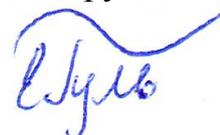


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Национальный исследовательский Томский государственный университет»

На правах рукописи



Гуль Елизавета Викторовна

ПОВЕДЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦНС КРЫС ПОСЛЕ
ПРЕБЫВАНИЯ В МОДЕЛИРУЕМЫХ ГИПОГЕОМАГНИТНЫХ
УСЛОВИЯХ

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, доцент
Ходанович Марина Юрьевна

Томск – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Современные представления о влиянии гипогеомагнитных условий на живые организмы по материал литературных данных	10
1.1. Магнитное поле Земли.....	10
1.2. Возможные механизмы восприятия магнитных полей	13
1.3. Гипогеомагнитные условия.....	20
1.3.1. Способы создания гипогеомагнитных условий.....	20
1.3.2. Влияние гипогеомагнитных условий на различные функциональные системы организма.....	24
1.3.3. Влияние гипогеомагнитной среды на ЦНС и поведение.....	31
1.4. Обзор методов исследования высшей нервной деятельности грызунов	38
1.4.1. Исследование двигательной активности грызунов.....	38
1.4.2. Исследования биоэлектрической активности мозга, выполненные на животных	40
1.4.3. Общая характеристика ЭЭГ	40
1.4.4. Основные методы регистрации ЭЭГ у животных.....	42
1.4.5. ЭЭГ у лабораторных животных в норме	44
1.4.6. Исследование нейрональной активности.....	52
1.4.7. Иммуногистохимические методы	52
1.4.8. Белок раннего ответа c-fos как маркер нейрональной активности	58
1.5. Мю-опиодные рецепторы.....	60
2. Объект и методы исследования	62
2.1. Объект исследования	62
2.2. Создание условий ослабленного магнитного поля Земли	62
2.3. Схема эксперимента.....	63
2.4. Метод исследования поведения крыс в «открытом поле».....	64
2.5. Метод выработки у крыс условного рефлекса пассивного избегания.....	65
2.6. Метод исследования агрессивного поведения	66
2.7. Методы исследования общей двигательной активности крыс	67
2.7.1. Метод визуального анализа общей двигательной активности крыс.....	67
2.7.2. Метод исследования двигательной активности крыс с помощью программы «Mouse Express».....	67
2.7.3. Метод проверки работы программы Mouse Express.....	68

2.8.	Метод исследования биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ)	70
2.9.	Метод оценки параметров нейрональной активации различных структур мозга с помощью иммуногистохимического метода	72
2.10.	Статистическая обработка результатов	72
3.	Результаты исследований	75
3.1.	Общее состояние животных в течение хронического эксперимента.....	75
3.2.	Результаты теста «открытое поле».....	75
3.3.	Результаты теста выработки условного рефлекса пассивного избегания	77
3.4.	Исследование общей двигательной активности крыс	78
3.4.1.	Исследование общей двигательной активности крыс в 10-суточной серии	78
3.4.2.	Оценка адекватности работы программы «Mouse Express»	82
3.4.3.	Исследование общей двигательной активности крыс с помощью программы Mouse Express.....	85
3.5.	Влияние ослабленного магнитного поля Земли на биоэлектрическую активность мозга крыс.....	87
3.6.	Результаты исследования агрессивного поведения крыс в течение хронического эксперимента.....	92
3.7.	Результаты анализа изменения параметров нейрональной активации различных структур мозга.....	96
4.	Обсуждение результатов	101
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
	ВЫВОДЫ.....	109
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
	ПРИЛОЖЕНИЕ 1	124

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МП	–	Магнитное поле
ЭП	–	Электрическое поле
ЭМП	–	Электромагнитное поле
ГГМУ	–	Гипогеомагнитные условия
ГМП	–	Геомагнитное поле
ГГМП	–	Гипогеомагнитное поле
ЭМЭ	–	Электромагнитное экранирование
$K_{0гмп}$	–	Коэффициент ослабления геомагнитного поля
Э	–	Эрстед
B	–	Магнитная индукция
E	–	Напряженность электрического поля
V	–	Напряжение
Гц	–	Герц
мкТл	–	Микротесла
нТл	–	Нанотесла
pH	–	Водородный показатель
ЭЭГ	–	Электроэнцефалограмма
ЦНС	–	Центральная нервная система
ВПСП	–	Возбуждающий постсинаптический потенциал
ТПСП	–	Тормозные постсинаптические потенциалы
УРПИ	–	Условный рефлекс пассивного избегания
АТФ	–	Аденозинтрифосфат
ДНК	–	Дезоксирибонуклеиновая кислота
МБЭ	–	Магнитобиологический эффект
ЭКГ	–	Электрокардиограмма
АТ	–	Антитело
ГОСТ	–	Государственный стандарт
PBS	–	Phosphate buffered saline
fps	–	Frames Per Second (кадров в секунду)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Каждый живой организм приспособлен к определённым экологическим условиям, в которых его процессы жизнедеятельности протекают на оптимальном уровне. Помещение организма в условия, к которым он не адаптирован, как правило, приводит к негативным последствиям.

Многочисленные исследования дают основания считать, что естественный электромагнитный фон окружающей среды обитания является необходимым эволюционно сложившимся условием для нормальной жизнедеятельности биологических систем [8, 17, 22, 29, 30]. Исходя из этого, можно предположить, что длительное систематическое пребывание в условиях изоляции от магнитного поля Земли может оказать негативное воздействие на человека.

Дефицит электромагнитного поля естественного происхождения широко распространён в современном мире. Выявлены жилые, офисные и общественные помещения, в которых наблюдается существенное ослабление ГМП. К таковым относятся отдельные помещения современных высотных (20 этажей и выше) каркасно-монолитных жилых домов, помещения офисных и торгово-развлекательных центров со стальными каркасами зданий [47]. Примером производственных объектов, на которых складываются гипогеомагнитные условия, являются экранированные сооружения, нашедшие широкое применение в радиотехнической, радиоэлектронной промышленности, где работает несколько миллионов человек. Гипогеомагнитные условия наблюдаются и в метро, в котором ежедневно находятся тысячи людей [45]. Таким образом, в современном мире огромное количество людей вынуждено находиться в среде ослабленного магнитного поля Земли в течение длительного времени (от 8 часов в сутки и больше).

Гипогеомагнитные условия будут важным фактором пребывания человека в дальнем космосе, при межпланетных перелетах, в условиях Луны и Марса. Исследования состояния организма в условиях гипогеомагнитной среды актуальны и в связи с «проблемой 30-го года» - планируемого полета на Марс и необходимости изучения возможных последствий длительного полета в межпланетном пространстве и пребывания человека на Марсе, где уровень МП в тысячи и десятки тысяч раз ниже, чем уровень привычного геомагнитного поля [22].

Проведенные к настоящему времени исследования по влиянию гипогеомагнитных условий на организм животных свидетельствуют о биологической активности фактора,

вызывающего ряд изменений на физиологическом, биохимическом и морфологическом уровнях функционирования организма [37]. Выявлено его неблагоприятное влияние на основные системы организма животных [162, 130, 63].

В тоже время, большинство работ по изучению влияния нахождения организмов в среде ослабленного магнитного поля Земли были посвящены исследованию кратковременного воздействия гипогеомагнитных условий (от нескольких минут до часа) [3, 49, 50, 130] и исследованию влияния гипогеомагнитных условий на отдельные параметры или отдельные системы организма [3, 49, 57, 80, 83, 135, 135]. Работы, посвященных исследованию эффектов и механизмов воздействия ослабленного геомагнитного поля на биологические объекты, немногочисленны [14, 84, 172].

Системные исследования по изучению эффектов длительного (в течение нескольких суток) непрерывного нахождения экспериментальных животных в гипогеомагнитных условиях, а также исследования механизмов воздействия этого фактора представлены единичными работами. В то же время такие исследования необходимы для разработки мер по адаптации организма к гипогеомагнитным условиям, а также для нормирования среды жизнедеятельности человека. В настоящей работе исследовано воздействие гипогеомагнитной среды на центральную нервную систему как одну из наиболее важных систем в функционировании организма, а также на поведение как интегральный показатель его состояния.

Цель и задачи исследования:

Цель работы: изучить влияние пребывания в моделируемых гипогеомагнитных условиях в течение периодов времени 5, 10 и 21 сутки на поведение и функциональное состояние ЦНС крыс.

Задачи:

1. Изучить влияние среды ослабленного геомагнитного поля на общую двигательную активность, поведение в тесте «открытое поле» и агрессивность крыс.
2. Изучить воздействие гипогеомагнитных условий на память и обучение крыс с помощью метода формирования условного рефлекса пассивного избегания.
3. Изучить влияние среды ослабленного геомагнитного поля на биоэлектрическую активность мозга крыс, общую нейрональную активацию структур мозга и активацию опиоидергической системы.
4. Проанализировать зависимость изменений поведения и функционального состояния ЦНС у лабораторных крыс от длительности воздействия гипогеомагнитных условий.

Гипотеза исследования:

Нахождение организма в среде ослабленного магнитного поля Земли приводит к различным биологическим эффектам на молекулярном и клеточном уровнях, в том числе и повышению порога потенциала действия. Мы предположили, что повышение порога потенциала действия приводит к снижению частоты импульсации и общего тонуса ЦНС, а также к уменьшению активности на поведенческом уровне. При длительном ослаблении геомагнитного поля урежение импульсации по механизму положительной обратной связи должно вызывать снижение количества воспринимающих рецепторов, следовательно, степень отрицательного воздействия должна усилиться.

Научная новизна исследования:

Впервые показано, что длительное пребывание в условиях ослабленного магнитного поля Земли оказывает угнетающее действие на ЦНС, что выражается в снижении абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ, снижении экспрессии белков раннего ответа c-fos во фронтальной коре, околопроводном сером веществе, таламусе, верхних буграх четверохолмия, а так же в уменьшении общей двигательной активности крыс.

Впервые показано, что под действием условий ослабленного геомагнитного поля происходит снижение доли активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, во фронтальной коре, в таламусе, в околопроводном сером веществе и в верхних буграх четверохолмия. Выявлено повышение агрессивности при многосуточной экспозиции в гипогеомагнитных условиях. Впервые показано, что при увеличении времени непрерывного нахождения в гипогеомагнитных условиях происходит нарастание негативных изменений поведения и ЦНС.

Научно-практическое значение работы:

Выявлены новые аспекты воздействия среды ослабленного геомагнитного поля на поведение и функциональное состояние ЦНС млекопитающих (уменьшение общей двигательной активности крыс, снижение активности нейронов, снижение абсолютных мощностей основных ритмов ЭЭГ, снижение доли активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы).

Результаты работы вносят вклад в понимание механизмов влияния многосуточного нахождения в условиях ослабленного магнитного поля Земли на поведение и функциональное состояние ЦНС млекопитающих.

Полученные результаты будут полезны при нормировании среды жизнедеятельности человека, а также при планировании длительных полётов в космическом пространстве, на Марс и Луну.

Положения, выносимые на защиту:

Многосуточное (5-21 сутки) нахождение в среде магнитного поля с напряженностью в 1000 раз меньше напряженности естественного геомагнитного поля оказывает угнетающее действие на тонус ЦНС, что выражается в снижении двигательной активности, абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ и уровня нейрональной активации, а также приводит к снижению антиноцицептивного ответа и повышению агрессивности. С увеличением времени пребывания в условиях ослабленного геомагнитного поля эффекты угнетающего воздействия гипогеомагнитных условиях усиливаются.

Апробация работы:

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на ряде научных конференций:

Научная студенческая конференция Биологического института "Старт в науку". г. Томск, 2008 г. «Влияние гипомангнитного поля на поведение млекопитающих»; 2009 «Суточная динамика двигательной активности и агрессивного поведения крыс в условиях длительного снижения уровня геомагнитного поля»; 2011 «Влияние хронического снижения уровня геомагнитного поля на центральную нервную систему».

Международная научная студенческая конференция "Студент и научно-технический прогресс", посвящённой 50-летию НГУ. 11-15 апреля 2009 г. г. Новосибирск. «Влияние гипомангнитной среды на поведение млекопитающих».

Международная научно-практическая конференция Экология. Риск. Безопасность. Курган. 20-21 октября 2010 г. «Автоматическое измерение двигательной активности лабораторных крыс»

Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина. 18-21 октября 2011. М.: ИМБП РАН, 2011. «Поведенческие реакции, способность к выработке условных рефлексов и физиологическое состояние у крыс при компенсации магнитного поля Земли».

Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина. 18-21 октября 2011. М.: ИМБП РАН, 2011. «Влияние хронического снижения уровня геомагнитного поля на центральную нервную систему крыс».

Международный Междисциплинарный конгресс НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И ПСИХОЛОГИИ. Судак, Крым, Украина, 2-12 июня 2012 г. Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина. 18-21 октября 2011. М.: ИМБП РАН, 2011. «Влияние ослабленной геомагнитной среды на высшую нервную деятельность»

лабораторных крыс в условиях хронического эксперимента. The effect of magnetic field deprivation on the higher nervous activity in rats in a long-term experiment»

Международная молодежная научная школа «Организация познавательной деятельности и функциональных систем мозга на разных этапах развития» в рамках фестиваля науки» г. Томск, 17–18 сентября 2012 года. Космический форум 2011, посвященный 50-летию полета в космос Ю.А. Гагарина. 18-21 октября 2011. М.: ИМБП РАН, 2011. «Влияние снижения уровня магнитного поля Земли на биоэлектрическую активность мозга высших млекопитающих.

Публикации:

Основные научные результаты по теме диссертации опубликованы в 13 печатных работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура работы:

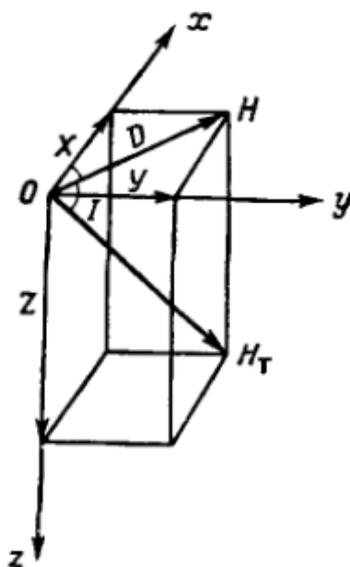
Диссертация изложена на 128 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Работа проиллюстрирована 34 рисунками и содержит 5 таблиц. Список использованной литературы содержит 65 отечественных и 114 зарубежных первоисточников.

1. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЛИЯНИИ ГИПОГЕОМАГНИТНЫХ УСЛОВИЙ НА ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ ПО МАТЕРИАЛУ ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ

1.1. Магнитное поле Земли

Накоплено достаточно большое число данных, свидетельствующих о том, что геомагнитное поле весьма существенно воздействует на процессы, протекающие в верхней и в нижней атмосфере, на земные ландшафтные зоны, оказывает влияние на климат и атмосферную циркуляцию. Но особое значение ГМП имеет для живых организмов, населяющих Землю [20].

Магнитное поле Земли (как векторное поле) характеризуется вектором напряженности (Нт, величина вектора напряженности измеряется в нанотеслах (нТл) и меняется от 6.8×10^5 нТл на полюсах до 3×10^5 нТл на экваторе [1]), который в направлении магнитного меридиана можно разложить на две составляющие: горизонтальную Н, действующее в горизонтальной плоскости, и вертикальную Z, перпендикулярную к Н. Горизонтальную составляющую в свою очередь можно разложить на силу, направленную вдоль географического меридиана, так называемую северную составляющую X, и силу, перпендикулярную к меридиану, – восточную составляющую Y. [22].



Нт – вектор напряженности, Н – горизонтальная составляющая напряженности, Z – вертикальная составляющая, X – северная составляющая, Y – восточная составляющая, D – магнитное склонение, I – магнитное наклонение

Рисунок 1.1.1 – Элементы земного магнетизма [22]

Вектор геомагнитного поля наряду с изменениями абсолютной величины претерпевает изменения в пространстве. Положение вектора в пространстве может быть охарактеризовано двумя угловыми величинами – склонением и наклонением. Магнитное склонение D является углом в горизонтальной плоскости, т.е. углом между географическим меридианом и магнитным меридианом данного места на Земле. Магнитное наклонение I – угол между горизонтальной плоскостью и направлением напряженности полного вектора ГМП [22].

Принято считать, что там, где магнитная ось пересекает поверхность Земли, располагаются геомагнитные полюса. Эти полюса не совпадают с географическими. В северном полушарии расположен южный геомагнитный полюс, а в южном полушарии – северный геомагнитный полюс. [22]. Напряженность ГМП является самой высокой на магнитных полюсах и самой низкой около магнитного экватора [170]. На границе магнитосферы ГМП переходит в межпланетное МП, которое связано с солнцем и вращается вместе с ним. Хотя это поле очень мало (на орбите Земли оно составляет приблизительно 5×10^{-5} Гс) оно играет большую роль во взаимодействии солнечного ветра с планетами Солнечной системы и во взаимодействии потоков солнечного ветра между собой [11].

ГМП можно подразделить по степени изменчивости, по характеру динамики на постоянное (основное) и переменное поле. Постоянным называется такое магнитное поле, которое освобождено от всех типов вариаций с периодом до года. Переменное МП представляет собой измененные поля с различными периодами внутри года (от долей секунды до месяцев). Величина переменного МП не превышает примерно 2 % величины постоянного МП, но его биологическая значимость велика. [22]. Основной причиной появления переменной составляющей ГМП являются переменные токи в плазме солнечного ветра [11].

Элементы земного магнетизма испытывают временные вариации – изменение магнитной активности. Вариации, носящие на первый взгляд произвольный характер, получили название магнитные возмущения, или (при больших изменениях) магнитные бури [46]. Изменения в ГМП связаны в основном с солнечной активностью. Но эта связь не является строго функциональной зависимостью, ибо является следствием наложения друг на друга процессов разного масштаба и разной физической природы, т.е. процессов, протекающих на Солнце, в межпланетном пространстве и атмосфере Земли [10].

С влиянием Солнца связана и суточная периодичность изменения элементов земного магнетизма. Амплитуды этих изменений варьируются от дня ко дню, но фазы остаются неизменными. Имеется группа магнитных возмущений периодического характера, которые

называются короткопериодными колебаниями (или микропульсациями магнитного поля). Периоды этих колебаний охватывают диапазон от сотых долей секунд до нескольких минут [46].

Особым видом изменения ГМП являются геомагнитные пульсации – электромагнитные волны очень низкой частоты, наблюдающиеся на поверхности Земли. Геомагнитные пульсации порождаются за счёт взаимодействия плазмы гидромагнитных волн, идущих от Солнца, с магнитосферой Земли. Продолжительность геомагнитных пульсаций на протяжении суток меняется от несколько минут до нескольких часов [22].

Происхождение магнитного поля Земли и по сей день остается загадкой для ученых, хотя существует много гипотез для объяснения этого феномена. Магнитное поле, которое существует на земной поверхности, является суммарным полем, образованным за счёт ряда источников: 1) токов, пересекающих поверхность Земли, так называемого «вихревого» поля; 2) внешних, космических источников, не связанных с Землей, и, наконец, 3) магнитного поля, обусловленного причинами внутренней динамики Земли.

Почти общепризнанной теорией происхождения магнитного поля Земли является гипотеза магнитного гидродинамо, основанная на признании существования жидкого внешнего ядра. Тепловая конвекция, то есть перемешивание вещества во внешнем ядре, способствует образованию кольцевых электрических токов. Скорость перемещения вещества в верхней части жидкого ядра будет несколько меньше, а нижних слоев – больше относительно мантии в первом случае и твердого ядра – во втором. Подобные медленные течения вызывают формирование кольцеобразных (тороидальных) замкнутых по форме электрических полей, не выходящих за пределы ядра. Благодаря взаимодействию тороидальных электрических полей с конвективными течениями во внешнем ядре возникает суммарное магнитное поле дипольного характера, ось которого примерно совпадает с осью вращения Земли. Для «запуска» подобного процесса необходимо начальное, хотя бы очень слабое, магнитное поле, которое может генерироваться гиромагнитным эффектом, когда вращающееся тело намагничивается в направлении оси его вращения. Реальные процессы, происходящие в земном ядре, конечно, намного сложнее и описываются законами магнитогидродинамики, изучающей магнитные и электрические свойства проводящей жидкости [32].

На основе теории «магнитного динамо» хорошо объясняются основные свойства основного магнитного поля: его общая конфигурация и основные аномалии, наличие магнитных полюсов геомагнитного поля, а также изменения его полярности (инверсия поля). Инверсия – это изменение величины ГМП на поверхности Земли до нуля, происходящие, видимо, через этап нарушения полярности МП и его неупорядочности,

после чего создаётся новое дипольное поле противоположного знака. Палеонтологические исследования показали, что за последние 80 млн. лет на Земле произошло 188 инверсий. При этом обнаружена тесная связь между инверсиями земного МП и развитием мира живых организмов. В частности выяснилось, что насекомые малочувствительны к инверсиям МП (они выживают в период инверсий), в то время как высшие позвоночные переносят инверсии очень плохо [11].

1.2. Возможные механизмы восприятия магнитных полей

К настоящему времени накоплено большое количество данных (экспериментальных и теоретических) по исследованию механизмов восприятия магнитных полей организмами. Экспериментальные работы проводились на различных объектах: растениях, животных, начиная от одноклеточных организмов, заканчивая высшими млекопитающими [25]. Показано, что живые организмы, отличающиеся по уровням биологической сложности, обнаруживают сходные зависимости между изменениями физиологического состояния и магнитной восприимчивости [23], что свидетельствует о близости способов магниточувствительности различных организмов.

Единого мнения в вопросе магниторецепции до сих пор не достигнуто, к настоящему моменту предложено множество различных механизмов и способов восприятия магнитного поля живыми организмами.

Регулирующее действие геомагнитного поля на процессы жизнедеятельности, возможно в силу того, что эти процессы имеют электромагнитную природу, а также влияние изменений параметров геомагнитного поля на течение ионных процессов в организме будет отражаться на процессах жизнедеятельности [24].

Исторически одна из первых идей в области магнитобиологии связана биогенным магнетитом в магнитном поле. В теле некоторых животных и микроорганизмах естественным путем образуются микроскопические кристаллы (обычно магнетиты), способные намагничиваться. Во внешнем магнитном поле такие кристаллы испытывают вращательный момент и оказывают давление на близлежащие ткани, что и вызывает биологическую реакцию. Кристаллы магнетита обнаружены в некоторых насекомых, бактериях, а также в мозге некоторых птиц, которые, как известно, обладают ярко выраженной способностью к ориентации в геомагнитном поле [4].

Сам же биогенный магнетит представляет собой форму окиси железа (Fe_3O_4), свойства которого зависят от размера и формы частиц. Ориентация и свойства этих частиц используются живыми организмами для восприятия магнитного поля, а также для

ориентации. Магнетит, чтобы функционировать как магниторецептор или использоваться для других целей, вероятно, должен быть связан с нервной системой. Рецептор, основанный на магнетите, может быть восприимчив к небольшим изменениям магнитного поля, влияя на связь структур в соответствующем преобразователе (например, отолиты или рецепторы растяжения), который уже изменяет проводимость мембраны [84].

Специализированных биологических магниторецепторов, помимо частиц биомагнетита в некоторых бактериях и птиц, в природе не существует, поэтому важно понять, каким путем сигнал магнитного поля трансформируется в отклик биологической системы. Первичные процессы взаимодействия магнитного поля с частицами материи, электронами, атомами, молекулами – чисто физические процессы. Заряженные частицы организмов, ионы и молекулы, участвующие в биофизических и биохимических процессах, являются посредниками в передачи сигналов магнитного поля на следующий биохимический уровень. Тонкая регуляция активности белков ферментного типа, биофизическими механизмами с участием ионов и молекул – посредников, приводит к смещению процессов метаболизма. Начиная с этого уровня можно наблюдать действие магнитного поля по изменению концентрации продуктов метаболизма [4].

Часто говорят об информационном характере действия слабых физико-химических факторов на биологические системы. При этом имеют в виду, что биосистема находится в состоянии, близком к режиму неустойчивого динамического равновесия. Поэтому надо лишь подтолкнуть систему, и она перейдет в другое состояние за счет внутренних ресурсов. Другими словами, произойдет так называемое биологическое усиление слабого сигнала магнитного поля [4].

Предложен ряд механизмов восприятия магнитных полей, основанных на изменениях свойств воды под действием ЭМП.

К ним относится предложенный Е.Е. Фесенко с соавторами [60] механизм по влиянию магнитного поля на процессы клатратообразования различных газов в водной среде живого организма, который приводит вследствие этого к реализации целого ряда эффектов биологического действия магнитных полей. Полученные результаты по изучению газогидратов ксенона методом замораживания-скалывания демонстрируют влияние слабых магнитных полей на процесс структурообразования в водной среде. Авторами показано, что предварительная обработка воды слабым магнитным полем приводит к перестройкам структуры газогидратов ксенона с образованием четко выраженных кристаллов особой формы субмикронных и микронных размеров [60].

Фесенко Е.Е. соавторами [65] также показали, что воздействие слабых магнитных полей на флуоресценцию воды и водно-солевых растворов изменяет интенсивность

флуоресценции воды и водно-солевых растворов. Гель-фильтрация растворов неорганических солей, обработанных магнитными полями, приводит к появлению интенсивно флуоресцирующих фракций. На основе полученных результатов авторы предположили, что под влиянием слабых ЭМП происходит возникновение структурных изменений водных растворов, проявление которых зависит от условий хроматографирования и химического состава исследуемых растворов [65].

В работе Сусак И.П. [54] предложен механизм по влиянию внешнего электромагнитного поля на биологические системы через изменения скоростей биохимических реакций вследствие изменения конформационных свойств воды в ЭМП. Электрические и магнитные поля влияют на движение протонов, чем меняют их действие на кластеры и изменяют свойства воды. Сама молекула воды нечувствительна к малым медленно меняющимся полям. Возможны длительные релаксационные процессы, обусловленные самосогласованным изменением структуры кластеров при наложении или снятии внешнего воздействия. Кроме того, в предложенном механизме восприятия МП имеет место пороговый эффект, когда изменения накапливаются, не меняя структуры, а потом происходит раскол кластеров или объединение двух кластеров в один. Было показано, что на кластерную организацию влияют не только поля, но и механические воздействия [54].

Галь Л.Н. и Галь Н.Р. [11, 12] была предложена новая концепция молекулярного механизма передачи энергии, а также восприятия сверхслабых воздействий (в том числе действия электромагнитных и космофизических факторов) живыми системами на основе представления о молекулярной ячейке как о едином объекте, обладающем биологически значимыми коллективными свойствами. Под молекулярной ячейкой понимается ограниченная в пространстве группа макромолекул с находящейся между ними межмолекулярной водной средой. Молекулярный каркас ячейки всегда состоит хотя бы из пары любых, расположенных близко друг к другу биополимеров живой клетки (макромолекул), которые, в свою очередь, участвуют во всех биохимических процессах в клетке. При этом молекулярная макросистема (клетка, ее элементы и т.д., а также модельные биологические или химические системы) являются совокупностью различных, прилегающих друг к другу, молекулярных ячеек, причем каждая макромолекула может входить в каркас двух или более прилегающих друг к другу молекулярных ячеек. Межмолекулярная водная среда ячейки, находящаяся в связанном состоянии вблизи макромолекул каркаса, упорядочена и неоднородна. Благодаря этой неоднородности молекулярная ячейка обладает новым коллективным эффектом – способностью усиливать сверхслабые воздействия физических полей: электромагнитных, акустических,

гравитационных. Молекулярный каркас и среда активно взаимодействуют в самосогласованных процессах под действием как собственных, так и внешних электрических и магнитных полей и сигналов, преобразующих среду и преобразуемых ею. Эффекты усиления сверхслабых энергетических внешних воздействий в живых системах обусловлены преобразованием случайных последовательностей сверхслабых воздействий в когерентные сигналы спинового эха за счет параметрических и ангармонических процессов в нелинейной межмолекулярной водной среде. Качественные и количественные свойства этой среды определяют резонансные частоты и амплитуды параметрических эхосигналов, воздействующих на биологические молекулы и побуждающих их к конформациям, что приводит к изменению их реакционной способности и наблюдаемым макроскопическим биохимическим и биологическим последствиям. Интересной и крайне важной особенностью молекулярной ячейки является ее неприхотливость в энергетической «пище». Всю потребляемую энергию биополимеры молекулярной ячейки перерабатывают в энергию высшего качества — когерентную электромагнитную (солитон). А вот в качестве своей «подпитки» биополимеры молекулярной ячейки готовы принимать не только химическую энергию, но и энергию электромагнитную (в широком диапазоне частот), а возможно, даже и акустическую. Энергетические процессы в живой системе и эффекты восприятия ею сверхслабых воздействий определяются единым молекулярным механизмом.

Земные формы жизни, например клетка, формируются из молекулярных ячеек, взаимодействующих внутри себя и друг с другом с помощью тех или иных управляющих сигналов, имеющих электромагнитную природу. Внешние по отношению к организму электромагнитные поля, кванты излучения, акустические и другие механические поля также могут формировать свои сигналы именно в тех же диапазонах, в которых взаимодействуют биополимеры. Эти сигналы, для молекулярных ячеек не отличимые от собственных, будут ими восприниматься как собственные и будут, таким образом, вмешиваться в поведение живых систем на молекулярном уровне. Именно этот механизм и ответственен за реакцию живого организма на слабые электромагнитные поля, на космофизические факторы или на воздействие физических полей. Физический механизм «спинового эха» в сформированной нелинейной водной среде в магнитном поле Земли помогает в этих воздействиях, позволяя суммировать и внутренние, и внешние, последовательные во времени, очень слабые сигналы, доводя их интенсивность до величины управляющих сигналов. Таким образом, этот механизм задействован как в процессах внутреннего и межмолекулярного взаимодействия, так и в процессах восприятия внешних сверхслабых воздействий [11, 12].

Ряд работ посвящен поиску механизмов восприятия биологическими объектами магнитных полей на молекулярном уровне [36, 83, 93, 114].

К таким работам относится модель взаимодействия слабых магнитных полей с биосистемами, разработанная Ледневым В.В. [36] Согласно модели, первичным звеном в цепи событий, запускаемых воздействием слабого магнитного поля на биосистему, является ион кальция, специфически связанный с кальций-связывающим центром белка. Этот белок обладает кальций-зависимой ферментативной активностью или, альтернативно, способен модулировать активность других ферментов. Связанный кальций рассматривается как изотропный осциллятор, несущий заряд, колебания которого возбуждаются флюктуациями структуры белка, т.е., в конечном счете, ударами окружающих его кислородных лигандов. Возбуждение каждого из кальций-осцилляторов осуществляется независимо. В каждом цикле биохимической кальций-зависимой реакции кальций-осциллятор является частью неравновесной системы, в которой изменяется структура комплекса кальций-белок и его энергия, что вызывается циклическими взаимодействиями кальций-зависимого фермента с субстратом и другими лигандами. При этом, в результате аллостерического взаимодействия между центрами связывания кальция, с одной стороны, и местами связывания субстрата – с другой, меняется сродство кальция к некоторым центрам связывания. Магнитное поле вызывает прецессию оси вибраций кальция-осциллятора относительно направления магнитного поля. При определенных соотношениях между временем жизни кальция-осциллятора и параметрами магнитного поля, можно существенно изменить степень поляризации колебаний кальция-осциллятора в плоскости, перпендикулярной направлению магнитного поля. Вероятность изменения структуры кальций-связывающих центров в каждом цикле кальций-зависимой биохимической реакции и, следовательно, вероятность изменения сродства кальция к кальций-связывающим центрам зависит от степени средней по времени поляризации колебаний кальция-осциллятора. Указанная зависимость, по мнению Леднева В.В., лежит в основе эффектов слабых магнитных полей на биосистемы.

Согласно этой модели, величина биоэффекта, индуцированного в биосистеме магнитным полем, пропорциональна степени поляризации колебания иона [36].

В ряде работ был предложен механизм на основе реакций с парами радикалов как возможный механизм магниторецепции [114, 143, 148], основанный на фоторецепции, включающей производство пар радикалов. В этом механизме выявлено влияние магнитного поля на интенсивность биохимических реакций, включающие в свои промежуточные этапы реакции с парами радикалов. Резонансное электромагнитное излучение (то есть ЭМП, обеспечивающее энергией, необходимой, чтобы соединить электроны с различными

спинами), может изменить динамику переходов электронов между состояниями их спинов, вызванных светом. Эти свето-зависимые переходы влияют на скорость и продукцию биологических реакций [144]. Этот возможный механизм подтвержден многочисленными исследованиями ориентаций животных [83]. Были предложены многие теоретические модели резонансов, которые предсказывают влияние ЭМП, (например параметрический резонанс, резонанс иона) [93, 124, 125]. В этих моделях магнитные стимулы изменяют идущий сигнал, изменяя баланс идущего процесса. Магнитные поля могут, таким образом, проявлять свое влияние на другие пути передачи сигнала, которые могут включать процессы с парами радикалов [83].

Свето-зависимое влияние ЭМП может быть связано с недавними открытиями влияния ЭМП на функционирование опиоидных рецепторов. Опиатные рецепторы формируют гомо- и гетеродимеры. В зависимости от конформационных изменений эти димеры могут увеличить или уменьшить действие G белков [100, 141]. Модификационные изменения G-белка в G-протеиновых рецепторах может влиять на функционирование кальциевых каналов и кальциевый ток, обеспечивая следующий возможный уровень действия [137].

Что касается млекопитающих, то есть данные, что млекопитающие могут чувствовать МП в диапазоне интенсивности ГМП и даже намного меньших интенсивностей, например, ежедневного изменения естественного МП [118, 142].

Один из предложенных механизмов магниторецепции млекопитающих основывается на меланосомах в дисках Меркеля. В меланосомах содержится меланин, предполагаемый Leucht T. в качестве биогенного магнетита. У меланосом есть парамагнитные центры с отрицательным электрическим зарядом [126, 160], и они двигаются в центре клетки во время нахождения в магнитном поле [159]. Эти причины делают меланосомы пригодными для магниторецепции у млекопитающих. Большие частицы, состоящие из различных доменов с их магнитными моментами, в значительной степени аннулируют друг друга; частицы в диапазоне между 1.2 нм и 0.05 нм состоят из единственного домена и имеют устойчивый магнитный момент, действуя как крошечные постоянные магниты. Поэтому, магнетиты, состоящие из одного домена и в диаметре 1 нм являются подходящими для восприятия магнитного поля [87]. Для процесса трансдукции в дисках Меркеля меланосома как постоянный магнит может вращаться как стрелка компаса в переменном магнитном поле и вызывать первичные процессы механочувствительности этим вращающим моментом [119]. В зависимости от ориентации и силы внешнего магнитного поля, меланосомы могут влиять на мембрану и активировать определенные механочувствительные ионные каналы, увеличивающие поток ионов в клетку. Открываясь,

эти каналы изменяют мембранный потенциал и производят градуальные рецепторные потенциалы, которые могут быть преобразованы в потенциалы действия, кодирующие частоту, и могут быть переданы в мозг через сенсорные нейроны. В качестве альтернативы, внешние магнитные поля могут вызвать расширение или сокращение меланосом определенным образом, передавая сигнал через цитоскелет и вызывая нейронный ответ. Поэтому, меланосомы и связанный с ними цитоскелет в дисках Меркеля составляют систему, способную воспринять изменения в магнитном поле и вызвать трансдукцию сигнала. Эта магниточувствительная система может функционировать как чувствительный биологический магнитометр, со специальными структурными особенностями, обозначающими кодирующую интенсивность поля и также направление. Так как эта магниточувствительная система, включая меланосомы и нервные окончания Меркеля, присутствует у всех млекопитающих, авторы полагают, что их предположение – реальный кандидат на механизм магниторецепции для млекопитающих. Способность дисков Меркеля секретировать гранулы нейротрансмитера после электромагнитного воздействия поддерживает предположение, что диски Меркеля – возможные электромагнитные рецепторы в клетках [119].

Томскими учеными была предложена гипотеза восприятия магнитного поля Земли млекопитающими, основанная на особых свойствах кожного покрова. Согласно авторам, параметры и ориентация линий Фойта идеально соответствует катушке, витки которой образованы чередованием кожных структур с различными электрофизическими свойствами. В качестве «проводников» выступают, с одной стороны, линии Фойта, состоящие из последовательно расположенных групп волосяных фолликулов с сетью опутывающих их капилляров и нервных волокон, и, с другой стороны, соединительная ткань разделяющего линии Фойта пространства. Пространственное расположение этих «проводников» представляет собой некую колебательную систему по аналогии со связанными контурами, имеющую широкую полосу частот и многомодальность вольтамперной характеристики. На эти структуры так же, как и на весь организм мыши, ГМП может действовать, вызывая переориентацию фосфолипидного окружения встроенных в мембрану белков [52], менять скорость химических реакций [36] или непосредственно действовать на ионы Ca^{2+} . При движении мышь пересекает силовые линии геомагнитного поля. Это может приводить к наведению в «проводниках» токов, величина которых зависит от скорости изменения магнитного потока через проводящий контур и сопротивления «проводников». Таким образом, линейное перемещение мыши, дыхательные движения животного, а также повороты и подъемы могут наводить индукционные токи. У мышей наблюдается асимметрия линий Фойта справа и слева. Это

наводит на мысль о наличии дифференциальной структуры рецепции электромагнитных полей.

Согласно выдвинутой гипотезе, упорядоченное расположение волосяных фолликулов (линия Фойта) может служить псевдосоленоидами, в котором под действием внешних полей наводятся токи, запускающие нейрогуморальный механизм ответной реакции. В соответствии с этой гипотезой, от ориентации животного относительно вектора геомагнитного поля зависит генерируемых афферентных нейрогуморальных сигналов. Вследствие этого происходит активация гипоталамо-гипофизано-надпочечниковой системы, которая определяет адаптивный статус животного и адекватность реагирования на совокупность внешних факторов [25].

Линии Фойта были описаны у человека [27] и у других млекопитающих, таких как кролики, морские свинки и мыши [64].

Немного известно о структурах мозга, где осуществляется обработка информация о магниторецепции. Исследование показало, что у грызунов верхний бугорок четыреххолмия участвует в обработке информации от магниторецепторов [128], тогда как у людей островок Рейля, и двусторонний гиппокамп / хвостатое ядро являются структурами, вовлеченные в обработку магнитной информации [145].

Таким образом, к настоящему времени единого мнения о механизмах магниторецепции нет. Предложено несколько гипотез о способах магниторецепции организмами, основанных на различных механизмах. Среди них можно отметить механизмы, связанные со структурными изменениями свойств воды в живых организмах; механизм восприятия сверхслабых воздействий на основе представлений о молекулярной ячейки; механизм на основе реакций с парами радикалов; механизмы магниторецепции на молекулярном уровне (влияние ЭМП на опиаты и возможно на другие соединенные, ассоциированные с G-белками рецепторов); механизм магниторецепции, основанный на биогенным магнетите; механизм восприятия магнитного поля Земли млекопитающими, основанный на особых свойствах кожного покрова с помощью линий Фойта.

1.3. Гипогеомагнитные условия

1.3.1. Способы создания гипомагнитных условий

Гипогеомагнитное поле – ослабленное ГМП, – это магнитное поле внутри обычного или экранированного помещения, которое определяется суперпозицией магнитного поля, создаваемых ослабленным ГМП, полем от ферромагнитных частей конструкции

помещения, полем постоянного тока, протекающего по шинам, отдельным частям конструкции или внутри нее. Основными показателями гипогеомагнитного поля являются: напряженность вектора постоянного магнитного поля внутри помещения, угол наклона этого вектора внутри помещения и градиент напряженности магнитного поля между двумя точками в пространстве внутри помещения. По мнению Ю.Г.Рябова [48] наиболее информативным является относительный критерий гипогеомагнитного поля, равный величине ослабления напряженности магнитного поля внутри помещения относительно напряженности естественного ГМП открытого пространства снаружи помещения – Кг. Максимальное значение ослабления ГМП, известное из информационных источников, составляет около 100 раз [48].

В 2001 году вышел в свет ГОСТ Р 51724-2001, регламентирующий на основании последних СанПиН Р2.2.755-99 и других нормативных документов, контроль условий труда при работе в условиях ГГМП.

Для контроля параметров, регламентируемых этим ГОСТ, в ИЗМИРАН создан магнитометрический прибор, позволяющий реализовать контроль всех основных и дополнительных параметров ГГМП. С помощью такого прибора можно проводить электромагнитный мониторинг производственных и жилых помещений их сертификацию, картирование, осуществлять контроль уровня электромагнитной обстановки в электронной промышленности, на рабочих местах, на транспорте, в локальных и гипомагнитных помещениях [28].

В настоящее время имеется пять методов получения пространства с гипомагнитной средой [83]:

1. Наложение полей – изменение векторов геомагнитного поля с помощью полосового магнита;
2. Астатизация – сведение геомагнитного поля к нулю с помощью определенным образом расположенных магнитов;
3. Экранирование с применением материалов очень высокой магнитной проницаемости;
4. Компенсация с помощью колец Гельмгольца;
5. Комбинированное экранирование с помощью мю-металла и активной электрической компенсации.

Наиболее распространенными в практике экспериментальных исследований являются способы компенсации и экранирования.

Экранирование – локализация электромагнитной энергии в определенном пространстве за счет ограничения распространения ее всеми возможными способами.

Полное экранирование может быть получено только под подавлением всех 4-х видов электромагнитных связей. Однако требования к эффективности экранирования в ряде случаев могут быть снижены. Тогда задачей экрана может быть ослабление того или иного вида связи [43].

Качество экранируемых приборов стало значительно выше с введением в практику материалов и сплавов с высокой магнитной проницаемостью (мю-металл, пермаллой и т.д.). Экран из указанных сплавов не поглощает магнитные силовые линии Земли, а лишь концентрирует и как бы отводит их от экранируемого объекта в сторону меньшего сопротивления. Прямое экранирование заключается в создании камеры со стенками, толщина которых рассчитана на уменьшение напряжённости ГМП. Эффективность экрана пропорциональна его толщине [22].

С целью получения больших коэффициентов ослабления ГМП используют ферромагнитные экраны, изготовленные из сплавов с высокой магнитной проницаемостью таких как: пермаллой. Метод экранирования с использованием пермаллового экрана, позволяет получить крайне слабые магнитные и электрические поля в большом частотном диапазоне [5]. Ферромагнитные экраны концентрируют силовые линии ГМП внутри своих стенок, что препятствует проникновению поля внутрь экрана [9].

Вторым распространённым способом создания гипогеомагнитных условий является компенсация. Для компенсации магнитного поля используют систему колец (обычно две-три пары), расположенных во взаимно перпендикулярных плоскостях. По этим кольцам, на которые настраиваются витки калибровочного медного провода, пропускается постоянный и переменный ток. Величина тока рассчитывается так, чтобы магнитное поле, образующееся в результате индукции, компенсировало колебания сверхнизкочастотных электромагнитных полей. Наибольшее распространение получили кольца Гельмгольца в их различных модификациях.

Компенсационные методики в корне отличаются от методик с полным экранированием, хотя назначение обоих методик – создание гипогеомагнитной среды. Различие заключается в том, что в компенсационных экспериментах остается неизменным естественный электромагнитный комплекс во всем диапазоне частот, а при полном экранировании он устраняется. Следовательно, при компенсационных экспериментах на организм возможно воздействие короткопериодических колебаний сверхнизкочастотных электромагнитных полей, атмосферного электричества и других видов естественных электромагнитных полей. Однако, если кольца Гельмгольца не имеют автоматической следящей системы и рассчитаны на компенсацию только одного определенного среднего уровня постоянного поля в данном месте, то при сильном воздействии возможно влияние

на объект внешнего электромагнитного поля (рисунок 1.3.1). Поэтому всегда необходимо использовать специальную электронную систему, следящую с высокой точностью за изменением уровня сверхнизкочастотных электромагнитных полей и составляющих его элементов, заключающийся в экранировании от внешних полей [63].

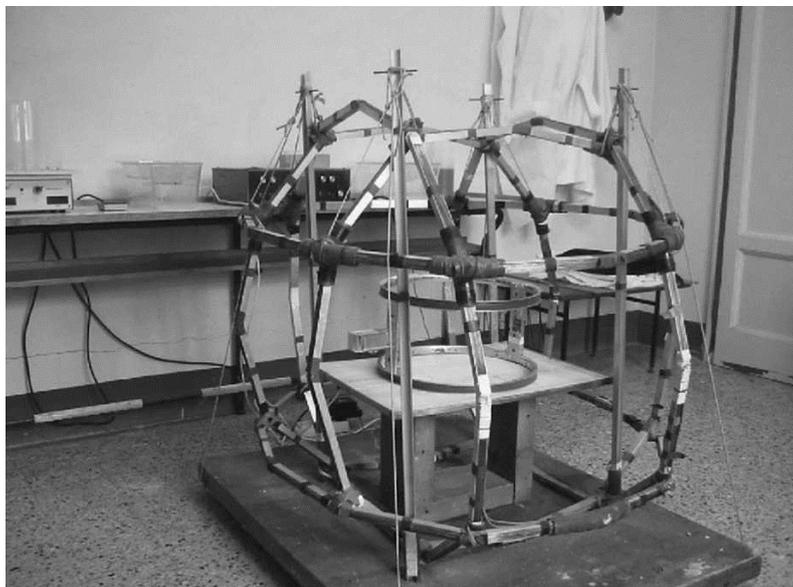


Рисунок 1.3.1 – Камера по созданию гипогеомагнитных условий, используемая в работе [85]

Быстрова Е.Ю. с соавторами в своей работе показали, что метод ослабления магнитного поля Земли (экранирование или компенсация) не влияет на результаты [8].

Кроме специально создаваемых гипогеомагнитных условий для экспериментальных работ или для других целей, среда ослабленного магнитного поля Земли может формироваться в помещениях помимо воли человека.

Розов В.Ю. с соавторами показали, что на сегодняшний день встречаются жилые, офисные и общественные помещения, в которых наблюдается существенное ослабление ГМП. К таким помещениям относятся отдельные помещения современных высотных (20 этажей и выше) каркасно-монолитных жилых домов (ослабление до 23 мкТл при допустимом уровне 30 мкТл), помещения офисных и торгово-развлекательных центров со стальными каркасами зданий (ослабление до 20 мкТл при допустимом уровне 25 мкТл), отдельные платформы метрополитена (ослабление до 9 мкТл при допустимом уровне для пассажиров 15 мкТл и для обслуживающего персонала 25 мкТл). Отличительной особенностью этих помещений является повышенный объем ферромагнитных масс охватывающих их несущих строительных конструкций.

Авторы показали, что основной причиной техногенного ослабления индукции ГМП в помещениях является индуктивное намагничивание под действием ГМП стальных элементов каркасов здания, что вызывает эффект магнитоэкранирования ГМП

внутри помещения. В общем случае, уровень ослабления ГМП определяется объемом и магнитной проницаемостью ферромагнитных конструкций каркаса, формой их граничных поверхностей, а также их пространственной ориентацией относительно вектора индукции ГМП. Зона ослабления ГМП в помещениях формируется основными ферромагнитными элементами каркаса здания – балками и колоннами. Ослабление ГМП максимально при совпадении направления вектора ГМП, либо его пространственных составляющих, с осью колонн (балок). Определяющее влияние на уровень ослабления ГМП в помещениях оказывают колонны, что связано с большим значением вертикальной составляющей ГМП, которая всегда направлена по оси колонн [47].

Таким образом, основными способами создания среды ослабленного магнитного поля Земли в экспериментальных условиях являются экранирование и компенсация с помощью колец Гельмгольца. Кроме специально создаваемых гипогеомагнитных условий для экспериментальных работ, среда ослабленного магнитного поля Земли может формироваться в помещениях помимо воли человека, основной причиной которой будет индуктивное намагничивание под действием ГМП стальных элементов каркасов здания, что вызывает эффект магнитоэкранирования ГМП внутри помещения.

1.3.2. Влияние гипогеомагнитных условий на различные функциональные системы организма

К настоящему времени получено большое количество данных по влиянию гипогеомагнитных условий на живые организмы. В большинстве своём эти данные свидетельствуют о негативных последствиях для организма. Исследования по воздействию условий сниженного магнитного поля Земли проводятся на биологических объектах различной сложности, начиная с грибов и отдельных клеток, и заканчивая человеком.

В работах, выполненных на грибах, показано, что условия экранирования МП могут влиять на функционирование ряда внутриклеточных структур, которое выражается в морфологических изменениях клеток грибов микромицетов [8], и что условия глубокого экранирования магнитного поля Земли (10-100 нТл) могут опосредованно влиять на рост грибного мицелия *Ulocladium consortiale* через элементы цитоскелета и ионы Ca^{2+} [21].

Проведён целый ряд работ, посвящённых изучению влияния экранирования ГМП на эмбриогенез. В этих работах в качестве объектов исследования выбирались организмы различных таксономических групп. Во всех работах обнаружено патологическое действие среды ослабленного ГМП на эмбрионы, что свидетельствует о чувствительности эмбрионов всех видов животных к данному фактору.

Пятидневное пребывание личинок Japanese newt (Японский тритон) в экранирующей камере (5 нТл, 1/10.000 нормального ГМП) приводило к увеличению числа соматических дефектов. Максимальное число, которых обнаруживалось на двадцатый день после окончания экспозиции в экранированном ГМП. Соматические дефекты выражались в нарушениях развития кишечной трубки, пороки развития спинного мозга, неправильном формировании глаз, замедление развития личинки [68].

Десятикратное уменьшение магнитного поля Земли на пятые и шестнадцатые сутки эмбриогенеза у кур приводило к тому, что импринтирование после вылупления происходило в 2 раза медленнее. Наблюдалось ингибирование митотической активности вентрикулярных клеток, участвующих в процессе дифференцировки и морфогенеза головного мозга, что приводило к нарушению формирования нервных центров конечного мозга, лежащих в медиальной части вентрального гиперстриатума и имеющих непосредственное отношение к осуществлению импринтинга. В гипوماгнитном поле с индукцией 5000 нТл на 2 и 16-е сутки эмбриогенеза кур наблюдается огрубление отростков фиброзных астроцитов и увеличение числа ядрышек; клеточное набухание в нейронах, что говорит о нарушении гомеостаза клеток [17].

В ходе культивирования первичных эмбриональных фибробластов мыши в «нулевом» магнитном поле (200 нТл, 1/250 нормального ГМП) снижается способность к адгезии и жизнеспособность клеток, меняется морфология монослоя, увеличивается гибель клеток [135]. При действии «нулевого» поля на более сложную экспериментальную модель – двухклеточные зародыши мыши – увеличивается проницаемость плазматических мембран для красителей, происходит реорганизация цитоскелета, нарушается пространственная ориентация бластомеров, в результате чего развитие двухклеточных зародышей, не достигая стадии бластоцисты, останавливается [41]. Длительное воздействие экранированного МП беременных крыс в период ранней половозрелости приводит к гибели зародышей (эмбрионов) на ранних стадиях развития с отсутствием видимых признаков беременности. У полностью сформировавшихся самок в стадии репродуктивного расцвета при электромагнитном экранировании беременность реализуется до стадии органогенеза и плодного периода, но сопровождается невынашиванием. Гибель потомства происходит на фоне сохранности морфофункциональных структур яичников обеспечивающих течение беременности и внутриутробное развитие у крыс [31].

Ослабление постоянного поля в 600 раз увеличивало смертность кроликов, приводило к нарушению их развития, уменьшению двигательной активности, изменениям в структуре печени и эндокринного аппарата, как у потомства, так и у матери [30].

Работы, посвященные влиянию гипогеомагнитных условий на процессы эмбриогенеза, свидетельствуют о важной роли геомагнитного поля в обеспечении нормального роста эмбриональных клеток, а также в регуляции раннего эмбриогенеза млекопитающих [41, 135]; об избирательности повреждающих эффектов экранированного МП на эмбриогенез [31]; о продолжении негативных последствий пребывания в гипогеомагнитных условиях, даже после прекращения экспозиции [68]; о широком повреждающем действии экранированного МП Земли на организм [30].

Демцун Н.А. с соавторами выполнили цикл работ, посвящённых исследованию воздействия экранированного ГМП, на удобном объекте для таких исследований – регенерирующих планариях. Эта система отличается доступностью, экономичностью, хорошей воспроизводимостью результатов и отвечает современным этическим требованиям, согласно которым следует ограничить использование млекопитающих в эксперименте [19], также для планарии показана чувствительность к изменению интенсивности и направления геомагнитного поля [75].

Авторы показали, что слабое электромагнитное экранирование стимулирует регенераторные процессы у планарий *Dugesia tigrina*. При этом интенсивность стимуляции зависит как от исходного состояния животных, определяемого сезоном года, так и от их функциональной асимметрии [58]. Регенерация планарий зависит от продолжительности экранирования. Кратковременное периодическое электромагнитное экранирование (один час в сутки) приводит к увеличению скорости регенерации в течение вторых–седьмых суток (на 13 %), тогда как в остальные сроки наблюдений значительных изменений не зафиксировано. Длительное электромагнитное экранирование (23 часа в сутки) регенерирующих планарий в течение десяти дней значительно увеличивает скорость их регенерации со вторых по шестые сутки наблюдений (на 147 %), сокращая сроки развития головы и глаз, синхронизируя этот процесс у различных животных. Во второй и третьей фазах регенерации значительных изменений не наблюдалось [19]. Также авторы показали, что у животных, подвергнутых длительному воздействию ГМП, остановка роста бластомеров происходила на сутки раньше, чем в контрольной группе. Вместе с возрастанием индексов регенерации прогрессивно нарастала и скорость их движения, но скорость движения планарий стабилизируется позже, чем индекс регенерации. Кроме того, в динамике скорости движения и индекса регенерации опытных животных ярко проявляется ритмическая составляющая [57].

Известно, что спектр ЭМП, регистрируемый на поверхности Земли, охватывает огромный частотный диапазон, причем для различных диапазонов источники ЭМП различны. Экраны, в зависимости от их свойств, ослабляют не только постоянное

геомагнитное поле, но снижают интенсивность ЭМП во всех частотных диапазонах. Таким образом, во время пребывания биологических объектов в экранированном объеме на него влияет спектр ЭМП, отличный от такового вне экрана. Потому, регистрируемые в экране изменения могут быть обусловлены ослаблением интенсивности ЭМП любого диапазона.

Полученные данные об увеличении скорости регенерации планарий в условиях экранирования, а также появление ее аномалий могут быть связаны с изменением спектра ЭМП, регистрируемых внутри камеры [19].

Приведённый цикл работ, посвящённых исследованию воздействия гипогеомагнитных условий на регенерирующие планарии, дополняет исследование Новикова В.В. с соавторами [133], посвящённое изучению влияния гипогеомагнитных условий с различной магнитной индукцией на деление планарии. В своей работе авторы показали, что компенсированное ГМП (остаточная индукция ± 5 нТл) существенно не влияет на деление планарий. Однако гипогеомагнитные условия с магнитной индукцией 100–300 нТл заметно стимулируют процесс деления планарий 1.5–2 раза, тогда как влияние следующего интервала снижения ГМП (400–600 нТл) не отличается от контроля. В гипомагнитных условиях (800–1500 нТл) снова наблюдается усиление процесса деления планарий, а при условиях 3000 нТл эффект исчезает [133].

Один из известных экспериментов по изучению длительного влияния гипогеомагнитных условий на млекопитающих был поставлен по заданию Национального управления по аэронавтике и исследованию космического пространства (НАСА, США) [107]. Экспозиция в экранированном ГМП составила от 4 до 12 месяцев, мыши находились в экранированном МП в течение нескольких поколений. Результаты эксперимента показали, что к четвертому поколению воспроизводство мышей прекращалось. Но даже ранее, (во втором поколении), в большей степени, чем в 3 и 4, отмечались преждевременные выкидыши мышат и каннибализм. В раннем возрасте большое число мышей, находившихся в экранированных условиях, становилось неактивными и вялыми, их поведение было необычным — длительное время они лежали на спине. Примерно у 14 % мышей взрослой популяции отмечалось прогрессирующее облысение, начиная от головы и далее вниз до половины спины. Часто к шести месяцам животные погибали.

В разных местах тела наблюдались эпителиальные соединительно-тканевые раковые образования. Кожа в облысевших местах была сильно изменена, отмечалось разрастание, гиперплазия рогового слоя, опробкование волосяных фолликул, гиперпластический чешуйчатый эпителий. В печеночной ткани экранированных мышей отмечено выраженное изменение ядер с резко увеличенными ядрышками. Почки у животных, находившихся в экранированном пространстве, также были изменены: отмечались многокамерность,

наличие кист, сжимавших кортикальную паренхиму и т. д. У мышей, особенно умерших внезапно, мочевого пузыря, заполненный мочой и белым неидентифицированным осадком, имел гиперпластическую слизистую оболочку с перегородками и полипами.

Результаты данного эксперимента показали, что длительное пребывание животных в условиях экранирования приводит к необратимым изменениям в их организме [22].

В работе [130] на мышах также показано, что после 3-часового пребывания в гипогомагнитных условиях обнаруживаются нарушения циркуляции крови и лимфы. Явные изменения в ультраструктуре кардиомиоцитов обнаружались после 6 часов экспозиции. В большинстве кардиомиоцитов был обнаружен лизис саркоплазматического матрикса и миофибрилл в саркоплазматическом ретикулуме. В митохондриях был обнаружен локальный лизис матрикса и разрушение крист, а в некоторых случаях полный лизис крист. Увеличение везикул гранулярного и гладкого ретикулума характеризует ультраструктурную перестройку в кардиомиоцитах в гипогомагнитных условиях. Ультраструктурные изменения в кардиомиоцитах результат повреждения биосинтеза структурных белков в геомагнитных аномалиях и нехватка их в регенераторных и пластических процессах в кардиомиоцитах. Сходные изменения в кардиомиоцитах были вызваны нарушением или подавлением биосинтеза белков. Стереотипная модель изменений в кардиомиоцитах подразумевает универсальные молекулярные и клеточные механизмы нехватки регенеративных и пластических процессов. В работе продемонстрировано, что наиболее частый эффект влияния гипогомагнитных условий – венозное и капиллярное общее полнокровие (плетора), интерстициальный отек, лимфостаз, спазм интрамуральных артерий. В конце эксперимента были замечены некробиотические изменения и рассасывания мононуклеарных клеток [130].

Сходные изменения в кардиомиоцитах вызвано атрофией клеток и рассасыванием их макрофагами. Последние стадии морфофункциональных перестроек сходны с апоптозом. Однако, в отличие от апоптоза, атрофические изменения в кардиомиоцитах обратимы [130].

Экспериментальные исследования влияния длительного пребывания животных в ГГМУ при всех исследованных коэффициентах ослабления геомагнитного поля (80–120, 300 и 1000 раз) свидетельствуют о развитии статистически значимых изменений состава крови, функционального состояния центральной нервной, иммунной, эндокринной и репродуктивной систем [130].

Таким образом, эксперименты с животными четко показывают глубокие изменения в их организме, происходящие при полном экранировании от ГМП.

Данные по влиянию гипогеомагнитных условий на людей в основном получены путем наблюдения за людьми, работающими в условиях ослабленного уровня магнитного поля Земли, которые на уже действующих производственных объектах является неустранимым фактором среды.

Исследования выявили, что биологическая граница, разделяющая безопасные и вредные условия труда при наличии ГГМУ характеризуется коэффициентом его ослабления относительно ЭМП открытого пространства равным 2.

Наблюдения за людьми, вынужденных длительное время находиться в помещениях, экранирующих естественные ЭМП (в самолетах, в космических аппаратах, в морских судах, в закрытой военной технике, в подземных сооружениях, в метро и т.д.), показали ухудшение деятельности сердечно – сосудистой и вегетативной нервной систем, снижение работоспособности [37].

Результаты клинико-физиологических обследований лиц, длительное время работавших в экранированных гипогеомагнитных помещениях (при коэффициенте ослабления геомагнитного поля в 3–10 раз), свидетельствуют о развитии у них ряда функциональных изменений в ведущих системах организма. Дистония мозговых сосудов с наличием регуляторной межполушарной асимметрии, синдром вегетативно-сосудистой дистонии, гипертоническая болезнь, нарушения механизмов регуляции вегетативной нервной системы проявляются в развитии функциональных изменений со стороны сердечно-сосудистой системы в виде лабильности пульса и артериального давления, нейроциркуляторной дистонии гипертензивного типа, нарушения процесса реполяризации миокарда, достоверное увеличение биологического возраста по сравнению с календарным на 4.2 года, что свидетельствует об ускоренном старении организма. Работники, работающие в гипогеомагнитных условиях, чаще, чем люди, работающие в условиях естественного магнитного фона, предъявляли жалобы на шум в голове, головокружения, раздражительность, ослабление памяти; значительно чаще были жалобы на снижение либидо и потенции [37]. Обнаруженные у персонала, работающего в ГГМУ, изменения свидетельствуют о нарушении неспецифических факторов защиты и иммунологической реактивности с формированием количественно-функционального иммунодефицита [45]. Фактически установлено, что у обследованных частота заболеваний, сопровождающих синдром иммунной недостаточности, существенно превышает таковую среди практически здоровых людей [37].

Проведенные исследования показали, что длительная работа в гипогеомагнитных условиях ($K_0^{гмп}=3-10$) при воздействии комплекса факторов производственной среды

приводит к напряжению адаптационных процессов в ведущих системах организма – центральной нервной, сердечнососудистой, иммунной и системе крови [45].

Экспериментальные условия с экранированным ГМП, моделирующее условия крупных городов, существенно влияют на биотропные эффекты естественных физических факторов. Динамика гелиогеофизических связей между некоторыми параметрами крови человека в гипомагнитных условиях демонстрируют биотропное влияние на систему свертывания крови у пациентов с сердечнососудистыми заболеваниями: многие параметры крови этих больных зависят от параметров гелиогеофизических факторов, что и у людей без артериальной гипертонии или сердечных заболеваний в течение всего исследования или пренатального развития [162].

Степень негативного воздействия магнитного поля на живой организм, прямо пропорциональна длительности его пребывания в экранированном помещении и коэффициенту ослабления магнитного поля. С увеличением длительности ежедневного сеанса нахождения в гипогеомагнитных условиях, как правило, отмечается увеличение выраженности выявленных изменений [16, 37]. Например, пребывание реанимационных больных во время сильной магнитной бури в экранированной камере с коэффициентом экранировки ЭМП в 4–5 раз, продолжительностью не более суток оказывают положительное воздействие. А пребывание в метро с коэффициентом экранировки естественных ЭМП 5–10 раз и одновременным десятикратным превышением допустимого уровня искусственных ЭМП, может вызывать у человека головные боли и сердечные приступы уже за 30 минут поездки на этом виде транспорта [37]. В ряде случаев кратковременное пребывание в гипомагнитной среде приводит к сильным нарушениям свойств биологических объектов. У людей, которые в течение пяти дней находились в полностью экранированной комнате, изменялась критическая частота мелькания, изменялся период циркадных ритмов, изменялась ритмика некоторых функциональных процессов [16].

Следует отметить, что в последнее время появились данные о модификации реакций организма на воздействие ряда неблагоприятных факторов в гипогеомагнитных условиях [15].

Таким образом, исследования по влиянию гипогеомагнитных условий на организм, показали, что геомагнитное поле играет важную роль в обеспечении нормального роста эмбриональных клеток, а также в регуляции раннего эмбриогенеза млекопитающих. Нахождение беременных самок в среде ослабленного магнитного поля Земли, приводит к негативным последствиям, как для самок, так и для потомства, причём экранированное МП

имеет избирательные повреждающие эффекты на эмбриогенез и в целом широкие повреждающие действие на организм. Исследования на животных показали, что длительное пребывание в условиях экранирования приводит к необратимым изменениям в организме. Клинико-физиологическое обследования лиц, длительное время работавших в гипогеомагнитных помещениях свидетельствуют о развитии у них ряда функциональных изменений в ведущих системах организма, ухудшение здоровья, снижение работоспособности, ускорения старения организма, нарушение неспецифических факторов защиты и иммунологической реактивности с формированием иммунодефицита.

Степень негативного воздействия магнитного поля на живой организм, прямо пропорциональна длительности его пребывания в экранированном помещении и коэффициенту ослабления магнитного поля. С увеличением длительности ежедневного сеанса нахождения в гипогеомагнитных условиях, как правило, отмечается увеличение выраженности выявленных изменений.

1.3.3. Влияние гипомагнитной среды на ЦНС и поведение

Первые экспериментальные исследования по влиянию электромагнитного поля на нервную систему были проведены в Советском Союзе. В монографиях профессора Ю.А. Холодова [63] опубликованы результаты его многолетних исследований по проблеме влияния электромагнитных и магнитных полей на центральную нервную систему. Было установлено наличие прямого действия электромагнитного поля на мозг, память, условно-рефлекторную деятельность, мембраны нейронов. В модельных экспериментах показана возможность влияния слабых электромагнитных полей на процессы синтеза в нервных клетках. Получены отчетливые изменения импульсации корковых нейронов, приводящие к нарушению передаваемой информации в более сложные структуры мозга.

К настоящему времени получено множество данных по воздействию среды ослабленного магнитного поля Земли на нервную систему организмов с помощью экспериментов, выполненных на различных объектах исследования (начиная с отдельных нервных клеток, заканчивая человеком), или путём психофизиологического обследования лиц, работающих в гипогеомагнитных условиях.

Исследование на мухах *Drosophila melanogaster* wild-type Berlin, выводимых в компенсированном ГМП (100-680 нТл) непрерывно в течение 10 поколений, показало постепенное ухудшение способности к обучению и запоминанию. При этом 10-ое поколение мух полностью потеряло способность обучаться и запоминать. При помещении мух в естественные магнитные условия, память у мух полностью восстанавливалась к

6 поколению. Таким образом, данные результаты показывают, что у живых организмов может произойти серьезные нарушения обучения и ухудшение памяти при длительном нахождении в условиях ослабленного ГМП на протяжении многих последовательных поколений. Но эти изменения обратимы [179].

Исследования на цыплятах выявили, что выведение цыплят в гипогеомагнитных условиях вызывает повреждение некоторые процессы эмбрионального развития, в том числе развитие ЦНС, при этом слабо влияя на процесс вылупления и период инкубации. [168]. У цыплят, выведенных в ГГМУ, выявлено ухудшение долговременной памяти в сравнении с цыплятами, выведенных в естественном ГМП (контрольная группа). При этом инкубация в среде ослабленного магнитного поля Земли слабо повлияло на кратковременную и среднесрочную память. Введение 0.1–0.5 нмоль/гемм норадреналина улучшало сохранение памятного следа у цыплят, выведенных в ГМП, но не помогало улучшению памяти цыплятам, выведенных в гипомагнитных условиях. Однако, долговременная память у этих цыплят могла быть улучшена до результатов контрольных цыплят введением относительно большой дозы норадреналина (1.0–1.75 нмоль/гемм) в IMHV (intermediate hyperstriatum ventrale). На основании этих результатов Ying Xiao с соавторами была высказана гипотеза, что норадреноэргическая система в мозге птенцов, возможно, была повреждена длительным воздействием гипомагнитных условий и уровень эндогенного норадреналина, участвующий в консолидации памяти, стал ниже [172].

В работе Zhang показано, что в стволе мозга золотого хомячка содержание норадреналина и плотность норадреноэргических нейронов значительно уменьшается после длительного нахождения в ослабленном геомагнитном поле [178]. По-видимому, аналогичные эффекты могли произойти у птенцов, выведенных в гипомагнитных условиях, и привести к уменьшению эндогенного норадреналина в структурах, связанных с памятью. Возможно, что нахождение в условиях ослабленного магнитного поля Земли влияет на процессы синаптической передачи (например: синтез, выброс и связывание медиатора с рецепторами, и т.д.) или распределение адренорецепторов.

Ying Xiao с коллегами [172] выдвигают гипотезу о том, что, возможно, изменения в норадренэргической системе, возникающие при нахождении в гипомагнитных условиях, могут привести к нарушениям в поведении, в настроении, а также в познавательной деятельности, что является важной проблемой в космической медицине [172].

В конце XX в. А.Н. Frey [97] высказал предположение о том, что в ответ на действие электромагнитных факторов различной природы и интенсивности изменяется активность опиоидной системы, которая является древней сигнальной системой [98].

C. Del Seppia со авторами [80] провели цикл работ, посвященных влиянию гипомагнитных условий на анальгезию у мышей. Авторы показали, что нахождение мышей в экранированном ГМП приводит к уменьшению обезболивания на раздражение, вызванного стрессом. Снижение антиноцицептивных реакций у мышей, находившихся в гипогеомагнитных условиях, сильнее выражено, чем у мышей, находившихся в переменном магнитном поле, или у мышей, которым вводили налоксон (антагонист опиатных рецепторов) [84]. Явление, что реакция обезболивания, вызванное нахождением в среде ослабленного магнитного поля Земли, подавляется после введения антагониста опиатных рецепторов – налоксона, показывает, что обезболивание обеспечивается эндогенной системой опиатов. Сходство эффектов налоксона и пребывания в переменном магнитном поле и в гипомагнитных условиях, указывает на то, что влияние магнитного поля, отличающегося от ГМП, имеет тормозное влияние на систему опиатов [84]. Было выявлено, что уменьшение анальгетического ответа, вызванного стрессорным воздействием, геомагнитным экранированием – обратимое явление. Отсутствие уменьшения обезболивающего ответа в случае, когда медная коробка экранировала электрический, но не магнитный компонент ГМП, доказывает специфику влияния магнитного поля. Интересно, тот же самый эффект не наблюдался в условиях, когда гипомагнитное поле было с нулевым вектором, но создано не экранированием, а компенсацией ГМП [80].

Авторы [85] также продемонстрировали, что уменьшение обезболивающего ответа может быть получено после краткосрочного пребывания в почти нулевом магнитном поле. На основе полученных данных, авторы предполагают, что магнитное поле, как и другие экологические факторы (такие как температура или сила тяжести), снижаясь в нормальных естественных условиях, могут вызвать изменения в физиологии и поведении [85].

Цикл работ по изучению воздействия гипогеомагнитных условий на реакции обезболивания у мышей C. Del Seppia с соавторами другие дополняют работы, выполненные на мышах и других объектах.

Так, Прато с коллегами [140] продемонстрировали, что ежедневное одночасовое помещение мышей в экранированное геомагнитное поле в течение 10 дней оказывает двухфазное влияние на болевой порог мышей. В течение первых двух дней наблюдается уменьшение болевого порога, затем резкое его увеличение, достигаемое на 5 день, и возвращение к прежнему уровню болевого порога к 8 дню. Данное явление похоже на болевой ответ, наблюдаемый после повторного ежедневного нахождения в сильном переменном ЭМП или введения налоксона, это также говорит о возможном участии опиодной системы в реакции обезболивания. Обезболивающий эффект введения налоксона и налтрексона, вероятно основывается на прекращении передачи запускающих сигналов от

опиатных рецепторов. Подобные явления могут лежать в основе антиноцицептивных эффектов гипогеомагнитных условий [83].

Темурьянц Н.А. с соавторами провели серию экспериментов по влиянию ноцицептивной чувствительности у мышей и моллюсков в условиях электромагнитного экранирования. На мышах были продемонстрированы трехфазные изменения ноцицепции под действиями электромагнитного экранирования. Данные согласуются с результатами, полученными в аналогичных экспериментах на наземных моллюсках, для которых было продемонстрировано фазные изменения ноцицептивной чувствительности: увеличение чувствительности к термическому стимулу сменяется развитием гипоанальгетического эффекта [58] и что экранирование различной продолжительности в течение всего эксперимента вызывает фазные изменения показателей болевого порога и латентного периода ответа [35]. Однако следует отметить, что изменения ноцицепции при ЭМЭ у мышей не только развиваются более быстро, чем у беспозвоночных животных, но и гораздо более выражены: максимальное увеличение чувствительности моллюсков при термостимуляции (гипералгезия) отмечалось позже, гипоанальгетический эффект был в 3 - 4 раза меньше, чем у мышей [59]. Авторы это связывают с тем, что у позвоночных животных преобладают миелиновые нервные волокна, благодаря чему все реакции на действие внешних раздражителей развиваются намного быстрее, чем у беспозвоночных, для которых характерно преобладание немиелинизированных волокон с низкой скоростью передачи нервного импульса. На основании этого авторы считают, что изучение механизмов влияния электромагнитных факторов удобнее проводить на животных низших таксономических групп, так как все реакции растянуты во времени, что позволяет более детально изучить исследуемые эффекты [33].

В эксперименте на крысах, которые находились в экранированном магнитном поле (20-23 нТл) в течение месяца, было показано, что гипогеомагнитные условия вызывают дисфункцию цикла Кребса в нейронах сенсомоторной коры. Дисфункция цикла Кребса проявляется в виде снижения разнообразия активности сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, основных ферментов цикла Кребса, и уменьшения вариабельности соотношений данных ферментов. Кроме того, под действием среды ослабленного магнитного поля Земли происходит нарушение месячного цикла изменения активности ферментов. Уменьшение разнообразия активности ферментов негативно влияет на метаболическое обеспечение приспособительных реакций нейронной популяции. В силу того, что снижаются доли нейронов с разной активностью ферментов, увеличивается вероятность присутствия в популяции клеток с одинаковым соотношением активности исследуемых ферментов. На основе полученных результатов авторы заключили, что под

действием гипогеомагнитных условий реакция энергетического обеспечения на внешние возмущения не будет разнообразной в большинстве нейронов популяции и, следовательно, популяция станет менее устойчива к внешним возмущениям [14].

В исследовании на мышах, находившихся в экранированном магнитном поле Земли (20 нТл) в течение одного дня, было выявлено, что пребывание в гипогеомагнитных условиях делает поведение мышей нервными и беспокойными. Авторы заключили, что поведение и настроение мышей чувствительны к нарушениям ГМП и могут быть изменены в краткосрочной экспозиции почти до нуля ГМП [151].

Del Seppia с соавторами [86] также исследовали влияние гипогеомагнитных условий в течение 90 минут на человека, моделируя магнитную обстановку на Международной Космической станции (от -48 мкТл до +53 мкТл), в течение одиночного оборота вокруг Земли. Во время нахождения в экспериментальном магнитном поле испытуемым показали ряд картин различного эмоционального содержания, при этом измеряли субъективную самооценку, проводимость кожи, артериальное давление, и частоту сердечных сокращений.

Результаты исследования показали, что во время нахождения испытуемых в магнитном поле проводимость кожи сильно отличалась в зависимости от эмоционального содержания картинок, будучи высоким во время просмотра эмоциональных картинок (положительный и отрицательный) и низкой во время просмотра нейтральных картинок. Когда испытуемые находились в естественном геомагнитном поле, никаких существенных различий по проводимости кожи не наблюдалось во время просмотра картинок. Была выявлена тенденция к увеличению частоты сердечных сокращений во время просмотра картинок при нахождении в магнитном поле по сравнению с естественным полем. Однако не было обнаружено никакого влияния на другие параметры. Авторы на основе полученных данных предположили, что под действием магнитного поля, с которым сталкивается люди, находящиеся на Международной космической станции, движущейся вокруг Земли, происходит увеличение автономного ответа вегетативной нервной системы на эмоциональные стимулы [86].

В.Н. Бинги с соавторами провели серию экспериментов по изучению влияния компенсации геомагнитного поля (<0.4 мкТл) на психологическую деятельность человека. Ослабление достигалось путем создания магнитного поля, равного и противоположно направленного локальному геомагнитному полю величиной около 44 мкТл [49].

Участники экспериментов были подобраны таким образом, чтобы можно было исследовать зависимость от пола и возрастную зависимость эффектов сниженного магнитного поля.

По результатам эксперимента, посвященного изучению влияния гипогеомагнитных условий на когнитивные процессы, установлено, что нулевое магнитное поле вызывает увеличение количества ошибок и увеличения времени выполнения задания в когнитивных тестах. Женщины в условиях нулевого магнитного поля выполняли задания хуже, чем мужчины. Возрастные различия в эффектах сниженного магнитного поля были менее выражены по сравнению с гендерными различиями. У 25 испытуемых из 40 в условиях компенсированного магнитного поля показатели когнитивных тестов ухудшались, у 15 – улучшались. У 5 из 40 испытуемых (12.5 %) такое ухудшение было наиболее ярко выражено. Наличие групп испытуемых, разнонаправлено реагирующих на снижение магнитного поля, не объясняется возрастными или гендерными различиями [49].

По результатам эксперимента, посвящённого исследованию воздействия среды ослабленного магнитного поля Земли и магнитного вакуума на цветовую память и другие проявления психологической деятельности человека, выявили незначительное ухудшение цветовой памяти и тенденцию к замедлению реакции в гипомагнитных условиях [49].

В исследовании по влиянию «нулевого» магнитного и электростатического полей на психофизиологическое состояние человека наблюдалось небольшие улучшения в кратковременной памяти на цвет у женщин и ухудшение кратковременной памяти у мужчин [3].

На основе полученных результатов авторы сделали ряд предположений. Вследствие схожести результатов совместного действия «нулевого» магнитного поля и электрических полей и результатов аддитивной суммы этих воздействий по отдельности, авторы выдвинули предположение, что биологические рецепторы магнитных и электрических полей имеют разную природу. К первым можно отнести магнитосомы, ко вторым — ДНК, белки, мембраны или другие молекулы или органеллы, имеющие электрический заряд или неоднородное распределение заряда по молекуле.

Значительные отличия результатов при тестировании мужчин и женщин, как в «нулевом» магнитном поле, так и в электрическом поле, говорит о том, что содержание рецепторов магнитного и электрического полей может зависеть от пола. На основе больших эффектов влияния ГГМУ в тесте на кратковременную память, нежели в тесте на скорость реакции, авторы предположили, что магнитосом содержится больше в гиппокампе чем в мозжечке, поскольку гиппокамп и мозжечок ответственны соответственно за память и координацию движений

Авторы предполагают, что помимо гипотетической вовлеченности частиц магнетита в рецепцию магнитных полей организмом человека, их наличие в клетках головного мозга

может являться как одна из вероятных причин болезней Паркинсона, Альцгеймера и других нейродегенеративных заболеваний [3].

Экспериментальные данные по исследованию воздействия среды ослабленного магнитного поля Земли дополняют психофизиологические обследования людей, работающие в гипогеомагнитных условиях.

Результаты гигиенического обследования ряда промышленных предприятий и других объектов, а также различных транспортных средств и транспортно-технологических установок показало, что гипогеомагнитные условия являются достаточно распространенным фактором производственной среды. Было выявлено статистически значимые изменения величин большинства исследованных показателей:

- Снижение показателей функционального уровня центральной нервной системы и уровня функциональных возможностей центральной нервной системы;
- Снижение критической частоты слияния световых мельканий;
- Возрастание амплитуды колебаний центра массы тела человека;
- Увеличение амплитуды нормального физиологического тремора [46].

Таким образом, изменение естественного магнитного поля, как и других экологических факторов (таких как температура или сила тяжести), в том числе его снижение, может вызвать изменения в физиологии и поведении. Исследования по воздействию гипогеомагнитных условий на нервную систему, выполненные на различных объектах, показали, что экспозиция в среде ослабленного магнитного поля Земли влияет как на молекулярном уровне, так и на поведенческом. На молекулярном уровне было обнаружено, что гипогеомагнитные условия вызывают нарушения в норадренэргической системе, что приводит к ухудшению памяти, оказывают тормозное влияние на систему опиатов, выражающееся в снижении антиноцицептивных реакций, вызывают дисфункцию цикла Кребса в нейронах, что делает нейроны менее устойчивыми к внешним воздействиям. На поведенческом уровне экспозиция в гипогеомагнитных условиях приводит к нервному и беспокойному поведению. Исследования на людях показали ухудшение памяти, снижение показателей функционального уровня ЦНС. Работы, посвященные влиянию ГГМУ на биоэлектрическую активность мозга, в доступной литературе отсутствуют.

1.4. Обзор методов исследования высшей нервной деятельности грызунов

1.4.1. Исследование двигательной активности грызунов

Одним из важнейших интегральных методов оценки функционального состояния организма является изучение поведения животного.

Большая часть из существующих количественных методик оценки поведения лабораторных животных предназначена для изучения поведения одного животного, помещенного в специальные условия, например, традиционный тест «открытое поле». Поведенческие реакции в «открытом поле» изучаются по комплексу тестов, характеризующих уровень эмоциональности, двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность, а также интегральную активность поведения животных в условиях свободного поведения [7]. Несмотря на простоту проведения теста «открытое поле», у данного метода есть существенный недостаток: как правило, в исследование используется несколько лабораторных крыс или мышей, и проведение тестирования требует много времени и непосредственное участие нескольких исследователей.

Ещё один метод оценки двигательной активности: актография – методика регистрации двигательной активности животного или человека для количественной оценки ее изменений во времени. Актография не нарушает нормальной жизнедеятельности организма, поэтому её широко используют для выявления суточных и сезонных биологических ритмов и в экологических исследованиях. Для актографии применяют специальный прибор – актограф [44].

Для измерения двигательной активности разработаны многочисленные коммерческие актометры [35], основанные на регистрации теплового излучения, актометры «Opto-Varimex» ("Columbus Instruments", США), которые фиксируют спонтанную двигательную активность с помощью инфракрасных датчиков. Недавняя перспективная российская разработка использует для оценки поведения лабораторных животных радиолокатор малой дальности [2].

Важным шагом к увеличению точности и объективности является автоматизация измерения двигательной активности. В последнее время для изучения пространственного перемещения (трассировки) животных распространение получили системы цифрового видео [35]. Принцип работы таких устройств заключается в следующем: животное помещают на арену под объектив цифровой видеокамеры, которая передает видеоинформацию в компьютер. Последовательность оцифрованных видеок кадров автоматически анализируется кадр за кадром.

Видеотрассировка имеет ряд несомненных преимуществ по сравнению с другими методами: это универсальный метод, который может быть применим для изучения различных форм поведения; метод обладает самой высокой точностью и позволяет в зависимости от разрешения измерять перемещение животного с точностью до миллиметра; цифровое видео позволяет получить наибольшее количество информации о поведении; цифровое видео допускает повторный просмотр видеозаписи эксперимента.

В настоящее время наиболее распространенной коммерческой системой видеотрассировки является EthoVision, разработанная голландской фирмой «Noldus Information Technology» [132]. Второй по известности является система Smart американской фирмы «San Diego Instruments». Эти системы адаптированы для оценки тревожности в тестах: «открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт», «свет/темнота» и «водный лабиринт Морриса».

В то же время современные системы видеотрассировки обладают рядом проблем [35]. Во-первых, необходимым условием работы систем является высокая освещенность для обеспечения контрастности объекта и фона, но даже при этих условиях контрастность не является достаточной для устойчивой работы системы. Другой нерешенной проблемой является отсутствие статистически обоснованных алгоритмов определения двигательной активности, и неподвижности. Третьим важным недостатком существующих в настоящее время методов исследования поведения состоит в том, что все они предназначены для наблюдения за одним животным, помещенным в специальные условия.

Визуальный анализ материалов круглосуточного видеонаблюдения за поведением животных, особенно при длительных многосуточных экспериментах, является чрезвычайно трудоемким и субъективным. Поэтому для автоматизированного анализа оценки двигательной активности сотрудниками НИИ ББ была разработана программа «Mouse Express» [56], позволяющая решить эти проблемы. Преимуществом программы является независимость типов кодирования видеоданных, устойчивость к шумам и неравномерности освещения, возможность исключения влияния незначительных движений, за счет настраивания отношения сигнала к шуму и возможность наблюдения за несколькими животными, для работы программы «Mouse Express» не требуется помещать животных в специализированные условия.

1.4.2. Исследования биоэлектрической активности мозга, выполненные на животных

1.4.3. Общая характеристика ЭЭГ

В нейрофизиологии основными методами регистрации физиологических процессов являются электрофизиологические методы. В физиологической активности клеток, тканей и органов особое место занимает электрическая составляющая. Электрические потенциалы отражают физико-химические следствия обмена веществ, сопровождающие все основные жизненные процессы, и поэтому являются надёжными (надёжность электрических показателей по сравнению с другими демонстративна, когда они оказываются единственным средством обнаружения деятельности), универсальными (об универсальности говорит единообразие потенциалов действия в нервной клетке, нервном волокне, мышечной клетке, как у человека, так и у животных) и точными (точность, т.е. временное и динамическое соответствие физиологических процессов электрическим показателям) показателями течения любых процессов [26].

Между двумя точками мозга, а также между точками мозга и удалёнными от него тканями организма, возникают переменные разности потенциалов, регистрация и анализ которых и составляют задачу электроэнцефалографии. Возбуждение нервных элементов, согласно современным представлениям, возникает в результате процесса их поляризации и деполяризации. Благодаря избирательной проницаемости оболочки нервной клетки по отношению к возникающим потенциалам, в состоянии покоя на наружной стороне оболочки нервной клетки устанавливается положительный заряд, а на внутренней – отрицательный. Возникающие при непрерывно происходящей поляризации и деполяризации различных нервных элементов головного мозга биоэлектрические токи взаимодействуют между собой и дают сложную интерференционную кривую электроэнцефалограммы (ЭЭГ) [51].

Электроэнцефалограмма представляет собой регистрацию колебаний электрических потенциалов мозга с поверхности черепа. В электроэнцефалограмме отражаются только низкочастотные биоэлектрические процессы длительностью от 10 мс до 10 мин. Предполагается, что ЭЭГ в каждый момент времени отражает суммарную электрическую активность клеток мозга [26].

Как любой электрический потенциал, ЭЭГ всегда измеряется между двумя точками. Существуют два способа регистрации ЭЭГ – биполярный и монополярный. При биполярном отведении регистрируется разность потенциалов между двумя активными

электродами. Этот метод применяется в клинике для локализации патологического очага в мозге. В нейрофизиологии общепринятыми считается метод монополярного отведения [26].

При монополярном отведении регистрируется разность потенциалов между различными точками на поверхности головы по отношению к какой-то одной индифферентной точке. В качестве индифферентной точки берут такой участок на голове или лице, на котором какие-либо электрические процессы минимальны и их можно принять за нуль. В этом случае с электрода, наложенного на скальп, регистрируются изменения потенциала с определённого участка мозга.

Отводящие электроды можно накладывать на самые разные участки поверхности головы с учётом проекции на них областей головного мозга [26].

При регистрации ЭЭГ возникают артефакты, которые можно разделить по происхождению на две большие группы: физические и биологические (физиологические). Физические артефакты чаще всего представлены тремя типами проявлений: появление шумовой частоты 50, или реже, 100 Гц (наводка переменного тока); регистрация больших нерегулярных потенциалов (вертикальные скачки записи); плавные смещения средней линии записи (механическое перемещение электродов). Биологические артефакты обусловлены регистрацией функциональной активности других (помимо головного мозга) органов и систем организма: мышечных потенциалов (электромиограмма); потенциалов мышц и проводящей системы сердца (ЭКГ); потенциалов, связанных с движением глаз (электроокулограмма); потенциалов, связанных с глотательными движениями; кожно-гальванического рефлекса [51].

ЭЭГ является отражением спонтанной ритмической активности мозга. Особый вклад в генерацию ЭЭГ вносят градуальные потенциалы ВПСП и ТПСП (возбуждение и тормозные постсинаптические потенциалы) дендритных волокон коры или различных ядер мозга. Суммация синаптических градуальных потенциалов даёт основной вклад активности при регистрации на скальпе. Меньший вклад в регистрацию вносят собственно потенциалы действия [13].

Различают потенциалы ближнего поля («near field») и дальнего поля («far field»). В том случае, когда сигнал ЭЭГ отражает информацию от генераторов, находящихся в коре, а электроды располагаются на скальпе в непосредственной близости от этих генераторов, сигнал характеризует ближнее поле. В другом случае сигнал ЭЭГ может быть от дальнего поля, когда электрод располагается на значительном расстоянии от генераторов сигналов, и сигнал проводится к месту регистрации за счёт объёмного проведения. Таким образом, скальповые сигналы ЭЭГ представляют сумму потенциалов ближнего и дальнего поля различного типа, в зависимости от отведения и способа регистрации [13].

1.4.4. Основные методы регистрации ЭЭГ у животных

Для съема ЭЭГ у крыс традиционным методом является вживление электродов. Для этого крысу предварительно анестезируют (например, кетамин, лидокаин [147], тиамил натрия [82]), помещают в стереотаксический инструмент так, чтобы брегма и лямбда находились на одной линии. Череп обнажается, в нем просверливаются отверстия для скрепляющих шурупов и канюли. Твердая оболочка мозга протыкается, электроды и канюля помещаются на место. Электроды объединяются, и вся конструкция цементируется на черепе зубным акрилом. Рана зашивается вокруг электродов и животному дают несколько дней на восстановление [82]. Используется пучок из 7–8 нихромовых проводов 0.025 мм диаметром для записи групп нейронов и 0.076 мм – для записи ЭЭГ. Координаты имплантации рассчитываются по стереотаксическому атласу мозга крысы [131].

Для крыс существует несколько техник записи, зависящих от типа. Так же, как съем ЭЭГ с кожи головы человека, ЭЭГ крысы имеет низкое разрешение вследствие того, что ток должен проникнуть через твердую оболочку, череп и кожу. Вживленные ЭЭГ электроды являются дополнительным травмирующим фактором при проведении экспериментальных исследований. В случае хронических экспериментов могут возникнуть проблемы с регистрацией ЭЭГ за счёт воспалительных реакций, которые происходят из-за введения электродов в мозг и последующих продвижением электродов в мозге [138, 163].

Кроме вживленных электродов, можно снимать ЭЭГ с помощью игольчатых электродов, не требующих имплантации (рисунок 1.5.2). Референтный электрод помещается на носовую кость. Для контроля артефактов, связанных с ЭКГ, в этом случае можно использовать дополнительный электрод, расположенный на туловище. Игольчатые электроды для регистрации ЭЭГ, как правило, изготавливают из серебра [82], из нержавеющей стали или платины [136].



Рисунок 1.5.2 – Регистрация ЭЭГ у крысы с использованием игольчатых электродов

Ещё один способ регистрации ЭЭГ разработал Bradley Greger с коллегами. Ими было разработано устройство для одновременной регистрации электрофизиологических сигналов и для введения химических препаратов в область в непосредственной близости от электродов. Хирургическая имплантация устройства осуществляется с минимальным использованием инвазивных процедур. Устройство имплантируют с помощью прибора стереотакс, через трепанацию черепа. Квалифицированный оператор может установить прибор примерно за 20 минут от начала анестезии [103].

Таким образом, существует два основных метода регистрации ЭЭГ у животных (крыс) – методика регистрации электроактивности с помощью вживлённых электродов и методика записи ЭЭГ с помощью подкожных электродов.

Регистрация ЭЭГ с помощью подкожных электродов имеет ряд преимуществ по сравнению с регистрацией ЭЭГ с помощью вживления электродов.

1. Размещение игольчатых электродов на поверхности черепа занимает гораздо меньше времени (2–5 минут), чем проведение операции по вживлению электродов (несколько часов). Что особенно актуально при регистрации ЭЭГ у большого количества животных.
2. Регистрация ЭЭГ игольчатыми электродами менее травматично для животного, чем вживление электродов.
3. Так как процесс вживления электродов является операцией с использованием наркоза, существует большая вероятность, что животное может иметь серьёзные осложнения после операции, вплоть до летального исхода. Чего не происходит при использовании игольчатых электродов.

К недостаткам регистрации ЭЭГ с использованием игольчатых электродов относится то, что электрическая активность мозга животного записывается с поверхности черепа без точной информации о локализации структуры-источника электроактивности мозга. При использовании методики вживления электродов для регистрации ЭЭГ электроды вживляются непосредственно в источник электроактивности мозга крысы.

Мониторинг ЭЭГ в течение нескольких суток у пациентов в состоянии комы с использованием различных типов электродов (дисковых и игольчатых) не показал существенных преимуществ традиционно используемых дисковых электродов по сравнению с игольчатыми по количеству артефактов, связанных с движениями [176]. Более того, при регистрации ЭЭГ с игольчатыми электродами количество артефактов было ниже.

Таким образом, регистрация ЭЭГ у животных при помощи игольчатых электродов обладает рядом преимуществ по сравнению с методикой регистрации электроактивности с помощью вживлённых электродов.

1.4.5. ЭЭГ у лабораторных животных в норме

Несмотря на то, что работ на крысах проделано в целом меньше, чем на людях, некоторые закономерности вывести удалось.

Показатели ЭЭГ обнаруживают сходство между видами, в частности человека и крыс [110]. Например, состояние настороженности связано с быстрыми частотами в ЭЭГ (например, бета-активности), в то время как фаза быстрого сна и сонливость характеризуются медленноволновой активностью. Кроме того, вызванные потенциалы показывают соответствие между показателями крыс и человека [167].

Предполагается, что ритмические колебания электрической активности мозга обеспечивают основную связь между функциями мозга, особенно для ассоциативных функций.

Результаты нескольких лабораторных исследований показали, что невозможно определить единственную функцию для данного типа ритма ЭЭГ. Ритмы имеют множество различных функций и выступают в качестве универсальных операторов или кодов функциональной активности мозга. Кроме частоты и региона, в которой регистрируется ритм, в функционировании мозга участвуют другие характеристики ритма. К таким характеристикам относятся: усиление ритма, временная блокировка ритма, фазовая синхронизация ритмов, задержка и продолжительность ритма ЭЭГ.

Сложные и интегративные функции мозга обеспечиваются одновременной работой нескольких ритмов. Нейронные сети источников ритмов (для дельта, тета, альфа- и гамма-ответов) активируются сенсорными и когнитивными стимулами. Эти стимулы вызывают несколько ритмов одновременно, которые распространяются к структурам с различной степенью интенсивности, синхронизации, продолжительности и задержки [70].

У крыс выделяют те же диапазоны ЭЭГ, что и у человека.

Дельта – диапазон (0.5–3.5 Гц, 100–300 мкВ), (δ -ритм) [39]

У человека дельта-ритм регистрируется во время медленноволнового сна [122].

Нахождение источников дельта-ритма упоминается во многих исследованиях, выполненных на различных объектах. Следы дельта-активности обнаружены во многих структурах мозга, среди них ствол [122] (работа выполнена на собаках), в прилежащем ядре полосатого тела и вентральном бледном шаре (*ventral pallidum*) [101]. Также найдены источники дельта-ритма в некоторых областях медиальной фронтальной коры [66]. Отклики наибольшей амплитуды на визуальные стимулы были зарегистрированы в теменных областях, в то время как на слуховые стимулы дельта-колебания высокой амплитуды были зарегистрированы в центральных и фронтальных областях [70].

Обнаружено, что дельта-ритм играет роль в процессах внимания, при решении когнитивных задач [108]. Выявлена корреляция дельта-ритма и вегетативной активности организма (вариабельностью сердечного ритма) [115, 174], отрицательная связь между дельта-активностью и средним значением артериального давления [79], уровнем секреции кортизола [104].

Дельта активность участвует в мотивационных ситуациях, связанных с опасностью или удовлетворением потребностей: мощность ритма увеличивается при состоянии голода [111] (мощность дельта-ритма уменьшается после приема пищи, которое следовало сразу за голоданием), при половом возбуждении (мощность дельта-ритма увеличивается при введении тестостерона, что свидетельствует о поведенческой активации мозга) [149], при болевых ощущениях [156] (так же тета- и бета- ритмы) и при паническом состоянии [121]. Также дельта-активность усиливается при сильном желании и уменьшается при удовлетворении (на примере приёма наркотиков) [121]. Дельта-ритм связан с обнаружением сигналов и принятием решений [70].

Дельта ритм представляет эволюционно старый ритм, который доминирует у низших позвоночных, но у бодрствующего взрослого человека дельта ритм «затемнен» более высокочастотными ритмами. Дельта ритм проявляется, когда по каким-либо причинам более продвинутые системы теряют приоритет. К таким условиям, когда проявляется

дельта колебания, относятся стадии раннего развития, сон и различные патологические состояния. Функционально дельта-колебания участвуют в синхронизации мозговой деятельности с вегетативными функциями, в мотивационных процессах дельта ритм связан с ситуациями вознаграждения и с защитными механизмами, в когнитивных процессах в основном связан со вниманием и с обнаружением мотивационно значимых стимулов в окружающей среде. Хотя в основном спекулятивные, эволюционные интерпретации имеют значительную объяснительную ценность и позволяют объединить и объяснить, казалось бы, изолированные и иногда даже противоречивые данные, поступающие из различных исследовательских областей [121].

Тета-диапазон (4–7 Гц, 100–300 мкВ), (θ -ритм) [39]

Фазовая синхронизация тета-ритма ритма является важным организующим принципом мозга во время бодрствования и быстрого сна [153].

Тета-волны, в основном, генерируются гиппокампом под контролем медиальной перегородки, в генерации ритма участвует холинэргическая система [82]. Тета-активность также регистрировали в некоторых экстрагиппокампальных регионах, в том числе в гипоталамусе, верхнем бугорке четверохолмия [116], в корковых областях [127]. Во фронтальной срединной коре крыс есть как минимум два тета-генератора, ретроспленальная кора также способна генерировать локальную тета-активность [175]. Бимодальная сенсорная стимуляция вызывает увеличение фронтального тета-ритма, что свидетельствует о том, что комплексная стимуляция усиливает процессы во фронтальной коре в диапазоне тета-ритма [70]. Тета-ритм был зарегистрирован в ядрах перегородки.

Тета-ритм гиппокампа у крыс является одним из наиболее хорошо изученных биологических ритмов. Данный ритм регистрируется у животного во время исследовательского поведения, которое включает различные типы движения, обнюхивание и ориентацию в пространстве [78].

Показано, что у грызунов тета-ритм гиппокампа сильно коррелирует с поведением [175]. Волны с частотой 6 – 12 Гц предшествуют и сопровождают активные и произвольные типы движения, такие как ходьба, прыжки. Состояние неподвижности (поза при ожидании угрозы) и автоматические типы движения, таких как мигание глаз, груминг, облизывание или покусывание шерсти, связаны с нерегулярной гиппокампальной активностью. Небольшие движения, такие как изменения позы или изолированное движение головой или конечностью, связаны с ритмической активностью тета-ритма уменьшенной амплитуды и сниженной средней частотой [164].

Есть данные, что тета-ритм гиппокампа участвует в когнитивных процессах и в эмоциях [100] и, возможно, участвует в формировании памятного следа [78]. Синхронизация тета-активности в нейронах в областях миндалины и гиппокампа представляет собой нейронный коррелят условно-рефлекторной реакции страха, служащей для улучшения нейрональной связи во время извлечения памятного следа [150].

Некоторые авторы выделяют из тета-ритма пару ритмов в двух диапазонах частот: медленный тета (4–6.5 Гц) и быстрый тета (6.5–9 Гц) [161]. Эти ритмы будут определяться структурами, генерирующими тета-ритм и стадиями возбуждения. Медленный тета-ритм связан с пассивным бодрствованием [173]. Холинергическая регуляция структур, генерирующих данный ритм, осуществляется через мускариновые рецепторы. Быстрый тета-ритм можно наблюдать во время активного бодрствования, связанного с произвольным движением. Структуры, генерирующие этот ритм менее известны, но вероятно, устойчивы к атропину [161].

Исследования на грызунах показывают причастность тета-ритма к нейронной пластичности [112] и кодированию информации [134].

Существует предположение об участии тета-ритма в сенсомоторной интеграции [72]. Экспериментальные данные предполагают, что тета-ритм может играть основную роль в когнитивных процессах и в кортико-гиппокампных взаимодействиях. «Ориентирование» – скоординированный ответ, указывающий на настороженность, возбуждение или готовность обрабатывать информацию – связано с тета-колебаниями и было зарегистрировано у кошек во время исследования, поиска и движения животного [70].

Ассоциативный характер для связанных с событием тета-колебаний более выражен, чем для ритмов более высоких частот.

Тета-колебания можно рассматривать как важный элемент функциональной передачи сигналов в мозге [70].

Считается, что изменения в тета-частотах у животных обусловлены теми же процессами, что у людей [147].

Альфа-диапазон (8–13 Гц, 50 мкВ), (α -ритм) [39]

Альфа ритм является доминирующим ритмом в ЭЭГ взрослого бодрствующего человека, и он значительно отличается по своим характеристикам и функциональной роли от других ритмов [13]. Частота ритма сильнее при дремоте, и отчетливо увеличивается сразу при закрывании глаз. Ритм доминирует, как правило, в задних отделах полушария. Альфа-ритм имеет наибольшую амплитуду и наибольшую устойчивость в затылочных и теменных отделах, но распространяется по градиенту к центральным и передним отделам.

Одной из характерной особенностей проявления альфа-ритма – это фазовые отношения в различных частях мозга. Часто затылочные и центральные альфа-ритмы находятся в противофазных соотношениях, имеется фазовая инверсия при переходе от задних к передним отделам.

Альфа-ритм подавляется и снижается по амплитуде при открывании глаз (спонтанном или произвольном) и усиливается при закрывании глаз. Депрессия альфа-ритма может происходить также при привлечении внимания, неожиданном напряжении, концентрации внимания [13].

В работе М. Doppelmaug [88] показана положительная связь между уровнем интеллекта и мощностью альфа-ритма. Альфа-активность связывают со вниманием [69], а также участием в процессах избирательного торможения [120].

Слуховые и зрительные стимуляции могут вызывать альфа-ответы в слуховых и зрительных путях, в гиппокампе и ретикулярной формации, которые могут быть видны без фильтрации.

Таламокортикальная система не уникальна в генерации альфа-ритма. Гиппокамп и ретикулярная формация имеют большее значение. Так, в отличие от таламокортикальной системы, гиппокамп и ретикулярная формация генерируют колебания на частоте 10 Гц во всех формах [70].

Альфа-активность может быть зарегистрирована у млекопитающих в таламокортикальных нейронных сетях. Альфа-ответы у человека аналогичны таковым у кошки [70].

Теменно-затылочная топография, депрессия при открывании глаз и другие характеристики альфа-ритма указывают на его тесную связь с функционированием зрительной системы. По мнению большинства исследователей, альфа-ритм возникает в отсутствие специфической афферентации в эту систему и представляет собой ритм расслабленного бодрствования или ритм «холостого хода», не связанный собственно с функционированием этой системы.

Другое объяснение роли альфа-ритма связано с периодами «очувствления» коры мозга за счет сканирующего механизма действия активирующих влияний на клетки коры. Кроме этого, есть ещё гипотеза, близкая к этим двум, – удержание многочисленных мембран мозга в рабочем состоянии за счёт их ритмической периодической поляризации и реполяризации, что обуславливает для таких неустойчивых систем некоторое состояние равновесия и возможность быстрого включения в работу различных систем мозга.

Существуют несколько вариантов альфа-ритма с аналогичными (или измененными) распределением и реактивностью, но отличающимися наличием замедленной или учащенной частотой [13].

Альфа-ритм может выступать в качестве функционального и коммуникативного сигнала с множеством функций. Такая интерпретация 10 Гц колебаний (на клеточном уровне, или в популяциях нейронов) может быть сопоставима с предполагаемой универсальной роли гамма ответов в передаче сигналов мозга [70].

Бета-диапазон (13–24 Гц, 25 мкВ), (β -ритм) [39]

Бета-ритм отличается от альфа-ритма преимущественно по частоте, реже по распределению и реактивности.

Частота бета-ритма выше 13 Гц. Хотя любую активность частотой от 13 Гц формально можно назвать бета-ритмом, но свыше 30 Гц этот ритм имеет обычно очень низкую амплитуду, выраженность его в спектре незначительная и его трудно идентифицировать в обычной ЭЭГ без специальных методических условий. В целом бета-ритм разделяется на синусоидальную активность с веретенами и четким пиком в спектре и бета-активность в широком диапазоне частот без четких или без доминирующих пиков. Последнюю бета-активность часто называют асинхронной. Часто такая активность выделяется у здоровых испытуемых с плоской ЭЭГ или на фоне депрессии альфа-ритма с наличием бета-активности во всем диапазоне [13].

Распределение и реактивность бета-ритмов варьируются в норме и при патологии. Различают три типа бета-активности по этим показателям. Все они исчезают при дремоте и сне, но некоторые виды могут дольше, чем альфа-ритм, сохраняться во время дремоты.

Широко распространенный бета-ритм. Этот тип бета-ритма может быть записан по всей поверхности головы, чаще виде синхронных и асинхронных колебаний. Он не блокируется, не усиливается при открывании глаз.

Лобно-центральный бета-ритм – наиболее часто встречающийся тип бета-активности. Он может быть выражен более широко, но чаще имеет лобно-центральную топографию. В некоторых случаях он подавляется при движениях или намерениях к движению или проприоцептивной стимуляции. Этот ритм может быть функционально сходен с мю-ритмом [13] (ритм сенсомоторной области коры головного мозга, расположенной в области роландовой извилины. Мю-ритм по своей частотно-амплитудной характеристике напоминает затылочный альфа-ритм, но он ниже по частоте, амплитуде и регулярности. Основная особенность мю-ритма состоит в том, что он изменяется только под влиянием проприоцептивных раздражителей и не реагирует или мало реагирует на

воздействие других раздражителей, например световых или звуковых сигналов. Выполнение любых движений независимо от их структуры, силовых, временных, пространственных характеристик всегда сопровождается блокированием ритма. Мю-ритм встречается у всех людей, но имеет разную выраженность. Мю-ритм описан в ЭЭГ не только людей, но и животных: обезьян, собак, кошек) [6].

Теменно-затылочный бета-ритм, или быстрый вариант альфа-ритма, имеет частоту, вдвое превышающую альфа (обычно 16-20 Гц). Этот бета-ритм депрессируется при тех же приемах, что и альфа-ритм.

Амплитуда бета-активности значительно ниже, чем альфа-ритма. Бета-ритм обычно симметричен и одинаково распределен по полушариям. Асимметрия бета-ритма (больше 30–40 %), одностороннее или фокальное его проявление являются патологическими признаками.

Проявление и устойчивость бета-активности в ЭЭГ индивидуальны, но, как правило, бета-активность увеличивается с возрастом. Так как альфа-ритм имеет тенденцию к уменьшению с возрастом, то отношение бета/альфа увеличивается к старости.

Физиологическая значимость бета-ритмов не совсем ясна. Блокирование бета-активности в лобно-центральных отделах при проприоцептивных нагрузках может предполагать связь этого типа бета с сенсомоторной функцией (аналогично мю-ритму). Теменно-затылочный бета-ритм, вероятно, имеет такое же физиологическое значение, как и альфа [13].

В работе P.S Foster, D.W Harrisson, (2002) показано, что повышение внимания и возбуждения, как правило, связано с увеличением мощности бета-ритма [95]. Бета-ритм и гамма-ритм (> 30 Гц) были зарегистрированы совместно с процессами внимания, восприятия и узнавания [171].

В работе на мышах [71] показано, что бета-ритм гиппокампа регистрируется во время исследования новой обстановки.

Гамма-диапазон (30–170 Гц, < 10 мкВ), (γ -ритм)

Гамма-ритм — колебания потенциалов ЭЭГ в диапазоне от 30 Гц до 120–170 Гц. Амплитуда очень низка — ниже 10 мкВ и обратно пропорциональна частоте. В случае если амплитуда гамма-ритма выше 15 мкВ, то ЭЭГ рассматривается как патологическая.

Гамма-ритм наблюдается при решении задач, требующих максимального сосредоточенного внимания.

Синхронизация нейронных импульсов на частоте гамма-ритма может являться пространственным и временным объединением различных отделов мозга во время процессов восприятия [146, 157].

В ряде работ показано, что гамма-ритм сопутствует процессам внимания, обучения и памяти [113, 117], участвует в процессах сознания, возбуждения, интеграции восприятия и в рабочей памяти [92].

Нейронная активность на частоте гамма-ритма играет важную роль в процессах обработки сенсорных стимулов и высших когнитивных стимулов в неокортексе [123].

Гамма-ритм, также как и бета-ритм, регистрируются ЭЭГ у человека во время представления нового звукового стимула [105].

Гамма-активность регистрировали в задней теменной коре, в передней височной и задних регионах фронтальной коры [117].

Синхронные гамма-колебания были зарегистрированы в зрительных, слуховых, соматосенсорных, обонятельных, моторных модальностях и модальностях памяти у широкого диапазона видов животных [92]. Гамма-ритм также является компонентом слухового и зрительного ответа у человека.

Что касается животных, то усиление мощности и когерентности гамма-осцилляций были зарегистрированы при предъявлении крысам различных стимулов и объектов [123].

В работе [123] показано, что синхронизация гамма-активности в первичной сенсорной коре у грызунов может отображать участие нейронов в процессах обнаружении нового объекта.

Широко распространенная гамма-активность в корковой ЭЭГ может быть легко продемонстрирована во время психологической деятельности. Различные исследования на животных показали, что синхронность гамма-ритма коррелирует с когнитивными функциями; нарушение синхронизации гамма-ритма коррелирует с убыванием когнитивных функций [95].

Гамма-колебания, возможно, представляет универсальный код связи в ЦНС [70].

Оптогенетические исследования говорят о том, что в генерации гамма-ритмов важную роль могут играть парвальбумин-содержащие нейроны [154]. Оптогенетика — методика исследования работы нервных клеток, заключающаяся во внедрении в их мембрану специальных каналов — опсинов, реагирующих на возбуждение светом. Для экспрессии каналов используются методы генной инженерии, для последующей активации либо ингибирования нейронов и сетей используются лазеры, оптоволокно и другая оптическая аппаратура [74].

Многие нейрофизиологи рассматривают колебания выше 30 Гц как высокочастотный шум и при анализе ЭЭГ отфильтровывают их, считая эти частоты наводками от потенциалов мышц головы и шеи. Показано, что во многих случаях за гамма-волны принимают электромиографическую активность [169] и миниатюрные движения глаз [177].

Однако из того, что гамма-ритм совпадает по частоте с мышечными потенциалами, не следует, что он является артефактом — гамма-ритм регистрируется и у животных с вживлёнными электродами. В ЭЭГ-исследованиях корректная регистрация гамма-ритма у человека возможна лишь при одновременной записи ЭЭГ и миограммы и сопоставлении этих данных.

Таким образом, у крыс выделяют те же ритмы ЭЭГ, что и у человека. Результаты различных исследований показали, что невозможно определить единственную функцию для данного типа ритма ЭЭГ. Ритмы имеют множество различных функций и выступают в качестве универсальных операторов или кодов функциональной активности мозга.

1.4.6. Исследование нейрональной активности

1.4.7. Иммуногистохимические методы

Бурное развитие иммунологии в начале 20 века привело к разработке нового метода гистологического исследования — иммуногистохимического. Иммуногистохимия — это метод выявления точной локализации того или иного клеточного или тканевого компонента (антигена) *in situ* благодаря связыванию его с мечеными антителами. Авторами этого метода по праву считается группа исследователей под руководством Альберта Кунса, которые впервые в 1941 г. получили меченные флюоресцеином антитела и применили их в диагностических целях. Последующие годы были отмечены не только совершенствованием самого метода, но и расширением сфер его применения.

В первые годы развития иммуногистохимии антитела к интересующему антигену приходилось получать самому исследователю. В настоящее время существует большое количество антител как поли-, так и моноклональных, которые выпускаются промышленным путем.

Иммуногистохимические методики исследования на сегодняшний день являются обязательной частью любых исследований, т. к. только они обеспечивают специфическую визуализацию локализации в тканях различных клеток, гормонов и их рецепторов,

ферментов, иммуноглобулинов, компонентов клеток (сократительных и промежуточных филаментов) и даже отдельных генов, изучать секреторные и синтетические процессы [42].

Имуногистохимия – метод идентификации и определения локализации в клетке и тканях структур, имеющих антигенные свойства, основанный на реакции антиген-антитело.

Антигеном называют любое вещество, которое при попадании в ткани восприимчивого организма вызывает иммунный ответ, в результате чего формируются специфические антитела, которые затем связываются с данным веществом. Антигенами обычно являются высокомолекулярные белки и полисахариды, реже ими являются полипептиды, липиды и нуклеиновые кислоты. Та часть молекулы антигена, которая соединяется с антителом, называется эпитопом или антигенной детерминантой. Биологические объекты, которые состоят из множества макромолекул, например бактерии, содержат большое количество эпитопов, что определяет разнообразие антител, специфичных данному объекту. Иммунный ответ могут вызывать и низкомолекулярные вещества, или гаптены, в том случае, если они соединяются с высокомолекулярными «носителями» (белками, полисахаридами). В качестве гаптенных могут выступать лекарственные вещества, моно- и полисахариды, низкомолекулярные полипептиды, фосфолипиды, триглицериды [42].

Антитела, представляют собой γ -глобулиновую белковую фракцию плазмы и называются иммуноглобулинами. Наиболее распространен класс иммуноглобулинов G (IgG). Молекула IgG состоит из двух субъединиц, соединенных дисульфидными связями (рисунок 1.6.1.1). Каждая субъединица состоит из двух полипептидных цепей — тяжелой (H-цепи) и легкой (L-цепи), которые также как и субъединицы иммуноглобулина, соединены между собой дисульфидными мостиками.

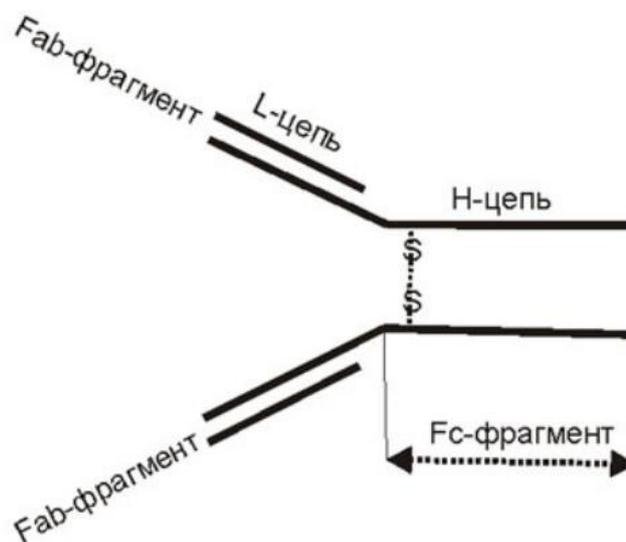


Рисунок 1.6.1.1 Структура молекулы IgG [42]

В каждой молекуле IgG выделяют следующие области: Fc-фрагмент (constant fragment) и Fab-фрагмент (antibody fragment). Структура Fc-фрагмента идентична для всех молекул IgG у определенного вида животных. Таким образом, Fc-фрагмент определяет видоспецифичность антител и не участвует во взаимодействии антитела с антигеном. Структура Fab-фрагмента крайне вариабельна. Fab-фрагмент определяет специфичность антитела, поскольку участвует во взаимодействии с эпитопом антигена. Каждая молекула IgG имеет в своем составе два Fab-фрагмента, то есть является бивалентной и может соединяться с двумя различными антигенными детерминантами.

Иммуноглобулины являются макромолекулами и сами могут выступать в роли антигенов. При введении иммуноглобулинов в организм животного другого вида получают антитела к Fc-фрагменту. Поскольку Fc-фрагмент определяет видоспецифичность, то полученные антитела являются специфичными ко всем возможным иммуноглобулинам данного вида животного. Таким способом получают т.н. «вторичные антитела» или антисыворотки, используемые при постановке иммуногистохимических реакций.

Антитела можно конъюгировать с флуорохромами или ферментами, используя аминокислотные остатки. Полученные антитела называются мечеными или конъюгированными [42].

Антитела, которые используются в иммунологических методиках, получают путем повторной иммунизации различных животных (мышей, кроликов, крыс, коз, ослов, овец, лошадей и др.) Затем в период максимальной выработки антител у животных забирается кровь, из которой затем выделяют фракцию иммуноглобулинов. При проведении иммуногистохимических реакций используются моно- и поликлональные антитела.

Моноклональные антитела продуцируются в большом количестве одиночными клонами клеток гибридомы, они идентичны по молекулярной организации, специфичности и родству к антигену. Гомогенность моноклональных антител делает более предсказуемой концентрацию антител, что обеспечивает более высокую воспроизводимость результатов, а высокая специфичность обеспечивает идентификацию антигена в смеси похожих по структуре антигенов. Однако они связываются только с одним участком молекулы антигена, и это обуславливает низкую чувствительность метода, проявляющуюся в слабом иммуноокрашивании на срезах, к тому же при единственном эпитопе высока вероятность того, что фиксатор сделает его недоступным для антител, в результате чего не произойдет иммуноокрашивания.

Поликлональные антисыворотки, получаемые при иммунизации животных, обычно кроликов, коз или овец, содержат антитела к различным эпитопам иммуногена. Наиболее

важным преимуществом поликлональной антисыворотки является то, что она образует крупные нерастворимые интенсивно окрашиваемые при иммуногистохимическом исследовании комплексы с антигеном благодаря одновременному связыванию антител со многими эпитопами антигена, вследствие этого они менее чувствительны к конформационным изменениям антигена [42].

Необходимым этапом любого иммуногистохимического метода является визуализация результатов реакции «антиген-антитело». Выявить антитела, связавшиеся с антигеном, можно используя различные метки, связанные с Fc-фрагментом антител. Такими метками могут быть:

- флюорохромы;
- ферменты;
- металлы и металлопротеиды;
- радиоизотопы;
- промежуточные связующие вещества, например, биотин, дигоксин.

Данные метки могут быть присоединены как к первичным антителам (прямой метод), так и к вторичным (непрямой метод).

Прямой метод предполагает использование меченых антител против интересующего антигена. Антитела взаимодействуют с антигеном в местах их локализации. Эти места выявляют при помощи метки, связанной с антителами. Это наиболее простой метод визуализации, однако чувствительность его крайне низкая, так как на одну молекулу искомого антигена будет приходиться одно меченое антитело.

Непрямой метод предполагает использование двух различных антител. Первичные антитела реагируют с антигенами ткани. Связанные с меткой вторичные антитела специфически взаимодействуют с первичными, которые для вторичных антител являются антигеном. Метод значительно чувствительнее прямого, т. к. с каждой молекулой первичных антител связывается несколько молекул вторичных антител, содержащих метку. И хотя в реакцию добавляется еще один этап, такой метод имеет некоторые преимущества:

вторичные антитела против Fc-фрагмента другого вида животного получать намного проще, также легче присоединить к ним метку;

первичные антитела не несут на себе лишнего груза в виде метки, а значит, легче и быстрее проникают в ткани, метка не влияет на конформационные изменения после взаимодействия антител с антигеном.

В качестве меток изначально использовались различные флюорохромы. При использовании этих методов исследователю необходимо иметь люминесцентный микроскоп [42].

Метод прямой иммунофлуоресценции — антиген связывается с антителом, конъюгированным с флуоресцентной меткой (рисунок 1.6.1.2)

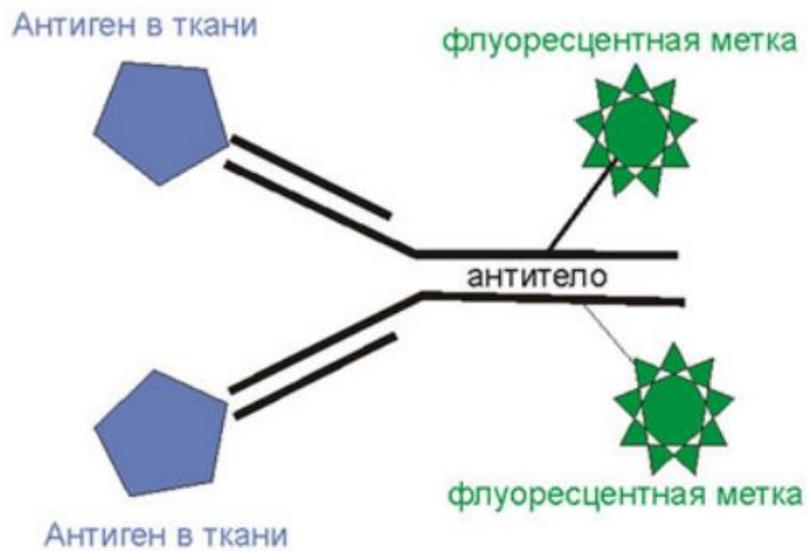


Рисунок 1.6.1.2 Метод прямой иммунофлуоресценции [42]

Недостатки метода:

- низкая чувствительность
- перекрестные реакции
- быстрое разрушение флуоресцентной метки

Метод непрямой иммунофлуоресценции – антиген связывается с неконъюгированным специфическим антителом (первичным антителом). Флуоресцентная метка конъюгирована с вторичным антителом, специфичным к Fc-фрагменту первичного антитела (рисунок 1.6.1.3).

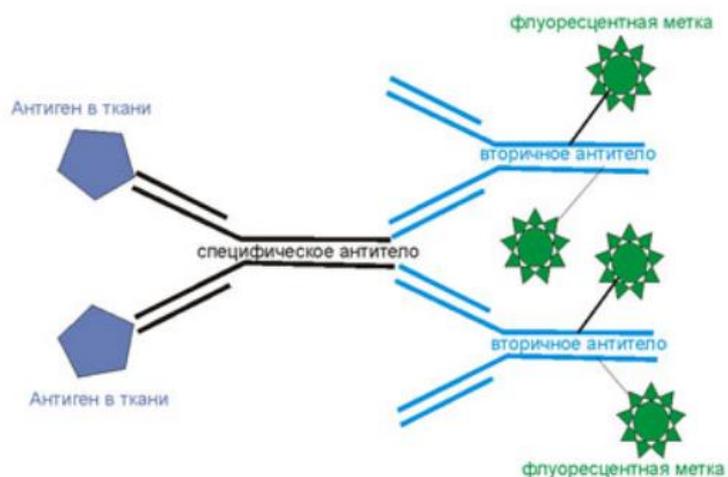


Рисунок 1.6.1.3 Метод непрямой иммунофлуоресценции [42]

Достоинства метода:

- более чувствителен, чем прямой метод

Недостатки метода:

- перекрестные реакции
- быстрое разрушение флуоресцентной метки

При использовании двойной метки (разные антитела, конъюгированные с различными флюорохромами) можно наблюдать на одном срезе взаимное расположение разных структур.

Однако флуоресцентные метки имеют свои недостатки:

- необходимость специального флуоресцентного микроскопа с набором барьерных фильтров;
- низкая чувствительность метода;
- сложность подготовки препаратов;
- быстрое затухание флуоресценции, даже при использовании реагентов, снижающих данный эффект;
- полученные препараты нельзя хранить.

Для успешного проведения иммуногистохимической реакции необходимо создать определенные оптимальные условия, которые, с одной стороны, повысили бы эффективность взаимодействия антигена с антителом, а с другой — свели бы к минимуму неспецифическое окрашивание (фон). С этой целью применяют комплекс приемов обработки срезов перед их инкубацией с антителами [42].

Создание и поддержание специальных условий для проведения иммуногистохимических реакций может осуществляться автоматически с помощью специальных аппаратов — иммуностейнеров, которые позволяют значительно сократить время и расход дорогостоящих реагентов.

Практическое значение иммуногистохимического исследования:

- Иммуногистохимический анализ широко применяется в онкологических исследованиях (уточнение гистогенеза опухолей, уточнение вероятного источника метастазирования, определение чувствительности опухоли к гормональному лечению);
- Диагностика аутоиммунных заболеваний;
- Поиск инфекционных агентов;
- Оценка функционального состояния клеток;
- Идентификация клеток различных типов по их уникальным маркерным признакам;
- Изучение синтетических и секреторных процессов;
- Выявление гормонов и рецепторов к ним [42].

1.4.8. Белок раннего ответа c-fos как маркер нейрональной активности

Гены немедленного реагирования – это гены, которые очень быстро активируются в ответ на какой-либо клеточный стимул [109]. Активация генов рассматривается как один из основных сохранившихся в эволюции компонентов нейронального ответа на повреждение [18]. Наиболее известные гены из этой группы – c-fos, c-mys, c-jun.

c-fos был одним из первых генов, для продукта которого было показано участие в регуляции транскрипции. Он вовлечен во множества клеточных функций, в том числе в процессы клеточной пролиферации и дифференцировки. Ген раннего реагирования c-fos быстро, однако, временно активируется в ответ на воздействие самого широкого спектра [18], в том числе при электрической активности нейронов (например, потенциалы действия) [165]. Максимум экспрессии гена c-fos наблюдается обычно через 25–40 минут после воздействия [99], однако, реакция может быть обнаружена уже через 5 минут [67]. После периода активации происходит быстрое угнетение экспрессии и ко второму часу после индукции мРНК c-fos почти не обнаруживается [90].

Ген находится под контролем множественных сигналпередающих систем. Промотор гена c-fos обладает сложной организацией, обуславливая необходимые функциональные свойства этого гена, связанные с клеточной дифференцировкой и пролиферацией, а также с целым рядом стрессовых реакций. При взаимодействии внешних факторов с клеточной поверхностью специфично активируются внутриклеточные процессы, приводящие к взаимодействию определенных транскрипционных факторов с промотором гена c-fos. В зависимости от характера воздействия может активироваться большой набор путей передачи сигнала, центральную роль в которых играют как мембранные компоненты, так и цитоплазматические протеинкиназы. Несмотря на линейный характер многих путей передачи сигнала, многие их компоненты взаимодействуют с сопутствующими факторами, что усложняет сигналпередающую схему и в то же время обогащает возможности тонкой регуляции гена c-fos [18].

Гену c-fos принадлежит важная роль и в физиологических функциях организма. Ген c-fos является тем самым «мостиком», через который индивидуальный опыт животного вступает во взаимодействие со всем генетическим аппаратом. Однако не всегда усиление экспрессии гена c-fos выполняет физиологическую функцию. В случае, когда экспрессия гена усиливается более чем в 20 раз, c-fos уже играет отрицательную роль. Гиперэкспрессия гена c-fos, приводит к значительному повышению в клетке содержания белка c-fos, который непосредственно участвует в процессе фрагментации ДНК и инициировании процессов апоптической гибели клетки.

Характер экспрессии гена будет определять дальнейшую судьбу клетки: либо в ней будут активироваться трансляционные, транскрипционные процессы, синтез пластических материалов, либо она апоптически погибнет (гиперэкспрессия) [18].

Анохин и соавторы установили, что данный ген идеально подходит на роль универсального зонда для картирования мозга. Ген *c-fos* обладает рядом уникальных свойств. Во-первых, в спокойном состоянии клетки он «молчит», у него практически нет «фонового» уровня активности. Во-вторых, если в клетке начинаются какие-либо новые информационные процессы, он очень быстро откликается на них, нарабатывая РНК и белки. В-третьих, он универсален, то есть активируется в самых разных отделах центральной нервной системы — от спинного мозга до коры. В-четвертых, его активация связана с обучением, то есть с формированием индивидуального опыта. Многочисленные экспериментальные исследования показали, что ген *c-fos* не реагирует на очень сильную стимуляцию, например световую, звуковую или болевую, в тех случаях, когда воздействие не несет в себе элементов новизны. Но как только ситуация обогащается новой информацией, ген «просыпается» [18].

Использование белка *c-fos* как маркер нейрональной активности предлагается во многих исследованиях [89, 99, 168, 166].

Белок *c-Fos* является ядерным, что позволяет легко обнаруживать метки, расположенные в цитоплазме с помощью стандартного метода двойного мечения. Другим преимуществом белка является то, что максимальная секреция белка наблюдается через 25–40 минут после начала стимуляции. Что позволяет исследователю проводить манипуляции с животным сразу после воздействия, не опасаясь, что это приведет к неспецифической или вызванной стрессом экспрессии генов немедленного реагирования [99].

Электронная микроскопия показала, что возбуждение нейронов вызывает секрецию белка *c-fos* в ядрах нейронов. Белок может быть обнаружен в нейронах с помощью иммуногистохимических методов. Menetrey 1989 предположил, что индукция гена *c-fos* может выступать как маркер физиологической активности [77].

Также белок *c-fos* можно использовать как нейрональный маркер при агрессивном поведении. В ряде работ показано, что при агрессивном поведении в структурах мозга регистрируется синтез белка *c-fos*. Экспрессия *c-fos* была обнаружена в дорсальной и каудальной части кортикомедиальной миндалины, которая вовлечена в реализацию агрессивного поведения [139]. Показано, что психосоциальные (сенсорный контакт) и агрессивные взаимодействия повышают активацию *c-fos* в прелимбической, передней поясной, агранулярной островковой, вентральной и латеральной орбитальной области коры. Инфраламбическая и медиальная орбитальная области активировались только при

агрессивных взаимодействиях. Другие зоны коры не активировались [106]. По экспрессии *c-fos* было обнаружено, что на проявления агрессии влияют средовые факторы, такие, как фотопериод [153].

Таким образом, многочисленные исследования показали, что белок раннего реагирования *c-fos* обладает рядом свойств, которые позволяют с помощью иммуногистохимических методов использовать данный белок как маркер нейрональной активности при воздействии на организм каким-либо новым фактором.

1.5. Мю-опиодные рецепторы

Опиодные рецепторы (опиатные рецепторы) – разновидность рецепторов нервной системы, относящихся к рецепторам, связанных с G-белками. Эти рецепторы расположены в центральной и в периферической нервной системе. Фармакологические исследования показали, что свойства рецепторов, расположенных на периферии и в головном мозге очень похожи. Опиодные рецепторы расположены во всех областях ЦНС участвующих в интеграции информации о боли – ствол мозга, медиальный таламус, спинной мозг, гипоталамус, лимбическая система [94].

Опиодные рецепторы активируются как эндогенными опиодными пептидами, так и экзогенным введением опиодных препаратов, такими как морфин. Активация рецепторов приводит к множеству эффектов, которые включают в себя обезболивание, угнетения дыхания, эйфорию, выделение гормонов, ингибирование желудочно-кишечного тракта [167].

Показано, что дисфункция эндогенной опиодной системы (уменьшение активности данной системы и повышение болевой чувствительности) может быть одним из факторов для проявления агрессивного поведения, и что агрессия связана с отсутствием опиодной анальгезии [76].

Существует несколько типов опиодных рецепторов, различаемые по их фармакологическим ответам на опиодные лиганды. На сегодняшний день были клонированы четыре типа опиодных рецепторов: μ -рецепторы (мю), δ -рецепторы (дельта), κ -рецепторы (каппа) и ноцицептивные рецепторы.

Передача сигналов боли в спинном мозге регулируется балансом усиливающих или тормозных влияний, действующих на нейронные сети соматосенсорной системы. Хотя опиодные структуры являются активными на периферии, они производят анальгезию в

первую очередь путем ингибирования ноцицептивной передачи в центральной нервной системе.

Опиодные рецепторы, расположенные пресинаптически и постсинаптически в синапсах в спинном мозге, были хорошо изучены. Рецепторы, расположенные на пресинаптических нервных окончаниях первого нейрона, уменьшают высвобождение возбуждающих нейротрансмиттеров из ноцицептивных нейронов. Это пресинаптическое ингибирование вызвано влиянием активации опиодных рецепторов на ионные каналы. В частности, опиодная активация приводит к гиперполяризации нервного окончания через открывание калиевых каналов или закрывание кальциевых каналов [94].

Опиодные рецепторы, расположенные постсинаптически, имеют аналогичное влияние на следующий второй нейрон. Гиперполяризация, вызванная изменениями в ионных потоках, приводит к снижению чувствительности этого нейрона к возбуждающим сигналам от первого ноцицептивного нейрона [94].

Передача сигнала от опиодных рецепторов происходит через связь с ингибирующими G-белками. Один опиодный рецептор может регулировать несколько G-белков, и несколько рецепторов могут быть активированы одним G-белком. Кроме того, один G-белок может регулировать несколько эффекторов, и один эффектор может быть активирован несколькими G-белками. С помощью этих механизмов может быть инициирован каскад сложных процессов, включающих активацию протеинкиназ, стимуляцию генов и синтез других нейромодуляторов. Эти процессы, в свою очередь, изменяют свойства нейронных ответов и приводят к синтетическим процессам, которые могут изменить различные рецепторы или другие структуры [94].

На основе данных С. Del Seppia и S. Bruehl о том, что гипогеомагнитные условия оказывают тормозное влияние на опиодэргическую систему, что может привести к агрессивному поведению, было решено провести исследования по изучению длительного (более 5 суток) влияния среды ослабленного геомагнитного поля на агрессивность и активацию опиодэргической системы у крыс в динамике, как одну из возможных причин агрессивного поведения. Так же, исходя из имеющихся литературных данных о том, что пребывание в ГГМУ снижает показатели функционального уровня центральной нервной системы у человека, ухудшает память и способность к обучению у мух, делает поведение мышей неактивным, вялым, было решено исследовать поведение, память, ЭЭГ – как показателя активности функционирования нервной системы, у крыс при воздействии ГГМУ и проанализировать зависимость изменений в высшей нервной деятельности и поведения лабораторных крыс от длительности воздействия гипогеомагнитных условий.

2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Объектами исследования были выбраны белые лабораторные половозрелые крысы-самцы с исходной массой тела 180–200 г. из аутбредного стока линии Вистар в возрасте 8 недель. Общий объем выборки трёх серий экспериментов составил 72 крысы: 10-суточный эксперимент (серия) – выборка 24 крысы; 21-суточный эксперимент (серия) – выборка 24 крысы; 5-суточный эксперимент (серия) – выборка 24 крысы.

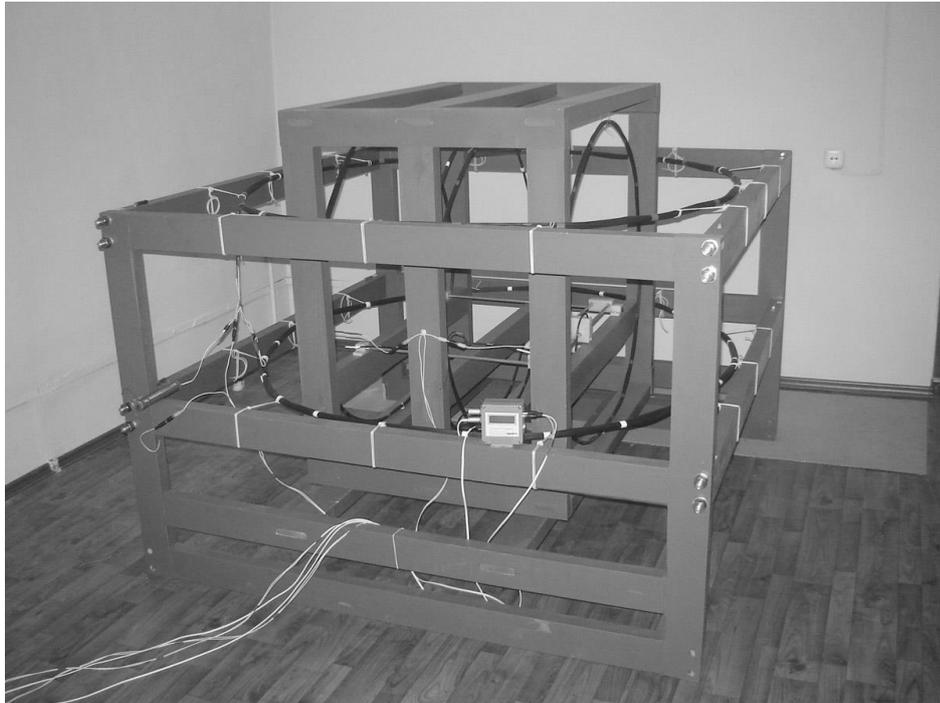
Животных содержали на стандартном пищевом рационе вивария, при свободном доступе к воде и пище, в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Перед началом исследования животные содержались на карантине в течение не менее 7 дней. В 10-суточном эксперименте животные содержались в условиях естественного освещения, в 21-суточном и в 5-суточном эксперименте при световом режиме 12/12 часов.

Лабораторные крысы были выбраны в связи с тем, что они относятся к высшим млекопитающим, для них хорошо разработаны методы забора крови и методы физиологически адекватного содержания в эксперименте. У крыс хорошо изучены их поведенческие реакции, внешние проявления состояния животного по состоянию кожных покровов. В эксперимент брали всегда только крыс-самцов в связи с возможным дополнительным влиянием гормонального фона у самок.

2.2. Создание условий ослабленного магнитного поля Земли

В работе моделировались гипогеомагнитные условия с помощью специальной камеры, которая состоит из клетки для животных и соленоидов для компенсации магнитной индукции горизонтальной и вертикальной составляющих Земли (колец Гельмгольца). Соленоиды установлены в каркасе из немагнитных материалов и подключены к пульту управления. Клетка выполнена из непрозрачного немагнитного материала с прозрачной крышкой, позволяющей вести визуальное и видеонаблюдение за животными, имеет вентиляционные отверстия. Габаритные размеры клеток 600×500×400 мм в 10-суточной и 21-суточной серии, 400×500×400 мм в 5-суточной серии. Внутри и снаружи установки находятся два магнитометра, измеряющие магнитную индукцию внутри и снаружи камеры. Эти датчики подключены к компьютеру. По соленоидам идет электрический ток, который

создает магнитное поле, компенсирующее магнитное поле Земли. Датчик фиксирует величину магнитной индукции, создаваемой магнитным полем внутри камеры, и отправляет сигнал в компьютер. Компьютерная программа, контролирующая токи соленоидов, в автоматическом режиме сравнивает показатель внутреннего датчика с показателем наружного датчика и автоматически компенсирует электромагнитное поле внутри камеры до нуля, показания датчиков сохраняются в файл для контроля компенсации ГМП.



Внутри установки уровень МП 0 ± 50 нТл

Рисунок 2.2 – Камера по созданию гипогеомагнитных условий

2.3. Схема эксперимента

Перед каждым экспериментом животных содержали от недели до десяти дней в виварии для адаптации.

После периода адаптации было проведено тестирование методом «открытого поля», для того чтобы отобрать в эксперимент животных со средней двигательной активностью с целью увеличения гомогенности групп. Отобранные крысы случайным образом разбивались на опытную и контрольную группы. Опытную группу (экспериментальных животных) помещали в условия гипогеомагнитной среды, контрольная группа животных находилась в том же помещении, где располагалась установка по созданию гипогеомагнитных условий, на расстоянии 4 метров (10-суточная серия) или в соседней комнате (21-суточная

и 5 суточные серии) от экспериментальной камеры. С помощью магнитометров было установлено, что электромагнитные поля установки не влияют на контрольных животных. В течение этого времени внутри установки поддерживался сниженный до 0 ± 50 нТл уровень магнитного поля.

В 10-суточной серии было отобрано 24 (по 12 животных в контрольной и в опытной группах) из 60 крыс. Опытная группа находилась в условиях гипогеомагнитной среды в течение 10 суток.

В 21-суточной серии было отобрано 24 крысы (по 12 животных в контрольной и в опытной группах) из 80 животных. Крысы опытной группы подвергались воздействию гипогеомагнитных условий в течение 21 суток.

В 5-суточной серии было отобрано 24 (по 12 животных в контрольной и в опытной группах) крысы из 70 животных. Крысы опытной группы находились в условиях гипогеомагнитной среды в течение 5 суток.

В 21-суточном и 5-суточном экспериментах животные контрольной и опытной групп находились в условиях искусственного освещения в режиме 12/12 часов (свет/темнота), в 10-суточном эксперименте – в условиях естественного освещения.

Все животные имели свободный доступ к воде и к пище.

За животными велась видеосъемка, включая ночное время (видеосъемка в инфракрасном свете).

После хронического эксперимента во всех сериях крыс вторично протестировали методом открытого поля. Затем были проанализированы круглосуточные видеозаписи экспериментов с целью анализа двигательной активности и агрессивного поведения животных.

В 21-суточной и 5-суточной сериях был проведен ряд дополнительных исследований: регистрация электроэнцефалограммы у крыс, иммуногистохимический анализ структур мозга, тест на выработку рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Тест УРПИ был проведен только в 21-суточной серии.

2.4. Метод исследования поведения крыс в «открытом поле»

Методика «открытое поле» относится к распространенным стандартным тестам, по изучению поведения животного; тест «открытое поле» основывается на помещении животного в незнакомую ситуацию новизны – открытого поля, норковой камеры и другие. Методика позволяет оценить резистентность ЦНС к воздействию какого-либо стрессирующего фактора.

Согласно методике «открытое поле» крысу помещали в центр ярко освещенной камеры размером 1×1 м из белого пластика с прозрачными бортами высотой 30 см. Поле размечено на 25 квадратов, на пересечении квадратов вырезаны отверстия диаметром 3 см («норки»). В течение пяти минут наблюдали за поведением животного, фиксируя следующие поведенческие акты:

- горизонтальная активность (количество пересеченных квадратов);
- вертикальная активность (стойки);
- эмоциональность (количество дефекаций и уринаций);
- норковый рефлекс;
- груминг;
- латентный период выхода из центрального квадрата.

После 5 минут исследования крысу возвращают в домашнюю клетку. Количество пересеченных квадратов, стоек, заглядываний в норку характеризует двигательную активность и исследовательское поведение животных, количество дефекаций – эмоциональную составляющую поведения. Указанные акты поведения подсчитывают в течение пяти минут и в течение каждой минуты. Камеру тщательно моют после каждого животного.

Тестирование проводилось в течение одного дня до и в течение одного дня после экспозиции в ГГМУ, с 10 до 12 часов утра.

2.5. Метод выработки у крыс условного рефлекса пассивного избегания

Выработку УРПИ проводили по методике, описанной Бурешом Я., Бурешовой О., Хьюстон Дж.П. [7] Для этого была изготовлена специальная установка (рисунок 2.5).



Рисунок 2.5 – Выработка у крыс условного рефлекса пассивного избегания

Она представляет собой прямоугольную камеру с решетчатым полом размером 50×50 см и стенками высотой 35 см, выполненную из прозрачного пластика. В центре одной стены находится прямоугольное отверстие 6×6 см, соединяющее большую камеру с малой размером 15×15 см с непрозрачными стенками, электрифицированным полом и съёмным потолком. Камеры разделены скользящей дверцей. Освещение мощностью 100 Вт над центром большой светлой камеры на высоте 150 см.

Тестирование выполняется в три стадии.

1. Исследование. Животное помещают в центре большой камеры спиной к входу в маленькую камеру, дверь между камерами открыта. Крысе разрешают исследовать установку в течение 3 мин. Измеряют время входа в небольшую камеру.

2. Обучение. Дверцу закрывают, крысу помещают в небольшую камеру, закрывают крышку, подают удар тока (50 Гц, 1.5 мА, 50 В, 1 с). Затем открывают крышку и возвращают крысу в домашнюю клетку.

3. Тестирование. Повторяют (1), регистрируют то же, что и в (1).

За день до эксперимента каждую крысу помещали в камеру три раза для исследования камеры. После того как крыса третий раз заходила в малую камеру, дверцу закрывали, и животное получала разряд тока. Крысу тестировали на следующий день, а также после эксперимента. Выработку УРПИ проводили за два дня до помещения животных ГГМУ, первое тестирование за 1 день до начала эксперимента.

2.6. Метод исследования агрессивного поведения

Под агрессивным поведением понималось нападение одного животного на другого.

Число агрессивных взаимодействий в каждой серии экспериментов подсчитывалось путем просмотра круглосуточной видеозаписи всего эксперимента.

В 10-суточной серии при просмотре каждые 2 часов (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 часа) видеозаписи подсчитывалось число агрессивных межиндивидуальных взаимодействий в течение 5 минут каждого просматриваемого часа.

В 21-суточной серии подсчет агрессивных взаимодействий проводился путём просмотра видеозаписи всего эксперимента, каждые 3 часа и дополнительно часы смены освещения, т.е. на каждые сутки было получено 10 временных точек (0, 3, 6, 8, 9, 12, 15, 18, 20, 21 час), просматривался полностью весь час.

В 5-суточной серии подсчет агрессивных межиндивидуальных взаимодействий проводился путём просмотра видеозаписи всего эксперимента, каждые 3 часа, т.е. на

каждые сутки было получено 8 временных точек (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 час), просматривался полностью весь час.

Изменение способа подсчета агрессивных взаимодействий в каждой серии экспериментов (смена выбранных часов просмотра, подсчет 5 минут или всего часа) связана с усовершенствованием методики по исследованию влияния ГГМУ на агрессивное поведение животных.

2.7. Методы исследования общей двигательной активности крыс

2.7.1. Метод визуального анализа общей двигательной активности крыс

В течение всех суток 10-суточной серии при просмотре круглосуточной видеозаписи эксперимента по 5 минут каждые 2 часа (0, 2, 4...22 часа) фиксировали следующие показатели поведения крыс:

- Число бодрствующих и спящих крыс;
- Количество межиндивидуальных взаимодействий;
- Горизонтальная активность (количество перемещений по клетке);
- Вертикальная активность.

Сумма показателей горизонтальной и вертикальной активности составляла общую двигательную активность.

2.7.2. Метод исследования двигательной активности крыс с помощью программы «Mouse Express»

Оценка двигательной активности с помощью программы «Mouse Express» (рисунок 2.7.2.1) основана на принципе покадровой оценки изменения видеоизображения. Программа автоматически оценивает суммарное количество движения в единицу времени в условных единицах. По соседним видеокдрам определяются вектора движения для макроблоков размерами 16×16 пикселей. Сумма длин векторов движения рассматривается как интегральная двигательная активность крыс в текущем кадре. При полном отсутствии движения (статичная картинка) программа приравнивает количество движения к 0 [55, 56]. По окончании обработки видеофайла записывается файл результатов (рисунок 2.7.2.2).

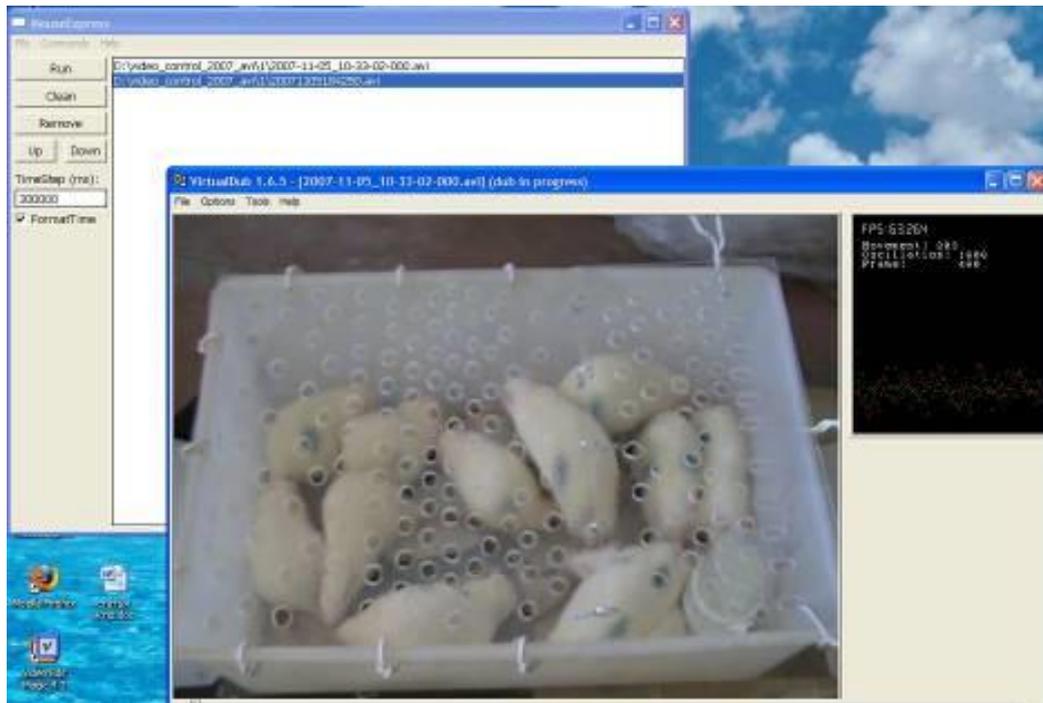


Рисунок 2.7.2.1 – Программа «Mouse Express» во время подсчета результатов

//Day/Month/Year	hour:Min	Movement	Oscillation
5/11/2007	10:38	1169494	12036500
5/11/2007	10:43	812024	13060764
5/11/2007	10:48	980482	13329752
5/11/2007	10:53	1115933	12589183
5/11/2007	10:58	727498	13386549
5/11/2007	11:3	624752	13720943
5/11/2007	11:8	656636	13329573
5/11/2007	11:13	1827665	11933664
5/11/2007	11:18	1781540	11751033
5/11/2007	11:23	2328133	11719675
5/11/2007	11:28	967332	11469350
5/11/2007	11:33	877170	12506417
5/11/2007	11:38	491747	13067344
5/11/2007	11:43	476101	13181414
5/11/2007	11:48	749518	12218180
5/11/2007	11:53	466057	13277510
5/11/2007	11:58	860644	13328019
5/11/2007	12:3	547198	13338664
5/11/2007	12:8	382501	13944364
5/11/2007	12:13	242026	14036458
5/11/2007	12:18	443503	13835510
5/11/2007	12:23	255023	13956773

Рисунок 2.7.2.2– Файл результатов работы «Mouse Express»

2.7.3. Метод проверки работы программы Mouse Express

Для анализа адекватности работы программы «Mouse Express» был проведен ряд экспериментов, направленных на проверку работы программы в зависимости от освещения, количества исследуемых животных, а также от параметров видеосъемки. В различных условиях освещения тестировали лабораторных крыс методом «открытого поля» в течение 5 минут. Также проводили тестирование при разном количестве крыс в установке «открытого поля». Во время тестирования регистрировали горизонтальную активность (число пересеченных квадратов) за каждую минуту. Само тестирование записывалось на

цифровую камеру, полученные видеофайлы анализировались программой «Mouse Express» с временным шагом – одна минута. В дальнейшем проводилось сопоставление поминутных результатов теста открытого поля и программы «Mouse Express».

Зависимость от освещения

В первой серии экспериментов исследовалась адекватность работы программы «Mouse Express» от освещения. Двенадцать лабораторных крыс были протестированы методом «открытого поля». При этом шесть крыс тестировались при искусственном освещении и шесть крыс тестировались в темноте при инфракрасном свете. Полученные данные «открытого поля» каждой группы крыс сопоставлялись с данными подсчета программы.

Зависимость от количества животных

Во второй серии экспериментов исследовалась адекватность работы программы «Mouse Express» от количества животных. Тестирование в «открытом поле» проходило в темноте в три этапа. На первом этапе тестировали животных по одному, на втором этапе в установку «открытого поля» запускали одновременно пару крыс, на третьем этапе в камеру «открытого поля» одновременно помещали три крысы. Показания горизонтальной активности считали суммарно для пары и тройки животных, поскольку программа Mouse Express оценивает двигательную активность в целом для группы животных. Полученные данные «открытого поля» каждой группы крыс сопоставлялись с данными подсчета программы.

Зависимость от параметров видео

В третьей серии экспериментов исследовалась адекватность работы программы «Mouse Express» от параметров видеосъёмки, точнее от разрешения и числа кадров в секунду. Для этого тестирование в «открытом поле» двух групп животных (одна группа тестировалась в темноте при инфракрасном свете, а другая при искусственном освещении) снималось при помощи двух видеокамер с разными параметрами. Тестирование, проводимое при искусственном освещении, снимали с помощью камеры Axis 221 (разрешение 320 × 240 точек и частота кадров 29 кадров/с), а тестирование, проводимое в темноте, снимали при помощи камеры Axis P1344 (разрешение 640 × 480 точек и частота кадров 15 кадров/с). При помощи программы VirtualDub уменьшали разрешение с 640 × 480 точек до 320 × 240 точек и уменьшали число кадров в секунду с 29 до 15. Таким образом, получили четыре группы видеофайлов:

1 – тестирование при искусственном освещении (разрешение 320 × 240 точек и 29 кадров в секунду);

2 – тестирование при искусственном освещении (разрешение 320×240 точек и 15 кадров в секунду);

3 – тестирование в темноте (разрешение 640×480 точек и 15 кадров в секунду);

4 – тестирование в темноте (разрешение 320×240 точек и 15 кадров в секунду).

В дальнейшем видеофайлы были исследованы программой «Mouse Express».

В 21-суточной и в 5-суточной сериях был проведён автоматизированный анализ оценки двигательной активности лабораторных крыс с помощью программы «Mouse Express».

2.8. Метод исследования биоэлектрической активности мозга (ЭЭГ)

Регистрацию электроэнцефалограммы проводили в 21-суточной и 5-суточной сериях.

Для регистрации ЭЭГ с помощью подкожных игольчатых электродов крысу фиксировали в руках исследователя (рисунок 2.8). Использовали следующие электроды:

1) два регистрирующих игольчатых электрода вводили подкожно в теменной части головы, в области левого и правого полушария;

2) референтный электрод вводили подкожно в области носовой кости;

3) в качестве земляного и дополнительного использовали серебряные клипсовые миниэлектроды и электродный гель «Унигель», земляной электрод фиксировали на левой передней лапе, дополнительный электрод – на правой задней лапе животного.

Дополнительный электрод применялся для контроля артефактов, связанных с работой сердца.



Слева – фиксация подкожных игольчатых электродов, справа – фиксация земляного и дополнительного электродов

Рисунок 2.8 – Регистрация ЭЭГ у крысы

ЭЭГ регистрировали монополярно при помощи 24-канального электроэнцефалографа «Энцефалан-131-03» («Медиком МТД», Таганрог) в частотном диапазоне от 0.16 до 70 Гц. Частота дискретизации составила 250 Гц. Применялся запирающий фильтр, вырезающий 50 Гц колебания, связанные с сетевой наводкой.

Регистрировали ЭЭГ в трех режимах:

- 1) фоновая проба 1 в течение 30 с;
- 2) звуковая стимуляция: частые стандартные (1000 Гц, 80 дБ) и редкие девиантные (500 Гц, 80 дБ) стимулы с вероятностью предъявления 80 и 20 %, межстимульный интервал 700 мс со случайной девиацией ± 10 %, всего 100 стимулов;
- 3) фоновая проба 2 в течение 30 с.

Звуковой стимулятор располагался на расстоянии 20 см от головы крысы с правой стороны.

ЭЭГ регистрировали до эксперимента. После экспозиции в гипомагнитных условиях у всех животных была проведена повторная регистрация ЭЭГ.

ЭЭГ было исследовано в диапазонах: дельта (0.5–4 Гц), тета (4–8 Гц), альфа (8–13 Гц), бета (13–24 Гц), гамма 1 (25–49 Гц), гамма 2 (51–70 Гц).

2.9. Метод оценки параметров нейрональной активации различных структур мозга с помощью иммуногистохимического метода

Для выявления механизмов влияния гипогеомагнитной среды на агрессивность был проведен иммуногистохимический анализ срезов мозга крыс в 21-суточной и 5-суточной сериях, включающий двойное иммуноокрашивание: первая флуоресцентная метка к белкам раннего ответа *c-fos*, вторая – к μ -опиоидным рецепторам. Поскольку опиоидергическая система имеет непосредственное отношение к болевой чувствительности и селективные агонисты для μ -рецепторов вызывают обезболивание [167], было предположено, что именно изменение болевого порога при воздействии гипогеомагнитной среды является причиной агрессивного поведения животных [76, 80, 83, 85]. В качестве структур мозга были проанализированы: фронтальная кора, верхние бугры четверохолмия, таламус и околотоводопроводное серое вещество. Фронтальная кора, как показано в литературе, имеет отношение к агрессивному поведению [106], таламус и околотоводопроводное серое вещество – к болевой чувствительности [40], в то же время эти структуры содержат значительное количество клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы [155]. Верхние бугры четверохолмия, как показано в работах [128, 129], характеризуются изменением экспрессии белков раннего ответа под влиянием измененного ГМП.

Для окраски срезов применяли так называемый «Сэндвич» – метод, использующийся при непрямом выявлении антител и антигенов. Преимуществом данного метода является повышение чувствительности реакции и более интенсивная флуоресценция. Специфичные к определенным белкам первичные антитела сначала связываются с антигеном, а затем связанные антитела выявляются с помощью вторичных антител, конъюгированных с флюорохромом. В качестве первичных использовали антитела к белкам *c-fos* и антитела к μ -опиоидным рецепторам, которые затем визуализировали с помощью вторичных антител с флюорохромами с разным спектром эмиссии (приложение 1).

2.10. Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0».

Агрессивное поведение крыс в течение хронических экспериментов анализировали путём просмотра видеозаписей. Количество агрессивных взаимодействий животных опытной и контрольной групп оценивали в суточной динамике и в динамике эксперимента. Результаты опытной группы сопоставлялись с результатами контрольной группы. По

полученным данным строились графики средних значений числа агрессивных взаимодействий. Статистическое исследование агрессивного поведения проводилось с помощью непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона и многофакторного дисперсионного анализа – ANOVA. Для оценки суточной динамики в качестве факторов использовали «часы» (число уровней – по числу временных точек) и «группа» (2 уровня – опытная и контрольная группы), оценивали также взаимодействие факторов «часы*группа». Факторами в дисперсионном анализе в динамике агрессивных взаимодействий в ходе эксперимента выступали «дата» (число уровней – по числу временных точек (сутки экспозиций в ГГМУ)), «группа» (2 уровня – опытная и контрольная группы) и оценивали взаимодействие факторов «дата*группа».

Анализ результатов тестирования методом «открытого поля» проводили путём сопоставления данных опытной группы с контрольной до и после экспозиции в ГГМУ, а также сопоставление данных для каждой группы до и после нахождения в условиях ослабленного геомагнитного поля. Результаты тестирования в «открытом поле» анализировали с помощью непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Манна-Уитни. По полученным данным строились таблицы.

Анализ результатов теста УРПИ проводили путём сопоставления результатов опытной группы с контрольной группой до обучения, после него и при повторном тестировании сохранности рефлекса после хронического эксперимента. Результаты тестирования УРПИ анализировали с помощью непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Манна-Уитни. По полученным данным строились гистограммы.

Для исследования общей двигательной активности крыс видеозапись экспериментов была обработана программой «Mouse Express». Двигательную активность опытной и контрольной групп оценивали в суточной динамике и в динамике эксперимента. Результаты опытной группы сопоставлялись с результатами контрольной группы. По полученным данным строились графики средних значений. Статистическое исследование общей двигательной активности проводилось с помощью непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона и многофакторного дисперсионного анализа – ANOVA. Факторами в дисперсионном анализе в суточной динамике агрессивного поведения выступали «часы» (число уровней – по числу временных точек), «группа» (2 уровня – опытная и контрольная группы), оценивали взаимодействие факторов «часы*группа»; факторами в дисперсионном анализе в динамике агрессивных взаимодействий в ходе эксперимента выступали «дата» (число уровней – по числу временных точек (сутки экспозиций в ГГМУ)), «группа» (2 уровня – опытная и контрольная группы) и оценивали

взаимодействие факторов «дата*группа». Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Статистическая обработка адекватности работы программы «Mouse Express» проводилась с помощью регрессионного анализа. Были построены графики линейной регрессии результатов программы «Mouse Express» и теста открытого поля в зависимости от освещения, количества животных и параметров видеосъёмки.

При исследовании ЭЭГ крыс анализировали спектр мощности основных ритмов. Анализ результатов ЭЭГ проводили путём сопоставления данных опытной группы с контрольной до и после экспозиции в ГГМУ, а также сопоставление данных для каждой группы до и после нахождения в условиях ослабленного геомагнитного поля. Результаты исследования ЭЭГ анализировались с помощью непараметрического критерия парных сравнений Вилкоксона и критерия Манна-Уитни. По полученным данным строились гистограммы.

Для определения уровня нейрональной активации проводился анализ микрофотографий срезов мозга, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа Axio Imager Z1. При анализе фиксировались следующие показатели:

1) общее количество клеток (подсчитывалось количество синих меток, что обозначало место связывания красителя ДАПИ с ДНК),

2) доля клеток, экспрессирующих белки c-fos от общего количества клеток (вычислялось путём подсчёта зеленных меток (что обозначало связывания метки с белком) колокалализованных с синими метками и деления их на общее число клеток (синие метки)),

3) доля клеток, имеющих μ -опиоидные рецепторы от общего количества клеток, (вычислялось путём подсчёта красных меток, ассоциированных с ядрами (синие метки) и деления их на общее число клеток (синие метки)),

4) доля активированных опиоидергических клеток (сочетание красной и зеленой метки, ассоциированных с ядром (синяя метка)), от количества опиоидергических клеток.

Использовался непараметрический критерий Манна-Уитни.

Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Общее состояние животных в течение хронического эксперимента

В течение трёх серий экспериментов все животные были в хорошем состоянии: шерсть у животных была сухая, белая, несвалявшаяся, аппетит хороший, потребление воды и корма во всех группах было одинаковым.

Таблица 3.1 – Масса тела животных в трёх сериях экспериментов

Серия эксперимента	Контроль		Опыт	
	До	После	До	После
10-суточная	311.7±5.8 г.	396.0±8.7 г.	309.5±6.8 г.	396.5±7.5 г.
21-суточная	227.0±6.1 г.	264.6±7.7 г.	224.2±6.6 г.	281.3±9.6 г.
5-суточная	220.4±3.9 г.	325.1±8.1 г.	211.3±2.9 г.	305.1±25.6 г.

Как видно из таблицы 3.1, все крысы (опытные и контрольные), используемые в экспериментах, прибавили в весе, что является нормой для возраста 10-12 недель. Значимых различий по весу между опытными и контрольными группами не наблюдалось.

3.2. Результаты теста «открытое поле»

Результаты тестирования в «открытом поле» до и после во всех трёх сериях экспериментов представлены в таблицах 3.2.1–3.2.3

Таблица 3.2.1 – Средние показатели теста «открытое поле» у крыс до и после хронического эксперимента в 10-суточной серии.

Показатель поведенческой активности в «открытом поле»	До хронического эксперимента		После хронического эксперимента	
	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)
Горизонтальный компонент	50.3±4.8 ##	48.4±4.1##	13.8±5.2	11.7±4.1
Вертикальный компонент	21.5±1.8 ##	18.8±1.5 ##	3.1±1.2	4.2±1.6
Эмоциональный компонент	1.1±0.5	1.4±0.5	1.1±0.3	2.6±0.7
Норковый компонент	10.8±1.6	9.7±1.5	6.7±1.5	8.9±2.1
Груминг	2.6±0.1	3.3±0.6	3.2±0.9	2.6±0.6
Латентный период выхода из центра (с.)	2.4±0.5 #	1.8±0.6 ##	16.1±6.7	14.4±3.3
Общая двигательная активность	71.8±5.3 ##	68.3±5.1##	16.8±6.2	15.8±5.4
Примечания: # – $p \leq 0.05$, ## – $p \leq 0.01$, критерий Вилкоксона, значимые различия между значениями до и после экспозиции в ГГМУ				

Таблица 3.2.2 – Средние показатели теста «открытое поле» у крыс до и после хронического эксперимента в 21-суточной серии.

Показатель поведенческой активности в «открытом поле»	До хронического эксперимента		После хронического эксперимента	
	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)
Горизонтальный компонент	39.3±2.4 ##	44.3±2.4#	8.5±2.3	19.2±7.3
Вертикальный компонент	12.9±1.8 ##	10.7±1.3##	3.7±0.9	4.8±1.5
Эмоциональный компонент	0.9±0.3	1.4±0.3	1.6±0.7	1.3±0.4
Норковый компонент	0.5±0.3 ##	1.3±0.5 ##	0.8±0.3	1.6±0.4
Груминг	2.9±0.5	3.9±1.1	1.9±0.5	2.3±0.7
Латентный период выхода из центра (с.)	3.3±1.0	2.3±0.5	5.8±2.0	3.3±0.8
Общая двигательная активность	52.8±2.4 ##	56.2±2.5 #	12.9±2.5	25.5±8.5
Примечания: # – $p \leq 0.05$, ## – $p \leq 0.01$, критерий Вилкоксона, значимые различия между значениями до и после экспозиции в ГГМУ				

Таблица 3.2.3 – Средние показатели теста «открытое поле» у крыс до и после хронического эксперимента в 5-суточной серии.

Показатель поведенческой активности в «открытом поле»	До хронического эксперимента		После хронического эксперимента	
	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)	Контроль (n=12)	Опыт (n=12)
Горизонтальный компонент	13.2±3.7	25.0±7.9	15.4±4.5	20.1±6.7
Вертикальный компонент	2.5±0.7	3.1±1.0	2.7±0.8	2.7±0.9
Эмоциональный компонент	1.1±0.3	1.1±0.4	2.0±0.6	2.1±0.7
Норковый компонент	3.4±0.9	6.3±2.0	3.5±1.0	3.4±1.1
Груминг	2.9±0.8	2.6±0.8	3.1±0.9	4.5±1.5
Латентный период выхода из центра (с.)	0.6±0.2	1.3±0.4	4.3±1.2	3.4±1.1
Общая двигательная активность	14.6±4.1	25.6±8.1	19.4±5.6	24.9±8.3

В 10-суточной и в 21-суточной сериях результаты теста «открытого поля» показали статистически достоверное уменьшение двигательной активности (горизонтальная,

вертикальная, общая двигательная активность) для контрольной и опытной групп после повторного тестирования.

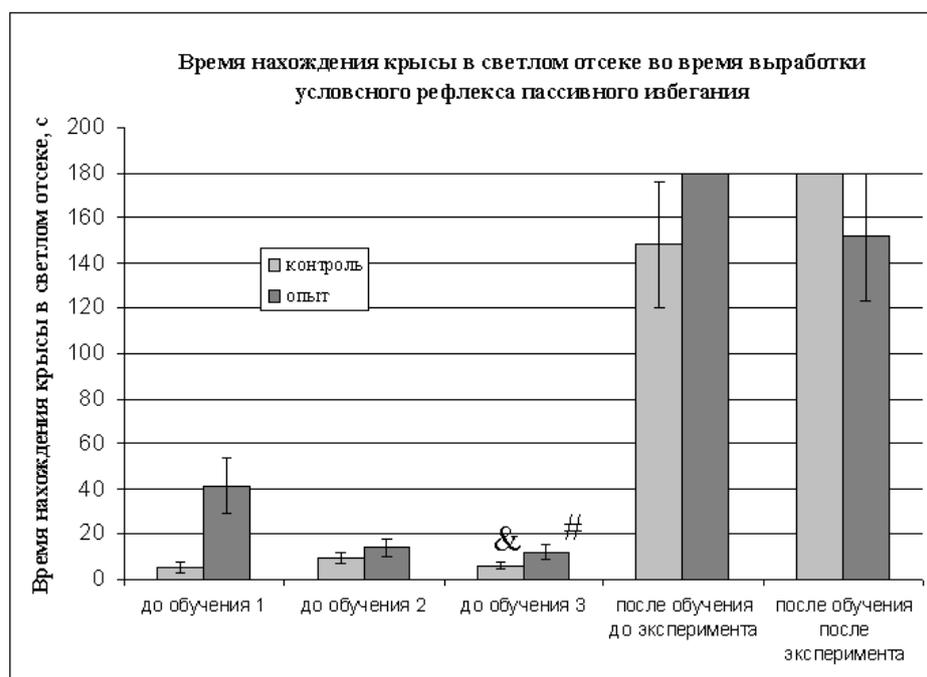
В 5-суточной серии не было выявлено статистически значимых различий по всем показателям.

Различий между опытной и контрольной группами по показателям «открытого поля» как до, так и после опыта, не было обнаружено во всех трёх сериях экспериментов.

Таким образом, стандартный тест «открытое поле» оказался нечувствителен к изменению поведения под воздействием гипогеомагнитных условий.

3.3. Результаты теста выработки условного рефлекса пассивного избегания

Влияние гипогеомагнитных условий на память крыс в 21-суточной серии изучалось с помощью метода выработки рефлекса пассивного избегания (УРПИ). Анализировали различия между опытной и контрольной группами до обучения, после него и при повторном тестировании сохранности рефлекса после хронического эксперимента (рисунок 3.3).



& – различия до и после обучения, критерий Вилкоксона, $p < 0.05$. Контроль;

– различия до и после обучения, критерий Вилкоксона, $p < 0.05$. Опыт

Рисунок 3.3 – результаты тестирования УРПИ

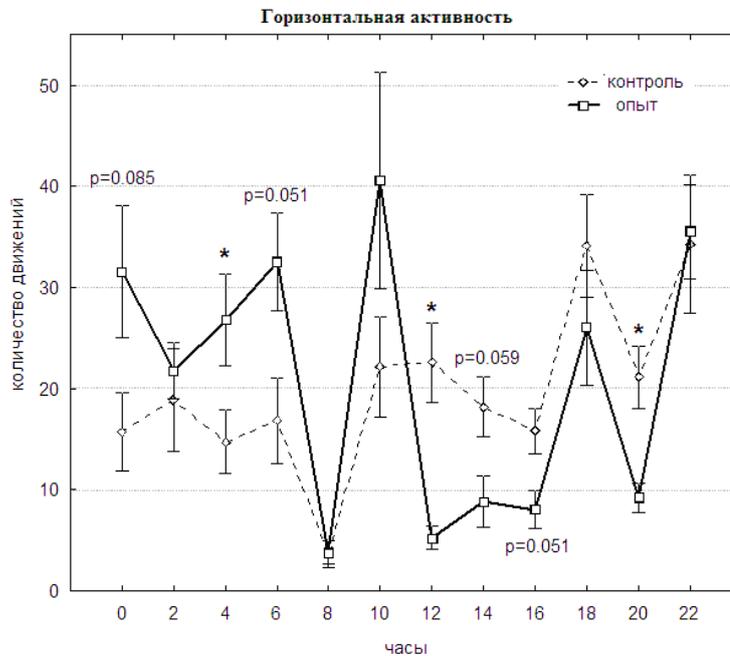
Обнаружены значимые различия между временем нахождения животных в светлом отсеке в третьем предъявлении (т.е. до обучения) и после обучения для обеих групп

животных. Полученный результат свидетельствует о том, что обучение произошло – практически все животные запомнили, что в малую камеру, где они получили удар электрического тока, заходить опасно. Тестирование животных на сохранность УРПИ после хронического эксперимента показало, что след памяти об ударе электрическим током хорошо сохранился через 25 суток после обучения. Об этом свидетельствует отсутствие значимых различий между значениями до и после эксперимента.

Статистически значимых различий между контрольной и опытной группами по времени нахождения в светлом отсеке после эксперимента не выявлено. Таким образом, тест УРПИ не показал влияния гипогеомагнитных условий на память у крыс.

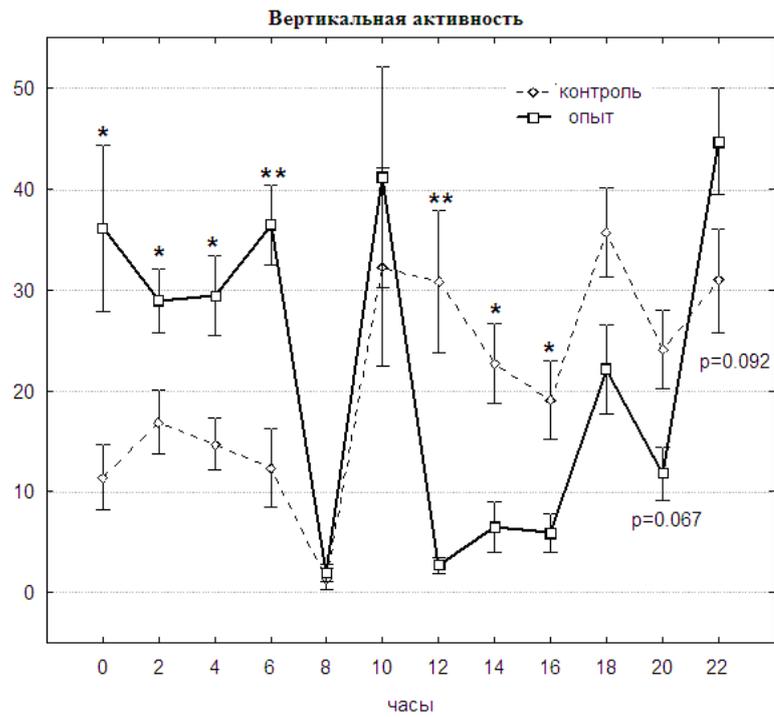
3.4. Исследование общей двигательной активности крыс

3.4.1. Исследование общей двигательной активности крыс в 10-суточной серии



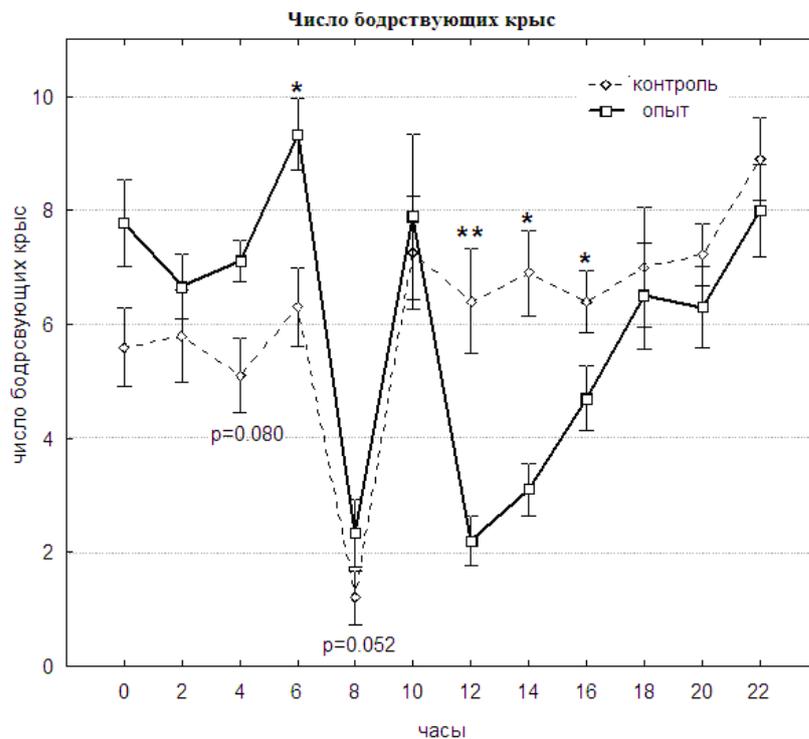
* – $p < 0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

Рисунок 3.4.1 – Суточная динамика горизонтальной активности крыс в 10-суточной серии



* – $p < 0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

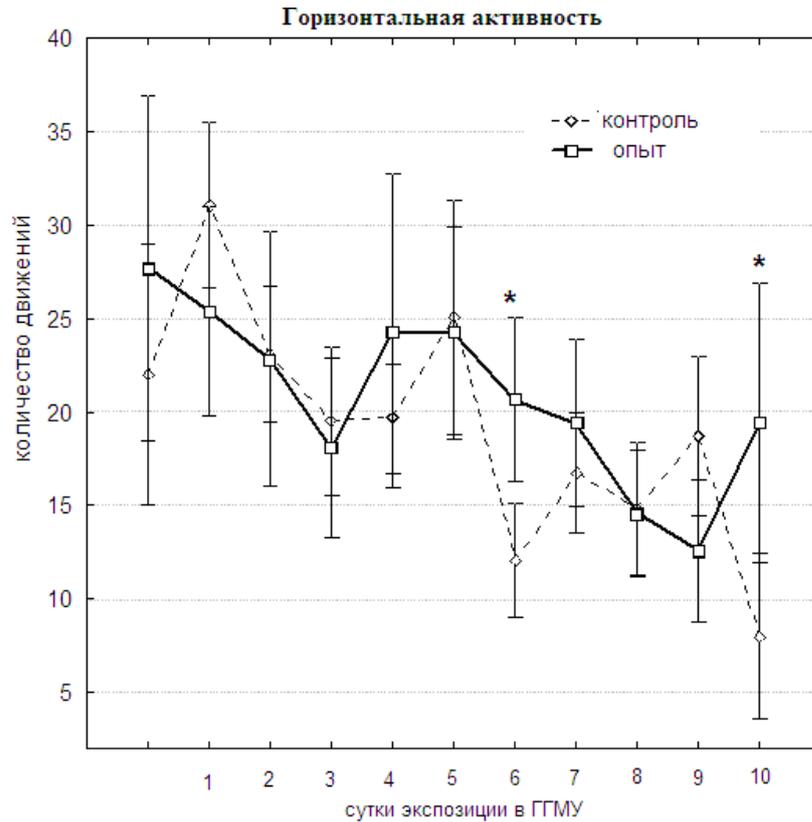
Рисунок 3.4.2 – Суточная динамика вертикальной активности крыс в 10-суточной серии



* - $p < 0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

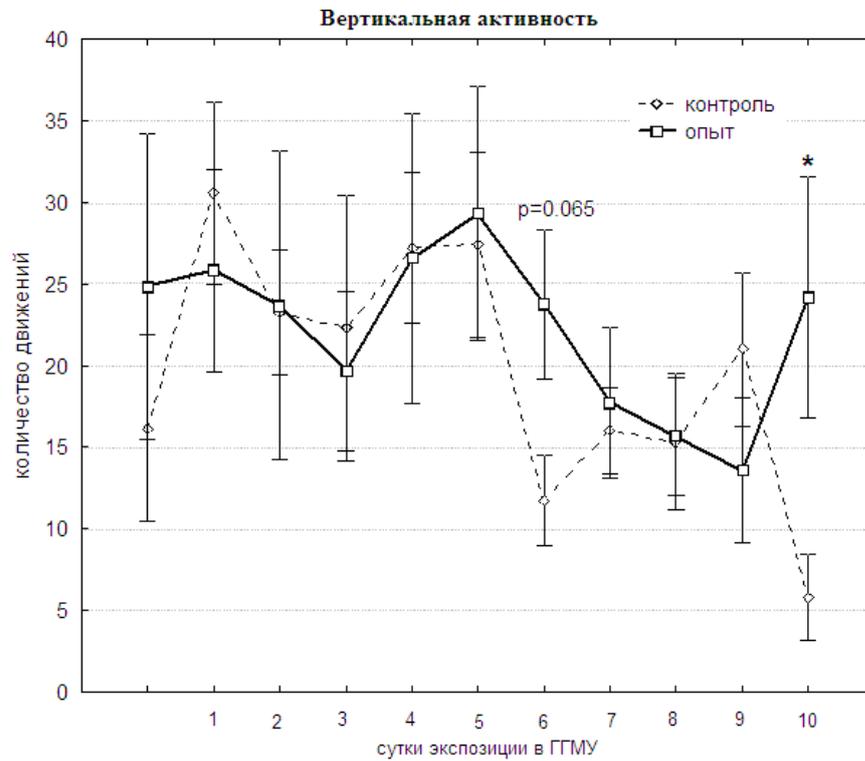
Рисунок 3.4.3 – Суточная динамика числа бодрствующих крыс в 10-суточной серии

Результаты общей двигательной активности показали, что суточные динамики горизонтальной, вертикальной и числа бодрствующих крыс схожи (рисунки 3.4.1-3.4.3). Выявлено, что суточная динамика данных показателей опытных животных выше в период времени до кормления (10 часов утра) и ниже после кормления; в контрольной группе наблюдается обратная картина (для горизонтальной активности – $F(11, 206)=3.4105$, $p=.00023$; для вертикальной активности – $F(11, 206)=6.2469$, $p=.00000$; для числа бодрствующих крыс – $F(11, 206)=4.3148$, $p=.00001$).



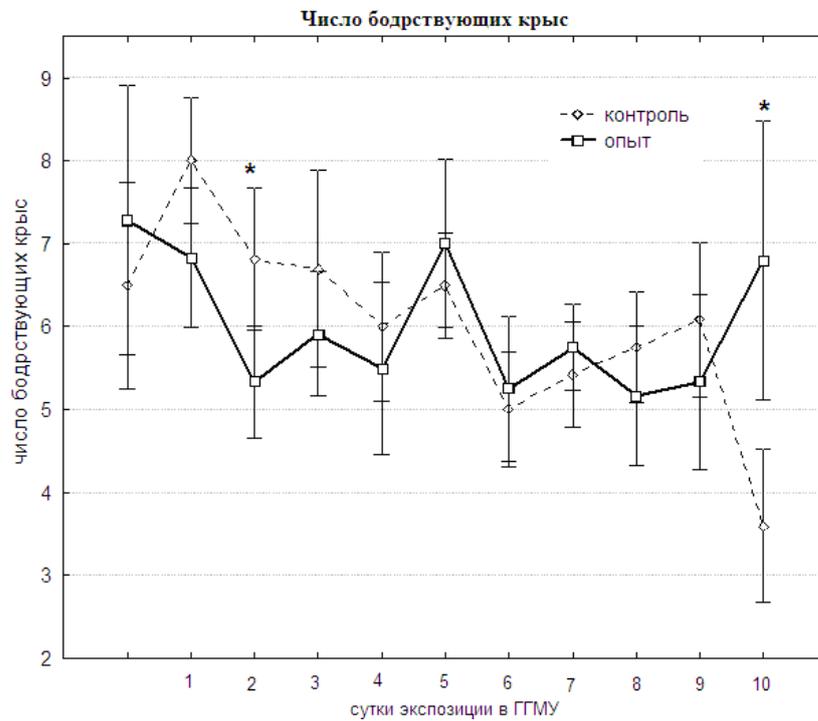
* – $p<0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

Рисунок 3.4.4 – Динамика горизонтальной активности в течение эксперимента 10-суточной серии



* – $p < 0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

Рисунок 3.4.5 – Динамика вертикальной активности в течение эксперимента 10-суточной серии



* – $p < 0.05$, критерий Вилкоксона, значимые различия между контрольной и опытной группами

Рисунок 3.4.6 – Динамика числа бодрствующих крыс в течение эксперимента 10-суточной

серии

Результаты общей двигательной активности показали, что динамики горизонтальной, вертикальной активности и числа бодрствующих крыс в течение эксперимента схожи (рисунок 3.4.4-3.4.6).

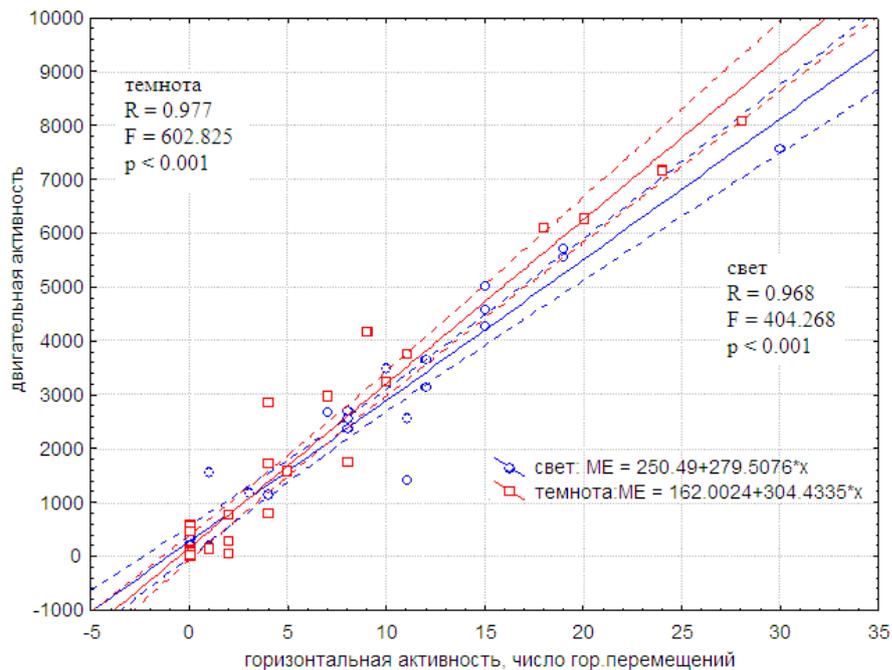
В 10-суточной серии динамики горизонтальной, вертикальной активности и числа бодрствующих опытных животных значимо не отличается от динамик контрольных животных, однако, выявлено увеличение активности опытной группы на 6 сутки (29 февраля) и на последние сутки экспозиции. Дисперсионный анализ выявил значимого влияния фактора нахождения в ГГМУ.

Анализ общей двигательной активности путём просмотра исследователем круглосуточной видеозаписи экспериментов показал слабое влияние длительного нахождения в условиях ослабленного геомагнитного поля на общую двигательную активность крыс.

3.4.2. Оценка адекватности работы программы «Mouse Express»

Зависимость работы программы «Mouse Express» от освещения

В первой серии экспериментов исследовалось адекватность работы программы «Mouse Express» от освещения.



ME – значения программы «Mouse Express», x – значения теста открытого поля

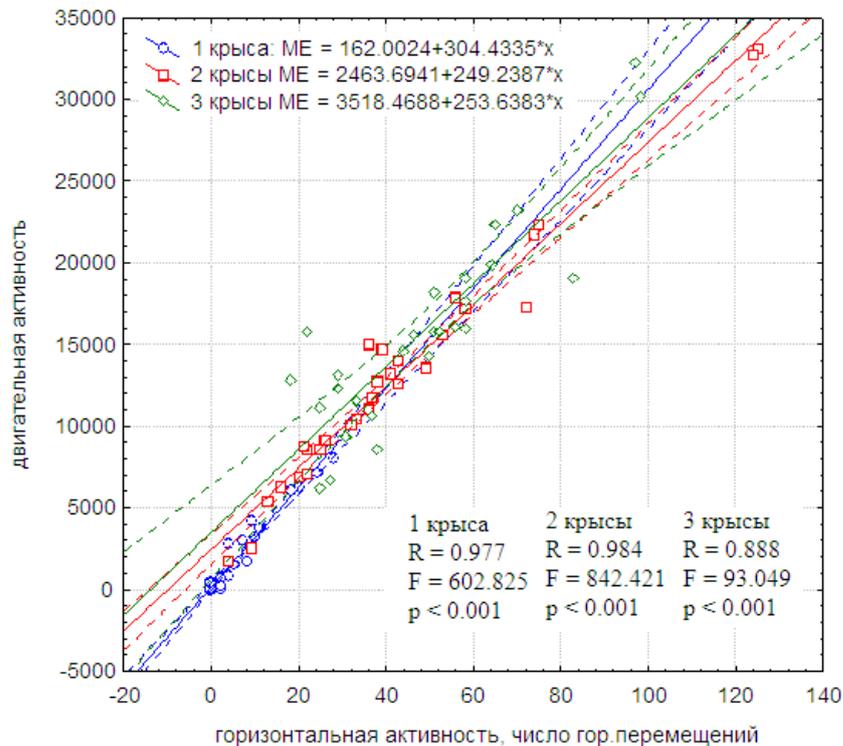
Рисунок 3.4.2.1 – Анализ сопоставления результатов программы «Mouse Express» и «открытого поля» в разных условиях освещения

На оси абсцисс представлены значения горизонтальной активности животных по минутам, на оси ординат представлены значения подсчётов программы «Mouse Express» по минутам.

Как видно из приведенного рисунка 3.4.2.1 регрессионный анализ показал высокий уровень корреляции ($R > 0.9$, $F=404.468$, $p < 0.001$) результатов программы с визуальным анализом при разных условиях освещения. Линии регрессии двух тестирований практически совпадают, что свидетельствует об отсутствии влияния разных режимов освещения на работу программы.

Зависимость работы программы «Mouse Express» от количества животных

Во второй серии экспериментов изучалось адекватность работы программы «Mouse Express» от количества исследуемых животных. Результаты анализа представлены на рисунке 3.4.2.2.



ME – значения программы «Mouse Express», x – значения теста «открытого поля»

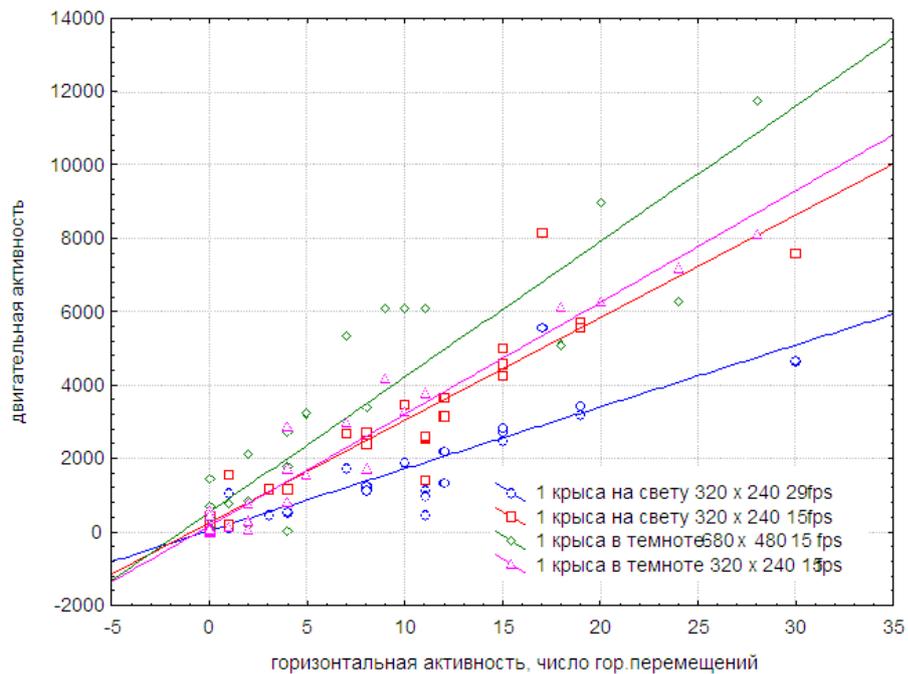
Рисунок 3.4.2.2 – Анализ сопоставления результатов программы «Mouse Express» и «открытого поля» в зависимости от количества тестируемых животных

Как видно из приведенного рисунка 3.4.2.2 регрессионный анализ показал высокий уровень корреляции ($R > 0.8$, $F=93.049$, $p < 0.001$) результатов программы с визуальным анализом тестирования одной, двух и трёх крыс. Это свидетельствует об отсутствии влияния количества животных на работу программы.

На графике видны выбивающиеся точки (точки, которые не лежат на линии регрессии). Детальный анализ данных показал, что животные мало передвигаются горизонтально, но много совершают мелких движений (повороты головы, движения хвоста и т.д.), которые фиксирует программа, но не фиксирует исследователь.

Зависимость работы программы «Mouse Express» от параметров видео

В третьей серии экспериментов исследовалась адекватность работы программы «Mouse Express» от параметров видеосъёмки, точнее от разрешения и числа кадров в секунду. Результаты анализа представлены на рисунке 3.4.2.3 и таблице 3.4.2



1 крыса на свету 320 x 240 29 fps: ME = 32.1834+168.6013*x

1 крыса на свету 320 x 240 15 fps: ME = 250.49+279.5076*x

1 крыса в темноте 640 x 480 15 fps: ME = 527.8134+369.1484*x

1 крыса в темноте 320 x 240 15 fps: ME = 162.0024+304.4335*x

ME – значения программы «Mouse Express», x – значения теста «открытого поля»

Рисунок 3.4.2.3 – Анализ сопоставления результатов программы «Mouse Express» и «открытого поля» в зависимости от параметров видеоизображения

Таблица 3.4.2 – Значения коэффициента множественной корреляции, F критерия, уровня значимости для регрессионного анализа сопоставления результатов программы «Mouse Express» и «открытого поля» в зависимости от параметров видеоизображения

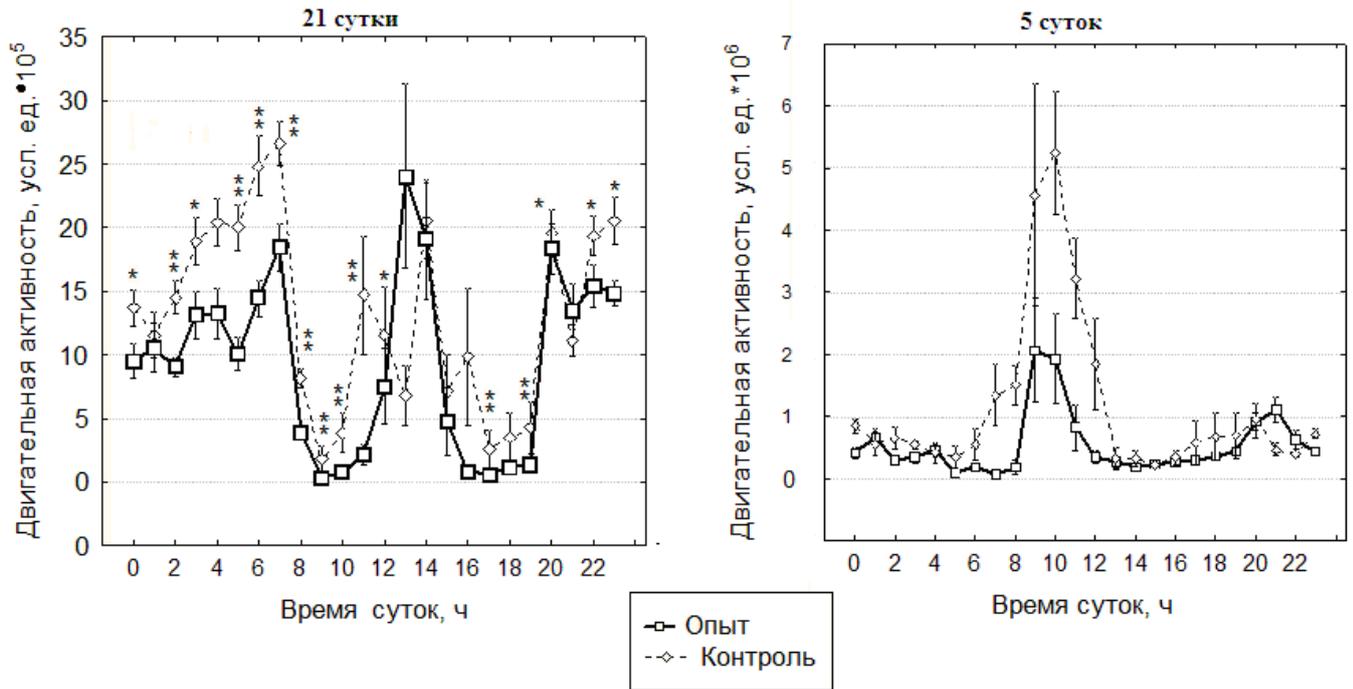
1 крыса на свету 320 x 240 точек, 29 кадров/с	1 крыса на свету 320 x 240 точек, 15 кадров/с	1 крыса в темноте 640 x 480 точек, 15 кадров/с	1 крыса в темноте 320 x 240 точек, 15 кадров/с
R = 0.941	R = 0.968	R = 0.922	R = 0.977
F = 212.184	F = 404.268	F = 160.720	F = 602.825
p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.001

Параметры видеоизображения (разрешение и число кадров) сильно влияют на результаты программы «Mouse Express» (рисунок 3.4.2.3, таблица 3.4.2). С уменьшением числа кадров и разрешения, результаты анализа программы показывают более высокие коэффициенты корреляции с результатами визуальной обработки. Это связано с тем, что с уменьшением разрешения и числа кадров, программа перестаёт фиксировать мелкие движения животного, и обработка видео становится более грубой.

Таким образом, результаты анализа работы программы «Mouse Express» в зависимости от различных условий исследования показали, что программа «Mouse Express» оценивает равноценно тесту «открытое поле» двигательную активность при различных условиях освещения и различном количестве животных. Результаты анализа общей двигательной активности программы «Mouse Express» сильно коррелируют с параметрами видеоизображения (расширения изображения и числа кадров в секунду). С уменьшением разрешения и числа кадров уменьшаются значения подсчёта программы «Mouse Express».

3.4.3. Исследование общей двигательной активности крыс с помощью программы Mouse Express

Общая двигательная активность в течение хронического эксперимента была изучена по результатам круглосуточного видеонаблюдения с помощью программы «Mouse Express».

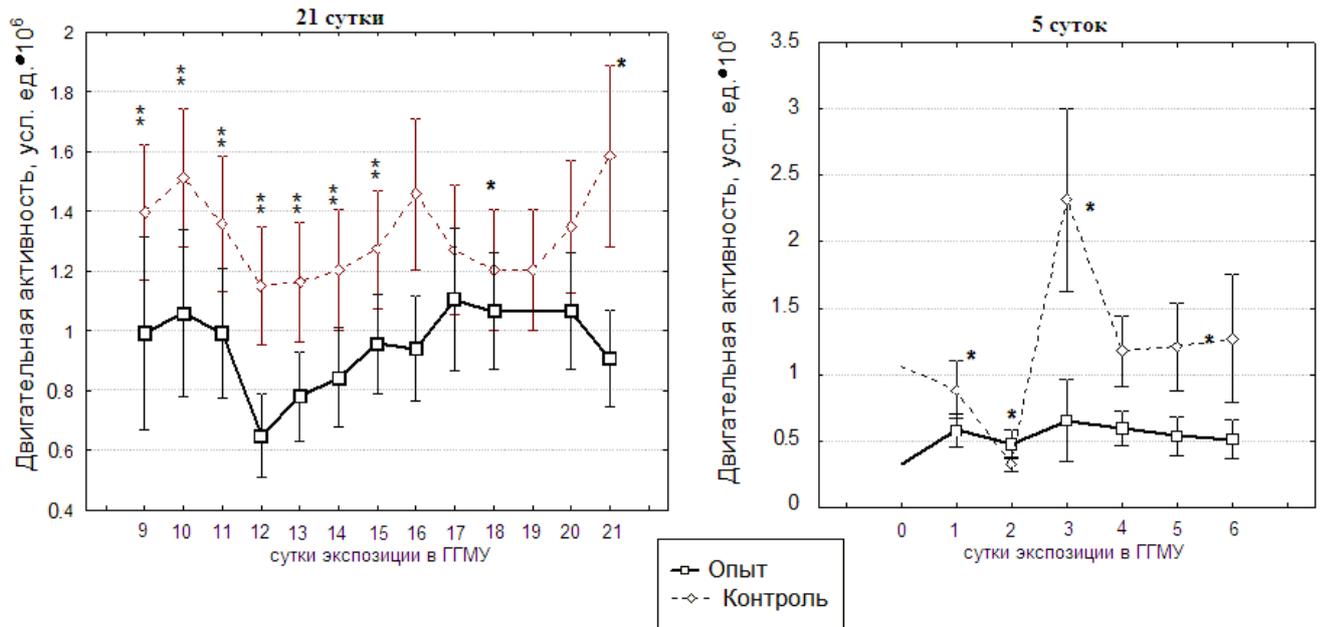


* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, критерий Вилкоксона

Рисунок 3.4.3.1. – Суточная динамика двигательной активности крыс опытной и контрольной группы в 21-суточной и в 5-суточной сериях

Анализ суточной динамики общей двигательной активности в 21-суточной и в 5-суточной сериях показал снижение данного показателя у опытных животных в сравнении с контрольными крысами. Дисперсионный анализ выявил влияние фактора группы (нахождения в ГГМУ) на двигательную активность в 21-суточной серии ($F(1, 552) = 27.017$, $p = 0.00000$) и в 5-суточной серии ($F(1, 138) = 21.866$, $p = 0.00001$). Обнаружено значимое взаимодействие факторов «воздействие гипомангнитной среды» и «время суток» для 21-суточной серии $F(23, 552) = 2.6348$, $p = 0.00006$ и для 5-суточной серии ($F(23, 138) = 2.4782$, $p = 0.00064$).

Более существенным снижением двигательной активности является для 21-суточного эксперимента, что свидетельствует о прогрессировании негативных изменений в ЦНС при пролонгированном действии среды ослабленного магнитного поля Земли (рисунок 3.4.3.1).



* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$, критерий Вилкоксона

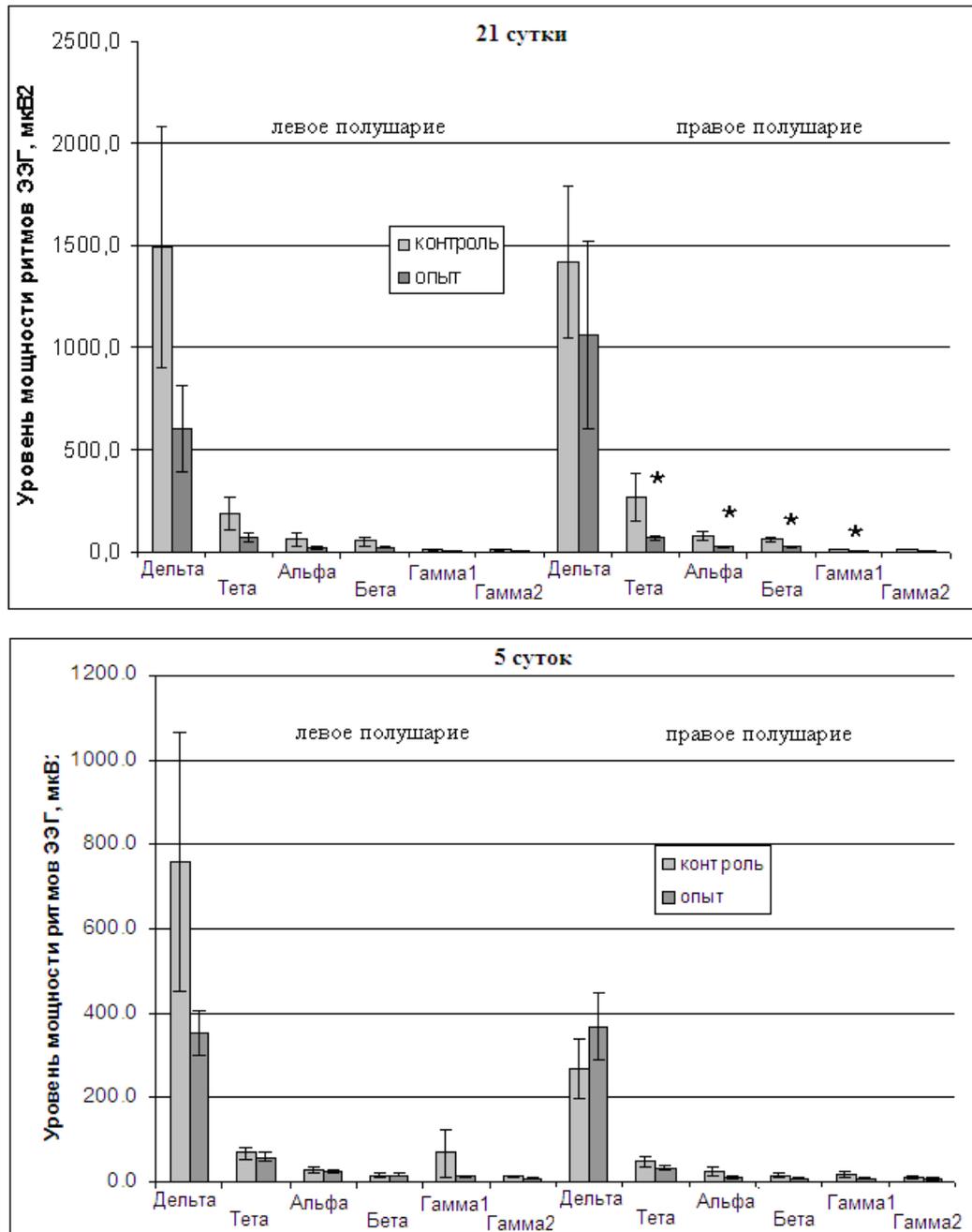
Рисунок 3.4.3.2 – Динамика общей двигательной активности крыс в течение эксперимента в 21-суточной и в 5-суточной сериях

Как следует из рисунка 3.4.3.2, в обоих экспериментах наблюдается значимое снижение двигательной активности опытных животных, подвергшихся экспозиции в гипогеомагнитной среде. Дисперсионный анализ показал влияние фактора группы на двигательную активность в 5-суточной серии экспериментов ($F(1, 598)=17.009, p=0.00004$). Более существенным снижением двигательной активности является для 21-суточного эксперимента.

3.5. Влияние ослабленного магнитного поля Земли на биоэлектрическую активность мозга крыс

Регистрацию ЭЭГ проводили в 21-суточной и в 5-суточной сериях экспериментов.

Биоэлектрическую активность мозга крыс анализировали путем сравнения показателей абсолютных мощностей основных ритмов ЭЭГ крыс контрольной и опытной групп (рисунок 3.5.1), также сравнения абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ крыс до и после эксперимента для контрольной группы (рисунок 3.5.2) и для опытной группы (рисунок 3.5.3) в режиме стимуляции.



* – критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$

Рисунок 3.5.1 – Различия абсолютных значений спектра мощности основных ритмов ЭЭГ в режиме стимуляции в правом и левом полушариях между опытной и контрольной группами

Для контрольной группы в 21-суточной серии статистический анализ (критерий парных сравнений Вилкоксона, $p < 0.05$) изменений до и после эксперимента показал увеличение мощностей ритмов в диапазонах тета, альфа и гамма2 в правом полушарии (рисунок 3.5.2) и в диапазоне гамма2 в левом полушарии.

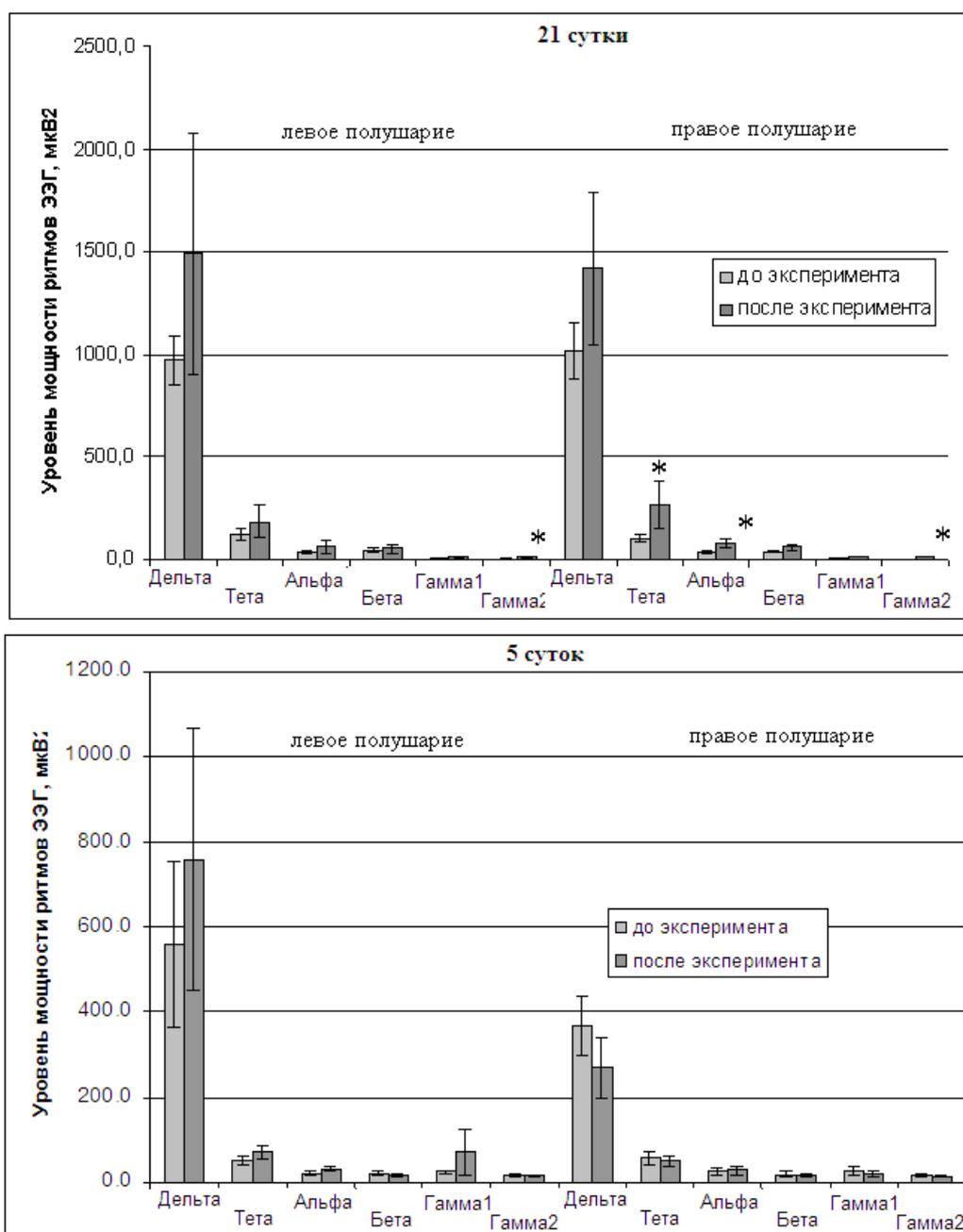
В целом контрольная группа животных характеризуется увеличением абсолютных мощностей ритмов.

В 5-суточной серии не было обнаружено статистических достоверных различий абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ при сравнении значений до и после эксперимента в контрольной группе животных (рисунок 3.5.2).

Статистический анализ данных 21-суточной серии экспериментов показал уменьшение абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ в диапазонах альфа, тета, бета и гамма1 (непараметрический критерий Манна-Уитни, $p < 0.05$) у опытной группы по сравнению с контрольной группой животных в правом полушарии. Подобные изменения (статистически незначимые) характерны и для левого полушария опытных крыс.

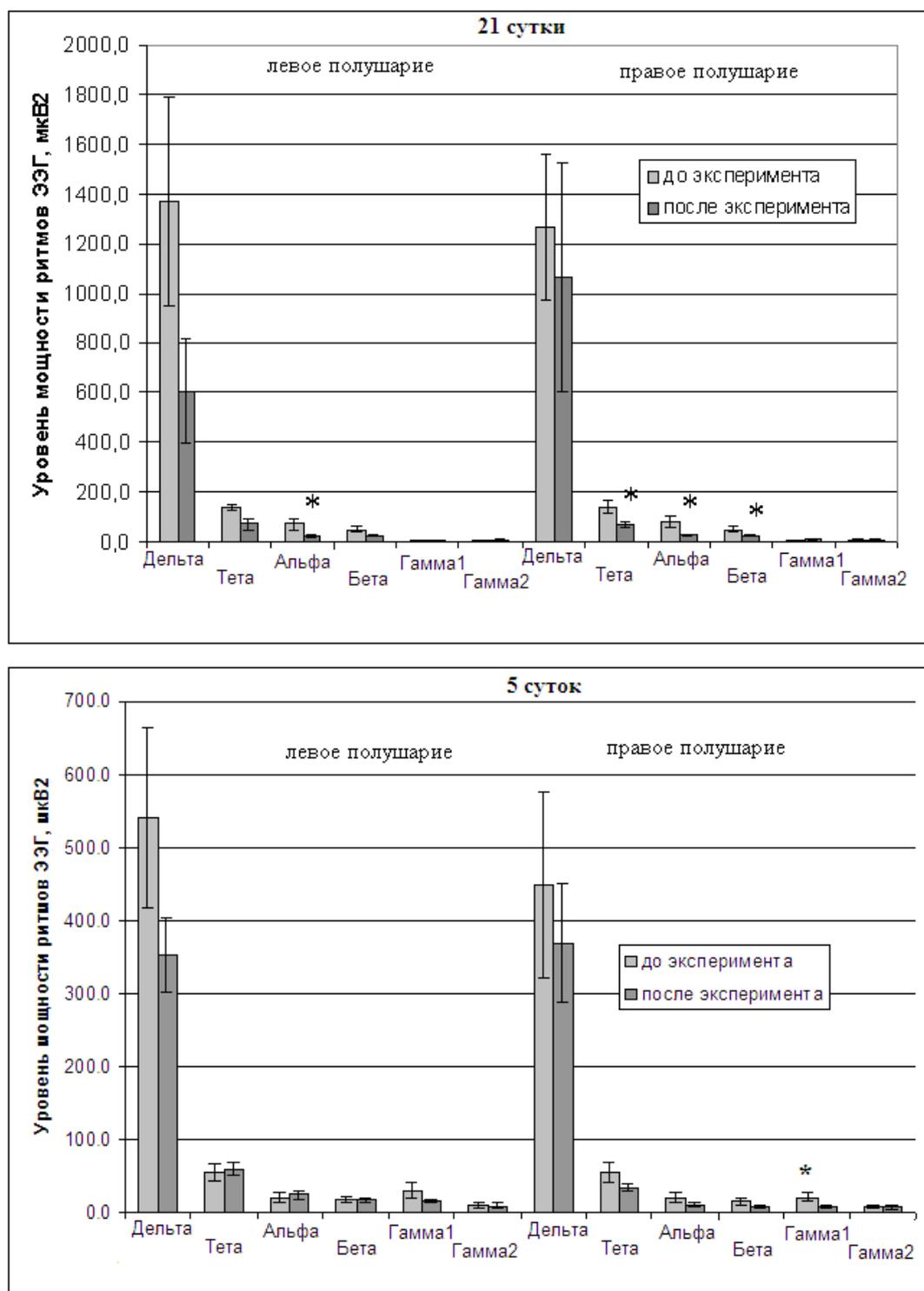
В целом для опытной группы животных характерно уменьшение абсолютных мощностей ритмов по сравнению с контрольной группой животных.

Статистический анализ в 5-суточной серии экспериментов не выявил различий в абсолютных значениях мощностей основных ритмов ЭЭГ между опытной и контрольной групп (рисунок 3.5.1).



* – критерий Вилкоксона, $p < 0.05$

Рисунок 3.5.2 – Различия спектра мощности основных ритмов ЭЭГ в режиме стимуляции между показателями до и после эксперимента в контрольной группе, 21-суточная и 5-суточная серии



* – критерий Вилкоксона, $p < 0.05$

Рисунок 3.5.3 – Различия спектра мощности основных ритмов ЭЭГ в режиме стимуляции между показателями до и после эксперимента в опытной группе, 21-суточная и 5-суточная серии

В 21-суточной серии динамика изменений до и после эксперимента у опытных животных сходна для левого и правого полушария мозга (рисунок 3.5.3). В опытной группе

наблюдается противоположные изменения по сравнению с контрольной группой, а именно, уменьшение абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ в диапазонах тета, альфа, бета (критерий Вилкоксона, $p < 0.05$) в правом полушарии и в диапазоне альфа в левом полушарии.

В целом, динамика изменений до и после эксперимента в опытной группе характеризуется снижением абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ.

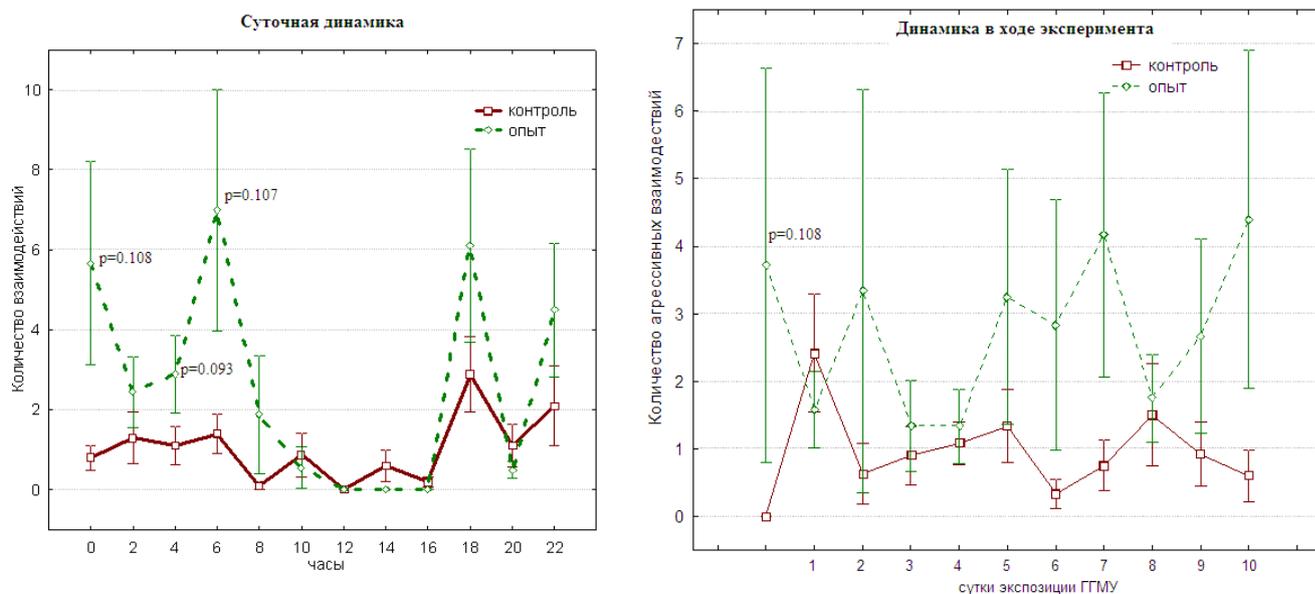
В 5-суточной серии анализ сравнения изменения абсолютных значений мощностей ритмов ЭЭГ крыс в опытной группе выявил статистически значимое (непараметрический критерий парных сравнений Вилкоксона, $p < 0.05$) снижение мощности ритма γ_1 в правом полушарии после эксперимента (рисунок 3.5.1). В целом, для опытной группы выявлена тенденция к снижению мощностей ритмов, т.к. средние значения абсолютных мощностей ритмов ниже после эксперимента в сравнении с мощностями ритмов, полученных до эксперимента.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для возникновения изменений в биоэлектрической активности мозга под действием среды ослабленного магнитного поля Земли необходимо длительное (более 5 суток) пребывание в ГГМУ. Экспозиция в гипогеомагнитных условиях в течение 21 суток вызывает снижение абсолютных мощностей ритмов у опытных животных. Результаты исследования биоэлектрической активности мозга крыс согласуются с результатами исследования общей двигательной активности крыс, которые также показали угнетающее действие гипогеомагнитных условий. Изменения в двигательной активности также наиболее выражены в 21-суточном эксперименте, что свидетельствует об усилении влияния гипогеомагнитных условий на организм с течением времени.

Результаты исследования влияние гипогеомагнитных условий в течение 21 суток на биоэлектрическую активность крыс опубликованы в журнале «Вестник Томского государственного университета. Биология» [62].

3.6. Результаты исследования агрессивного поведения крыс в течение хронического эксперимента

Агрессивное поведение в течение хронических экспериментов анализировали визуальным просмотром видеозаписей. Поведение опытной и контрольной групп оценивали в суточной динамике и в динамике эксперимента.



критерий Вилкоксона;

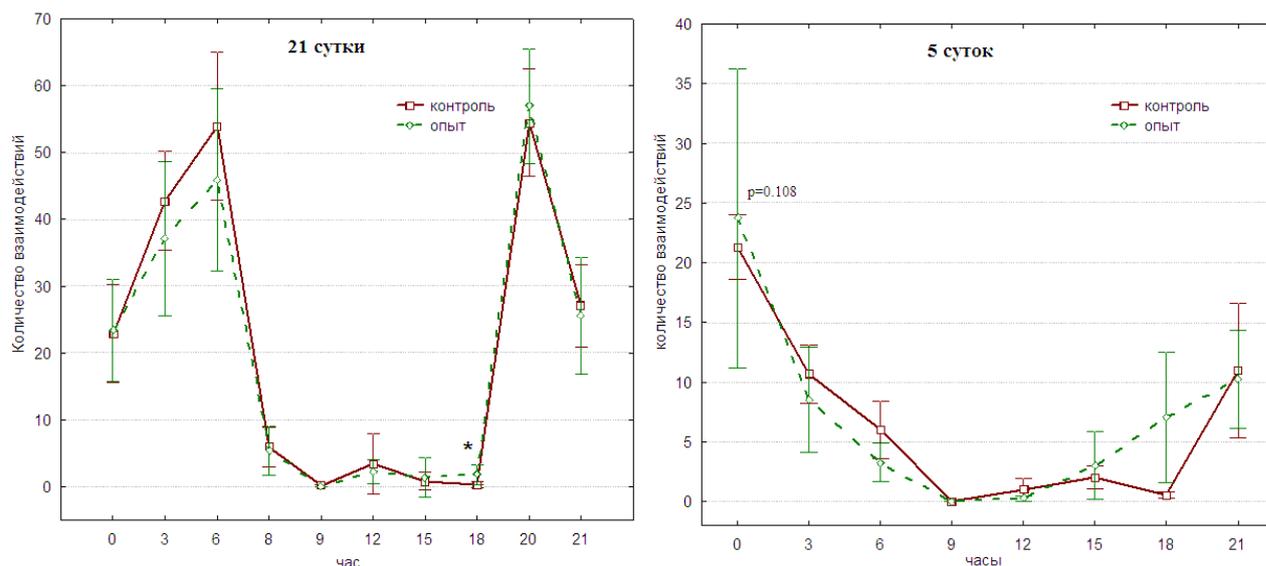
Рисунок 3.6.1 – Суточная динамика и динамика межиндивидуальных взаимодействий в течение 10-суточной серии

Как видно из приведенного рисунка (рисунок 3.6.1), средние значения числа агрессивных взаимодействий в опытной группе выше, чем в контрольной группе в тёмное время суток. Это является нормой, поскольку крысы являются ночными животными, для которых свойственна повышенная активность в тёмное время суток [53]. Дисперсионный анализ выявил влияние фактора воздействия ГГМУ на суточную динамику агрессивных взаимодействий ($F(1, 206)=10.790$, $p=.00120$), связанное с увеличением числа агрессивных взаимодействий.

Средние значения числа агрессивных взаимодействий в опытной группе выше, чем в контрольной группе крыс в динамике эксперимента в 10-суточной серии. Дисперсионный анализ показал значимость влияния гипогеомагнитной среды на проявление агрессии ($F(1, 208)=10.522$, $p=.00137$), связанное с увеличением числа агрессивных взаимодействий.

В целом анализ суточной динамики и динамики эксперимента агрессивных взаимодействий показал повышение агрессивности у опытных крыс по сравнению с контрольными животными.

В последующих сериях экспериментов было решено провести более точный подсчет числа агрессивных взаимодействий, включающий регистрацию этого показателя в каждой временной точке не в течение 5 минут, а в течение часа.

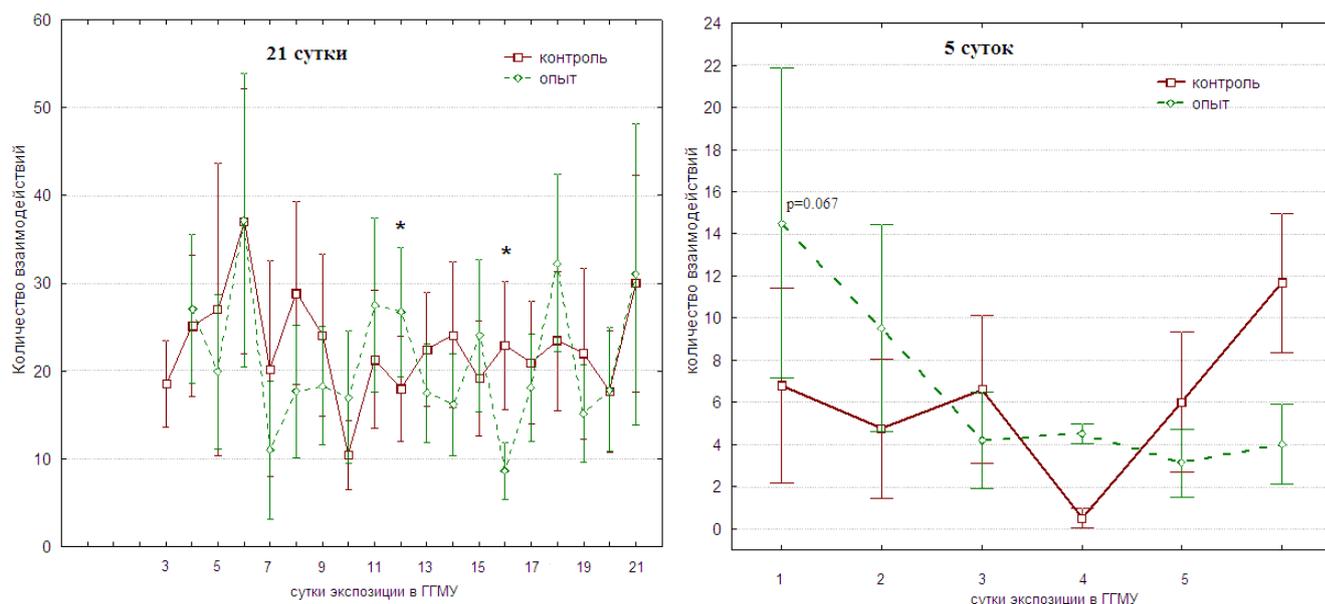


* – $p < 0.05$, критерий Вилкоксона;

Рисунок 3.6.2 – Суточная динамика межиндивидуальных взаимодействий в экспериментах 21-суточной и 5-суточной серий

В 21-суточной серии экспериментов обнаружено статистически достоверное повышение агрессивного поведения в 18 часов. В остальное время (рисунок 3.6.2) суточная динамика агрессивных взаимодействий опытных крыс не отличается от динамики контрольных крыс.

В 5-суточной серии экспериментов не обнаружено статистически значимых различий в суточной динамике агрессивных взаимодействий между контрольной и опытной группами. Дисперсионный анализ суточной динамики агрессивных взаимодействий не выявил влияние гипогеомагнитных условий в 21-суточной и в 5-суточной сериях экспериментов.



* - $p < 0.05$, критерий Вилкоксона;

Рисунок 3.6.3 – Динамика межиндивидуальных взаимодействий в ходе эксперимента в 21-суточной и в 5-суточной сериях

Динамика агрессивных взаимодействий в ходе 21-суточной серии экспериментов опытной группы имеет волновой характер в сравнении с контрольной группой крыс (рисунок 3.6.3).

Статистический анализ 21-суточной серии показал увеличение агрессивного поведения на 13 сутки эксперимента и уменьшение количества агрессивных взаимодействий на 17 сутки эксперимента. В остальное время не было выявлено статистически значимых различий между опытной и контрольной группой в динамике эксперимента агрессивных взаимодействий. Дисперсионный анализ не показал влияния фактора группы (воздействие нахождения в условиях ослабленного магнитного поля Земли) на агрессивное поведение.

В 5-суточной серии экспериментов динамика агрессивных взаимодействий в течение эксперимента в опытной группе имеет волновой характер. Обнаружена тенденция к повышению агрессивности в первые сутки эксперимента (8 марта). Дисперсионный анализ не показал влияния фактора воздействия ГГМУ на агрессивное поведение. В целом статистически достоверных различий между опытной и контрольной групп в 5-суточной серии экспериментов не было получено.

Результаты исследования влияния гипогомагнитных условий в течение 21 суток на агрессивное поведение крыс опубликованы в журнале «Вестник Томского государственного университета» [61].

Таким образом, было выявлено, что экспозиция в гипогеомагнитных условиях в течение 5 суток не влияет на агрессивное поведение крыс. Увеличение длительности пребывания до 10 суток в среде ослабленного магнитного поля вызывает увеличение агрессивности животных. Пребывание в ГГМУ в течение 21 суток вызывает тенденцию к повышению агрессивности.

В работе Bruehl, S. et al., 2002 высказывается предположение о том, что одним из факторов проявления агрессии может выступать дисфункции эндогенной опиоидной системы (уменьшение активности её и повышение болевой чувствительности) и что, агрессия связана с отсутствием опиоидной анальгезии [76]. Мы предположили, что именно изменение болевого порога при воздействии гипогеомагнитной среды является причиной агрессивного поведения животных, поскольку в ряде работ было показано, что ГГМУ условия оказывают тормозное влияние на систему опиатов, понижают реакции обезболивания [80, 84, 85], т.е. повышают восприимчивость к боли.

3.7. Результаты анализа изменения параметров нейрональной активации различных структур мозга

Для исследования механизмов влияния условий ослабленного геомагнитного поля был проведен иммуногистохимический анализ срезов мозга (рисунок 3.7.1).

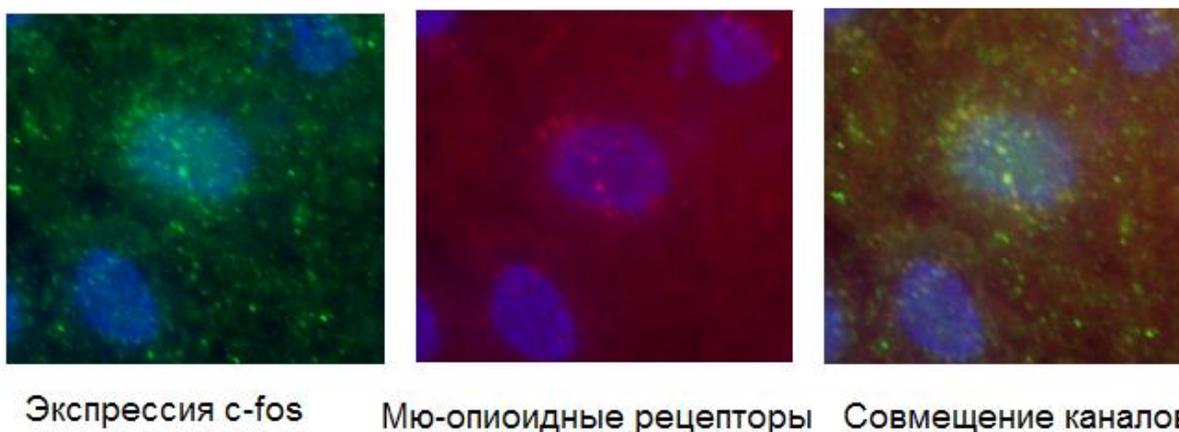
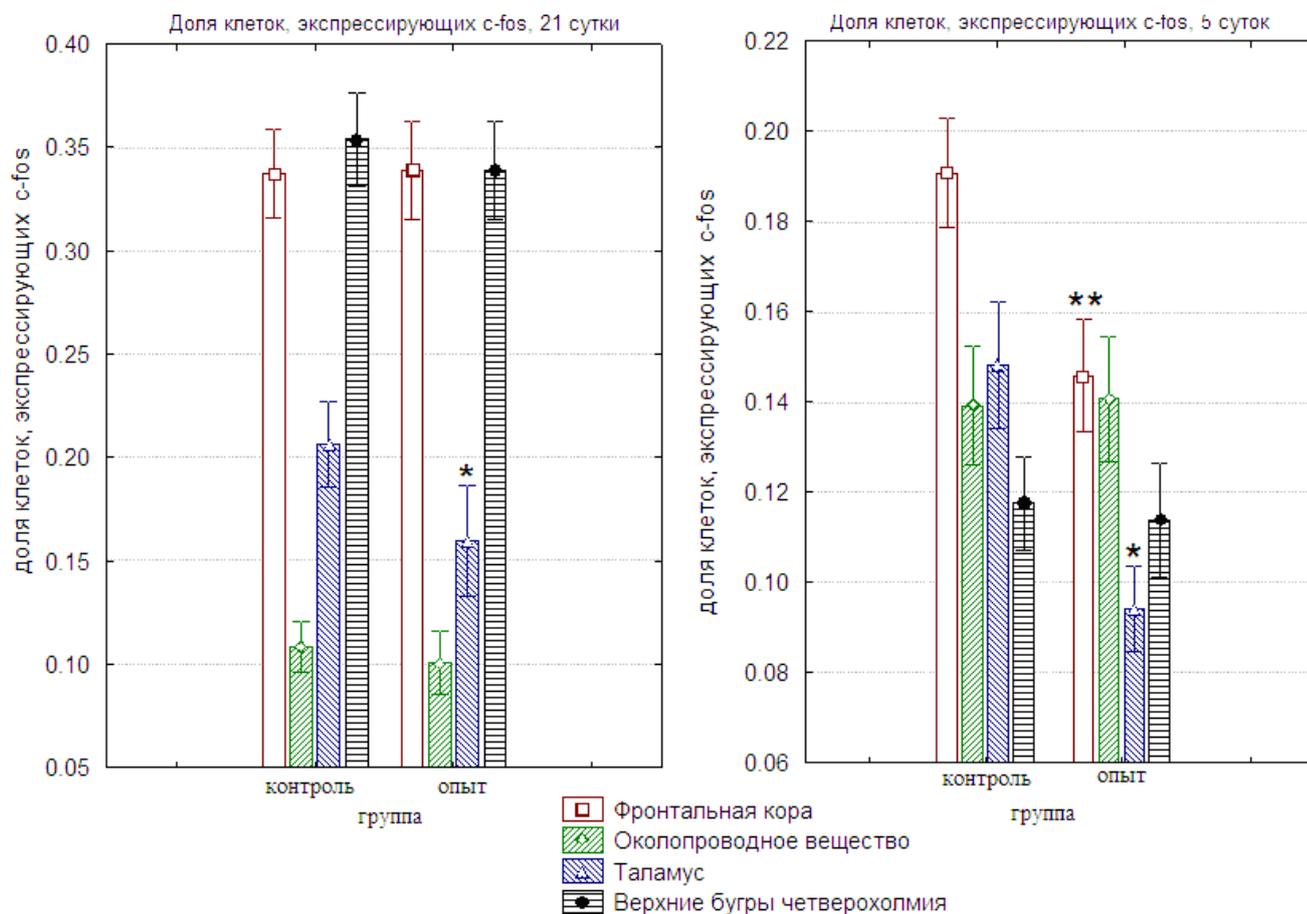


Рисунок 3.7.1– Часть микрофотографии среза фронтальной коры мозга крысы, демонстрирующая клетку с двойной флуоресцентной меткой

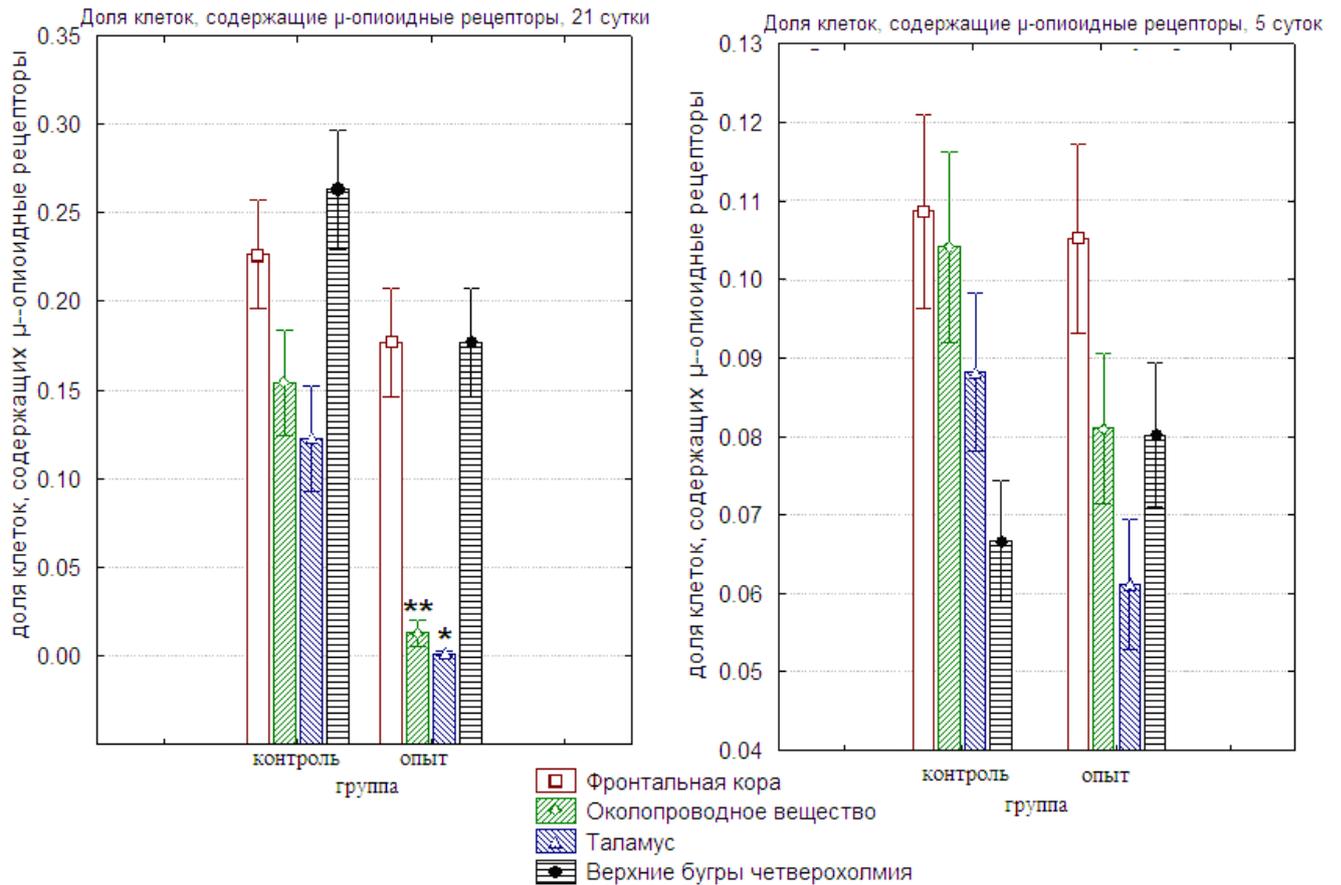


** – $p < 0.01$, * – $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

Рисунок 3.7.2 – Доля клеток, экспрессирующих c-fos, в различных структурах мозга для опытной и контрольной группы крыс в 21-суточной и в 5-суточной сериях

Анализ полученных результатов показал статистически значимое снижение содержания клеток, экспрессирующих c-fos, в 21-суточной серии экспериментов в таламусе у опытных крыс по сравнению с контрольными. В целом, как видно из приведённого графика (рисунок 3.7.2), средние значения содержания клеток, экспрессирующих белок c-fos, в опытной группе ниже, чем в контрольной. Значимое снижение уровня нейрональной активации зарегистрировано для таламуса ($p < 0.05$).

В 5-суточной серии экспериментов было обнаружено снижение среднего значения содержания клеток, экспрессирующих c-fos в опытной группе в сравнении с контрольной группой в таких структурах мозга, как фронтальная кора, таламус и околопроводное серое вещество. Достоверное снижение было выявлено для фронтальной коры и таламуса (рисунок 3.7.2)

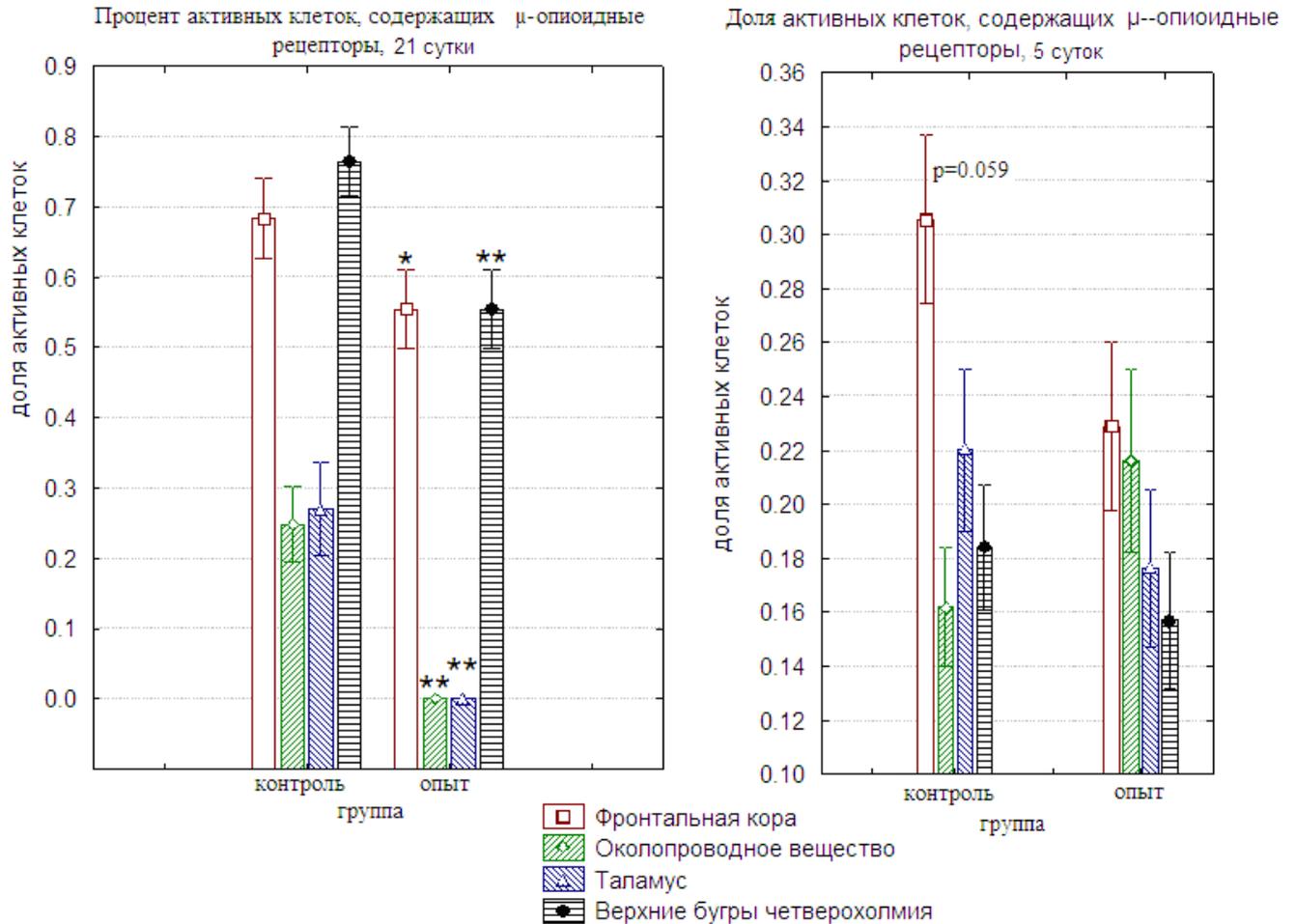


** – $p < 0.001$, * – $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни,

Рисунок 3.7.3 – Доля клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в различных структурах мозга для опытной и контрольной группы крыс в 21-суточной и 5-суточной серии

В 21-суточной серии экспериментов анализ результатов показал в целом снижение у опытных животных количества клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в структурах мозга по сравнению с контрольными. Наиболее выраженное снижение обнаружено в околопроводном сером веществе и в таламусе, где наблюдались достоверные отличия от контрольной группы. В верхних буграх четверохолмия опытных животных выявлена тенденция к снижению количества клеток с μ -опиоидными рецепторами ($p = 0.058$, критерий Манна-Уитни).

В 5-суточной серии экспериментов не обнаружено значимых различий между контрольной и опытными группами крыс по количеству клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы в исследуемых структурах мозга (рисунок 3.7.3). Выявлена тенденция к снижению доли клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в околопроводном веществе ($p = 0.092$, критерий Манна-Уитни). В опытной группе средняя доля клеток составила 0.08 ± 0.01 , в контрольной группе 0.10 ± 0.01 .



** – $p < 0.001$, * – $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни

Рисунок 3.7.4 – Доля активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в различных структурах мозга для опытной и контрольной группы крыс, 21-суточная и 5-суточная серия

В 21-суточной серии экспериментов было выявлено статистически достоверное снижение количества активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы во всех исследуемых структурах мозга.

В 5-суточной серии статистический анализ результатов показал отсутствие значимых различий между контрольной и опытными группами крыс по доле клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы и экспрессирующих белок *c-fos*, в различных структурах мозга. В целом, как видно из приведенного рисунка (рисунок 3.7.4) средние значения содержания активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в опытной группе ниже, чем в контрольной, во фронтальной коре, в околопроводном сером веществе и в таламусе.

Таким образом, под действием среды ослабленного геомагнитного поля в течение 21 суток происходит снижение доли активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, во всех исследуемых структурах мозга.

Под действием гипогеомагнитной среды в течение 5 суток происходит снижение доли клеток, экспрессирующих *c-fos*, и отсутствие изменений в количестве клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, в отличие от результатов 21-суточного эксперимента, где кроме понижения общего уровня нейрональной активации происходит уменьшение как числа активных, так и общего числа клеток с μ -опиоидными рецепторами. Следовательно, для возникновения изменений на уровне рецепции сигнала, по крайней мере, для опиоидной системы, необходимо более длительное нахождение (больше 5 суток) в условиях ослабленного магнитного поля Земли.

Результаты исследования влияния гипогеомагнитных условий в течение 21 суток на общую нейрональную активацию различных структур мозга по белкам раннего ответа *c-fos* и, в частности, активацию опиоидергических нейронов крыс опубликованы в журнале «Вестник Томского государственного университета» [61].

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования в целом подтвердили нашу гипотезу о снижении общего тонуса ЦНС и активности на поведенческом уровне после экспозиции в гипогеомагнитных условиях. Так, под воздействием ГГМУ выявлено снижение общей двигательной активности животных, снижение мощности основных ЭЭГ-ритмов, снижение числа активных нейронов во фронтальной коре, околопроводном сером веществе, таламусе и верхних буграх четверохолмия.

Анализ автоматической обработки видеофайлов экспериментов показал, что под действием ГГМУ происходит снижение общей двигательной активности опытных животных по сравнению с контрольными животными в суточной динамике и в динамике эксперимента. Наиболее существенным снижением двигательной активности является для 21-суточного эксперимента, что свидетельствует о прогрессировании негативных изменений ЦНС при пролонгированном действии среды ослабленного магнитного поля Земли. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых сообщается о снижении активности лабораторных животных под воздействием гипогеомагнитных условий [30].

В то же время обработка видеофайлов визуальным анализом (по 5 минут в начале каждого часа) не показала столь четких различий в активности животных контрольной и опытной группы. Так, в 10-суточной серии выявлено повышение активности опытных животных в период времени с двенадцати часов ночи до десяти часов утра (время кормления) и снижение активности опытной группы после кормления (с десяти утра и до десяти часов вечера). Анализ динамики двигательной активности в течение 10-суточного эксперимента также не выявил четкой картины воздействия гипогеомагнитных условий на поведение крыс. Поэтому в дальнейших сериях экспериментов для изучения влияния нахождения в гипогеомагнитных условиях на общую двигательную активность применялась автоматическая обработка круглосуточных видеофайлов с помощью программы «Mouse Express» [55]. Оценка работы «Mouse Express» показала, что данная программа адекватно оценивает двигательную активность при различных условиях освещения и различном количестве животных.

Исследование влияния гипогеомагнитных условий на поведение крыс методом «открытого поля» также не показало воздействие среды ослабленного магнитного поля Земли. Различий между опытной и контрольной группой по показателям «открытого поля» до и после экспозиции в ГГМУ не было обнаружено во всех трёх сериях экспериментах. После повторного тестирования у опытной и контрольной групп снизилась двигательная

активность. Такое изменение структуры поведения при повторном предъявлении теста является нормой для крыс и свидетельствует о привыкании и снижении стрессорной нагрузки [7]. Однако, эти изменения были характерны как для опытной, так и для контрольной группы животных.

Таким образом, автоматическая обработка, включающая более репрезентативную оценку двигательной активности, оказалось эффективнее, чем визуальная обработка и тестирование в «открытом поле», и позволила выявить воздействие исследуемого фактора на общую двигательную активность крыс, которое выразилось в снижении общей двигательной активности.

Результаты исследования общей двигательной активности согласуются с результатами исследования влияния ГГМУ на биоэлектрическую активность мозга крыс, которые также выявили угнетающее действие на ЦНС среды ослабленного магнитного поля Земли. Было установлено, что в течение 21 суток происходит снижение абсолютной мощности ритмов ЭЭГ во всех диапазонах, что свидетельствует о снижении уровня функциональной активации ЦНС в группе опытных животных. Для возникновения изменений в биоэлектрической активности мозга под действием среды ослабленного магнитного поля Земли необходимо длительное (более 5 суток) пребывание в ГГМУ, поскольку значимых изменений биоэлектрической активности при экспозиции в течение 5 суток не выявлено. Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых сообщается, что под влиянием ослабленного поля Земли происходит снижение показателей функционального уровня и уровня функциональных возможностей центральной нервной системы [45], преобладания процессов торможения в нервной системе [37], замедление реакции [49].

Результаты исследования общей двигательной активности и биоэлектрической активности мозга также согласуются с результатами оценки уровня нейрональной активации мозга крыс. Иммуногистохимический анализ выявил, что под влиянием ГГМУ происходит уменьшение активности нейронов, которое проявляется в снижении экспрессии белка c-fos в исследуемых структурах мозга (фронтальная кора, околопроводное серое вещество, таламус, верхние бугры четверохолмия).

На основе полученных результатов, связанных с угнетающим действием гипогеомагнитных условий на абсолютные мощности ритмов ЭЭГ, и на основе литературных данных, о том, что ритмы ЭЭГ связаны с определёнными когнитивными функциями [69, 70, 78, 92, 96, 102, 108, 112, 113, 120, 123, 171] можно было предположить, что в условиях длительного пребывания в среде ослабленного магнитного поля Земли

будет наблюдаться ухудшение когнитивных функций, о чем сообщается в ряде литературных источниках [3, 37, 45, 49, 179].

Однако проведенное тестирование обучения и сохранности памятного следа с помощью метода формирования условного рефлекса пассивного избегания показало, что нахождение в гипогеомагнитных условиях не влияет на обучение и память крыс. Вероятно, полученные результаты объясняются особенностью используемых методик обучения. При тестировании крыс методом формирования условного рефлекса пассивного избегания используется сильный стимул к запоминанию (удар током), а в цитируемых работах [50, 178, 172], в которых исследования проводились на людях, эмоциогенный стимул для запоминания был существенно слабее [50]. Вторым возможным объяснением является возможное влияние ГГМУ на консолидацию, а не сохранность памятного следа. Так, в работе Ying Xiao [172] влияние гипомагнитных условий проявилось как раз на процессы запоминания у птенцов. В настоящей работе процесс обучения состоялся до начала воздействия ГГМУ.

Кроме результатов, связанных с угнетающим действием ГГМУ на ЦНС, нами были обнаружены влияние гипогеомагнитной среды на опиоидную систему и агрессивное поведение.

Иммуногистохимический анализ выявил, что под воздействием ГГМУ в течение 21 суток происходит снижение доли активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы во всех исследуемых структурах мозга (фронтальная кора, околопроводное серое вещество, таламус, верхние бугры четверохолмия).

Как утверждает S. Bruehl, дисфункция эндогенной опиоидной системы (уменьшение активности и повышение болевой чувствительности) может быть одним из факторов, вызывающих агрессивное поведение, и что агрессия связана с отсутствием опиоидной анальгезии [76].

Анализ агрессивного поведения крыс показал влияние гипогеомагнитных условий на агрессию, проявляющееся в повышении числа агрессивных взаимодействий в опытной группе. При этом установлено, что экспозиция в среде ослабленного магнитного поля Земли в течение 5 суток не влияет на агрессивное поведение крыс. Увеличение экспозиции до 10 суток приводит к повышению агрессивности животных. Увеличение длительности нахождения в гипогеомагнитных условиях до 21 суток приводит к уменьшению агрессивного поведения по сравнению с показателями 10-суточного пребывания. При этом в опытной группе сохраняется тенденция к повышению агрессивности по сравнению с контрольной группой. Возможно, это связано с тем, что при экспозиции в 21 суток у животных происходит адаптация к условиям гипогеомагнитной среды.

Полученные результаты согласуются с литературными данными Походзей Л.В., полученные при поликлиническом обследовании радиотехнического персонала, работающего в экранированных помещениях, члены персонала предъявляли жалобы на раздражительность [45].

Мы предположили, что именно изменение болевого порога при воздействии гипогеомагнитной среды является причиной агрессивного поведения животных, поскольку в ряде работ было показано, что ГГМУ условия оказывают тормозное влияние на систему опиатов, понижают реакции обезболивания [80, 84, 85], т.е. повышают восприимчивость к боли.

Из литературных данных известно, что различные опиатные рецепторы дифференциально участвуют в различных компонентах агрессивного поведения [158]. Показано, что активация μ -опиоидных рецепторов в дорсальных ядрах имеет сильный эффект по подавлению агрессии [98], антагонисты μ_1 рецепторов вызывают снижение страха [74]. В работе V. Dyakonova [92] сообщается о том, что введение налоксона (антагониста μ -рецепторов) вызывает агрессию у самцов *Gryllus bimaculatus*, которые имеют опыт поражения, введение DAGO (агониста μ рецепторов) подавляет агрессию у самцов, которые имеют опыт победы в агрессивном взаимодействии. Автор отмечает, что существует сходство эффектов налоксона в агрессии у сверчков и эффектов налтрексона (в дозе антагониста μ опиатных рецепторов) у мышей [93].

Все эти факты свидетельствуют о том, что, вероятно, снижение активности μ -опиоидных рецепторов напрямую повлияло на повышение агрессивности у крыс в гипогеомагнитных условиях. Пребывание в гипогеомагнитных условиях оказывает тормозное влияние на опиоидэргическую систему, снижая количество и активность μ -опиоидных рецепторов. Угнетение опиоидэргической системы увеличивает болевую чувствительность, что вызывает повышение агрессивности у животных.

Сопоставление результатов трёх серий экспериментов показало, что при увеличении времени воздействия гипогеомагнитных условий происходит усиление негативных последствий в организме. После экспозиции животных в ГГМУ в течение 5 суток, выявлено только значимое снижение общей двигательной активности и общего числа активных нейронов. Изменения биоэлектрической активности, изменения активности опиоидной системы, а также изменения в агрессивном поведении отсутствуют. Эксперимент, в котором животные подвергались экспозиции в ГГМУ в течение 10 суток, показал, что для изменения агрессивного поведения, которое выражается в его повышении, необходимо длительное воздействие ГГМУ (более 5 суток). ЭЭГ и нейрональную активацию в этом эксперименте не оценивали. Наиболее длительная экспозиция животных в ГГМУ в течение

21 суток вызвала изменения практически всех исследуемых показателей, за исключением поведения в «открытом поле» и тесте УРПИ. Так, после экспозиции в гипогеомагнитных условиях в течение 21 суток наблюдается наиболее выраженное снижение двигательной активности, значимое снижение абсолютных мощности ритмов ЭЭГ, общей нейрональной активации и, в частности, активации опиоидергической системы. Кроме того, возникают изменения на уровне рецепторного аппарата опиоидергической системы, связанные с уменьшением доли клеток, отвечающих на сигналы опиоидной системы, т.е. изменения прямо связаны с уменьшением антиноцицептивного ответа. Снижение показателей агрессивного поведения в 21-суточной серии по сравнению с показателями 10-суточной серии, свидетельствует о том, что у животных, возможно, произошла адаптация или привыкание к ГГМУ.

Полученные результаты согласуются с литературными данными, в которых утверждается, что степень отрицательного воздействия магнитного поля на живой организм, прямо пропорциональна длительности его пребывания в экранированном помещении и коэффициенту ослабления магнитного поля, что подтверждает полученные нами результаты исследования влияния гипогеомагнитных условий на крыс [37].

На основе литературных данных нами была выдвинута гипотеза о возможном механизме действия гипогеомагнитных условий на ЦНС крыс, которая объясняет полученные результаты, основываясь на предложенной Галль Л.Н. [12] концепции о том, что все биологические системы на молекулярном уровне состоят из множества прилегающих друг к другу молекулярных ячеек. Биополимеры в молекулярной ячейке энергетически связаны между собой потоком энергии через водную (кристаллическую) субстанцию, что обеспечивает синхронность конформационных перестроек.

Нами было предложено, что МП Земли играет важную роль в процессе синхронизации передачи энергии между биополимерами через водную среду и, как следствие, в синхронизации конформационных перестроек биомолекул. Помещение организма в гипогеомагнитные условия вызывает нарушение передачи энергии между биополимерами, нарушает согласованность конформационных перестроек, что приводит к изменению реакционной способности молекул и биологическим последствиям, таким как увеличение порога потенциала действия [38].

Вследствие этого происходит снижение частоты импульсации (активности нейронов) в различных структурах мозга. Снижение активности нейронов приводит к снижению общего тонуса ЦНС, т.е. снижению абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ и, на поведенческом уровне, к снижению активности животных. Снижение активности нейронов также приводит к снижению выброса медиатора в пресинаптическую щель и, как

следствие, уменьшению активации рецепторов, в том числе опиоидных [80, 84, 85]. Снижение активации опиоидных рецепторов приводит к повышению активности ноцицептивных рецепторов и передачи ноцицептивной информации, что вызывает повышение болевой чувствительности и может являться причиной повышения агрессивности [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования в целом подтвердили нашу гипотезу о снижении общего тонуса ЦНС и активности на поведенческом уровне. Так, под воздействием гипогеомагнитных условий выявлено снижение общей двигательной активности животных, снижение мощности основных ЭЭГ-ритмов, снижение числа активных нейронов во фронтальной коре, в околопроводном сером веществе, в таламусе и в верхних буграх четверохолмия.

Анализ автоматической обработки видеофайлов экспериментов показал, что под действием гипогеомагнитных условий происходит снижение общей двигательной активности животных. В тоже время, визуальный метод исследования (по 5 минут в начале каждого часа) оказался малочувствителен к влиянию среды ослабленного магнитного поля Земли на двигательную активность. Исследование поведения крыс методом «открытого поля» также не показало значимого воздействия гипогеомагнитных условий.

Результаты исследования общей двигательной активности согласуются с результатами исследования влияния гипогеомагнитных условий на биоэлектрическую активность мозга крыс, которые также показали угнетающее действие среды ослабленного магнитного поля Земли. Полученные данные свидетельствуют о снижении уровня функциональной активации ЦНС в группе опытных животных.

Результаты тестирования с помощью метода формирования условного рефлекса пассивного избегания показали, что пребывание в гипогеомагнитных условиях в течение 21 суток не влияет на память и обучения крыс.

Результаты исследования биоэлектрической активности мозга согласуются с результатом оценки уровня нейрональной активации мозга крыс, связанным с уменьшением активности нейронов.

Установлено, что под воздействием гипогеомагнитных условий в течение 21 суток происходит снижение доли активных клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы. Анализ агрессивного поведения крыс показал, что для увеличения агрессии животных необходимо влияние гипогеомагнитных условий в течение 10 суток. Экспозиция в среде ослабленного геомагнитного поля в течение 5 суток не влияет на агрессивное поведение крыс. При увеличении длительности воздействия гипогеомагнитных условий до 21 суток агрессивное поведение становится менее выражено по сравнению показателями агрессивного поведения в 10-суточной экспозиции. При этом в опытной группе наблюдается тенденция к повышению агрессивности в сравнении с контролем. Возможно, это связано с тем, что при

экспозиции в 21 суток у животных происходит адаптация к условиям гипогеомагнитной среды.

Было выявлено, что эффект воздействия среды ослабленного магнитного поля Земли зависит от времени экспозиции, при увеличении времени воздействия гипогеомагнитных условий происходит усиление негативных последствий в организме. Сначала изменения происходят на молекулярном уровне (снижение активности нейронов), затем по прошествии нескольких суток снижается мощность ритмов ЭЭГ, снижается активность животных, снижается активность нейронов, содержащих μ -опиоидные рецепторы, что вызывает повышение болевой чувствительности, которое, возможно, является причиной повышения агрессивности.

ВЫВОДЫ

- 1) Экспозиция в гипогеомагнитных условиях в течение 5, 10 и 21 суток вызывает снижение общей двигательной активности и не влияет на поведение крыс в тесте «открытое поле». Пребывание в среде ослабленного магнитного поля Земли в течение 5 суток не влияет на агрессивное поведение. При увеличении экспозиции до 10 и 21 суток происходит повышение агрессивного поведения.
- 2) Экспозиция в гипогеомагнитных условиях в течение 21 суток не влияет на память и обучение крыс в тесте формирования условного рефлекса пассивного избегания.
- 3) Экспозиция в гипогеомагнитных условиях в течение 5 суток вызывает снижение уровня экспрессии белков раннего ответа c-fos во фронтальной коре, таламусе и верхних буграх четверохолмия. Увеличение времени пребывания в среде ослабленного геомагнитного поля до 21 суток приводит к снижению абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ и активности клеток, содержащих μ -опиоидные рецепторы, во фронтальной коре, околопроводном сером веществе, таламусе и верхних буграх четверохолмия.
- 4) Эффекты воздействия гипогеомагнитных условий на поведение и функциональное состояние ЦНС крыс зависят от длительности экспозиции. С увеличением времени пребывания в гипогеомагнитных условиях до 21 суток происходит усиление воздействия среды ослабленного магнитного поля Земли, связанное с дальнейшим снижением общей двигательной активности, абсолютных мощностей ритмов ЭЭГ, активации опиоидергической системы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акасофу С., Чепмен С., Солнечно-земная физика. пер. с англ., ч. 1-2, М., 1974–75.
2. Анищенко Л.Н., Васильев И.А., Ивашов С.И., Парашин В. Б., Бугаев А.С., Медведев О.С. Оценка поведения лабораторных животных с помощью радиолокатора малой дальности. III Всероссийская конференция «Радиолокация и радиосвязь». Москва: ИРЭ РАН. Р. 155–162.
3. Бинги В. Н., Миляев В. А., Саримов Р. М., Заруцкий А. А. Влияние «нулевого» магнитного и электростатического полей на психофизиологическое состояние человека. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2006. Т. 8. №. 8. С. 48–58.
4. Бинги В.Н., Савин А.В. Физические проблемы действия слабых магнитных полей на биологические системы // Успехи физических наук. 2003. № 3. С.265 – 300.
5. Богатина Н.И., Шейкина Н.В., Мартынюк В.С., Темурьянц Н.А., Павлюков Д.В. Метод получения крайне слабых постоянного магнитного и электрического полей и хорошо воспроизводимого комбинированного магнитного поля для биологических исследований // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Сер. Биология. Химия. 2010. Т. 23. № 2. С. 125.
6. Большой психологический словарь. — М.: Прайм-ЕВРОЗНАК. Под ред. Б.Г. Мещерякова, акад. В.П. Зинченко. 2003.
7. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М.: Высшая школа. 1991. 399 с.
8. Быстрова Е.Ю., Богомолова Е.В., Гаврилов Ю.М., Панина Л.К., Стефанов В.Е., Сурма С.В., Щеголев Б.Ф. Влияние постоянного магнитного и экранированного геомагнитного полей на развитие колоний микромицетов // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. № 5. С. 438.
9. Введенский В.Л., Ожогин В.Н. Сверхчувствительная магнитометрия и биомагнетизм. М.: Наука. 1986. 200 с.
10. Вительс Л.А. О влияние циклов солнечной активности разной длительности на некоторые характеристики «атмосферных процессов» // Труды Всесоюзного научного метеорологического совещания. 1963. Т.3. с.161.
11. Галль Л. Н. мире сверхслабых. Нелинейная квантовая биоэнергетика: новый взгляд на природу жизни. 2009. 317. с.

12. Галль Л. Н., Галль Н. Р. Механизм межмолекулярной передачи энергии и восприятия сверхслабых воздействий химическими и биологическими системами // Биофизика. 2009. Т. 51. Вып. 3. С. 563-574.
13. Гнездицкий В.В. Вызванные потенциалы мозга в клинической практике // Таганрог. – 1997.
14. Гоженко А.И., Масевич Ю.В., Насибуллин Б.А. Гистохимически выявляемые особенности активности ферментов цикла Кребса в нейронах сенсомоторной коры крыс при депривации геомагнитного поля // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2013 г. № 2 (32). С. 98–103.
15. Горелкин А.Г., Арвакова И.В. Психовегетативные функции организма человека в условиях геомагнитного экранирования // Тезисы докладов 1-го Тихоокеанского конгресса геокосмической экологии человека. Петропавловск-Камчатский. 1998. С.23–25.
16. Гривенная Н.В. Анализ методов и методик коррекции влияния космического и солнечного электромагнитных полей на биологические объекты // Вестн. СевКавГТУ. Сер. Естеств. науки. 2003. N 1(6). С.163–168.
17. Григорьев Ю.Г. Реакция организма в ослабленном геомагнитном поле (эффект магнитной депривации) // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35. вып. 1 С. 3–18.
18. Губский Ю.И., Левицкий Е.Л., Беленичев И.Ф., Павлова С.В., Жернова Г.А. Роль гена раннего реагирования c-fos в норме и нейродеструктивной патологии возможности фармакокоррекции нейропептидными лекарственными средствами // Новости медицины и фармации. 2008. № 9 (244). С. 18–21.
19. Демцун Н.А., Махонина М.М., Темурьянц Н.А., Мартынюк В.С. Влияние электромагнитного экранирования различной продолжительности на регенерацию планарий DUGESIA TIGRINA // Физика живого. Т. 16. № 1. 2008. С.68–73.
20. Дзердеевский Б.Л. Анализ многолетней изменчивости характера общей циркуляции атмосферы и показателей климатических элементов на поверхности земного шара. Геофиз.бюлл.Междувед.геофиз.комитета при Президиуме АН СССР. 1964. № 14.
21. Дмитриев С. П., Доватор Н. А., Богомолова Е. В., Л. К. Панина, Гаврилов Ю. М. Экспериментальное моделирование воздействия гипомагнитных полей на биологические объекты // Научное приборостроение. 2012. Т. 22. № 1. С. 68–73.
22. Дубров А.П. Геомагнитное поле и жизнь. ГИДРОМЕТЕОИЗДАТ. Ленинград. 1974. 176 с.

23. Еськов Е.К., Дарков А.В., Швецов Г. А. Зависимость магнитной восприимчивости различных биообъектов от их физиологического состояния и жизнеспособности // Биофизика. 2005. Т. 50. № 2. С. 357–360.
24. Ефименко Г.Д., Копанев В.И., Шакула А.В. О биологическом действии на организм гипогеомагнитной среды / Известия АН СССР. 1979. № 3. С. 342–353
25. Зеленцов В.И., Пеккер Я.С., Перельмутер В.М., Фалькович В.М., Чуприкова Е.М. Упорядоченное расположение волосяных фолликулов (линии Фойта) и рецепция геомагнитного поля // Бюллетень сибирской медицины. 2002. № 2. С. 112–117.
26. Иваницкий А.М., Стрелец В.Б., Корсаков И.А. Информационные процессы мозга и психическая деятельность. М.: Наука. 1984. 197 с.
27. Калантаевская К.А. Морфология и физиология человека. Москва—Киев, 1972. 267 с.
28. Кириаков В.Х., Любимов В.В. Новые приборы для исследования гипомагнитных полей и помещений. Электронный ресурс: <http://pribory-magic.narod.ru/Gipomag.htm/2010/06/30> (дата обращения 30.06.2010)
29. Колесник А.Г., Колесник С.А., Побаченко С.В. Электромагнитная экология: Учебное пособие. Томск: ТМЛ-Пресс. 2009. 336 с.
30. Копанев В.И., Ефименко Г.Д., Шакула А.В. О биологическом действии на организм гипогеомагнитной среды // Изв. АН Сер. Биол. 1979. № 3. С. 342–345.
31. Королев В.А., Захарова М.В., Ярмолюк Н.С. Особенности репродуктивного процесса у крыс в условиях электромагнитного экранирования // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». Т. 22 (61). 2009. № 3. С. 68–74.
32. Короновский Н.В. Магнитное поле геологического прошлого Земли. Соросовский Образовательный Журнал. 1996. N 5. С.56–63.
33. Костюк А.С. Участие опиоидной системы в изменениях ноцицепции мышей при электромагнитном экранировании // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского Серия «Биология, химия». Т. 27 (66). 2014. № 2. С. 113–122.
34. Костюк А.С., Темурьянц Н.А. Изменение болевой чувствительности моллюсков *HELIX ALBESCENS* в условиях электромагнитного экранирования // Космос и биосфера. VIII международная крымская конференция (28.09.09. – 3.10.09.) Судак. Крым. Украина.
35. Куликов А.В., Куликов В.А. Ethostudio – новый инструмент для точного и объективного фенотипирования признаков в генетике поведения. Вестник ВОГиС. 2009. Т. 13 (3). С. 543–553.

36. Леднев В.В. Биоэффекты слабых комбинированных, постоянных и переменных магнитных полей // Биофизика. 1994. Т. 41. № 1.
37. Любимов В.В., Рагульская М.В. Электромагнитные поля, их биотропность и нормы экологической безопасности // Успехи современной радиоэлектроники. Успехи современной радиоэлектроники. 2004. Т.3.
38. Новиков С. М. Исследование действия ослабленного магнитного поля на функционирование нервной клетки: автореф. дис. канд. физ.-мат. наук. М. 2007.
39. Ноздрачев А.Д., Баженов Ю.И., Баранникова И.А. Общий курс физиологии человека и животных: В 2-х кн. Книга Первая. Физиология нервной, мышечной и сенсорной систем. М: Высшая школа. 1991. 509 с.
40. Одинак М.М., Живолупов С.А., Самарцев И.Н. Болевые синдромы в неврологической практике // Журн. неврологии и психиатрии. 2009. Вып. 109. № 9. С. 80–89.
41. Осипенко М.А., Межевикина Л.М., Крастс И.В., Яшин В.А., Новиков В.В., Фесенко Е.Е. Влияние «нулевого» магнитного поля на рост эмбриональных клеток и ранних зародышей мыши в культуре *in vitro* // Биофизика. 2008. Т. 53. № 4. С. 705–714.
42. Основы иммуногистохимии [Электронный ресурс] // BioVitrum. Режим доступа: <http://www.biovitrum.ru/articles/73/> (Дата обращения: 12.12.2011)
43. Паспорт-заявка научно-технического проекта. 2010. [Online]. Available: <http://www.centercem.ru/index.html /2010/06/30.> [Accessed: 30-Jun-2010]
44. Петровский Б. В. Большая медицинская энциклопедия. Т. 1. Москва: Советская энциклопедия. 1974. 576 с.
45. Походзей Л.В., “Типомагнитные условия как неблагоприятный фактор производственной среды: автореф. дис. доктора. мед. М. 2004.
46. Пресман А.С. Электромагнитные поля и живая природа. М. Наука. 1968. 288 с.
47. Розов В.Ю., Пелевин Д.Е., Левина СВ. Экспериментальные исследования явления ослабления статического геомагнитного поля в помещениях // Электротехника і Електромехатка. 2013. № 6. С. 71–76.
48. Рябов Ю.Г. Совместимость принципов и показателей нормирования электромагнитной безопасности // Электромагнитные поля и здоровье человека. Материалы 2-й Международной конференции "Проблемы электромагнитной безопасности человека. Фундаментальные и прикладные исследования. Нормирование ЭМП: философия, критерии и гармонизация" (20-24 сентября 1999 г., г. Москва, Россия). М.. 1999. С.102 – 103.
49. Саримов Р. М., Бинги В. Н., Миляев В. А. Влияние компенсации геомагнитного поля на когнитивные процессы человека. Биофизика. 2008. Т. 53. № 4. С. 856–866.

50. Саримов Р.М., Бинги В.Н., Миляев В.А. Метод исследования влияния «магнитного вакуума» на цветовую память человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45. № 4. С. 451–456
51. Сахаров В., Андреев А. Методы математической обработки электроэнцефалограмм. – Таганрог: Антон. 2000. С. 44.
52. Симонов А.Н., Вишенская Т.В., Лившиц В.А., Кузнецов А.Н. Влияние постоянного магнитного поля на электрическую емкость бислойной липидной мембраны // Биофизика. 1984. Т. 29. 4. С. 610–614.4
53. Соколов В.Е., Карасева Е.В. Серая крыса: Систематика, экология, регуляция численности. М.: Наука. 1990. с. 456.
54. Сусак И.П., Пономарев О.А., Шигаев А.С. О первичных механизмах воздействия электромагнитных полей на биологические объекты // Биофизика. 2005. Т. 50. № 2. С. 367–370.
55. Суханов Д.Я., Зеленская А.Е., Суханов Д.Я., Ходанович М.Ю., Кривова Н.А., Гуль Е.В. Автоматическое измерение двигательной активности лабораторных крыс // Экология. Риск. Безопасность: Материалы международной научно-практической конференции. Курган. 20-21 октября 2010 г. С. 135–136.
56. Суханов Д.Я., Кривова Н.А., Ходанович М. Ю. Рекламно-техническое описание. Программа оценки двигательной активности крыс в ограниченном прямоугольном пространстве по цифровому видеоизображению ‘Mouse Express’. Свидетельство ОФЕРНиО № 15873 от 16.06.2010.”Томск, р. 5, 2010.
57. Темурьянц Н.А., Демцун Н.А., Баранова М.М., Ярмолюк Н.С. Динамика скорости движения планарий DUGESIA TIGINA, регенерирующих в условиях электромагнитного экранирования // Космос и биосфера.VIII международная крымская конференция. 2009. Судак, Крым, Украина. 28.09.09. – 3.10.09
58. Темурьянц Н.А., Демцун Н.А., Костюк А.С., Ярмолюк Н.С. Особенности регенерации планарии DUGESIA TIGRINA и ноцицепции моллюсков HELIX ALBESCENS в условиях слабого электромагнитного экранирования // Геофизические процессы и биосфера. 2011. Т. 10. № 4. С. 66–80.
59. Темурьянц Н.А., Костюк А.С., Туманянц К.Н. Участие мелатонина в изменении ноцицепции моллюсков и мышей при длительном электромагнитном экранировании // Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова РАН. 2013. Т. 99 (11). С. 1333–1342.

60. Фесенко Е.Е., Попов В.И., Новиков В.В. Структурообразование в воде при действии слабых магнитных полей и ксенона. Электронно-микроскопический анализ // *Биофизика*. 2002. Т.47. № 3. С. 384–394.
61. Ходанович М.Ю., Гуль Е.В., Зеленская А.Е., Пан Э.С., Кривова Н.А. Влияние длительного ослабления геомагнитного поля на агрессивность лабораторных крыс и активацию опиоидергических нейронов // *Вестник Томского государственного университета*. 2011. № 348. С. 155–160.
62. Ходанович М.Ю., Гуль Е.В., Зеленская А.Е., Пан Э.С., Кривова Н.А. Влияние длительного снижения уровня геомагнитного поля на биоэлектрическую активность мозга лабораторных крыс // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. 2013. № 1 (21). С. 146–160.
63. Холодов Ю.А., Лебедева Н.Н. Реакция нервной системы человека на электромагнитные поля. М.: Наука. 1992. 187 с.
64. Шаловой В.В., Перельмутер В.М., Ржевская З.И. Сравнительные характеристики расположения волосяных фолликулов (линий Фойта) в коже животных разных видов // *Деп. В ВИНТИ*. 1993. < 1823- В93. С. 9.
65. Яблоков Е.В., Новиков В.В., Фесенко Е.Е. Действие слабых магнитных полей на флуоресценцию воды и водно-солевых растворов. Выделение и частичная характеристика флуоресцирующих фракций // *Биофизика*. 2007. Т. 52. № 2. С.197–204.
66. Alper K. R., John E. R., Brodie J., Günther W., Daruwala R., and Prichep L. S. Correlation of PET and qEEG in normal subjects // *Psychiatry research*. 2006. V. 146. N. 3. P. 271–82.
67. Andrews G.K. The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the c-fos proto-oncogene // *Molecular and cellular biology*. 1987. № 7. P. 3452–3458
68. Asahima M., Shimada K., Pfeiffer C. Magnetic shielding induces early developmental abnormalities in the newt, *Cynops pyrrhogaster* // *Bioelectromagnetics*. 1991. V. 12. P. 215–224.
69. Babiloni C., Miniussi C., Babilonia F., Carduccia F., Cincottia F., Del Percio C., Sirello G., Fracassio C., Nobre A. C., Rossini P. M. Sub-second “temporal attention” modulates alpha rhythms. A high-resolution EEG study // *Cognitive Brain Research*. 2004. V. 19. P. 259–268.
70. Başar E., Başar-Eroglu C., Karakaş S., Schürmann M. Gamma, alpha, delta, and theta oscillations govern cognitive processes // *International Journal of Psychophysiology*. 2001. V. 39. P. 241–248.
71. Berke J.D., Hetrick V., Breck J., Greene R.W. Transient 23–30 Hz oscillations in mouse hippocampus during exploration of novel environments // *Hippocampus*. 2008. V.18. P. 519–529.

72. Bland B. H., Oddie S. D. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration // *Behavioural Brain Research* . 2001. V. 127. P. 119–136.
73. Bodnar R.J., Klein G.E. Endogenous opiates and behavior: 2003 // *Peptides*. 2004. V. 25. I. 12. P. 2205–2256.
74. Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity // *Nat. Neurosci*. 2005. V.8 (9). P. 1263–8.
75. Brown F.A. Effects and after effects on planarians of reversals of the horizontal magnetic vector // *Nature*. 1966. V. 209. P.533-535.
76. Bruehl S., Burns J. W., Chung O. Y., Ward P., and Johnson B. Anger and pain sensitivity in chronic low back pain patients and pain-free controls: the role of endogenous opioids // *Pain*. 2002. V. 99. N. 1–2. P. 223–33.
77. Bullitt E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat // *Journal of Comparative Neurology*.1990. V. 296. P. 517–530.
78. Buzsaki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory // *Hippocampus*. 2005. V. 15. P. 827–840.
79. Charloux A., Piquard F., Ehrhart J. Time courses in renin and blood pressure during sleep in humans // *Journal of sleep*. 2002. V. 11. P. 73–79.
80. Choleris E., Del Seppia C., Thomas A.W., Luschi P., Ghione S. , Moran G.R., Prato F.S. Shielding, but not zeroing of the ambient magnetic field reduces stress-induced analgesia in mice // *Proceedings of the Royal Society of London*. 2002. V. 269. P. 193–201.
81. Conley C. C. Effects of near-zero magnetic fields upon biological systems. In: *Biological Effects of Magnetic Fields*. V.2 (M. F. Barnothy, Ed.). New York. Plenum Press. 1969. P. 29–31.
82. Crouziera D., Baubichon D., Bourbon F., Testylier G. Acetylcholine release, EEG spectral analysis, sleep staging and body temperature studies: A multiparametric approach on freely moving rats // *Journal of Neuroscience Methods*. 2006. V. 151. P. 159–167.
83. Del Seppia C., Ghione S., Luschi P., Ossenkopp K.-P., Choleris E., Kavaliers M. Pain perception and electromagnetic fields // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2007. V. 31. P. 619–642.
84. Del Seppia C., Luschi P., Ghione S., Crosio E., Choleris E., Papi F. Exposure to a hypogeomagnetic field or to oscillating magnetic fields similarly reduce stress-induced analgesia in C57 male mice // *Life Sciences*. 2000. V. 66. № 14. P. 1299–1306.

85. Del Seppia C., Mezzasalma L., Choleris E., Luschi P., Ghione S. Effects of magnetic field exposure on open field behaviour and nociceptive responses in mice // *Behavioural Brain Research*. 2003. V. 144. P. 1–9.
86. Del Seppia C., Mezzasalma L., Messerotti M., Cordelli A., Ghione S. Simulation of the geomagnetic field experienced by the International Space Station in its revolution around the Earth: Effects on psychophysiological responses to affective picture viewing // *Neuroscience Letters*. 2006. V. 400. P.197–202.
87. Diebel C.E., Proksch R., Green C.R., Neilson P., Walker M.M. Magnetite defines a vertebrate magnetoreceptor // *Nature*. 2000. V. 406. P. 299–302.
88. Doppelmayr M., Klimesch W., Stadler W., Pöllhuber D., Heine C. EEG alpha power and intelligence // *Intelligence*. 2002. V. 30. P. 289–302.
89. Dragunow M., Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing // *Journal of Neuroscience Methods*. 1989. V. 29. P 261-265.
90. Draisci G., Iadarola M. Temporal analysis of increases in c-fos, preprodynorphin and preproenkephalin mRNAs in rat spinal cord // *Molecular Brain Research*. 1989. № 6. P. 31-37
91. Dyakonova V., Schürmann F.-W., Sakharov D.A. Effects of opiate ligands on intraspecific aggression in crickets // *Peptides*. 2002. V. 23. I. 5. P. 835–841.
92. Engel A.K., Singer W. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness // *Trends Cognit Sci*. 2001. V. 5. P. 16–25.
93. Engstrom, S., Bowman, J.D. Magnetic resonances of ions in biological systems // *Bioelectromagnetics*. 2004. V. 25 P. 620–630.
94. Fine Perry G. Chapter 2: The Endogenous Opioid System // *A Clinical Guide to Opioid Analgesia – McGraw Hill*. 2004. P. 9-15.
95. Fitzgibbon S., Pope K., Mackenzie L. Cognitive tasks augment gamma EEG power // *Clinical Neurophysiology*. 2004. V. 115. P. 1802–1809.
96. Foster P.S, Harrisson D.W. The relationship between magnitude of cerebral activation and intensity of emotional arousal // *nt. J. Neurosci*. 2002. V.112. P. 1463–1477.
97. Frey A.H. Electromagnetic field interactions with biological systems // *FASEB J*. 1993. V. 7. No. 2. P. 272–281.
98. Giraud O., Cervo L., Grignaschi G., Samanin R. Activation of μ opioid receptors in the nucleus raphe dorsalis blocks apomorphine-induced aggression in rats: serotonin appears not to be involved // *Brain Research*. 1989. V. 488. Issues 1–2. P. 174–179.
99. Gloria E. Hoffman, M. Susan Smith, Joseph G. Verbalis. C-fos and Related Immediate Early Gene Products as Markers of Activity in Neuroendocrine Systems // *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1996.V. 14. N. P. 173-21.

100. Gomes I., Gupta A., Filipovska J., Szeto H.H., Pintar J.E., Devi L.A. A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. V. 101. P. 5135–5139.
101. Grace A. A. The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function // *Drug and Alcohol Dependence*. 1995. V. 37. N. 2. P. 111–129.
102. Gray JA, McNaughton N. *The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. New York: Oxford University Press. 2000.
103. Gregera B., Kateb B., Gruenc P., Pattersonb P.H. A chronically implantable, hybrid cannula-electrode device for assessing the effects of molecules on electrophysiological signals in freely behaving animals // *Journal of Neuroscience Methods*. 2007. V. 163. P. 321–325.
104. Gronfier C., Simon C., Piquard F., Ehrhart J., Brandenberger G. Neuroendocrine processes underlying ultradian sleep regulation in man // *Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. P. 2686–2690.
105. Haenschel C., Baldeweg T., Croft R.J., Whittington M., Gruzelier J. Gamma and beta frequency oscillations in response to novel auditory stimuli: A comparison of human electroencephalogram (EEG) data with in vitro models // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. V. 97. P. 7645–7650.
106. Halász J. The activation of prefrontal cortical neurons in aggression--a double labeling study // *Behavioural brain research*. 2006. № 175. P. 166–75.
107. Halpern M.H., Van Dyke J.H. Very low magnetic field: biological effects and their implication for space exploration. *Aerospace Medicine*. 1966. V. 37. № 3. p.281.
108. Harmony T., Silva J., Bernal J. EEG delta activity: an indicator of attention to internal processing during performance of mental tasks // *International Journal of Psychophysiology*. 1996. V. 24. P. 161–171.
109. Herdegen T., Leah J.D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ ATF proteins // *Brain Research Reviews*. 1998. V. 28. P. 370–4900.
110. Hernández-González M., Guevara M. A., Ágmo A. Electroencephalographic activity during sexual behavior: A novel approach to the analysis of drug effects on arousal and motivation relevant for sexual dysfunctions // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Available online 14 February 2014.
111. Hoffman L. EEG, ERPs and food consumption // *Biological psychology*. 1998. V. 48. P. 139–151.

112. Hölscher C., Anwyl R., Rowan M.J. Stimulation on the positive phase of hippocampal theta rhythm induces long-term potentiation that can be depotentiated by stimulation on the negative phase in area CA1 in vivo // *J Neurosci*. 1997. V. 17. P. 6470–6477.
113. Jensen O., Kaiser J., Lachaux J.P. Human gamma-frequency oscillations associated with attention and memory // *Trends Neurosci*. 2007. V. 30. P. 317–324.
114. Johnsen, S., Lohmann, K.J. The physics and neurobiology of magnetoreception // *Nature Reviews Neuroscience*. 2005. V. 6. P. 703–712.
115. Jurysta F., van de Borne P., Lanquart J. Progressive aging does not alter the interaction between autonomic cardiac activity and delta EEG power // *Clinical Neurophysiol*. 2005. V. 116. P. 871–877.
116. Kahana M.J., Seelig D., Madsen J.R. Theta returns // *Current opinion in neurobiology*. 2001. V. 11. № 6. P. 739–744.
117. Kaiser J., Lutzenberger W. Induced gamma-band activity and human brain function // *Neuroscientist*. 2003. V. 9. P. 475–484.
118. Karasek M, Woldanska-Okonska M. Electromagnetic fields and human endocrine system // *Sci World J*. 2004. № 4. P. 23–28.
119. Kirschvink JL, Gould JLB. Biogenetic magnetite as a basis for magnetic field detection in animals // *BioSystems*. 1981. V. 13. P. 181–201.
120. Klimesch W., Sauseng P., Hanslmayr S. EEG alpha oscillations: the inhibition–timing hypothesis // *Brain research reviews*. 2007. V. 53. P. 63–68
121. Knyazev G. G. EEG delta oscillations as a correlate of basic homeostatic and motivational processes // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2012. 36. P. 677–695.
122. Lambertz M., Langhorst P. Simultaneous changes of rhythmic organization in brainstem neurons, respiration, cardiovascular system and EEG between 0.05 Hz and 0.5 Hz // *Journal of the Autonomic Nervous System*. 1998. V. 68. № 1-2. C. 58–77.
123. Lapray D., Bergeler J., Luhmann H.J. Stimulus-induced gamma activity in the electrocorticogram of freely moving rats: the neuronal signature of novelty detection // *Behavioural brain research*. 2009. V. 199. № 2. C. 350–354.
124. Lednev V.V. Possible mechanisms for the influence of weak magnetic fields on biological systems // *Bioelectromagnetics*. 1991. V.12. P. 71–75.
125. Lerchl A., Reiter R.J., Howes K.A., Nonaka K.O., Stokkan K.A. Evidence that extremely low frequency Ca^{2+} -cyclotron resonance depresses pineal melatonin synthesis in vitro // *Neuroscience Letters*. 1991. V. 124. P. 213–215.
126. Leucht T. Magnetic effects on tail–fin melanophores of *Xenopus laevis* tadpoles in vitro. // *Naturwissenschaften*. 1987. V. 74. P. 441–3.

127. Mitchell S.J., Ranck J.B. Jr. Generation of theta rhythm in medial entorhinal cortex of freely moving rats // *Brain Res.* 1980. V. 189. P.49-66.; Collins D.R., Lang E.J., Pare D. Spontaneous activity of the perirhinal cortex in behaving cats // *Neuroscience.* 1999. V. 89. P. 1025–1039
128. Nemeč P, Altmann J, Marhold S, Burda H, Oelschläger HH. Neuroanatomy of magnetoreception: the superior colliculus involved in magnetic orientation in a mammal // *Science.* 2001. V. 294. P. 366–8.
129. Nemeč P., Burda H., Oelschläger Helmut H. A. Towards the neural basis of magnetoreception: a neuroanatomical approach // *Die Naturwissenschaften.* 2005. V. 92. N. 4. P. 151–7.
130. Nepomnyashchiida L. M., Lushnikova E. L., Klinnikova M. G., Molodykh O. P., Ashcheulova N. V. Effect of Hypogeomagnetic Field on Tissue and Intracellular Reorganization of Mouse Myocardium // *Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny.* 1997. V. 124. № 10. P. 455–459.
131. Nerad L., Bilkey D.K. Ten- to 12-Hz EEG Oscillation in the Rat Hippocampus and Rhinal Cortex That Is Modulated by Environmental Familiarity // *Journal of Neurophysiology.* 2005. № 93. P. 1246–1254.
132. Noldus. L. P., Spink A. J., Tegelenbosch R. A. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments // *Behavior research methods, instruments, & computers: a journal of the Psychonomic Society, Inc.* 2001. V. 33. N. 3. P. 398–414.
133. Novikov V. V., Sheiman I. M., Fesenko E. E. Multimodal Effects of Nearly Complete Geomagnetic Field Deprivation on Fission of the Planarian *Dugesia tigrina* / *Biophysics.* 2007. V. 52. №. 5. P. 498.
134. O'Keefe J., Recce M.L. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm // *Hippocampus.* 1993. V. 3 P. 317–330.
135. Osipenko M. A., Mezhevikina L. M., Krasts I. V., Yashin V. A., Novikov V. V., Fesenko E. E. Deterioration of Murine Embryonic Fibroblasts and Early Embryos upon Magnetic Field Deprivation // *Biofizika.* 2008. V. 53. №. 4. P. 705–712.
136. Pellegrino F., Sica R. Canine electroencephalographic recording technique: findings in normal and epileptic dogs // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 2004. V. 115. P. 477–87.
137. Percherancier Y., Berchiche Y.A., Slight I., Volkmer-Engert R., Tamamura H., Fujii N., Bouvier M., Heveker N. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers // *Journal of Biological Chemistry.* 2005. V. 280. P. 895–9903.
138. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes // *J Neurosci Methods.* 2005. V. 148. P. 1–18.

139. Potegal M. Attack priming in female Syrian golden hamsters is associated with a c-fos-coupled process within the corticomедial amygdala // *Neuroscience*. 1996. № 75. P. 869–880.
140. Prato F. S., Robertson J. A., Desjardins D., Hensel J., and Thomas A. W. Daily Repeated Magnetic Field Shielding Induces Analgesia in CD-1 Mice // *Bioelectromagnetics*. 2005 V. 117. P. 109–117.
141. Prinster S.C., Hague C., Hall R.A. Heterodimerization of G- protein-coupled receptors: specificity and functional significance // *Pharmacological Reviews*. 2005. V. 57. P. 289–298.
142. Rajkovic V., Matavulj M., Lukac T, Gledic D., Babic L., Lazetic B. Morphophysiological status of rat thyroid gland after subchronic exposure to low frequency electromagnetic field // *Med Pregl*. 2001. № 54. P. 119–27.
143. Ritz T., Adem S., Schulten K. A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds // *Biophysical Journal*. 2000. V. 78. P. 707–718.
144. Ritz T., Thalau P., Phillips J. B. Resonance effects indicate a radical-pair mechanism for avian magnetic compass // *Nature*. 2004. V. 429. P. 177–184.
145. Robertson JA, Theberge J, Weller J, Drost DJ, Prato FS, Thomas AW. Low frequency pulsed electromagnetic field exposure can alter neuroprocessing in humans // *J R Soc Interface*. 2010. V.7. P.467–73.
146. Rodriguez E., George N., Lachaux J.-P., Martinerie J., Renault B., Varela F.J. Perception's shadow: Long-distance synchronization of human brain activity // *Nature*. 1999. V. 397. P. 430–433
147. Sambeth A., Riedel W.J., Smits L.Th., Blokland A. Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: Relation with hippocampal EEG? // *European Journal of Pharmacology*. 2007. V. 572. P. 151–159.
148. Schulten K., Swenberg C., Weller A. A biomagnetic sensory mechanisms based on magnetic field modulated coherent electron spin motion // *Zeitschrift fur Physikalische Chemie*. 1978. T. 111. P. 1–5.
149. Schutter D., van. Honk J. Decoupling of midfrontal delta–beta oscillations after testosterone administration // *International Journal of Psychophysiology*. 2004. V. 53. P. 71–73.
150. Seidenbecher T., Laxmi T.R., Stork O., Pape H.C. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval // *Science*. 2003. V. 301. P. 846–850.
151. Shen G., Xie K., Luo P., Wu X., Luo E.. Effects of Short-Term Exposure to Near-Zero Geomagnetic Field on Behavior of Laboratory Mice // 2012 International Conference on Environment, Chemistry and Biology IPCBEE v.49. IACSIT Press, Singapore.
152. Siapas A.G., Lubenov E.V., Wilson M.A. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations // *Neuron*. 2005. V. 46. № 1. C. 141–151.

153. Silva A.L. Effects of photoperiod and experience on aggressive behavior in female California mice // *Behavioural brain research*. 2010. № 208. P. 528–34.
154. Sohal V.S., Zhang F., Yizhar O. Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance // *Nature*. 2009. V. 459 (7247). P698–702.
155. Stein C., Schäfer M., Macheltska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids // *Nature Med*. 2003. V. 9(8). P. 1003–1008.
156. Stevens A., Batra A., Kötter I., Bartels M., Schwarz J. Both pain and EEG response to cold pressor stimulation occurs faster in fibromyalgia patients than in control subjects // *Psychiatry research*. 2000. V. 97. P. 237–247.
157. Tallon-Baudry C., Bertrand O. Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation // *Trends Cogn Sci*. 1999. V. 3. P. 151–162.
158. Teskey G.C., Kavaliers M. Effects of opiate agonists and antagonists on aggressive encounters and subsequent opioid-induced analgesia, activity and feeding responses in male mice // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1988. V. 31. I.1. P. 43–52.
159. Testorf M.F., Ake Oberg P., Iwasaka M., Ueno S. Melanophore aggregation in strong static magnetic fields // *Bioelectromagnetics*. 2002. T. 23. P. 444–449.
160. Testorf M. F., Lundström I., and Ake Oberg P. The electric charge of pigment granules in pigment cells // *Biosensors & bioelectronics*. 2001. V. 16. N. 1–2. P. 31–6.
161. Timofeeva O.A., Gordon C.J. Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine // *Brain Res*. 2001. V. 893 P. 165–177.
162. Trofimov V., Sevostyanova E. V. Dynamics of Blood Values in Experimental Geomagnetic Deprivation (In Vitro) Reflects Biotropic Effects of Natural Physical Factors during Early Human Ontogeny // *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny*. 2008. V. 146. №. 7. P. 109–113.
163. Turner JN., Shain W., Szarowski DH., Andersen M., Martins S., Isaacson M. Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants // *Exp Neurol*. 1999. V. 156. P. 33–49.
164. Vanderwolf C.H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat // *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1969. V. 26. P. 407–418.
165. VanElzakker M, Fevurly RD, Breindel T, Spencer RL Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex // *Learn. Mem*. 2008. V. 15 (12). P. 899–908.
166. Vann S. D., Brown M. W., Aggleton J. P. Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests // *Neuroscience*. 2000. V.101. P. 983–991.

167. Waldhoer M., Bartlett S.E., Whistler J.L. Opioid receptors // *Journals Biochemistry*. 2004. V.73. P. 953–990.
168. Wang X.-B., Xu M.-L., Li B., Li D.-F., Jiang J.-C. Long-term memory was impaired in one-trial passive avoidance task of day-old chicks hatching from hypomagnetic field space // *Chinese Sci. Bull.* 2003. V. 48. P. 2454–2457.
169. Whitham E.M., Pope K.J., Fitzgibbon S.P. Scalp electrical recording during paralysis: quantitative evidence that EEG frequencies above 20 Hz are contaminated by EMG // *Clin Neurophysiol.* 2007. V. 118 (8). P. 1877–88.
170. Wiltschko W. and Wiltschko R. Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals // *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology.* 2005. V. 191. N. 8. P. 675–93.
171. Wróbel A. Beta activity: A carrier for visual attention // *Acta Neurobiol Exp.* 2000. V.60. P. 247–260.
172. Xiao Y., Wang Q., Xu M.-L., Jiang J.-C., Li B.. Chicks incubated in hypomagnetic field need more exogenous noradrenaline for memory consolidation // *Advances in Space Research.* 2009. V.44. P. 226–232.
173. Yamamoto J. Effects of nicotine, pilocarpine, and tetrahydroaminoacridine on hippocampal theta waves in freely moving rabbits // *Eur J Pharmacol.* 1998. V. 359. P. 133–137.
174. Yang C.C., Shaw F.Z., Lai C.J., Lai C.W., Kuo T.B. Relationship between electroencephalogram slow-wave magnitude and heart rate variability during sleep in rats // *Neuroscience letters.* 2003. V. 336. P. 21–24.
175. Young C.K., McNaughton N. Coupling of theta oscillations between anterior and posterior midline cortex and with the hippocampus in freely behaving rats // *Cerebral Cortex.* 2009. V. 19. № 1. C. 24.
176. Young G.B., Ives J.R., Chapman M.G., Mirsattari S.M. A comparison of subdermal wire electrodes with collodion-applied disk electrodes in long-term EEG recordings in ICU // *Clinical Neurophysiology.* 2006. V. 117. P. 1376–1379.
177. Yuval-Greenberg S., Tomer O., Keren A.S., Nelken I., Deouell L.Y. Transient induced gamma-band response in EEG as a manifestation of miniature saccades // *Neuron.* 2008. V. 58 (3). P. 429–41.
178. Zhang X., Li J.-F., Wu Q.-J., Li B., Jiang J.-C. Effects of hypomagnetic field on noradrenergic activities in the brainstem of golden hamster // *Bioelectromagnetics.* 2007. № 28. P. 155–158.
179. Zhanga B., Lu H., Xi W., Zhou X., Xu S., Zhang K., Jiang J., Li Y., Guo A. Exposure to hypomagnetic field space for multiple generations causes amnesia in *Drosophila melanogaster* // *Neuroscience Letters.* V. 371. 2004. P. 190–195.

Протокол окраски срезов мозга на c-fos и μ -опиоидные рецепторы

Перед окрашиванием срезов предварительно готовили растворы (можно за сутки)

1. маточный раствор PBS
2. рабочий раствор PBS
3. блокирующий раствор
4. параформальдегид
5. разведение антител

Растворы должны быть холодными (температура + 5°C)

1. Маточный раствор PBS:

NaCl: 86.6 г

Na₂HPO₄ × 12 H₂O: 25 г

NaH₂PO₄ × 2 H₂O: 4.7 г

Доводили объём до 1 л, pH = 7.5

Количество солей рассчитывали в зависимости от количества стекол

2. Рабочий раствор PBS

1 часть маточного раствора + 9 частей дистиллированной воды

3. Блокирующий раствор (для создания среды):

PBS – 10 мл

Тритон – 50 мкл (для разрушения мембран эукариотических клеток, улучшает проницаемость реагентов)

Азид натрия – 2-3 мкг (для длительной сохранности)

Сыворотка – 250 мкл (donkey serum) (для блокирования неспецифического окрашивания антител)

бычий сывороточный альбумин – 0.5 г (для создания среды и блокирования неспецифического окрашивания антител)

Количество реагентов рассчитывали в зависимости от количества стекол

4. Параформальдегид (для фиксации препарата)

4 % = 0.04 гр. + 1 мл PBS

5. Разведение антител

c-fos

Первичные антитела (sc-52, rabbit)

Разведение 1:100 в блокирующем растворе перемешать.

Вторичные антитела (Alexa Fluor® 488, A-21206, donkey anti-rabbit)

Разведение 1:200 в блокирующем растворе

Ми – опиоидные рецепторы

Первичные антитела (sc-27072, goat) (1:1000)

Разведение 1:1000 в блокирующем растворе

Вторичные антитела (Texas Red sc-2783, donkey anti-goat)(1:100-1:400)

разведение 1:1000 в блокирующем растворе

Приготовление растворов для окрашивания 20 стекол антителами

Растворы должны быть холодными (температура + 5°C)

1. Маточный раствор PBS:

реактив	Исходное количество		На 20 стекол
NaCl	86.6 г		3,464 г
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	25 г	/ 25	1 г
NaH ₂ PO ₄ × 2 H ₂ O	4.7 г		0,188 г

Делаем навески данных солей. Ссыпаяем в колбу, доводим до 40 мл, pH = 7,5

2. Рабочий раствор PBS

1 часть маточного раствора + 9 частей дистиллированной воды

Отмеряли в колбу 10 мл маточного раствора PBS и добавляли 90 мл дистиллированной воды.

10 мл маточный раствор PBS + 90 мл дистиллированная вода

3. Блокирующий раствор:

Блокирующий раствор используется при разведении первичных антител, вторичных антител и непосредственно на стекла. Примерно на одно стекло в сумме уходит 300 мкл. На 20 стекол 6 мл (300 мкл × 20 стекол)

Реактив	Исходное количество		На 20 стекол
PBS	10 мл		6 мл
Тритон	50 мкл		30 мкл
Азид натрия	2-3 мкг	× 0.6	1.2 мкг
Сыворотка – (donkey serum)	250 мкл		150 мкл
бычий сывороточный альбумин	0.5 г		0.3 г

Сначала делали навески сухих реагентов в пробирки типа эппендорф (2 мл). Затем добавляли жидкие реагенты.

4. Параформальдегид

4 % = 0.04 гр. + 1 мл PBS

На одно стекло уходит примерно 100 мкл параформальдегида, на 20 стекол 2 мл. 0.08 г параформальдегида растворяем в 2 мл PBS.

5. Разведение антител

c-fos

Первичные антитела (sc-52, rabbit) (1:100)

На 1 стекло уходит примерно 100 мкл раствора АТ, на 20 стекол – 2 мл

В эппендорф (2 мл) наливали 2 мл блокирующего раствора и добавляли 20 мкл I АТ, перемешивали.

Вторичные антитела (Alexa Fluor® 488, A-21206, donkey anti-rabbit) (1:200)

На 1 стекло уходит примерно 100 мкл раствора АТ, на 20 стекол – 2 мл

В эппендорф (2 мл) наливали 2 мл блокирующего раствора и добавляли 10 мкл II АТ.

М_μ – опиоидные рецепторы

Первичные антитела (sc-27072, goat) (1:1000)

В эппендорф с I АТ добавляем 2 мкл I АТ μ рецепторы, перемешать

Вторичные антитела (Texas Red sc-2783, donkey anti-goat) (1:1000)

В эппендорф с II АТ добавляем 2 мкл II АТ μ рецепторы, перемешать

Процесс окрашивание срезов антителами

День 1

Приготовление срезов мозга

Мозг приклеивают к столику и оставляют в криостате на 10 – 15 минут. Срезы получают с помощью криостата Thermo HM525 (Германия). Мозг выравнивается параллельно ножу, температура -22 °С, толщина среза 20 мкм.

Готовые срезы мозга наклеиваются на полизиновые предметные стекла фирмы Thermo scientific (ca./env./approx. 25×75×1.0 mm)

Если покраска не в день резки, срезы хранить в морозилке (температура -20 °С)

Так как все реагенты являются растворами в данном процессе, то перед тем как окрашивать, срезы нужно обвести в рамку гидрофобным карандашом, что бы ничего ни стекало

День 2

1. Параформальдегид (холодный) на срезы на 10-15 минут. Затем смывают его PBS'ом

2. PBS на стекла на 10 – 15 минут. Смыть PBS'ом же
3. На стекло 80 мкл блокирующего раствора, распределить по срезам и накрыть парафильмом на 30 минут. Не ополаскивать, промокнуть блокирующий раствор фильтром.
4. 80 мкл первичных АТ на стекло, накрыть парафильмом и во влажной камере в холодильнике на 24 часа (коробка с крышкой, на дне смоченная фильтровальная бумага, стёкла на какой-либо подставке).

День 3

1. Стекла отмывают в PBS 2-3 раза, оставляют стекла с PBS на 30 минут, еще раз ополаскивают PBS.
2. Вторичные АТ наносят на стекла и накрывают парафильмом, оставляют на 1 сутки

День 4

1. Промыть стекла PBS, оставить стекла с PBS на 25 минут.
2. Покрывают стёкла синтетической средой для заливки препаратов Vectashield Mounting Medium with DAPI (для окраски ядер клеток).
3. Анализ и регистрацию проводят с помощью флуоресцентного микроскопа AxioImager Z1 (Karl Zeiss, Германия), камеры Olimpus.

Используются реактивы для иммуногистохимического анализа:

1. PBS (Phosphate buffered saline) –натрий-фосфатный буфер:
 - NaCl, ГОСТ 4233-77;
 - Na₂HPO₄ × 12 H₂O, ГОСТ 4172-76;
 - NaH₂PO₄ × 2 H₂O, ГОСТ 245-76 изм.1;
2. Тритон – Triton X-100, фирма Applichem (Германия);
3. Натрия Азид, фирма Диаэм (Россия);
4. Бычий сывороточный альбумин, фирма Диаэм (Германия);
5. Сыворотка – Normal donkey serum, фирма Jackson ImmunoResearch Labourite (Великобритания);
6. Антитела:
 - Первичные антитела к белку раннего ответа c-fos – sc-52, polyclonal rabbit IgG, фирма Santa Cruz Biotechnology (США);
 - Вторичные антитела к белку раннего ответа c-fos – A-2120, donkey anti-rabbit IgG (H+L), Alexa Flour 488 conjugated affiniPure Donkey, фирма Jackson ImmunoResearch Labourite (Великобритания);

- Первичные антитела к μ -опиодным рецепторам – sc-27072, goat, фирма Santa Cruz Biotechnology (США);
 - Вторичные антитела к μ -опиодным рецепторам – sc-2783, donkey anti-goat IgG-TR, Texas Red, фирма Santa Cruz Biotechnology (США)
7. Покровная среда – Vectashield Mounting Medium with DAPI, фирма Vector Laboratories (США)