт/см², оценивали с помощью стандартных методик на основе антенных

измерений и калориметрических калибровок [13]. Во время воздействий животных в пластиковых контейнерах диаметром 3 см размещали в дальней зоне рупора антенны на расстоянии 20 см. Это обеспечивало воздействие на область головы мышей при средних значениях интенсивности от 0.6 до 2.4 мВт/см². Данные значения не выходят за пределы максимальных ПДУ в производственных условиях для времени экспозиции несколько минут (СанПиН 2.2.4.1191-03 “Электромагнитные поля в производственных условиях”, 2003). Мыши подвергались облучению с удельной поглощенной мощностью (УПМ) 3.6, 7.8 и 9.6 мВт/г при частотах повторения 6, 13 и 16 Гц соответственно. УПМ оценивали в соответствии с общепринятой методикой [14] по скорости нагрева тканей головного мозга. Определение скорости нагрева, а также контроль температуры тканей во время экспериментов осуществляли с помощью волоконно-оптического термометра МТ-4МО-1 (Россия).

Эвтаназию животных по завершении полного цикла облучения проводили путем декапитации. Мозг облученных и ложнооблученных мышей подвергали через систему кровообращения перфузии для доставки фиксатора мозга формалина. Далее образцы мозга мышей извлекали, последовательно выдерживали сначала в 10%-ной сахарозе на натрий-фосфатном буфере (PBS), затем в 20%-ной сахарозе на PBS. Выдерживание проводили в каждом растворе сахарозы до осаждения мозга на дно флакона, после чего образцы замораживали в парах жидкого азота и помещали на хранение при температуре –75°C. Срезы головного мозга толщиной 20 мкм были получены с помощью криостата Thermo HM 525 (Германия) при температуре –26°C. Для выявления структур мозга, изменяющих свою нейрональную активность после воздействия ИПМИ, использовали метод иммуногистохимического окрашивания срезов мозга. Этот метод является ключевым в оценке степени активации экспрессии белка *c-fos*, он включает в себя комплекс методик, основанных на микроскопировании срезов тканей и на способности немеченых первичных антител связываться с искомым антигеном белка раннего ответа *c-fos* и далее выявляться при помощи вторичных меченых антител. Осуществление высокоспецифичной иммунной реакции антиген-антитело в срезах тканей сопровождается цветной реакцией, видимой в световой микроскоп, либо флуоресценцией в ультрафиолетовом диапазоне [4]. В качестве первичных и вторичных антител использовали антитела к белкам *c-fos* (sc-52, Rabbit, фирма “Santa Cruz Biotechnology” (США); Alexa Fluor® 488, A-21206, donkey anti-rabbit (фирма “Jackson Immuno Research Labourite” (Великобритания)). В проведенной работе были изучены состояния вентромедиального и дорсомедиаль-

ного ядер гипоталамуса, ретикулярной формации и моторной коры. Для определения уровня нейрональной активности в указанных структурах мозга проводили анализ микрофотографий срезов мозга, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z1 ("CarlZeiss", Германия). При анализе в программе "Imaris" проводили автоматический подсчет активированных (экспрессирующих белок *c-fos*) нейронов, выраженных в процентах относительно общего количества нервных клеток для исследуемой структуры на микрофотографиях в квадратах 500×500 нм. Всего было проанализировано 678 микрофотографий структур срезов мозга. Полученные результаты подвергали статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statsoft STATISTICA for Windows 8.0, при которой рассчитывалась средняя арифметическая величина показателя и ее ошибка. Значимость различий между показателями облученных и ложно облученных животных определяли с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из результатов проведенных экспериментов следует, что ежедневное воздействие 4000 наносекундных импульсов ИПМИ в течение 10 дней оказывает влияние на головной мозг мышей. Это проявляется в изменении уровня нейрональной активности в ядрах гипоталамуса (рис. 1) и ретикулярной формации. Такие эффекты оказались зависимыми от частоты повторения импульсов.

10-кратное воздействие ИПМИ на мозг с частотой повторения 16 Гц вызывало увеличение количества клеток с повышенным уровнем белка раннего ответа *c-fos* в вентромедиальном и дорсальном ядрах гипоталамуса, в то время как после воздействия с частотами повторения 6 и 13 Гц значимого изменения уровня активированных нейронов в гипоталамусе не наблюдалось (рис. 2). В ретикулярной формации по истечении 10-кратного воздействия было обнаружено увеличение процента клеток с повышенной экспрессией белка *c-fos* только после облучения мозга с частотой повторения 13 Гц (рис. 3). Воздействия с частотами 6 и 16 Гц оказались неэффективными. Реакция моторной коры после аналогичных облучений головного мозга мышей оказалась значительно меньшей в сравнении с гипоталамусом и ретикулярной формацией (рис. 4). По-видимому, нейроны коры в течение 10 дней воздействия успели адаптироваться к воздействию ИПМИ, и поэтому статистически значимого повышения уровня нейрональной активности не было обнаружено. Более того, выявилась определенная тенденция к снижению этого показателя после облучения с частотой 6 Гц. По-видимому, наблюдавшееся в

данной работе отсутствие изменения нейрональной активности в моторной коре может быть объяснено тем, что она регистрировалась после 10 дней облучения, когда, согласно ранее полученным результатам [2], общая двигательная активность облученных мышей значимо не отличалась от таковой у ложнооблученных, и, соответственно, электрическая активность нейронов должна была быть сопоставима у ложнооблученных и облученных животных.

Таким образом, проведенные эксперименты обнаружили изменение уровня нейрональной активности в ядрах гипоталамуса и ретикулярной формации после облучения головного мозга мышей наносекундным ИПМИ, что подтвердило предположение о прямом влиянии этого фактора на деятельность головного мозга.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени имеются единичные работы, посвященные изучению нейрональной активности головного мозга после воздействия электромагнитных излучений. Поэтому проведенные эксперименты подтвердили возможность использования методики определения белка *c-fos* для анализа эффектов воздействия ЭМИ. На фоне отсутствия значимых изменений в моторной коре увеличение уровня нейрональной активности в гипоталамусе и ретикулярной формации, по-видимому, физиологически более значимо. В частности, в результате воздействия активность нейронов в указанных структурах усиливается с соответствующим усилением процессов возбуждения. Стоит обратить внимание, что физиологически более значимым может быть усиление процессов возбуждения в структурах гипоталамуса, что может найти отражение в повышении уровня нейрональной активности после воздействия наносекундным ИПМИ. Это может сопровождаться изменением метаболической ситуации в организме после облучения головного мозга. Как было ранее показано [16], воздействие наносекундным ИПМИ может инициировать перекисное окисление липидов в клетках. Не исключено, что аналогичные процессы перекисидации мембран в ходе воздействия реализуются и в нейронах гипоталамуса. В свою очередь, это должно вызывать изменения в липидном матриксе мембран нейронов и, соответственно, изменения лиганд-рецептор опосредованных реакций [17]. Это должно сопровождаться изменением аффинности рецепторов гипоталамуса к гормонам, в том числе, участвующим в регуляции энергетического метаболизма в организме, таким как лептин, γ -пептид и грелин [18]. Именно такие эффекты могут сопровождаться изменением физиологических показателей в облученном организме,

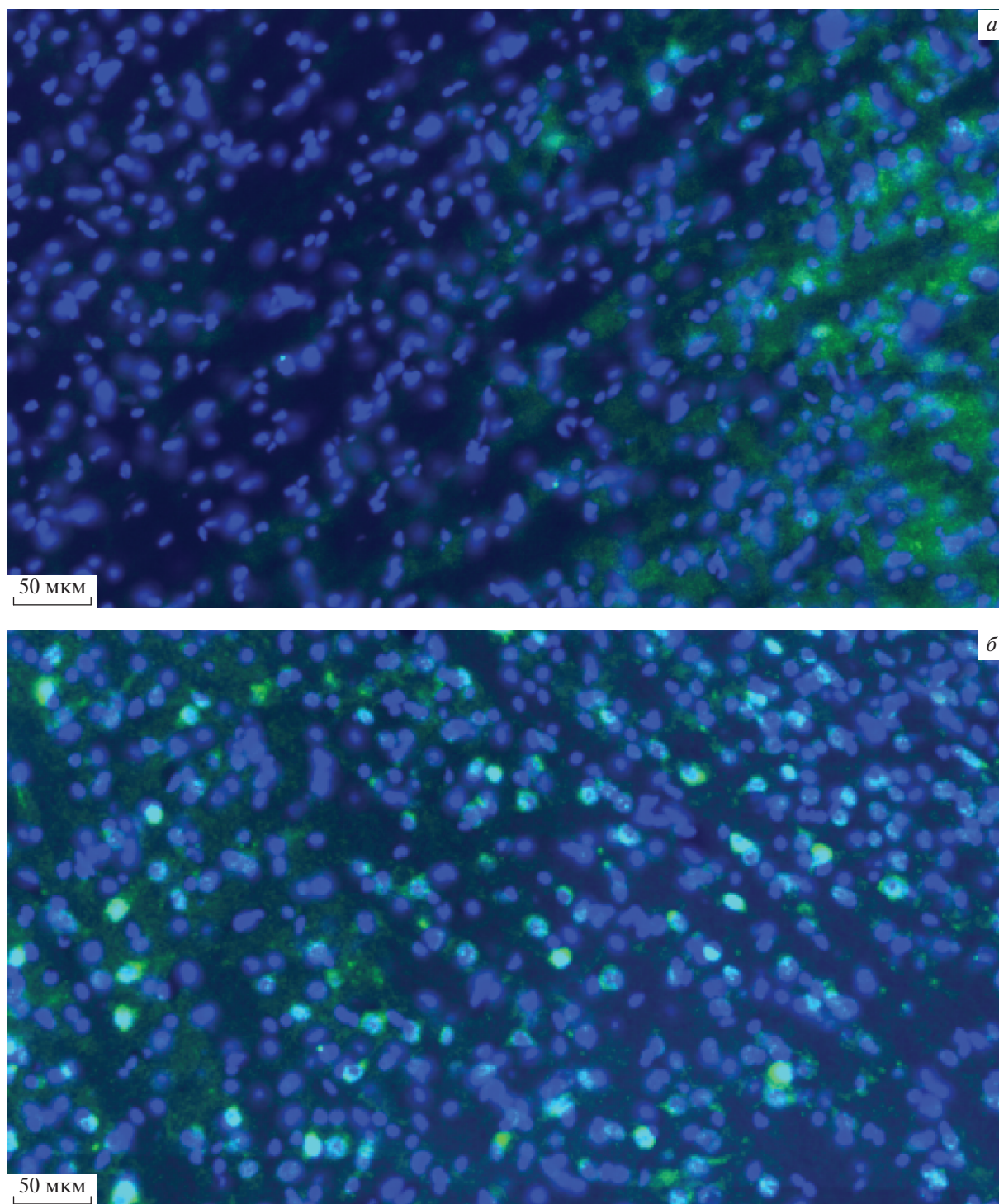


Рис. 1. Микрофотографии срезов мозга мышей с нейронами, маркированными белком *c-fos* в дорсомедиальном гипоталамусе у ложнооблученных (*а*) и облученных (*б*) животных ИПМИ с частотой 16 имп./с. Примечание: зеленым цветом показаны нейроны, активированные белком *c-fos*.

изменяющих потребление пищи, массы тела животных и массы внутренних органов [1, 2].

Таким образом, результаты проведенного исследования нейрональной активности в вентро-

муса и ретикулярной формации головного мозга после воздействия на него наносекундным ИПМИ подтверждают возможность прямого влияния на головной мозг. Нейрональная активность ядер гипоталамуса указывает на возмож-

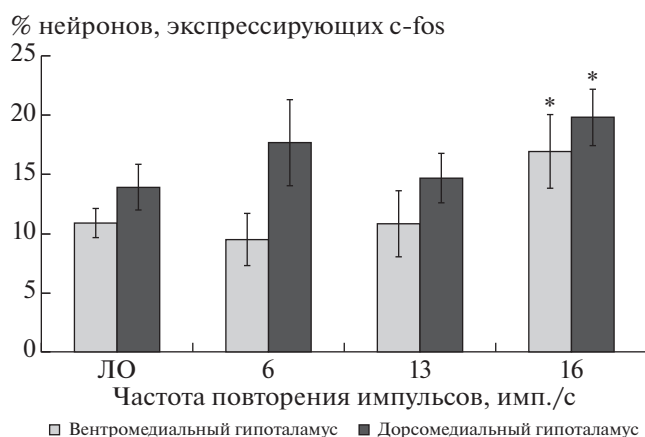


Рис. 2. Процент нейронов, экспрессирующих белок c-fos в вентромедиальном и дорсомедиальном ядрах гипоталамуса. *Различия статистически значимы по отношению к показателям ЛО животных ($p \leq 0.05$).

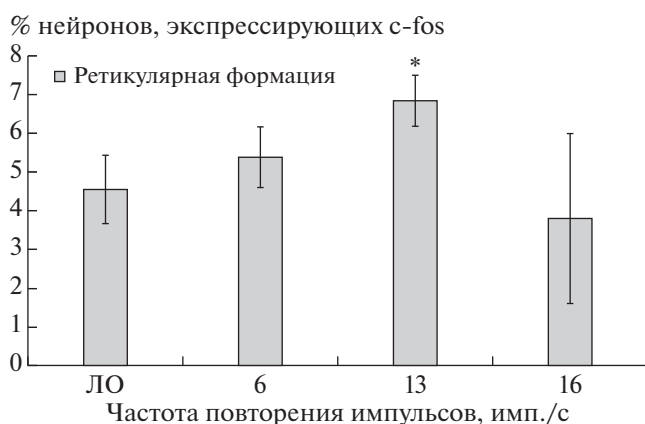


Рис. 3. Процент нейронов, экспрессирующих белок c-fos в ретикулярной формации. *Различия статистически значимы по отношению к показателям ЛО животных ($p \leq 0.05$).

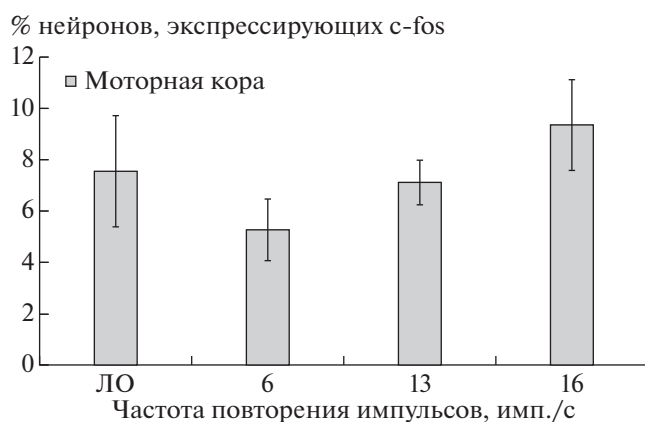


Рис. 4. Процент нейронов, экспрессирующих белок c-fos в моторной коре после облучения головного мозга ИПМИ.

ность модификации энергетического метаболизма при помощи данного фактора. Результаты экспериментов не позволяют определенно говорить о связи повышения нейрональной активности в ретикулярной формации с функционированием других структур мозга, в том числе корковых отделов. Этот аспект требует отдельного специального исследования. Тем не менее, результаты проведенных экспериментов позволяют характеризовать метод определения уровня нейрональной активности по экспрессии белка раннего ответа c-fos как удобный способ оценки состояния мозга, когда невозможно напрямую регистрировать его электрическую активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Керя А.В., Большаков М.А., Замощина Т.А. и др. Поведенческие и метаболические реакции лабораторных мышей на воздействие наносекундного импульсно-периодического микроволнового излучения на головной мозг // Изв. высших учебных заведений. Физика. 2014. Т. 57. № 12/2. С. 198–203.
2. Керя А.В., Большаков М.А., Замощина Т.А. и др. Двигательная активность лабораторных мышей после воздействия наносекундными импульсно-периодическими микроволновым и рентгеновским излучениями // Междунар. науч.-исслед. журн. 2015. № 4(35). С. 14–19.
3. Tyazhelov V.V., Tigranian R.E., Khizhniak E.P. New artifact-free electrodes for recording of biological potential in strong electromagnetic fields // Radio Sci. 1977. V. 12/6S. P. 121–123.
4. Sundquist S.J., Nisenbaum L.K. Fast Fos: rapid protocols for single- and double-labeling c-Fos immunohistochemistry in fresh frozen brain sections // J. Neurosci. Meth. 2005. P. 9–20.
5. VanElzakker M., Fevurly R.D., Breindel T. et al. Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the peripheral cortex // Learning and Memory. 2008. V. 12. № 15. P. 899–908.
6. Sheng M., Greenberg M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system // Neuron. 1990. V. 4. P. 477–485.
7. Судakov К.В., Умрюхин П.Е. Экспрессия гена c-fos при эмоциональном стрессе у крыс: эффекты пептида, вызывающего дельта-сон, и фрагмента АКТГ // Изв. НАН Беларуси. Серия мед.-биол. наук. 2001. № 1. С. 6–14.
8. Babaei P., Sudakov K.V. Stress induced c-fos expression in the rat brain is individualtypological dependent // Pathophysiol. Abstr. III Int. Congr. of Pathophysiology. 1998. V. 5. Suppl. 1. P. 221.
9. Carballo-Quintás M., Martínez-Silva I., Cadarso-Suárez C. et al. A study of neurotoxic biomarkers, c-fos and GFAP after acute exposure to GSM radiation at 900 MHz in the picrotoxin model of rat brains // Neurotoxicol. 2011. V. 32. № 4. P. 478–494.
10. Ходанович М.Ю., Гуль Е.В., Зеленская А.Е. и др. Влияние долговременного ослабления геомагнитного

- поля на агрессивность лабораторных крыс и активацию опиоидергических нейронов // Вестн. Томск. Гос. Ун-та. Биология. 2013. № 1(21). С. 146–160.
11. Euro guide on the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (Based on the revised Appendix A of the European Convention ETS 123) FELASA: Federation of European Laboratory Animal Science Associations. London (UK), 2007. 17 p. // www.felasa.eu.
 12. Chizhenkova R.A. Impulse fluxes of neuronal populations of the cerebral hemispheres on exposure to weak ultrahigh frequency electromagnetic radiation // Biophys. 2003. V. 48. № 3. P. 509–515.
 13. Klimov A.I., Eltchaninov A.A., Konobeeva E.Yu. Measurements of Parameters of X-Band High-Power Microwave Pulses // Rus. Phys. J. (Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Fiz). 2006. V. 49. № 11. P. 431–434.
 14. Pakhomov A.G., Prol H.K., Mathur S.P. et al. Role of Field Intensity in The Biological Effectiveness of Millimeter Waves At A Resonance Frequency // Bioelectrochem. Bioenergetics. 1997. V. 43. Issue 1. P. 27–33.
 15. Ефимов В.М., Ковалева В.Ю. Многомерный анализ биологических данных. СПб., 2008. 86 с.
 16. Bolshakov M.A., Knyazeva I.R., Rostov V.V. et al. Initiation of free-radical oxidation in albino mice by exposure to pulse periodic microwaves and X-rays // Biophys. 2005. V. 50. № 1. P. S104–S109.
 17. Philippova T.M., Novoselov V.I., Alekseev S.I. Influence of microwaves on different types of receptors and the role of peroxidation of lipids on receptor-protein shedding // Bioelectromagnetics. 1994. V. 15. № 3. P. 183–92.
 18. Dietrich M.O., Horvath T.L. Neural regulation of food intake and energy balance // Nature Reviews. Neuroscience. 2010. <http://www.nature.com/nrn/posters/feeding>.

Evaluation of Mice Brain Reactions after Nanosecond Microwave Pulses Using c-fos Expression

A. V. Kereya^{1,2}, M. A. Bolshakov^{1,3}, M. Yu. Khodanovich³, N. M. Nemirovich-Danchenko³,
O. P. Kutenkov¹, V. V. Rostov¹

¹*Institute of High-Current Electronics, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

²*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

³*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

*e-mail: kereya21@mail.ru

The effect of a nanosecond repetitively-pulsed microwave (PPMR, pulse repetition frequency 6, 13, and 16 Hz, peak power density 1500 W/cm²) on mouse brain structures was investigated. The effect was assessed by arousal in neuronal structures with c-fos proteins as a marker of neuronal activation. It has been found that neuronal activation in hypothalamus and reticular formation increases after irradiation, and it does not change in motor cortex. The effect depends on the pulse repetition frequency.