

БЛОКИРОВКА СТРЕССОРНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ КЛЕТОК МОЗГА КРЫС ТРАНСКРАНИАЛЬНОЙ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ

© 2018 г. Е.Б. Шадрин, В.О. Самойлов*, Я.С. Кацнельсон**, А.В. Ильинский, Н.Е. Иванова***, А.Ю. Иванов***, В.В. Бобинов***, М.М. Галагудза****, Ю.М. Забродская***, Е.В. Казацкая***, К.А. Кликунова*****, Т.В. Соколова***

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 26

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

**Premier Annecto Technologies, 181 North Clinton Street, Doylestown Pennsylvania PA, USA

***Российский научно-исследовательский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова – филиал Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова МЗ РФ, 191104, Санкт-Петербург, ул. Маяковского, 12

****Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова МЗ РФ, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

*****Санкт-Петербургский Государственный педиатрический медицинский университет МЗ РФ, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2

E-mail: shard.solid@mail.ioffe.ru

Поступила в редакцию 21.08.18 г.

Изучено влияние транскраниальной электромагнитной стимуляции на вызванное иммобилизационным стрессом повреждение клеток мозга крыс. Электромагнитную стимуляцию проводили микроволновым ($\lambda = 5,6$ мм) электромагнитным излучением с плотностью мощности 0,67, 1,3 и 2,0 Вт/см², промодулированным низкочастотными импульсами с частотой повторений 78 Гц. Во всех трех случаях выявлено статистически достоверное блокирующее действие электромагнитной стимуляции на процесс стрессорного повреждения клеток мозга (нейронов), установленное сравнением состояния клеток нейронной сети до и после стрессорного воздействия. Наиболее выраженный антистрессорный эффект обнаружен при использовании электромагнитной стимуляции мощностью 1,3 Вт/см². Предложена биофизическая модель механизма антистрессорного эффекта, согласно которой микроволновое излучение вызывает фазовый переход «глобула–клубок» в главном белке ликвора – альбумине, освобождая молекулу триптофана, зафиксированную внутри глобулы. Свободный триптофан, проникая с потоком ликвора в мозг, усиливает в нейронной сети мозга выработку серотонина, который и блокирует стрессорное воздействие.

Ключевые слова: транскраниальная электромагнитная стимуляция, клетки мозга, нейроны, иммобилизационный стресс.

DOI: 10.1134/S0006302918060169

Как известно [1,2], стресс, в частности иммобилизационный, провоцирует среди прочего обратимые и необратимые патологические изменения клеток нейронной сети мозга. Эти изменения состоят в возникновении баллонной дистрофии нейронов, сморщивании нейронов, генерации клеток-теней и т.п. В случае обратимых функциональных изменений защитные механизмы организма устраняют патологию за

обозримое время. В случае необратимых органических изменений это время стремится к бесконечности. Ускорению восстановления при обратимых изменениях способствует целый ряд методик, предотвращающих или купирующих развитие стрессорных патологических изменений клеток мозга [3]. Это проявляется в том, что появление баллонной дистрофии, сморщивания нейронов и т.п. «замедляется». В настоящей работе показано, что предотвратить патологические изменения клеток можно также с помощью транскраниальной электромагнитной

Сокращения: ТЭМС – транскраниальная электромагнитная стимуляция, УР – условный рефлекс.

стимуляции мозга (ТЭМС) (Transcranial Electromagnetic Stimulation – TEMS).

Следует заметить, что помимо блокировки стрессорных повреждений клеток, описанных в настоящей работе, известно также влияние ТЭМС на поведение лабораторных животных [4]. Оно заключается в том, что ТЭМС мозга самцов крыс электромагнитным излучением миллиметрового диапазона ($\lambda = 5,6$ и $7,1$ мм), промодулированного серией низкочастотных импульсов (78 Гц), в 50% случаев приводит к весьма сильному подавлению выработки условного рефлекса (УР) избегания болевого раздражителя. Еще в 25% случаев облучение приводило к полному торможению выработки УР. Потеря влияния на выработку УР-воздействия электромагнитного излучения возникает на фоне внутрибрюшинного введения животному блокатора серотонинергических рецепторов (китрила). ТЭМС мозга также не влияет на сохранность УР у животных, у которых был заранее выработан устойчивый УР. На основании полученных данных было высказано предположение о том, что использованная в цитируемой работе [4] ТЭМС способствует выработке серотонина, оказывающего тормозящее влияние на формирование нейронных связей, определяющих наличие УР. Кроме того, хорошо известно влияние микроволнового электромагнитного излучения на клетки кожных покровов при лечении экземы [5,6]. Таким образом, можно констатировать, что удары током при выработке у животных УР являются сильным стрессорным воздействием.

При этом, как будет показано в настоящей работе, ТЭМС представляет собой эффективный метод, блокирующий результаты стрессорного воздействия, а именно: ТЭМС блокирует как изменения в нейронной сети, необходимые для выработки УР после стрессорного токового воздействия, так и повреждения нейронов, вызванные иммобилизационным стрессом. Однако при исследовании влияния ТЭМС на процесс выработки УР после стрессорного токового воздействия в работе [4] гистологические исследования клеток мозга не проводили и детально не обсуждался механизм блокировки изменений в нейронной сети, возникающих под действием ТЭМС.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель работы состоит в изучении возможности блокады с помощью ТЭМС как процесса выработки УР, так и блокады различных изменений состояния клеток мозга, возникающих под влиянием иммобилизационного стресса.

Для выявления изменений состояния клеток были проведены гистологические исследования структур мозга самцов лабораторных крыс: определена выраженность реактивно-деструктивных изменений клеток мозга во всех группах животных, подвергавшихся стрессорному воздействию.

Задачами гистологического исследования являлись сравнительные анализы: количественных характеристик реактивно-деструктивных изменений нейронов во всех группах животных, полученные при исследовании гистологических препаратов коры, гиппокампа, глиоцитов белого вещества; а также количественных характеристик выраженности апоптоза по иммуногистохимическим препаратам с каспазой-3 в коре, гиппокампе и глиоцитах белого вещества. В задачу работы входила также статистическая обработка результатов гистологических исследований.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

ТЭМС мозга осуществляли в течение 10 мин непосредственно перед началом выработки УР или в течение 40 мин одновременно с осуществлением иммобилизационного стресса. Параметры стимуляции: длина волны электромагнитного излучения 5,6 мм (что соответствует частоте 54 ГГц), плотность мощности излучения $0,67$ Вт/см², площадь облучаемой области головы животного около 2 см². Поток электромагнитного излучения модулировали низкочастотной (78 Гц) последовательностью прямоугольных импульсов с крутизной фронтов не более 1 мс.

С целью проверки предположения о выработке серотонина под действием ТЭМС, способного блокировать клеточные процессы в нейронной сети, животному за 30 мин до начала ТЭМС внутрибрюшинно вводили китрил в дозе 100 мкг/кг. После этого в течение 10 мин проводили ТЭМС.

Сразу после ТЭМС осуществляли процесс выработки УР. При этом определяли, а затем и фиксировали число сочетаний условного звукового раздражителя и безусловного токового раздражителя до образования устойчивой реакции избегания условного токового воздействия при подаче звукового сигнала. Звуковым раздражителем являлся электрический звонок с частотой ударов молоточка по колоколу, равной 50 Гц, и уровнем громкости 50–60 дБ, расположенный на расстоянии 1 м от испытуемого животного. Безусловное подкрепление осуществляли болевым токовым раздражением, подаваемым на лапки животного сериями из

70 импульсов напряжения амплитудой 100 мВ и длительностью 8 мс от электростимулятора ЭС-50-1. Образование устойчивой реакции на раздражитель после 10–12 циклов воздействия сочетаний условного и безусловного раздражителей принимали за стандартное формирование УР, принятое в физиологической практике на базе многолетних наблюдений [7]. Образование устойчивой реакции лишь после 20 циклов воздействия принимали за частичное подавление процесса выработки УР. Отсутствие устойчивой реакции после 25 циклов воздействия принимали как полное подавление процесса выработки УР.

При исследовании повреждения клеток мозга крыс при иммобилизационном стрессе животные были разделены на пять групп в зависимости от вида воздействия: первая группа в количестве семи животных – контрольная без какого-либо воздействия; вторая группа в количестве шести животных – только с 40-минутным иммобилизационным стрессом; три группы с шестью животными в каждой, в которых 40-минутный иммобилизационный стресс сопровождался ТЭМС также продолжительностью 40 мин. Мощность облучения для каждой из групп была разной. Для третьей группы она составляла 0,67 Вт/см², для четвертой группы – 1,34 Вт/см², для пятой группы – 2 Вт/см². ТЭМС проводили, таким образом, на фоне иммобилизации.

При исследовании повреждения клеток мозга крыс при иммобилизационном стрессе материалом для гистологического и иммуногистохимического исследования служили участки коры головного мозга, а также белого вещества и гиппокампа головного мозга крыс. Для гистологического исследования образцы головного мозга фиксировали 10%-м «забуференным» нейтральным формалином, обезжировали стандартным способом и заливали парафином. Парафинированные срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином, эозином и толуидиновым синим по методу Ниссля.

При гистологической оценке повреждений нейронов учитывали деформацию и сморщивание клеток, баллонную дистрофию, деформацию аксонов и появление клеток-теней. Проводили подсчет процентного содержания (на 100 клеток) количества клеток с выделенными реактивно-деструктивными изменениями нейронов в десяти полях зрения в каждом случае в коре, белом веществе и гиппокампе.

Имуногистохимическое исследование выполняли на парафиновых срезах по стандартному протоколу с демаскировкой антигена в водяной бане. Для выявления клеток, вступив-

ших в апоптоз, использовали первичные антитела к активной форме caspase-3 (Abcam) в разведении 1 : 700 и полимерная система детекции EnVision (Dako, Дания). Для визуализации антигена использовали раствор диаминобензида (Dako, Дания). Положительная иммуногистохимическая реакция проявлялась в виде коричневого ядерного окрашивания, оценку результата реакции проводили путем подсчета процентного содержания (на 100 клеток) количества клеток с окрашенными ядрами в десяти полях зрения в каждом случае.

МЕТОДИКА СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для статистических методов обработки результатов гистологического исследования в качестве исходного материала было взято: среднее количество caspase-3-позитивных глиальных клеток коры головного мозга ($p = 0,075$), белого вещества ($p = 0,395$) и гиппокампа ($p = 0,323$) головного мозга крыс; среднее относительное количество поврежденных нейронов коры; среднее количество деформированных и сморщенных нейронов гиппокампа; среднее количество нейронов гиппокампа с баллонной дистрофией.

Для сравнения средних значений использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро–Уилка, однородность дисперсий – критерием Левена. Уровень значимости принимали равным $p = 0,05$. В случае обнаружения при дисперсионном анализе различий между группами апостериорное сравнение численных значений статистических характеристик групп было проведено в рамках критерия наименьшей значимой разности (LSD test) при выполнении условия однородности дисперсий, а также в рамках критерия Геймса–Хоуэлла в том случае, если дисперсии признавались неоднородными. Для обработки данных был использован пакет прикладных программ IBM SPSS Statistics.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

При гистологическом исследовании обнаружены следующие реактивно-деструктивные патоморфологические изменения нейронов. Баллонная дистрофия нейронов относится к гидропической и сопровождается острым набуханием нейронов. Клетка становится округлой, цитоплазма и ядро светлыми, отмечается «смазывание» структур тигроида (рис. 1а). При некротических необратимых изменениях нейрона растворяется ядро и образуется «клетка-тень»

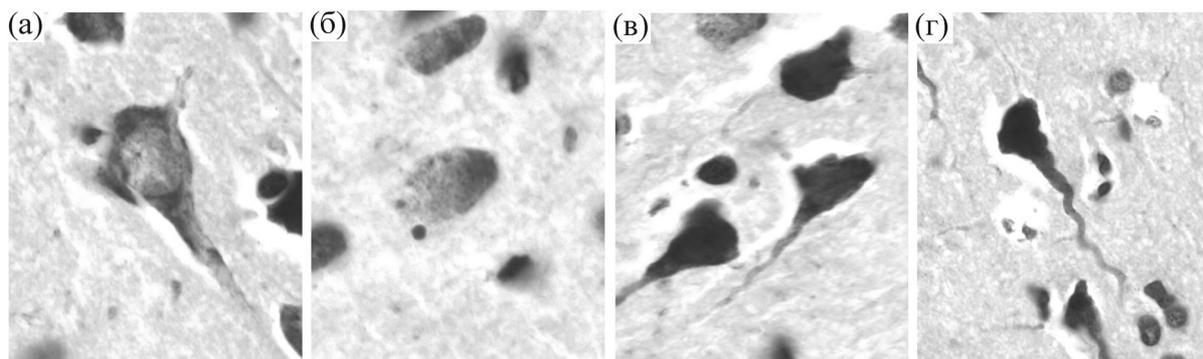


Рис. 1. Патоморфологические варианты повреждений нейронов: (а) – нейрон с баллонной дистрофией; (б) – «клетка-тень» с сохранившимися очертаниями нейрона; (в) – сморщенный «ишемически» измененный нейрон с плотной гиперхромной цитоплазмой, неотчетливым ядром; (г) – набухание и штопорообразный вид отростка при его повреждении. Окраска по Нисслю.

(рис. 1б). Гиперхроматоз нейронов – темные сморщенные клетки, так называемые «ишемически» измененные нейроны характеризуются уплотнением и базофилией цитоплазмы и ядра, деформацией клетки, спеканием тигроида (рис. 1в) с развитием в дальнейшем коагуляционного некроза с появлением безъядерной клетки-тени. Повреждение самого отростка нейрона – аксонопатия – демонстрируется различной деформацией, извитостью и набуханием отростков (рис. 1г).

При гистологическом исследовании коры, белого вещества и гиппокампа цитоархитектоника коры больших полушарий головного мозга не нарушена, очагов выпадения нет. Были выявлены повреждения нейронов в виде деформации аксонов, сморщивания, явления хроматолиза, баллонная дистрофия части нейронов, появление клеток-теней; в белом веществе – умеренно и значительно выраженный глиоз с явлениями сателлитоза, разволокнение нейропиля, явления перивакулярного и перичеселлюлярного отека. Выявлены изменения нейронов гиппокампа (явления хроматолиза, деформация, сморщивание, баллонная дистрофия части нейронов).

При сравнении мозга животных второй группы, подвергавшихся иммобилизационному стрессу, с мозгом животных первой (контрольной) группы выявлены выраженная зона повреждения нейронов коры, нарушение полнокровия сосудов и явления перичеселлюлярного и периваскулярного отека в коре и подкорковых ядрах, повреждения нейронов гиппокампа; также обнаруживается большее число клеток-теней. В контрольной группе явлению сателлитоза подвержены единичные нейроны, имеет место слабо выраженный глиоз. Основным результатом настоящей работы являются данные, полученные при гистологическом анализе, и оцен-

ка повреждений головного мозга животных третьей–пятой групп, одновременно подвергавшихся иммобилизационному стрессу и ТЭМС различной мощности (0,65, 1,3 и 2,0 Вт/см²). Характер повреждения мозга животных отражен на рис. 2 и в табл. 1–3. Важными особенностями являются существенное уменьшения различных повреждений мозга в третьей–пятой группах по сравнению со второй группой (иммобилизационный стресс без ТЭМС), причем наиболее сильно эффект блокады стрессорного повреждения клеток мозга крыс выражен для четвертой группы. Здесь явлению сателлитоза подвержены лишь единичные нейроны, а также имеет место слабо выраженный глиоз. Для пятой группы (максимальная мощность ТЭМС 2,0 Вт/см²) все же имеет место умеренно или значительно выраженный глиоз, а также выражены явления сателлитоза, однако менее, чем во второй группе.

Статистическая обработка результатов экспериментов изложена ниже.

При помощи однофакторного анализа ANOVA не было выявлено статистически значимых различий между группами животных в среднем количестве caspase-3-позитивных глиальных клеток в коре головного мозга ($p = 0,075$), в белом веществе ($p = 0,395$) и в гиппокампе ($p = 0,323$). Были выявлены статистические различия по количеству поврежденных нейронов в коре головного мозга между группами по всем видам повреждений, а именно: деформации и сморщиванию нейронов, баллонной дистрофии нейронов, деформации аксонов, наличию клеток-теней.

Результатом проведенного дисперсионного анализа явилось установление зависимости математического ожидания массивов данных от номера группы животных по всем видам по-

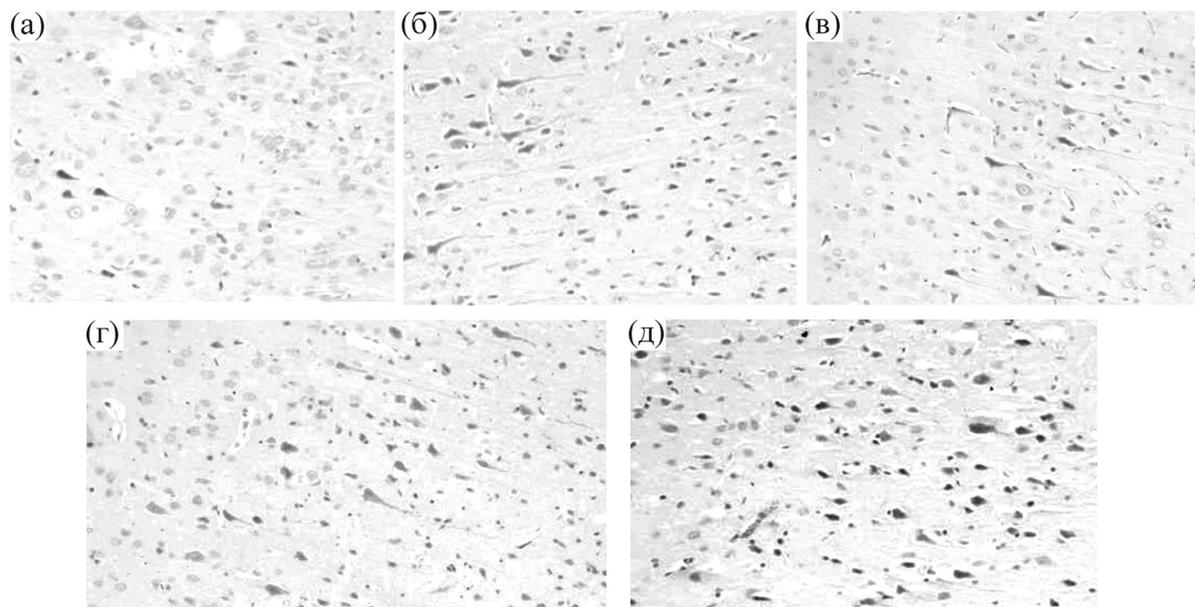


Рис. 2. Срез коры головного мозга крысы в экспериментальных группах животных: (а) – контрольная группа; (б) – контрольная группа с иммобилизацией; (в) – крысы, получавшие ТЭМС (33%) на фоне иммобилизации (участок деформации нейронов с перичеллюлярным отеком); (г) – крысы, получавшие ТЭМС (67%) на фоне иммобилизации (деформация нейронов и перичеллюлярный отек в подкорковых ядрах); (д) – крысы, получавшие ТЭМС (100%) на фоне иммобилизации (деформация нейронов, перичеллюлярный отек). Окраска гематоксилином и эозином.

вреждений (первая группа – контрольная, без стрессорного воздействия и ТЭМС; вторая – группа после стрессорного воздействия без ТЭМС; третья – группа после стрессорного воздействия на фоне «слабого» ТЭМС, 33% мощности – 0,67 Вт/см²; четвертая – группа после стрессорного воздействия на фоне «среднего» ТЭМС, 66,6% мощности – 1,34 Вт/см²; пятая – группа после стрессорного воздействия на фоне «сильного» ТЭМС, 100% мощности – 2,00 Вт/см²).

Результаты статистического анализа приведены на рис. 3 в виде графиков зависимости математического ожидания (средних значений) количества поврежденных нейронов от номера группы и соответственно плотности мощности электромагнитного облучения (плотности мощности ТЭМС. Графики сформированы на основе данных в таблицах, приведенных на рис. 3 справа.

Таким образом, все приведенные графики показывают, что ТЭМС осуществляет блокаду

Таблица 1. Относительное количество поврежденных нейронов коры в экспериментальных группах животных

Группы	Виды повреждения нейронов				
	Деформация и сморщивание нейронов	Деформация аксонов	Баллонная дистрофия нейронов	Клетки-тени	Всего
Группа 1 (контрольная)	6,98 ± 2,66	1,47 ± 0,55	0,69 ± 0,37	0,69 ± 0,37	9,94 ± 3,76
Группа 2 – иммобилизация	16,8 ± 2,66	4,12 ± 0,8	1,77 ± 0,54	1,83 ± 0,31	24,67 ± 4,02
Группа 3 – ТЭМС (33%) на фоне иммобилизации	15,32 ± 1,9	3,81 ± 0,63	1,6 ± 0,53	2,0 ± 0,66	22,19 ± 2,49
Группа 4 – ТЭМС (67%) на фоне иммобилизации	9,85 ± 2,17	2,82 ± 0,7	1,35 ± 0,2	1,98 ± 0,28	18,48 ± 2,49
Группа 5 – ТЭМС (100%) на фоне иммобилизации	14,6 ± 2,32	3,59 ± 0,98	1,65 ± 0,44	2,5 ± 0,34	22,48 ± 3,89

Примечание. Приведены средние значения (в %) и стандартные отклонения ($M \pm \sigma$).

Таблица 2. Среднее количество нейронов гиппокампа с разным типом повреждения в экспериментальных группах животных

Группы	Зоны гиппокампа					Всего
	CA1	CA2	CA3	CA4	GD	
Группа 1 (контрольная)	9,36 ± 5,04	8,36 ± 9,6	21,29 ± 12,69	8,14 ± 766	28,21 ± 29,69	75,36 ± 51,23
Группа 2 – иммобилизация	24,33 ± 14,42	13,42 ± 13,93	60,83 ± 40,6	20,5 ± 16,32	47,58 ± 41,47	166,67 ± 112,64
Группа 3 – ТЭМС (33%) на фоне иммобилизации	31,5 ± 21,4	13,33 ± 6,14	57,67 ± 31,33	25,58 ± 16,99	81,25 ± 65,98	209,33 ± 133,64
Группа 4 – ТЭМС (67%) на фоне иммобилизации	21,75 ± 13,04	6,5 ± 3,27	27,25 ± 14,17	12,33 ± 3,99	26,17 ± 6,95	94 ± 19,79
Группа 5 – ТЭМС (100%) на фоне иммобилизации	22,83 ± 8,7	7,75 ± 5,47	26,5 ± 5,37	13 ± 11,5	26,17 ± 9,8	96,25 ± 34,8

Примечание. Приведены средние значения и стандартные отклонения ($M \pm \sigma$).

Таблица 3. Среднее количество caspase-3-позитивных глиальных клеток в различных структурах головного мозга крыс в экспериментальных группах

Группы	Структура головного мозга		
	Кора	Белое вещество	Гиппокамп
Группа 1 (контрольная)	21,5 ± 2,0	8,8 ± 2,0	33,3 ± 5,2
Группа 2 – иммобилизация	21,4 ± 1,1	8,5 ± 1,6	33,4 ± 6,0
Группа 3 – ТЭМС (33%) на фоне иммобилизации	22,5 ± 1,1	9,9 ± 1,9	36,0 ± 5,6
Группа 4 – ТЭМС (67%) на фоне иммобилизации	22,1 ± 1,2	9,9 ± 1,5	38,5 ± 6,1
Группа 5 – ТЭМС (100%) на фоне иммобилизации	23,6 ± 1,8	9,9 ± 1,0	38,4 ± 4,1

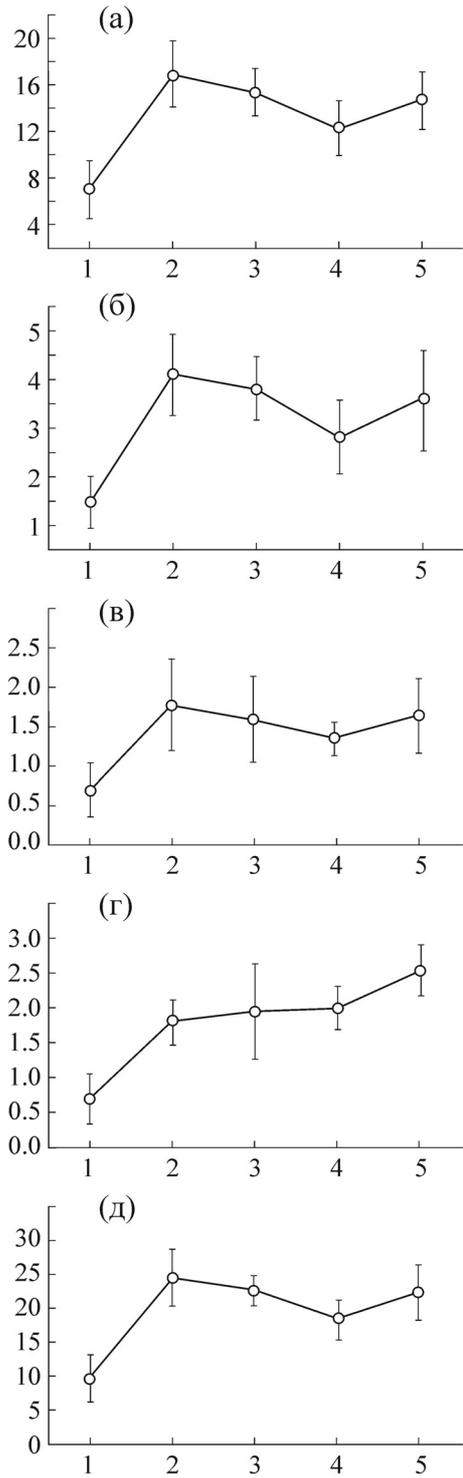
Примечание. Приведены средние значения (в %) и стандартные отклонения ($M \pm \sigma$).

стрессорного повреждения клеток (нейронов) мозга крыс, причем эта блокада наиболее эффективна для животных четвертой группы при мощности облучения 1,3 Вт/см². Укажем, что мощность облучения 2,0 Вт/см² (пятая группа) обладает блокирующим действием, пониженным по сравнению с мощностью 1,3 Вт/см². Кроме того, следует сказать, что ТЭМС для всех групп животных, т.е. для различных мощностей облучения, использованных в нашем эксперименте, не оказывает повреждающего воздействия на нейронную сеть мозга.

Подводя промежуточный итог, укажем, что при гистологическом и морфометрическом исследовании установлены достоверные реактивно-деструктивные изменения нейронов в коре, вызванные иммобилизационным стрессом. Также достоверно установлено наличие блокирующего повреждения действия ТЭМС. Сказанное обсудим на основании анализа результатов четырех серий экспериментов, описанных ниже.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Серия 1. Здоровых животных подвергали в течение 10 мин исключительно лишь ТЭМС без иммобилизации. При этом было установлено, что в результате микроволнового облучения во всех экспериментах животные погружались в состояние обездвиженности, снижались их реакции на внешние раздражители, а также снижалась частота дыхания. Кроме того, животные, подвергшиеся облучению, теряли, как показали дополнительные эксперименты, способность к выработке УР защиты от токового стрессорного воздействия [4]. Такой результат на первый взгляд представляется весьма необычным, так как нашими специальными экспериментами показано, что микроволновое излучение не проникает непосредственно сквозь кости черепа. Тем не менее микроволновое излучение, как показано в работе [4], оказывает сильное воздействие на поведение животного, несмотря на то что энергия кванта излучения с длиной волны 5 мм, которым производили облучение при ТЭМС, равна $0,2 \cdot 10^{-4}$ эВ, т.е.



Деформация и сморщивание нейронов

Отмечены различия, значимые на уровне $p < .05000$

Группа	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=6.9857	M=16.872	M=15.317	M=12.253	M=14.683
1		0.000000	0.000001	0.00498	0.000004
2	0.000000		0.268360	0.002421	0.123537
3	0.000001	0.268360		0.034733	0.648871
4	0.000498	0.002421	0.034733		0.088883
5	0.000004	0.123537	0.648871	0.088883	

Деформация аксонов

Отмечены различия, значимые на уровне $p < .05000$

Группа	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=1.4714	M=4.1183	M=3.8117	M=2.8217	M=3.5867
1		0.000001	0.000006	0.03012	0.000024
2	0.000001		0.480320	0.005499	0.225495
3	0.000006	0.480320		0.028970	0.603749
4	0.003012	0.005499	0.028970		0.085702
5	0.000024	0.225495	0.603749	0.085702	

Баллонная дистрофия нейронов

Отмечены различия, значимые на уровне $p < .05000$

Группа	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=.69571	M=1.7783	M=1.5967	M=1.3517	M=1.6500
1		0.000129	0.000926	0.011468	0.000522
2	0.000129		0.474302	0.100082	0.612360
3	0.000926	0.474302		0.336530	0.832874
4	0.001468	0.100082	0.336530		0.243913
5	0.000522	0.612360	0.832874	0.243913	

Клетки тени

Отмечены различия, значимые на уровне $p < .05000$

Группа	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=.68714	M=1.7900	M=1.9433	M=1.9833	M=2.2533
1		0.000060	0.000010	0.000007	0.000000
2	0.000060		0.527476	0.426682	0.005047
3	0.000010	0.527476		0.868602	0.022678
4	0.000007	0.426682	0.868602		0.032741
5	0.000000	0.005047	0.022678	0.032741	

Сумма повреждений

Отмечены различия, значимые на уровне $p < .05000$

Группа	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
	M=9.8400	M=24.558	M=22.668	M=18.410	M=22.443
1		0.000000	0.000000	0.000116	0.000000
2	0.000000		0.344598	0.004267	0.291269
3	0.000000	0.344598		0.039421	0.909643
4	0.000116	0.004267	0.039421		0.050127
5	0.000000	0.291269	0.909643	0.050127	

Рис. 3. Зависимости от стадии эксперимента математического ожидания относительного числа поврежденных клеток мозга, вызванных иммобилизационным стрессом: (а) – деформация и сморщивание нейронов, (б) – деформация аксонов, (в) – баллонная дистрофия нейронов, (г) – клетки-тени, (д) – сумма повреждений. Группы животных: группа 1 – контрольная, группа 2 – иммобилизация, группа 3 – ТЭМС (33% – 0,67 Вт/см²) на фоне иммобилизации, группа 4 – ТЭМС (67% – 1,34 Вт/см²) на фоне иммобилизации, группа 5 – ТЭМС (100% – 2,00 Вт/см²) на фоне иммобилизации.

во много раз меньше тепловой энергии при эффекте заключается в резонансном действии 300 К, равной $30 \cdot 10^{-3}$ эВ. Причина данного кванта микроволнового излучения на химиче-

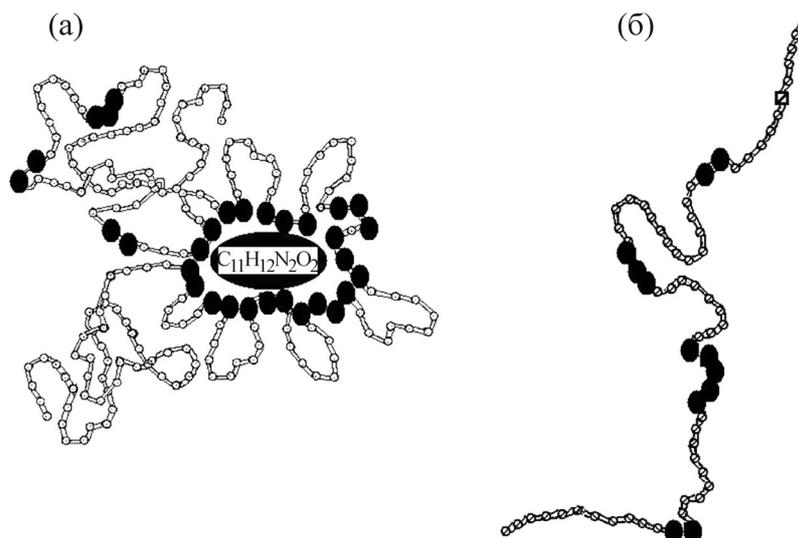


Рис. 4. Освобождение молекулы триптофана благодаря инициированному ГЭМС разворачиванию глобулярной цепи в клубок при конформационном фазовом переходе «глобула–клубок»: (а) – фрагмент альбуминовой глобулы с активным центром, удерживающим молекулу триптофана посредством ван-дер-ваальсовых связей; (б) – фрагмент белковой нити альбуминового клубка после превращения глобулы в клубок с потерей активным центром глобулы способности удерживать триптофан.

ские связи в молекулах белков, в отличие от нерезонансного характера теплового воздействия.

Итак, согласно полученным в настоящей работе результатам, информация о воздействии ГЭМС на кожные покровы головы животного эффективно переносится в мозг, что надежно фиксируется как по изменению поведения животного при выработке УР, так и по блокировке иммобилизационных стрессорных повреждений клеток. Сказанное определяет необходимость построения физической модели механизма описанного результата.

Биофизическая модель процесса транскраниальной электромагнитной стимуляции. Основным положением предлагаемой модели является утверждение о том, что перенос информации о факте воздействия микроволнового излучения осуществляется молекулой триптофана, освобождаемой излучением из альбуминовой глобулы (рис. 4). Триптофан в организме животных не синтезируется, а поставляется в их организм с пищей, молекулы триптофана изначально зафиксированы внутри альбуминовых глобул ликвора [8]. Далее свободные молекулы триптофана сквозь микроотверстия в кости черепа переносятся в мозг животного потоком ликвора, циркулирующего в пространстве Вирхова–Робина вокруг микрокапилляров кожных покровов [9]. Согласно предлагаемой модели, освобождение триптофана происходит потому, что микроволновое излучение вызывает двухстадийный конформационный фазовый переход

«глобула–клубок» в альбуминовых глобулах, находящихся в пространстве Вирхова–Робина. Первой стадией фазового перехода является разворачивание альбуминовой глобулы в клубок [10]. Второй стадией фазового перехода является необратимое образование бесконечного перколяционного кластера из альбуминовых клубков [11]. Свободная молекула триптофана, проникая с потоком альбумина под кожу черепа в нейронную сеть мозга, резко усиливает выработку серотонина ($C_{10}H_{12}N_2O$), синтезируемого мозгом из триптофана ($C_{11}H_{12}N_2O_2$). Воздействие серотонина на серотонинэргические рецепторы блокирует повреждение клеток нейронной сети, вызываемое иммобилизационным стрессом.

Дополнительным фактором усиления выработки серотонина, согласно предлагаемой модели, является осуществление преимущественной ориентации микроволновым излучением спинов ионов железа, находящихся в составе дезоксигемоглобина кровяного русла. А именно, эритроцитарные агрегаты, как показывают эксперименты, имеют собственное остаточное магнитное поле с индукцией порядка 1000 Гс [12, 13]. Суммарный спин электронной подсистемы ионов железа в составе гема равен 2 (4/2), а g -фактор равен 6 [14]. При спине 2 и g -факторе 6 расщепление спиновых подуровней в поле 1000 Гс, как убеждают простые оценки, соответствует энергии квантов микроволнового излучения с длиной волны 5 мм. Это излучение резонансным образом ориентирует вдоль век-

тора магнитного поля спины, изначально ориентированные хаотично благодаря термическим флуктуациям. Дополнительная ориентация спинов увеличивает численное значение суммарной индукции магнитного поля эритроцитарных агрегатов, запоминаемое благодаря наличию ферромагнитного гистерезиса, присущего ионам железа в составе гемоглобина [13]. Микроволновое излучение производит ориентирующее действие также на спины неподеленных электронных пар молекул триптофана, гидратных оболочек и молекул альбумина ликвора в пространстве Вирхова–Робина [9], индуцируя у них наведенный орбитальный магнитный момент.

При этом магнетизм неподеленных электронных пар возникает в рамках механизма, аналогичного механизму, реализующемуся, например, в бензосемихионе [15]. А именно, если какой-либо неспаренный электрон находится на сильно делокализованной орбитали (в молекуле триптофана – на p_z -орбитали атома кислорода, т.е. входит в состав π -связи и поэтому является слабосвязанным), то благодаря высокой константе спин-орбитального взаимодействия в атомах кислорода [16–18] внешнее магнитное поле индуцирует орбитальное движение электронов p -орбиталей, возникающее из-за прецессии неспаренного (или слабосвязанного) спина вокруг направления внешнего магнитного поля эритроцитов. Тем самым индуцируется наведенный магнитный момент атомов кислорода. Под неспаренным электроном понимается единственный электрон, находящийся на атомной орбитали. Электрон ведет себя как неспаренный, даже если он входит в состав слабой химической связи (π -связи в O_2), где взаимодействует со вторым электроном другого атома [15]. Инициированное прецессией орбитальное движение тем эффективнее, чем ниже энергия участвующих в нем химических связей и чем больше неподеленных электронных пар участвует в таком движении.

Таким образом, ориентированные микроволновым излучением спины электронов играют роль спиновых катализаторов [19], дополнительно активирующих как рецепторы, ответственные за выработку серотонина, так и серотонинэргические рецепторы, отвечающие за проникновение действия серотонина в мозг. Молекулы триптофана, приобретая ориентированные спины за счет магнитного поля эритроцитарной массы и запоминая это состояние благодаря магнитному взаимодействию спинов и орбитальных моментов, дополнительно в несколько раз усиливают свою химическую активность при взаимодействии с серотонинэргическими рецепторами.

Для построения механизма усиления химической активности в магнитном поле может быть привлечена идеология спиновой химии – хорошо развитой к настоящему времени отрасли биохимии [19].

Согласно постулатам спиновой химии, скорость протекания химических реакций многократно возрастает в присутствии внешнего магнитного поля. Причина этого явления заключена в том, что для образования любого химического соединения требуется возникновение либо σ -связей, либо π -связей, либо координационных связей, либо дативных связей между молекулами химических реагентов. Во всех этих случаях для образования нового соединения требуется строго ориентированная антипараллельная ориентация спинов электронов на атомных орбиталях вступающих в реакцию веществ. В то же время термические флуктуации оказывают разориентирующее воздействие на спины реагентов. Напротив, магнитное поле оказывает ориентирующее действие на магнитные моменты электронов на орбиталях реагентов, увеличивая этим химическую активность и скорость реакций, в том числе и выработку из триптофана с ориентированными спинами серотонина также с ориентированными спинами.

Таким образом, из результатов экспериментов первой серии можно сделать вывод о том, что серотонин с ориентированными спинами в резко увеличенной концентрации по сравнению со стандартной концентрацией усиленно воздействует на клетки нейронной сети мозга. При этом он вызывает погружение животного в состояние обездвиживания, а также блокирует те изменения в нейронной сети, которые при стандартной низкой концентрации серотонина сводятся либо к выработке защитного УР против стрессорного токового воздействия [4], либо к дистрофическим изменениям нейронов и аксонов, вызванных иммобилизационным стрессом.

Серия 2. В этой серии животных второй группы подвергали токовому или же иммобилизационному стрессу.

Для целостности картины кратко повторим результаты исследований, полученные в работе [4] при воздействии удара током на процесс выработки УР у лабораторных крыс. В результате токового воздействия на конечности животного вырабатывался УР, проявлявшийся в «избегании» возможного токового стресса при подаче звукового сигнала. На основании полученных результатов можно заключить, что токовое стрессорное воздействие на фоне звукового сигнала приводит к изменению состояния клеток нейронной сети, состоящее в установлении дополнительных нейронных связей, при-

водящих к выработке УР-защиты. В то же время иммобилизационное стрессорное воздействие, осуществленное в настоящей работе, приводит к патологическому изменению морфологической структуры клеток мозга, проявляющееся в повреждении клеток нейронной сети. Сказанное иллюстрируется микрофотографиями клеток мозга на рис. 2 и сравнением точек 1 и 2 на графиках, приведенных на рис. 3.

Серия 3. В этой серии животных третьей-пятой групп подвергали иммобилизационному стрессорному воздействию и одновременному воздействию ТЭМС различной мощности. В наших дополнительных исследованиях, посвященных выработке УР-избегания стрессорного воздействия при одновременном действии ТЭМС, использовали воздействие электрическим током, которое может классифицироваться как токовое стрессорное воздействие.

В случае токового стрессорного воздействия при наличии ТЭМС животное теряло способность к выработке УР. В случае иммобилизационного стрессорного воздействия и одновременного воздействия ТЭМС наблюдалось уменьшение патологических изменений клеток мозга по сравнению со второй группой без ТЭМС (сравни численные значения параметров патологических изменений, представленных точками 3 и 4 на графиках, приведенных на рис. 3 по сравнению со значением в точке 2). Такое уменьшение обусловлено в предлагаемой модели эффективной выработкой из триптофана (благодаря ТЭМС) серотонина с ориентированными спинами электронов бензольных колец в присутствии магнитного поля эритроцитов. Серотонин блокирует, как уже говорилось, как процесс установления нейронных связей, ответственных за выработку УР, так и процесс патологических изменений клеток, вызванных иммобилизационным стрессом.

Однако следует заметить, что при максимальной плотности мощности ТЭМС, несмотря на выработку дополнительного серотонина и ожидаемую блокировку им результатов стрессорного воздействия, все же фиксируются значимые патологические изменения клеточных структур мозга животных (см. точки 5 и 2 на графиках, приведенных на рис. 3). Этот результат мы объясняем насыщением серотонинэргических рецепторов, теряющих при перегрузке способность передавать производимое на них внешнее воздействие. Явление насыщения характерно для любых сенсоров: как биологических, так и электронных, поскольку любой сенсор имеет S-образную передаточную характеристику [20]: начиная с некоторого порогового воздействия сенсор перестает воспринимать из-

быточную часть оказываемого на него внешнего воздействия. Характерными примерами такого поведения являются временное ослепление глаза и временная потеря слуха человеком.

Серия 4. С целью проверки положений предлагаемой модели животных подвергали действию блокатора серотонина – китрила. После введения блокатора серотонина животных подвергали ТЭМС в течение 10 мин, а затем токовому стрессорному воздействию на фоне подачи звукового сигнала. Было обнаружено, что животное сохраняло в данных условиях способность к выработке УР-защиты от токового удара.

Таким образом, можно заключить, что ТЭМС способствует выработке серотонина, который блокирует развитие изменений клеток мозга, спровоцированных стрессорными воздействиями: как токовыми, так и иммобилизационными.

ВЫВОДЫ

ТЭМС мощностью 0,67 и 1,34 Вт/см² обладают антистрессорным эффектом, причем при мощности 1,34 Вт/см² (точка 4 на рис. 3) – наибольшим. Для этих мощностей ТЭМС сохраняет клетки мозга неповрежденными, не внося дополнительных патологических изменений. Это иллюстрируется тем, что точка 5 на рис. 3 (100% мощности – 2,0 Вт/см²) по численному значению ее ординаты на оси ОУ практически совпадает с таким значением для точки 2, соответствующей максимальному стрессорному в отсутствие ТЭМС.

В то же время ТЭМС с мощностью 2,0 Вт/см² (точка 5) приводит к потере способности блокировки стрессорных повреждений. Это обусловлено, по нашему мнению, «отказом» функционирования серотонинэргических рецепторов ввиду их перегрузки при чрезмерном производстве серотонина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Л. К. Хныченко, *Обзоры по клинич. фармакологии и лекарств. терапии* **10** (2), 3 (2012).
2. Н. Komobuchi, N. Nato, M. Teraoka, et al., *Acta Otolaryngol.* **130** (1), 173 (2010).
3. J. G. Boyd and T. Gordon, *Mol. Neurobiol.* **27** (3), 277 (2003).
4. В. О. Самойлов, Е. Б. Шадрин, Е. Б. Филиппова и др., *Биофизика* **60** (2), 1 (2015).
5. А. П. Суворов, М. В. Герасимова, А. И. Завьялов и др., *Вестн. дерматологии и венерологии*, № 1, 26 (1994).

6. В. Г. Радионов и др., в кн. *Аппаратный комплекс «Электроника – КВЧ» и его применение в медицине*, под ред. чл.-корр. АН СССР Л. Г. Гасанова (М., 1991), сс. 125–130.
7. А. Б. Коган, *Основы физиологии высшей нервной деятельности* (Наука, М., 1972).
8. R. Bito, T. Shikano, and H. Kawabata, *Biochim. Biophys. Acta* **1646**, 100 (2003).
9. T. Brinker, E. Stopa, J. Morrison, and P. Klinge, *Fluids and Barriers of the CNS* **11**, 10 (2014). DOI: 10.1186/2045-8118-11-10.
10. А. Ю. Гросберг и А. Р. Хохлов *Статистическая физика макромолекул* (Наука, М., 1989).
11. G. E. Dobretsov, N. K. Kurek, T. I. Syrejschikova., et al., *Nucl. Instruments and Methods in Phys. Res. A* **448**, 471 (2000).
12. А. Л. Чижевский, *Биофизические механизмы реакции оседания эритроцитов* (Наука, Новосибирск, 1980).
13. Е. Б. Шадрин, А. В. Ильинский, В. М. Капралова и В. О. Самойлов, *Науч.-технич. вестн. СПбГПУ*, **77**, 51 (2009).
14. Л. А. Блюменфельд и А. Н. Тихонов, *Соросовский образоват. журн.*, № 9, 91 (1997).
15. *Экспериментальные методы химической кинетики*, под ред. Н. М. Эмануэля и М. Г. Кузьмина (Изд-во Московского университета, М., 1985).
16. Б. Ф. Минаев и Л. Б. Яшук, *Спектроскопия* **95** (4), 596 (2003).
17. A. S. Moskvin and A. V. Zenkov, *Solid State Commun.* **80** (9), 739 (1991).
18. А. С. Москвин и А. В. Зенков, *Физика твердого тела* **44** (10), 1811 (2002).
19. А. Л. Бучаченко и В. Л. Бердинский, *Химия и жизнь*, № 3, 8 (2005).
20. А. Ф. Алейников и М. П. Цапенко, *Датчики и системы* **5**, 2 (2000).

Use of Transcranial Electromagnetic Stimulation to Undo the Damaging Effects of Stress on Rat Brain Cells

E.B. Shadrin*, **V.O. Samoilov****, **Ya.S. Katznelson*****, **A.V. Ilyinskiy***, **N.E. Ivanova******,
A.Yu. Ivanov****, **V.V. Bobinov******, **M.M. Galagudza*******, **Yu.M. Zabrodskaya******,
E.V. Kazatskaya****, **K.A. Klikunova*******, and **T.V. Sokolova******

**Ioffe Institute, Polytechnicheskaya ul. 26, St. Petersburg, 194021 Russia*

***Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia*

****Premier Annecto Technologies, 181 North Clinton Street, Doylestown Pennsylvania PA, USA*

*****Polenov Russian Research Neurosurgical Institute – Branch of Almazov National Medical Research Center, The Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Mayakovskogo 12, St. Petersburg, 191104 Russia*

******Almazov National Medical Research Center, The Ministry of Health of the Russian Federation, ul. Akkuratova 2, St. Petersburg, 197341 Russia*

******St. Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya ul. 2, St. Petersburg, 194100 Russia*

Influence of transcranial electromagnetic stimulation on immobilization stress-induced damage to the cells in the rat brain was studied. Electromagnetic stimulation was carried out using a microwave source with frequency 78 Hz (corresponding wavelength 5.6 mm), power density 0.67, 1.3 and 2 W/cm². The comparison of the neurons prior to and after the damaging effect showed that modulated microwave radiation had anti-stress effect on the rat brain cells (neurons). More pronounced anti-stress effect was observed after microwave radiation with power density 1.3 W/cm². A biophysical model of the anti-stress effect mechanism is proposed. In accordance with the proposed model, microwave radiation causes a globule-coil phase transition in albumin, the major plasma protein. Phase transition is associated with the release of the tryptophan residues of a protein molecule in the globule state. Free tryptophan, transported from the blood into the brain, increases serotonin levels, and this protects neurons from damaging effects from stress.

Keywords: transcranial electromagnetic stimulation, brain cells, neurons, immobilization stress