

А.А. Кокая<sup>1</sup>, М.В. Ведунова<sup>1</sup>, Е.В. Митрошина<sup>1</sup>,  
Т.А. Сахарнова<sup>1</sup>, Н.Г. Кокая<sup>3</sup>,  
В.П. Козяков<sup>2</sup>, И.В. Мухина<sup>1</sup>

## Устойчивость нейронов к нормобарической гипоксии *in vitro* при воздействии низкоинтенсивным электромагнитным излучением

<sup>1</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гигиены профпатологии и экологии человека, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственное объединение Плазма», Нижний Новгород

**Резюме.** Представлены данные эффекта электромагнитного излучения гелий-неонового лазера, преобразованного биоструктурами, при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* на первичную культуру клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей с использованием культуральной среды с низким содержанием кислорода. Выявлено, что замена нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода приводит к снижению числа жизнеспособных нейронов в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей. В контрольной культуре, в сравнении с интактной, относительное число погибших нейронов при моделировании нормобарической гипоксии на 1-е сутки постгипоксического периода составило 10,13%, а на 7-е сутки – 15,82%. Установлено, что воздействие электромагнитным излучением, преобразованным первичной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей, оказывает защитное действие на исходно неустойчивую клеточную культуру той же линии и способствует повышению её резистентности к нормобарической гипоксии. В результате данного воздействия число погибших нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей снижается. В ответ на воздействие данного излучения относительное число погибших нейронов в опытной культуре на 1-е сутки постгипоксического периода не превышало 6,49%, а на 7-е сутки – 10,2%.

**Ключевые слова:** нормобарическая гипоксия, острая гипобарическая гипоксия, электромагнитное излучение, биоструктура, диссоциированная нейрональная культура, сверхслабые воздействия, резистентность, мозг эмбрионов мышей.

**Введение.** Гипоксия широко распространенное патологическое состояние, возникающие, как в условиях дефицита кислорода во внешней среде, так и в результате самых разных патологических состояний в организме, связанных с нарушением функции дыхательной, сердечно-сосудистой систем, а также транспортной функции крови. Во всех случаях происходит снижение доставки кислорода к тканям до уровня, недостаточного для поддержания функции, метаболизма и структуры клетки. Среди различных методов коррекции гипоксических состояний наиболее изучена и применяется в практической медицине фармакологическая защита с использованием препаратов метаболического действия и их сочетаний, направленных на поддержание энергетического обмена в клетках [2]. В настоящее время всё больше внимания уделяется применению физических методов коррекции различных патологических состояний, в том числе связанных с нарушением транспорта кислорода в ткани и клетки организма. Однако влияние физических методов коррекции гипоксических состояний и компенсаторно-приспособительные механизмы, связанные с этим воздействием остаются мало изученными.

Ранее нами [3, 4] экспериментально на модели острой гипобарической гипоксии у крыс было установлено, что превентивное воздействие электромагнитным излучением (ЭМИ), преобразованным препаратом ткани гипоталамо-гипофизарного отдела головного мозга новорожденного крысенка, приводит к формированию устойчивости животных к действию острой гипобарической гипоксии на «смертельной площадке» у исходно неустойчивых животных. В результате данного воздействия достоверно увеличивается время жизни на «высоте». При этом число устойчивых особей к действию гипоксии достигает 80%. [3]. По-видимому, превентивное воздействие низкоинтенсивным электромагнитным излучением, преобразованным биоструктурами на исходно неустойчивых животных, способствует формированию компенсаторно-приспособительных механизмов к условиям острой гипоксии. Однако судить о степени защиты нейронов головного мозга к условиям острой гипоксии по полученным результатам не представляется возможным. Ранее проведенные нами исследования [4, 5] показали, что воздействие электромагнитным излучением, преобразованным первичной культурой клеток коры головного мозга

эмбрионов мышей, оказывает защитное действие на исходно неустойчивую клеточную культуру той же линии и способствует повышению её резистентности к токсическому действию несимметричного диметилгидразина в дозах от 0,5 до 50 предельно допустимых концентраций.

**Цель исследования.** Оценить защитный эффект ЭМИ гелий-неонового (He-Ne) лазера, преобразованного биоструктурами, на жизнеспособность нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа мозга эмбрионов мышей при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro*.

**Материалы и методы.** В исследовании использованы культуры клеток гиппокампа головного мозга, полученных от 18-дневных эмбрионов белых беспородных мышей. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

Препарирование беременной мыши производилась дислокацией шейных позвонков. Матка с эмбрионами помещалась в стерильную чашку Петри с раствором Хэнкса (Биолот X-12-05). Далее все процедуры выполнялись в стерильных условиях. После промывания матки в растворе Хэнкса, производилось извлечение эмбрионов. В результате хирургических манипуляций под микроскопом осуществлялось извлечение головного мозга из черепной коробки с последующим отделением гиппокампа из полушарий каждого из эмбрионов.

Выделенные гиппокампы подвергались механическому измельчению и помещению в 0,25% раствор трипсина на 20 минут с целью разрушения связей между клетками. Затем ткань несколько раз промывалась раствором полифосфатного буфера «PBS» (Gibco 70011-051), суспензировалась в питательной среде, состоящей из 92,5% нейробазальной среды «Neurobasal™» (Invitrogen 21103-049), 5% эмбриональной телячьей сыворотки «FCS» (ПанЭко K055), 2% биоактивной добавки B27 (Invitrogen 17504-044), 0,5% глутамина «L-glutamin» (Invitrogen 25030-024) и центрифугировалась в течение 1–2 мин на 1000 об/мин. Надосадочная жидкость удалялась, осадок подвергался ресуспензированию, после чего диссоциированные культуры были готовы к посадке.

Суспензия клеток раскапывалась по 40 мкл в центр подложки или стекла, выдерживалась инкубация в течение 2 ч для лучшего прикрепления клеток к субстрату, после чего каждая культура заливалась 1 мл питательной среды. Исходная плотность клеток составляла 9000 кл/мм<sup>2</sup>.

Поддержание жизнеспособности культуры осуществлялось в условиях углекислотного (CO<sub>2</sub>) инкубатора при температуре 35,5°C и газовой смеси, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Смена культуральной среды на среду с низким содержанием сыворотки осуществлялась через сутки после посадки и далее – раз в 3

дня, причём образцы отработанной среды подвергали криоконсервации для дальнейшего анализа.

Для изучения компенсаторно-приспособительных механизмов у животных и степень защиты нейронов головного мозга в условиях острой гипоксии при воздействии ЭМИ He-Ne лазера, преобразованным биоструктурами, использовали экспериментальную модель нормобарической гипоксии *in vitro*. Моделирование нормобарической гипоксии проводилось на 33 день развития культуры *in vitro* (DIV) путем замены нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода в течение 10 мин.

Для получения культуральной среды с обедненным содержанием кислорода использовался герметичный сосуд, в котором воздух был замещен на инертный газ – аргон, который способен вытеснить кислород из жидкостей, так как имеет большую растворимость, чем кислород. По своим химическим свойствам аргон не вступает в химические реакции, что обеспечивает идеальные условия для проведения эксперимента. Использование не инертных газов, таких как углекислый, непременно приведет различным биохимическим реакциям, в результате которых могут образоваться продукты, активно влияющие на жизнедеятельность клеток. Для приготовления среды с низким содержанием кислорода использовалась установка, представленная на рисунке 1.

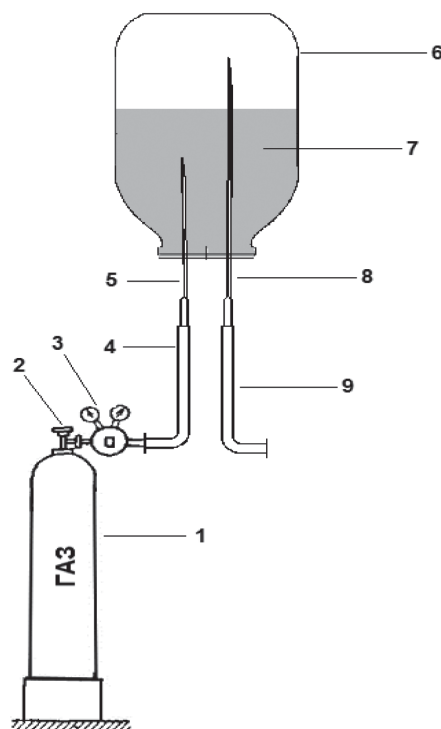
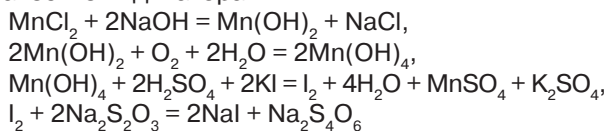


Рис. 1. Установка для приготовления культуральной среды с низким содержанием кислорода. 1 – баллон с аргоном, 2 – кран газового баллона, 3 – редуктор, 4, 9 – газовые шланги, 5 – игла для введения газа, 6 – сосуд для обработки среды, 7 – культуральная среда, 8 – газоотводная игла

Из баллона с инертным газом по газоотводной трубке, на конце которой находится игла, под давлением 1–1,5 МПа, аргон проходит через культуральную среду, находящейся в герметичном сосуде. Для того чтобы в сосуде не накапливалось избыточное давление, выше уровня жидкости находится конец второй газоотводной иглы, которая соединена с выходящей газоотводной трубкой.

Для определения эффективности вытеснения кислорода из культуральной среды использовалась методика йодометрического титрования определения концентрации растворенного кислорода [6]. Методика Винклера [8, 9] основана на способности гидроксида марганца (II) окисляться в щелочной среде до гидроксида марганца (IV), количественно связывая при этом кислород. В кислой среде гидроксид марганца (IV) снова переходит в двухвалентное состояние, окисляя при этом эквивалентное связанному кислороду количество йода. Выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала в качестве индикатора.



Точность методики составляет ±0,1 мг/л [6, 8, 9].

Поскольку в среде содержится pH-зависимый краситель, конечную точку титрования определяли с помощью спектрофотометра «Synergy MX» фирмы «BioTek» (Соединенные штаты Америки).

Установлено, что исходное содержание растворенного кислорода в культуральной среде составило 4,66 мг/л (3,26 мл/л). После 10-минутной обработки аргоном при помощи предложенной установки содержание кислорода снизилось до 0,53 мг/л (0,37 мл/л).

С целью защитного действия на нейроны в первичной культуре клеток гиппокампа мозга эмбрионов мышей при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro* использовали He-Ne лазер мощностью 2 мВт и длиной волны 632,8 нм, который

имеет две совмещенные, ортогональные, линейно поляризованные моды излучения, одночастотные в каждой из них. Генерацию ЭМИ проводили по схеме интерферометра «Фабри-Перо», в которой рабочий лазерный луч многократно проходит через диссоциированную культуру клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей с небольшим количеством среды для культивирования. Полупрозрачное стекло с выращенной на нем диссоциированной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей помещали на предметное стекло и располагали на оптической оси «лазерный луч – препарат». Юстировку стекол с нейрональной культурой проводили таким образом, чтобы обеспечить частичное отражение луча, модулированного диссоциированной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей обратно в резонатор лазера. Такой многопроходный режим позволяет препарату выступать в роли оптического коррелятора [7] и влиять на распределение вторичных мод излучения лазера. Оптические сигналы регистрировались и подавались на электронную схему, которая управляет режимом генерации лазера, при этом происходит частотная стабилизация когерентного излучения. Лазер в таком режиме работы генерирует, помимо красного света и ЭМИ, преобразованное культурой нейронов (пЭМИ). Расстояние от зондируемого препарата до активного элемента лазера составляло 11 см.

Общее количество объектов исследования и распределение их по экспериментальным группам представлено в таблице 1.

Интактную диссоциированную культуру клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей не подвергали никаким физическим и химическим воздействиям. В контрольной диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей моделировали нормобарическую гипоксию по вышеуказанной методике, при этом не оказывали никакого защитного воздействия. На опытную клеточную культуру воздействовали ЭМИ, преобразованным диссоциированной культурой нейронов гиппокампа

Таблица 1

Общее количество объектов исследования и распределение их по группам

Экспериментальная модель	Группа	Моделирование нормо-барической гипоксии	Вид воздействия пЭМИ	Биоструктура для преобразования ЭМИ	Число воздействий пЭМИ
Нормобарическая гипоксия <i>in vitro</i>	Интактная диссоциированная культура клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей	-	-	-	-
	Контрольная диссоциированная культура клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей	+	-	-	-
	Опытная диссоциированная культура клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей	+	Превентивное и корректирующее	Диссоциированная культура клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей	4

эмбрионов мышей в течение 4 дней по 30 мин ежедневно. Воздействие пЭМИ проводили в течение 2 дней до моделирования нормобарической гипоксии и в течение 2 дней после на 1-е и 2-е сутки постгипоксического периода. Планшеты с опытными образцами клеточных культур располагали на расстоянии 50 см от источника ЭМИ. Оценку жизнеспособности клеток проводили на 1 (34 DIV) и 7 (40 DIV) сутки постгипоксического периода.

Для изучения показателя жизнеспособности диссоциированных культур гиппокампа при моделировании кратковременной нормобарической гипоксии проводили окраску клеточных культур пропидий иодидом (Sigma 81845-25MG) и бис-бензимидам (Sigma 14530-100MG) с целью обнаружения погибших клеточных ядер и общего количества клеток в диссоциированной культуре соответственно. При возбуждении длиной волны 488 нм пропидий иодид флуорисцирует красным, максимум эмиссии составляет 562–588 нм. Максимум поглощения бис-бензида составляет 350 нм и, испуская синее свечение, детектируется в проходящем свете в диапазоне 510–540 нм.

Визуализация окрашенных клеток проводилась с помощью инвертированного микроскопа «DMIL HC» фирмы «Leica» (Германия) и осуществлялся подсчет числа клеточных ядер, окрашенных пропидий иодидом и ядер, окрашенных бис-бензимидам. Количество живых клеток рассчитывалось как процентное соотношение между бис-бензимидам позитивными и пропидий иодид позитивными клетками.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью статистических программных пакетов «Stastica 6.0», MS-Excel for Windows.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что замена нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода приводит к снижению числа жизнеспособных нейронов в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей. В контрольной культуре по сравнению с интактной наблюдалось снижение

Таблица 2

**Жизнеспособность нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей при моделировании нормобарической гипоксии in vitro, M±m**

Клеточная культура	Число погибших нейронов в постгипоксическом периоде, сутки	
	1-е	7-е
Интактная	3,02±0,71	2,43±0,53
Контрольная	10,13±1,25*	15,82±1,47*
Опытная	6,49±0,68**	10,2±1,37**

**Примечание:** \* – различия по сравнению с интактной культурой, p<0,005; \*\* – по сравнению контрольной культурой, p<0,05.

числа жизнеспособных нейронов на 1-е и 7-е сутки постгипоксического периода. Относительное число погибших нейронов в контрольной культуре было достоверно (p=0,001) больше в сравнении с интактной и на 1-е сутки постгипоксического периода оно составило 10,13%, а на 7-е сутки – 15,82% (табл. 2, рис. 2).

Воздействие ЭМИ, преобразованным первичной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей, оказало защитный эффект на клетки той же культуры при моделировании нормобарической гипоксии in vitro. В опытной культуре замена нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода приводила к снижению числа жизнеспособных нейронов в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей. Число погибших нейронов в опытной культуре на 1-е сутки постгипоксического периода составило 6,49%, а на 7-е сутки – 10,2%, что достоверно (p=0,001) больше при сравнении с интактной культурой. Однако в ответ на воздействие пЭМИ число погибших нейронов в опытной культуре было меньше, чем в контроле (см. табл. 2, рис. 2). После моделирования нормобарической гипоксии в опытной нейрональной культуре и воздействии на неё пЭМИ относительное число погибших нейронов

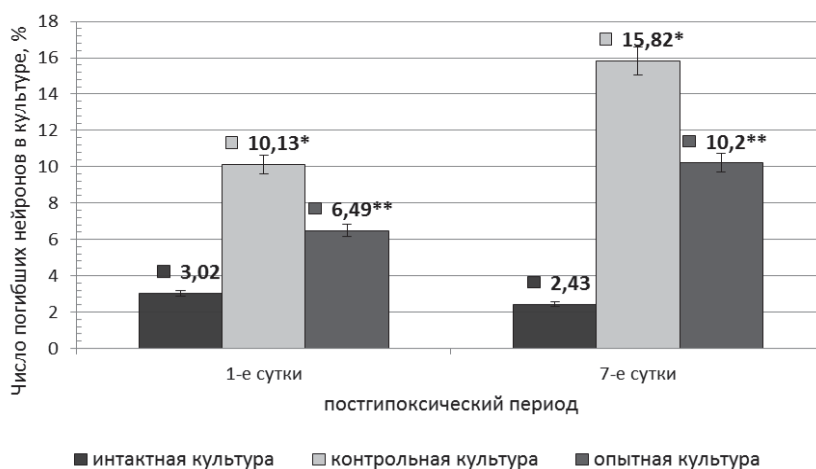


Рис. 2. Число погибших нейронов в диссоциированной клеточной культуре гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей при моделировании нормобарической гипоксии и воздействии пЭМИ

в культуре на 1-е и 7-е сутки постгипоксического состояния достоверно ( $p=0,01$  и  $p=0,03$ ) отличалось при сравнении с контрольной культурой.

Таким образом, воздействие ЭМИ, преобразованной диссоциированной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей, оказывает защитное действие на исходно неустойчивую клеточную культуру той же линии и способствует повышению её резистентности к гипоксии при замене нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода.

**Заключение.** Установлено, что замена нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода приводит к снижению числа жизнеспособных нейронов в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей. Относительное число погибших нейронов в контрольной культуре на 1-е сутки постгипоксического периода составило 10,13%, а на 7-е сутки – 15,82%.

Воздействие ЭМИ, преобразованной первичной культурой клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей, оказало защитный эффект на клетки той же культуры при моделировании нормобарической гипоксии *in vitro*. В опытной культуре замена нормоксической культуральной среды на среду с низким содержанием кислорода приводит к снижению числа жизнеспособных нейронов в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей. Относительное число погибших нейронов в опытной культуре на 1-е сутки постгипоксического периода составило 6,49%, а на 7-е сутки – 10,2%. Однако в ответ на воздействие пЭМИ число погибших нейронов в опытной культуре было достоверно меньше, чем в контрольной культуре.

Установлено защитное действие на нейроны нейротрофических факторов при моделировании глюкозной депривации и нормобарической гипоксии *in vitro* [1]. В связи с этим полагаем, что в ответ на воздействие

пЭМИ нейронами в диссоциированной культуре клеток гиппокампа головного мозга эмбрионов мышей вырабатываются специфические нейротрофические факторы, которые в дальнейшем оказывают защитный эффект и повышают резистентность клеток культуры к нормобарической гипоксии *in vitro*, а также могут способствовать повышению резистентности животных к условиям острой гипобарической гипоксии на «площадке смерти» [3]. Однако в ответ на воздействие пЭМИ возможна реализация и других компенсаторно-приспособительных механизмов, обеспечивающих повышение резистентности организма к условиям острой гипоксии.

#### Литература

1. Ведунова, М.В. Влияние BDNF на функционирование нейрональной сети первичной культуры гиппокампа в условиях глюкозной депривации / М.В. Ведунова [и др.] // Вестн. Нижегород. универ. им. Н.И. Лобачевского – 2011. – № 2. – С. 237–242.
2. Дюба, Д.Ш. Медикаментозная профилактика гипоксии мозга у больных перед аортокоронарным шунтированием / Д.Ш. Дюба [и др.] // Междунар. невролог. журн. – 2013. – № 1 (55). – С. 257–262.
3. Кокая, А.А. Специфичность действия электромагнитного излучения, преобразованного различными биоструктурами / А.А. Кокая [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2012. – № (40). – С. 163–168.
4. Кокая, А.А. Чувствительность нейронов к низкоинтенсивному электромагнитному излучению при токсическом действии гидразинов / А.А. Кокая, [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № (42). – С. 109–115.
5. Кокая, А.А. Влияние превентивного электромагнитного излучения на жизнеспособность и морфологические изменения нейронов при токсическом действии гидразинов / А.А. Кокая, [и др.] // Вестн. Росс. воен.-мед. акад. – 2013. – № (44). – С. 163–168.
6. Лурье, Ю.Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбникова. – М.: Химия, 1974. – С. 45–54.
7. Мазур, А.И. Электрохимические индикаторы / А.И. Мазур, В.Н. Грачев // М.: Радио и связь, 1985. – 178 с.
8. Jeroschewski P. A flow system for calibration of dissolved oxygen sensors / P. Jeroschewski, D. zur Linden // Fresenius j. anal. chem., 1997. – Vol. 358, № 6. – P. 67–82.
9. Winkler, L.W. Die bestimmung des im wasser gelösten sauerstoffes. / L.W. Winkler // Chem. Ber. – 1888. – Vol. 21. –

A.A. Kokaya, M.V. Vedunova, E.V. Mitroshina, T.A. Saharnova, N.G. Kokaya, V.P. Kozyakov, I.V. Mukchina

#### Resistance to normobaric hypoxia neurons *in vitro* when exposed to low-intensity electromagnetic radiation

**Abstract.** The data of the effect of electromagnetic radiation of a helium-neon laser is converted biostructures, for modeling normobaric hypoxia *in vitro* on primary cultures of hippocampus cells of the brain of mouse embryos with a culture medium with a low oxygen content. It was revealed that substitution of normoxic culture medium on a medium with a low oxygen content leads to a reduction in the number of viable neurons in dissociated cell cultures of hippocampus brain of mouse embryos. In the control culture, in comparison with the intact, the relative number of dead neurons in the simulation hypoxia on the 1st day posthypoxic period was 10,13%, and on the 7th day – 15,82% It has been established that exposure to electromagnetic radiation, transformed primary culture hippocampus brain cells in mouse embryos, has a protective effect on cell culture initially unstable same line and enhances its resistance to hypoxia. As a result of this feedback in the number of dead neurons in the hippocampus primary culture of brain cells in mouse embryos is reduced. In response to the impact of the radiation relative number of dead neurons in experimental cultures on day 1 posthypoxic period did not exceed 6,49%, and on the 7th day – 10,2%.

**Key words:** normobaric hypoxia, acute hypobaric hypoxia, electromagnetic radiation, biostructure, dissociated neuronal culture, superweak impact resistance, the brain of mouse embryos.

Контактный телефон: +7-910-795-07-77; e-mail: kann9988@gmail.com