

К.Н. Ляхова¹, И.А. Колесникова^{1,5}, Д.М. Утина^{1,5}, Ю.С. Северюхин^{1,5}, Н.Н. Буденная^{1,5},
А.Н. Абросимова^{2,3}, А.Г. Молоканов¹, М. Лалковичова^{1,4}, А.А. Иванов^{1,2,3}

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

1. Объединенный институт ядерных исследований, Дубна. E-mail: lyakhovakn@mail.ru;
2. Институт медико-биологических проблем РАН, Москва;
3. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва;
4. Институт экспериментальной физики САН, Кошице, Словакия;
5. Университет «Природа, общество, человек», Дубна

К.Н. Ляхова – м.н.с.; И.А. Колесникова – м.н.с.; Д.М. Утина – м.н.с.; Ю.С. Северюхин – н.с.; Н.Н. Буденная – м.н.с.;
А.Н. Абросимова – с.н.с., к.б.н.; А.Г. Молоканов – с.н.с., к.т.н.; М. Лалковичова – н.с., к.б.н.; А.А. Иванов – зав. лаб., проф., д.м.н.

Реферат

Цель: Исследование зависимостей доза–время–эффект поведения мышей и крыс после облучения ускоренными протонами и сопоставление этих данных с морфологическими изменениями в гиппокампе и мозжечке грызунов.

Материал и методы: Исследования проводили на аутбредных половозрелых самках мышей ICR (CD-1), SPF категории, массой 30–35 г, в возрасте 10 нед – 61 голов и на 39 самцах аутбредных крыс *Sprague Dawley*, массой 190–230 г, возраста 6,5–7,5 нед. Животные были подвергнуты облучению протонами с энергией 70 МэВ на медицинском пучке фазотрона Объединенного института ядерных исследований (Дубна). Мышей помещали в индивидуальные контейнеры и облучали по 4 особи одновременно. Облучение проводили в модифицированном пике Брэгга в дозах 0,5; 1; 2,5 и 5 Гр в каудокраниальном и краниокаудальном направлении. Крысы были разделены на 2 группы: интактный контроль и группа, облученная протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, мощность дозы 1 Гр/мин в краниокаудальном направлении. Поведенческие реакции экспериментальных животных протестированы на установке «Открытое поле» на 1, 7, 14, 30, 90 сут у крыс и на 8, 30 и 90 сут у мышей. Сделан количественный анализ разреженности клеток Пуркинье в мозжечке крыс, а также морфологических изменений нейронов гиппокампа крыс, показано развитие структурных изменений нейронов различной степени тяжести через 30 и 90 сут после облучения протонами.

Результаты: В период 1–8 сут после протонного облучения мышей и крыс в нелетальных дозах (0,5–5,0 Гр) происходит дозозависимое снижение основных показателей спонтанной двигательной активности грызунов.

К 90 сут после облучения отмечается повышенный уровень показателей ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) и эмоционального статуса (ЭС) во всех группах облученных животных по сравнению с биоконтролем.

Нарушение двигательной активности облученных протонами грызунов в ранний период и её относительная нормализация в отдаленный после облучения период происходят на фоне увеличенного числа морфологически измененных и дистрофических нейронов в гиппокампе и разреженности клеток Пуркинье в мозжечке.

Заключение: Сложное иерархическое строение ЦНС, зависимость её функции от состояния организма в целом и его гормонального фона, а также от состояния кровоснабжения и других факторов, наряду с её высокой пластичностью требуют комплексного физиологического, морфологического и нейробиологического подходов при анализе радиобиологического эффекта воздействия корпускулярного излучения, с учетом неравномерности дозового распределения.

Ключевые слова: протоны, нейроны, гиппокамп, мозжечок, мозг, поведение, открытое поле, ориентировочно-исследовательская реакция, эмоциональный статус, крысы, мыши

Поступила: 15.01.2019. Принята к публикации: 27.02.2019

Введение

Непосредственным побудительным моментом для экспериментов с протонным облучением органов центральной нервной системы явилось желание найти пути совершенствования лучевой терапии новообразований головного мозга. В ранних исследованиях в середине 1950-х гг. [1] было показано, что спустя 10 нед после протонного облучения с энергией 10 МэВ в дозе 50 Гр области головы крыс, у животных в головном мозге, в области пика ионизации (пика Брэгга) развиваются дистрофические изменения нейронов и некрозы в виде дорожки. Более быстрые и более грубые нарушения тканей головного и спинного мозга отмечены при дозах 200–400 Гр от протонов с энергией 180 МэВ в опытах на козах и кроликах. При тотальном протонном облучении с энергией 510 МэВ в дозах 2,5–7,0 Гр у собак в различных отделах головного мозга отмечены глубокие дистрофические изменения, более выраженные чем после рентгеновского и γ -облучения [2].

Детальное исследование морфологических нарушений в коре головного мозга после облучения прото-

нами различного энергетического спектра в широком диапазоне доз от 0,5 до 6 Гр на протяжении 6 месяцев позволили определить ОБЭ протонов с энергией 65 и 50 МэВ на уровне $0,8 \pm 0,1$ и $1,1 \pm 0,1$ соответственно [3].

Морфологические изменения в головном мозге, включая повреждение нейронов [3], объясняют выявленные другими авторами [4] функциональные нарушения у облученных протонами животных. Кроме того, отмечены значительные нарушения в содержании различных медиаторов в структурах головного мозга, а также определенные сдвиги в поведенческих реакциях [5].

С началом космических полетов возникла задача оценки опасности клеточных повреждений в результате воздействия тяжелых заряженных частиц основной компоненты галактических космических лучей (ГКЛ), воздействию которых подвергаются космонавты в полетах за пределами околоземной орбиты. Характер передачи энергии заряженных частиц веществу кардинально отличается от рентгеновских и гамма-излучений [6]. Наибольший вклад в ГКЛ вносят протоны с энергиями в диапазоне 100–700 МэВ, способные про-

никать через тонкие стенки космических аппаратов. На трассе полета к Марсу возрастает роль ГКЛ и мощных вспышек на Солнце – солнечных протонных событий (СПС) как радиационно-опасных факторов. СПС возникают спорадически, и не обязательно в годы, близкие к максимуму активности Солнца. Протоны мощных солнечных вспышек с высокой энергией являются реальной угрозой длительных дальних миссий. Энергия, выделенная в треках протонов и более тяжёлых частиц в конце их пробега в различных тканях организма, обуславливает их высокое радиационное воздействие. Это обстоятельство может определять развитие радиационных синдромов, принципиально отличных от наблюдаемых при действии редкоизирующих излучений. При таких длительных полетах важно учитывать радиобиологическое воздействие космической радиации на центральную нервную систему (ЦНС), в частности, на такие структуры как гиппокамп и мозжечок. Действие ИИ на ЦНС вызывает комплекс сложных биохимических и морфологических реакций. Изучение биологических эффектов воздействия ИИ на организм в различные периоды после облучения является важным направлением для решения задач космической биологии. Кроме того, рост популярности применения протонной терапии для лечения онкологических заболеваний в различных отделах мозга делает актуальным анализ и прогнозирование постлучевых поражений ЦНС.

Свидетельства о развитии радиационных повреждений при действии тяжелых заряженных частиц на структуры головного мозга, приводящих к нарушениям его интегративной целостности, дают основания рассматривать ЦНС как критическую систему при оценке риска радиационного воздействия на организм космонавтов при осуществлении межпланетных полётов [7]. Известно, что через 3 месяца после облучения изменения проявляются в выраженных нарушениях пространственной ориентации, угнетении когнитивных функций. Авторы связывают эти нарушения с гибелью нейронов (прежде всего, гиппокамп, как наиболее уязвимой в этом случае структуры ЦНС) [8]. Установлено, что гистологические изменения нейронов максимальны спустя 15 сут после облучения ионами углерода [6].

Внимание большинства исследователей было сосредоточено на исследовании поведенческих реакций и морфологических изменений в коре большого мозга животных после облучения протонами и тяжелыми заряженными частицами с $Z > 6$, тогда как изучению подобных биологических эффектов в других участках головного мозга, в частности гиппокампе и мозжечке было уделено гораздо меньше внимания, а именно эти структуры во многом ответственны за поведенческие реакции. Нейрофизиологическим исследованиям действия протонов в последнее время уделяется большее внимание (Штемберг), поскольку помимо того, что в составе космических лучей протоны составляют основную часть, этот вид корпускулярного излучения реально широко используется при лучевой терапии

заболеваний головного мозга. Однако подавляющее большинство физиологических исследований проводится в отрыве от морфологического анализа структур головного мозга.

Указанные обстоятельства определили цель нашей работы: исследование зависимостей доза–время–эффект поведения мышей и крыс после облучения ускоренными протонами и сопоставление этих данных с морфологическими изменениями в гиппокампе и мозжечке грызунов.

Материалы и методы

Животные

Мыши. Исследования проводили на 61 аутбредных половозрелых самках мышей ICR (CD-1), категории SPF, с исходной массой тела 30–35 г, в возрасте 10 нед.

Крысы. Также был проведен эксперимент на 39 самках аутбредных крыс *Sprague Dawley*, с исходной массой тела 190–230 г, возраста 6,5–7,5 нед.

Облучение

Животные были подвергнуты облучению ускоренными протонами на медицинском пучке фазотрона Объединенного института ядерных исследований (Дубна). Мышей помещали в индивидуальные радиационно-проницаемые контейнеры, затем группировали по 4 контейнера и размещали на пути протонного пучка. Сечение протонного пучка составляло 9×9 см, что позволяло одновременно облучать по 4 животных. Облучение животных проводили в натуральном пике Брэгга в дозах 0,5; 1; 2,5 и 5 Гр в каудокраниальном и краниокаудальном направлении. В виду отсутствия различий в зависимости от положения животных эти данные были объединены при статистической обработке результатов.

Использование дополнительного замедлителя толщиной 190 мм позволяло снизить энергию протонов со 170 до 70 МэВ.

Крысы были разделены на 2 группы: интактный контроль и группа, облученная протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, мощность дозы 1 Гр/мин в краниокаудальном направлении.

Оценка поведенческих реакций облученных животных

Оценка проводилась по уровню локомоторной активности в тестовой установке «Открытое поле» (ОП) [9, 10] с круговой серой ареной диаметром 63 см. В течение 3 или 6 мин учитывали акты пересечения секторов, проходы через центр, подъем, норковый рефлекс. Сумма этих актов составила показатель ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР), а акты груминг, замирание, движение на месте – показатель эмоционального статуса (ЭС). Также оценивали отношение показателей ОИР/ЭС. Влияние облучения протонами на поведенческие реакции у мышей проводили на 8, 30 и 90 сут после облучения, у крыс – на 1, 7, 14, 30 и 90 сут после облучения.

Крысы были выведены из эксперимента методом декапитации на 30 и 90 сут после облучения для морфологического исследования нервной ткани. Головной мозг животных был извлечен и помещен в фиксирующий раствор Карнуа. Обработка биологического материала и приготовление препаратов проходила в соответствии со стандартной гистологической техникой [11]. Гистологические срезы окрашивались крезилвиолетом по методу Ниссля.

Для оценки степени тяжести структурных нарушений в нейронах гиппокампа крыс использована количественная методика оценки морфологических изменений клеток [12]. В препарате от каждого животного анализировали все клетки гиппокампа полей СА1, СА2, СА3. В зависимости от степени структурных нарушений выделяли группы клеток: неизмененные и измененные нейроны (легкоизмененные и дистрофические) [13]. В мозжечке был посчитан показатель разреженности клеток Пуркинье, для этого в препаратах от каждого животного в 50 полях зрения посчитано полное количество клеток Пуркинье.

Для статистической обработки подсчета среднего арифметического и погрешности среднего ис-

пользовали программный комплекс Origin Pro 2015, достоверность рассчитывали с помощью критерия Манна – Уитни. Результаты принимали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Все эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» Совета международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1995 г.

Результаты и обсуждение

Поведенческие реакции

Данные, характеризующие влияние облучения на поведенческие показатели мышей приведены в табл. 1 и на рис. 1. Как видно в таблице, облучение ускоренными протонами оказало статистически значимое влияние на изученные показатели, однако этот эффект имел сложную зависимость и не укладывался в прямую зависимость доза–эффект.

Таблица 1

Показатели неврологического статуса мышей самок ICR (CD-1) после протонного облучения с энергией 70 МэВ (число актов за 3 мин $M \pm m$)

Группа	Количество животных	Доза облучения, Гр	Время после облучения и показатели								
			8 сут			30 сут			90 сут		
			ОИР	ЭС	ОИР/ЭС	ОИР	ЭС	ОИР/ЭС	ОИР	ЭС	ОИР/ЭС
Биоконтроль	8	0	147,0 $\pm$ 5,3 ¹	5,4 $\pm$ 1,1	34,1 $\pm$ 7	109,7 $\pm$ 6,0 ²	5,2 $\pm$ 1,1	26,0 $\pm$ 5,3	50,3 $\pm$ 4,4 ³	2,6 $\pm$ 0,5 ⁴	24,7 $\pm$ 5,5 ⁵
Облученные	16	0,5	102,3 $\pm$ 7,7	5,3 $\pm$ 0,6	21,9 $\pm$ 2,8	92,8 $\pm$ 3,8	4,4 $\pm$ 0,3	22,3 $\pm$ 1,9	72,5 $\pm$ 7,7	6,3 $\pm$ 0,6	13,0 $\pm$ 1,7
	16	1	108,3 $\pm$ 5,7	4,9 $\pm$ 0,3	23,2 $\pm$ 1,9	78,8 $\pm$ 5,9	3,8 $\pm$ 0,5	29,6 $\pm$ 6,8	62,9 $\pm$ 6,5	4,8 $\pm$ 0,3	16,4 $\pm$ 1,5
	16	2,5	115,6 $\pm$ 8,1	5,4 $\pm$ 0,3	22,4 $\pm$ 2,0	60,6 $\pm$ 6,5	3,8 $\pm$ 0,3	18,4 $\pm$ 2,8	64,1 $\pm$ 6,6	5,2 $\pm$ 0,7	17,0 $\pm$ 4,0
	16	5	120,5 $\pm$ 5,3	5,6 $\pm$ 1,1	23,8 $\pm$ 7,0	82,5 $\pm$ 3,7	3,1 $\pm$ 0,4	35,1 $\pm$ 5,7	77,6 $\pm$ 6,3	4,9 $\pm$ 0,5	21,6 $\pm$ 4,6

Примечание: ¹ – Статистически значимые различия с группой «0,5 Гр», «1 Гр»;

² – Статистически значимые различия с группой «1 Гр», «2,5 Гр», «5 Гр»;

³ – Статистически значимые различия с группой «5 Гр»;

⁴ – Статистически значимые различия с группой «0,5 Гр», «1 Гр», «2,5 Гр», «5 Гр»;

⁵ – Статистически значимые различия с группой «0,5 Гр»

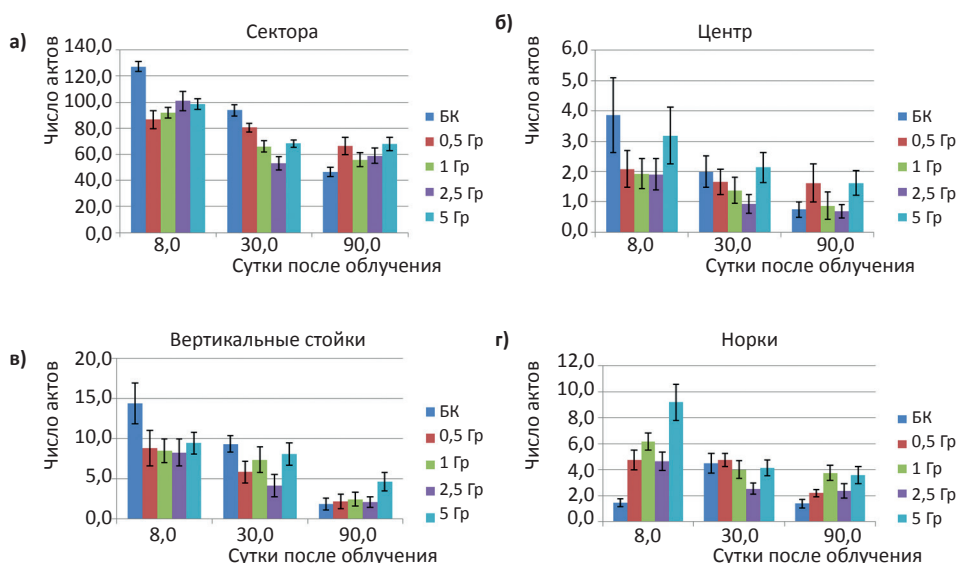


Рис. 1. Показатели (число актов за 3 мин, $M \pm m$) ОИР мышей самок ICR CD-1 после облучения протонами 70 МэВ в дозах 0,5–5 Гр: (а) – количество пройденных секторов, (б) – проходы в центр, (в) – вертикальные стойки, (г) – норки

Облучение протонами в дозах 0,5 и 1 Гр вызвало статистически значимое снижение показателей ОИР на 8 сут после облучения относительно контроля. Было отмечено статистически значимое снижение ОИР на 30 сут после облучения у животных, облученных в дозах 1; 2,5 и 5 Гр, относительно контрольной группы. На 90 сут после облучения снижение ОИР не было отмечено ни в одной группе облученных животных.

На 90 сут после облучения наблюдалось ярко выраженное статистически значимое увеличение показателя ЭС у облученных мышей в дозе 0,5 Гр ($6,3 \pm 0,6$) относительно контрольной группы ($2,6 \pm 0,5$). Далее, с увеличением дозы происходило небольшое уменьшение показателя у животных, облученных в дозе 1 Гр ($4,8 \pm 0,3$) и сохранение его на приблизительно таком же уровне при дозах 2,5 и 5 Гр ($5,2 \pm 0,7$ и $4,9 \pm 0,5$ соответственно). Статистически значимых различий между группами облученных животных в дозах 1; 2,5 и 5 Гр на 90 сут отмечено не было.

На 8 сут происходило статистически значимое уменьшение количества пройденных секторов у животных, облученных в дозе 0,5 Гр относительно контрольной группы (рис. 1а). При увеличении доз облучения до 1; 2,5 и 5 Гр этот показатель статистически значимо не изменяется относительно группы животных, облученных в дозе 0,5 Гр. Аналогичная картина наблюдалась на 8 сут после облучения и при анализе количества вертикальных стоек у группы облученных животных (рис. 1в). На рис. 1а на 30 сут п/о наблюдается обратная зависимость. Как видно на диаграмме, при увеличении доз с 0,5 до 2,5 Гр происходит статистически значимое снижение количества пройденных секторов. Однако при дозе 5 Гр уже не наблюдается такой обратной зависимости и происходит увеличение этого показателя.

При облучении крыс протонами (табл. 2) происходят значительные изменения активности у облученных крыс. Эмоциональный статус крыс, подвергшихся воздействию протонов, по сравнению с контрольной группой понижен в первые три минуты первых суток и увеличивается с 4 до 6 мин на 14 сут. ОИР у животных, облученных протонами, снижена на протяжении 6 мин наблюдения в первые сутки, была снижена в периоде аверсии (период с 1-й по 3-ю мин) на 7 сут, что было замечено в работе [5], увеличивается в первые три минуты наблюдения на 30 сут и была повышена в течение 6 мин на 90 сут.

Результаты действия протонов в дозе 1 Гр на поведенческие реакции крыс, прошедших тест ОП на 14, 30 и 90 сут, представленные в табл. 2, показывают, что как в среднесрочные (14 сут), так и в долгосрочные периоды (30–90 сут) после облучения протонами в дозе 1 Гр у животных наблюдаются повышение показателей ОИР и ЭС, в том числе в ряде случаев статистически значимые.

Таким образом, следует отметить ряд положений, характеризующих влияние условий эксперимента на поведенческие реакции экспериментальных животных.

В ходе эксперимента на мышах, начиная с 8–30 сут, происходит снижение таких показателей как «сектора», «выход в центр» и «вертикальные стойки» как у облученных, так и необлученных животных. Показатель «норки» снизился только у облученных животных, после выраженной стимуляции на 8 сут после облучения.

Показатели дозовой зависимости имеют сложный, в большинстве случаев непропорциональный характер. Так на 8 сут после облучения во всех группах облученных животных отмечено снижение показателя «сектора», «вертикальные стойки», «ОИР» и отношения «ОИР/ЭС», а напротив, показатель «норки» оказался статистически значимо увеличен. Наиболее вероятным представляется стрессорный механизм дозозависимого снижения поведенческой активности на 1–7–8 сут после протонного облучения, тем более, что возможна его фармакологическая отмена введением пептида «Семакс» – аналога АКГГ, лишенного гормональной активности. Следует также отметить выраженные сосудистые изменения в головном мозге в этот период [14].

К 90 сут после облучения большинство показателей приблизились к значениям у биоконтроля, и даже превысило контрольное значение. Учитывая важную роль гиппокампа в формировании ЭС, следует отметить прямую дозовую зависимость снижения этого показателя на 30 сут после облучения. В отдаленный после облучения период 30–90 сут на функциональную активность ЦНС, наиболее вероятно, оказывают влияние дистрофические процессы, о чем свидетельствуют литературные [6] и наши данные.

Интегральный показатель в виде отношения ОИР/ЭС на 90 сут после облучения продемонстрировал отчетливую обратную дозовую зависимость, что указы-

Таблица 2

Показатели неврологического статуса крыс самцов *Sprague Dawley* после протонного облучения с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр (число актов за 1–3 и 4–6 мин, $M \pm m$)

Группы	Количество животных	Время тестирования, мин	Время после облучения и показатели									
			1 сут		7 сут		14 сут		30 сут		90 сут	
			ОИР	ЭС	ОИР	ЭС	ОИР	ЭС	ОИР	ЭС	ОИР	ЭС
Облученные, 1 Гр	10	1–3	$102,7 \pm 8,3^*$	$5,3 \pm 0,6^*$	$85,9 \pm 3,3^*$	$2,9 \pm 0,5$	$46,2 \pm 6,3$	$5,0 \pm 0,6$	$49,8 \pm 7,6^*$	$2,8 \pm 0,7$	$57,7 \pm 6,1^*$	$2,7 \pm 0,7$
Контроль	10		$121,4 \pm 6,9$	$8,3 \pm 0,9$	$99,3 \pm 4,5$	$3,3 \pm 0,5$	$40,9 \pm 7,3$	$3,7 \pm 0,6$	$31,5 \pm 6,3$	$2,9 \pm 0,5$	$35,3 \pm 7,5$	$2,0 \pm 0,3$
Облученные, 1 Гр	10	4–6	$45,9 \pm 9,8^*$	$9,9 \pm 0,8$	$42,2 \pm 5,5$	$4,9 \pm 0,3$	$25,5 \pm 6,2$	$7,5 \pm 0,5^*$	$17,3 \pm 5,3$	$2,7 \pm 0,4$	$41,3 \pm 5,3^*$	$3,4 \pm 0,5$
Контроль	10		$71,5 \pm 5,7$	$11,7 \pm 1,1$	$44,7 \pm 6,8$	$4,4 \pm 0,4$	$14,8 \pm 5,8$	$5,0 \pm 0,8$	$17,0 \pm 3,2$	$2,9 \pm 0,3$	$18,8 \pm 2,7$	$3,1 \pm 0,4$

Примечание: * Статистически значимые различия с группой контроля

вает на сложные взаимоотношения процессов возбуждения и торможения в ЦНС облученных животных.

Группа животных, облученных в наибольшей дозе 5,0 Гр, во все сроки наблюдения продемонстрировала наибольшую активность по группе показателей, относящихся к ОИР, и наименьшую по показателю ЭС.

Морфологические изменения в головном мозге крыс

Результаты проведенных исследований показали, что в клетках гиппокампа наблюдаются структурные изменения различной степени тяжести. Встречаются нейроны с нарушениями разных типов. Наиболее часто выявляются нервные клетки с изменениями по гипо- и гиперхромному типу. Гипохромные клетки отличаются светлой окраской цитоплазмы и из-за уменьшения количества хроматофильного вещества, РНК и белка. В цитоплазме части нейронов наблюдалось укрупнение глыбок базофильного вещества, рассеянного диффузно по цитоплазме. Ядра в гипохромных нейронах светлые, обычно увеличены в объеме и нередко располагаются эксцентрично. Гиперхромные клетки, наоборот отличаются повышенным содержанием хроматофильного вещества, РНК, белка, что обуславливает их интенсивную окраску. В части клеток наблюдаются очаги хроматолиза. Ядра обычно уменьшены в объеме и четко контурируются. Выраженные изменения по гипо- или гиперхромному типу были отнесены к пограничным изменениям. Пограничные изменения обратимы, на их основе в дальнейшем могут возникать как дистрофические, так и адаптационные изменения. Негативное воздействие протонов на состояние нейронов головного мозга мышей в нелетальных дозах на 8 сут после облучения уже было показано в работе [14]. Показано, что при дозе 2,5 Гр показатель дистрофически измененных нейронов существенно выше, чем у необлученных животных. Также авторы отметили эффект облучения в виде нарушений микроциркуляторного русла в коре большого головного мозга облученных животных.

Результаты количественного анализа нейроморфологических изменений при облучении в дозе 1 Гр на клетки гиппокампа (поля СА1, СА2, СА3) представлены на рис. 2. К измененным нейронам относятся нейроны с морфофункциональными, компенсаторно-приспособительными и дистрофическими нарушениями. Количество измененных нейронов у облученных животных статистически значимо превышало число поврежденных клеток у контрольной группы как на 30, так и на 90 сут. Количество нормальных клеток в контроле больше, чем у облученных крыс. Считается, что в гиппокампе нейрогенез осуществляется непрерывно на протяжении всей жизни. И этот процесс уязвим к воздействию ИИ. Радиационные когнитивные нарушения могут быть обусловлены поражением нейрогенной клеточной популяции, которая расположена в зубчатой субгранулярной зоне (ЗСЗ) гиппокампа. Дисфункция памяти согласуется с изменениями нейрогенеза после острого облучения. Возможно,

облучение в дозах, которое вызывает острую лучевую болезнь у мышей, достаточно для нарушения деятельности гиппокампа, а именно обучения и процесса запоминания, вероятно, вследствие подавления нейрогенеза. Когнитивные расстройства ассоциированы с уменьшением пролиферации клеток в ЗСЗ зубчатой извилины. С данным обстоятельством может быть связано отсутствие привыкания крыс к нахождению в ОП: у контрольных крыс ОИР снижен на 90 сут, а у облученных этот показатель статистически значимо выше (табл. 2).

Таким образом, радиационный ответ клеток-предшественников из ЗСЗ гиппокампальной зубчатой извилины и нарушенный нейрогенез могут играть значимую, если не причинную, роль в радиационно-индуцированных когнитивных нарушениях [15].

При анализе литературных источников по исследованию воздействия радиации на структуры головного мозга было установлено, что разные области гиппокампа отличаются своим ответом на воздействие ИИ. Так, поле СА1 наиболее чувствительно к облучению, как и к другим повреждающим факторам в первые сутки [16], и в этот период мы отметили отчетливое нарушение ОИР – на 14–90 сут было установлено повышение ОИР у крыс.

Полученные нами результаты согласуются с данными из литературных источников. У облученных крыс число дистрофических и морфологически измененных нейронов (гипо- и умеренно-гиперхромных) больше, чем у интактных животных, что совпадает с полученными результатами Б.С. Федоренко [6].

В разные сроки после облучения у животных наблюдались отличия в поведении по сравнению с контрольной группой. Облученные животные находились в более эмоционально напряженном состоянии. В ранние сроки (1, 7 сут у крыс и 8 сут у мышей) облученные животные были менее активны, и у них наблюдалось угнетение ОИР. На 30 и 90 сут облученные крысы проявляли большую исследовательскую активность и были более подвижны по отношению к контрольной группе. Схожая картина наблюдалась и у мышей на 90 сут после облучения на фоне выраженных изменений в гиппокампе.

В мозжечке были исследованы клетки Пуркинье. Был определен показатель разреженности этих нейро-

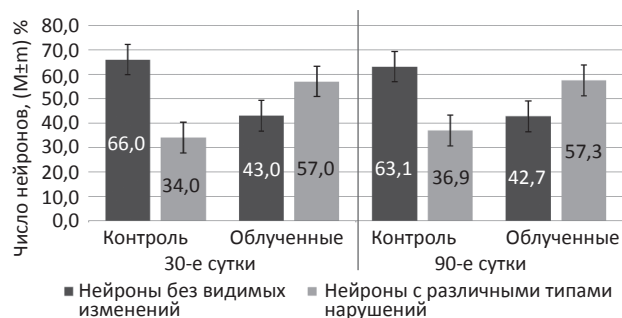


Рис. 2. Результаты количественного анализа морфологических изменений нейронов крыс SD (30 и 90 сут) после протонного облучения с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр

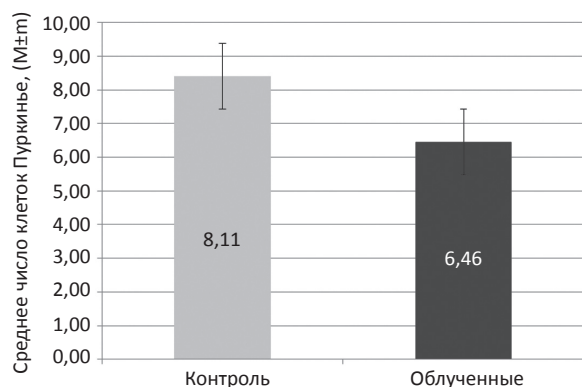


Рис. 3. Среднее число клеток Пуркинье в мозжечке крыс в поле зрения при ув. 40×10 на 30-е сут после облучения протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр

нов на 50 полей зрения в каждом препарате. По результатам морфологического анализа выявлено статистически значимое снижение плотности клеток Пуркинье у облученных протонами животных на 30 сут (рис. 3).

Следует отметить, что в это время (90 сут) показатель ОИР у облученных крыс превышал контрольное значение, а ЭС не отличался от контрольного значения.

В результате исследования показано действие заряженных частиц на ЦНС: видны как изменения на поведенческом уровне, так и нарушения на клеточном уровне, в том числе стабильное превалирование числа измененных нейронов у облученных животных в разные сроки.

Морфологическое исследование полей СА1, СА2, СА3 полей гиппокампа показало статистические различия соотношения нормохромных нейронов к числу нейронов с нарушениями разных типов на 30 сут. При подсчете показателя разреженности клеток Пуркинье мозжечка статистически значимым было снижение показателя у облученных животных на 30 сут.

Представленные результаты нейроморфологических исследований разных структур центральной нервной системы подтверждают гипотезу об опасности космического излучения для мозга. Изменения в поведенческих реакциях облученных животных со-

провождаются нарушениями в строении нейронов. Это наблюдение позволяет предположить возможную корреляцию между структурными и поведенческими нарушениями у животных, подвергшихся облучению.

Полученные в данной работе результаты позволяют приблизиться к пониманию механизма влияния протонного излучения на ЦНС в разные сроки после облучения, что является одной из основных задач в связи с планированием пилотируемых полетов за пределами околоземной орбиты, а также при прогнозировании побочных эффектов протонной терапии опухолей головного мозга.

Выводы

1. В период 1–8 сут после протонного облучения мышей и крыс в нелетальных дозах (0,5–5,0 Гр) происходит дозозависимое снижение основных показателей спонтанной двигательной активности грызунов.

2. К 90 сут после облучения отмечается отчетливая тенденция относительно увеличения показателей ОИР и ЭС во всех группах облученных животных.

3. Нарушение двигательной активности облученных протонами грызунов в ранний период и её относительная нормализация в отдаленный после облучения период происходят на фоне увеличенного числа морфологически измененных и дистрофических нейронов в гиппокампе и разреженности клеток Пуркинье в мозжечке.

Работа выполнена при финансовой поддержке ОИЯИ в соответствии с темой 04-9-1077-2015/2020 Исследования биологического действия тяжелых заряженных частиц различных энергий и программы фундаментальных исследований ИМБП РАН, а также при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-01028.

Для цитирования: Ляхова К.Н., Колесникова И.А., Утина Д.М., Северюхин Ю.С., Буденная Н.Н., Абросимова А.Н., Молоканов А.Г., Лалковичова М., Иванов А.А. Морфофункциональные показатели воздействия протонов на центральную нервную систему // Мед. радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64. № 2. С. 75–81.

DOI: 10.12737/article_5ca60c7bba45e9.77708543

Morphofunctional Indicators of the Effects of Protons on the Central Nervous System

**K.N. Lyakhova¹, I.A. Kolesnikova^{1,5}, D.M. Utina^{1,5}, Yu.S. Severyukhin^{1,5}, N.N. Budennaya^{1,5},
A.N. Abrosimova^{2,3}, A.G. Molokanov¹, M. Lalkovičova^{1,4}, A.A. Ivanov^{1,2,3}**

1. Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia. E-mail: lyakhovakn@mail.ru;
2. Institute for Biomedical Problems, Moscow, Russia;
3. A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia;
4. Institute of Experimental Physics, Košice, Slovakia;
5. University "Nature, Society, Man", Dubna, Russia

K.N. Lyakhova – Junior Researcher; I.A. Kolesnikova – Junior Researcher; D.M. Utina – Junior Researcher; Yu.S. Severyukhin – Researcher; N.N. Budennaya – Junior Researcher; A.N. Abrosimova – Senior Researcher, PhD Biol.; A.G. Molokanov – Senior Researcher, PhD Tech.; M. Lalkovičova – Researcher, PhD Biol.; A.A. Ivanov – Head of Lab., Dr. Sci. Med., Prof.

Abstract

Purpose: Investigation of the dose–time–effect dependency of the behavior of mice and rats after irradiation with accelerated protons and comparison of these data with the morphological changes in the hippocampus and the cerebellum of rodents.

Material and methods: Experiments were performed on outbred adult female ICR mice (CD-1), SPF categories, body weight 30–35 g, of the age of 10 weeks – total number 61 animals, and on 39 male Sprague Dawley outbred rats weighing 190–230 g, aged 6.5–7.5 weeks. The animals were irradiated with accelerated protons with energy of 70 MeV on the medical beam of the phasotron of the Joint Institute for Nuclear Research (Dubna). Mice were placed in individual containers and irradiated 4 ones at a time. Irradiation was performed in a modified Bragg peak at doses of 0.5; 1; 2.5 and 5 Gy in caudocranial and craniocaudal direction. Rats were divided into 2 groups: intact control and group irradiated with 170 MeV protons at a dose of 1 Gy, dose rate of 1 Gy / min in the craniocaudal direction. The behavioral responses of experimental animals were tested in the Open Field test on days 1, 7, 14, 30, 90 in rats and on days 8, 30, and 90 in mice. Quantitative analysis of the dilution of Purkinje cells in the rat cerebellum was made, as well as morphological changes in the rat hippocampal neurons. It was shown a development of structural changes after irradiation with protons in neurons of different severity at different times after exposure: after 30 and 90 days.

Results: In the period of 1–8 days after proton irradiation of mice and rats in non-lethal doses (0.5–5.0 Gy), there is a dose-independent decrease in the main indicators of the spontaneous locomotor activity of rodents.

By the 90th day after irradiation, there is a clear tendency to normalize the indicators of OIR in all groups of irradiated animals, while the ES remains elevated.

Disruption of motor activity of rodents irradiated with protons in the early period and its relative normalization in the late post-irradiation period occur on the background of an increased number of morphologically altered and dystrophic neurons in the hippocampus and rarefied of Purkinje cells in the cerebellum.

Conclusion: The complex hierarchical structure of the central nervous system, the dependence of its function on the state of the whole organism and its hormonal background, as well as on the state of the blood supply and other factors, along with its high plasticity, require complex physiological, morphological and neurochemical approaches in analyzing the radiobiological effect of corpuscular radiation, taking into consideration the unevenness in dose distribution during irradiation.

Key words: protons, neurons, hippocampus, cerebellum, brain, behavior, open field, orienting-exploratory reaction, emotional status, rats, mice

Article received: 15.01.2019. Accepted for publication: 27.02.2019

REFERENCES

- Larsson B, Leksell L, Rexed B, et al. Effect of high energy protons on the spinal cord. *Acta Radiol.* 1959;51:52-64.
- Bibikova AF, Lebedev BI. Morphological changes in the nervous system under the action of high-energy protons. *Radiobiology.* 1965;5(4):562-5. (Russian).
- Fedorenko BS, Karpovsky AL, Ryzhov NI, Krasavin EA. Study of radiation damage in rat brain tissue. *Biological studies at the Salyut orbital stations.* Moscow: Science; 1984; 152-8. (Russian).
- Winkler JR. Primary cosmic rays. *Radiation Hazard during Space Flights.* Moscow: Mir. 1964;25-52. (Russian).
- Shtamberg AS, et al. Effect of high-energy proton irradiation on the behavior of rats: neurochemical mechanisms. *Aerospace and Environmental Medicine.* 2013;47(6):54-60. (Russian).
- Fedorenko BS. Radiobiological effects of corpuscular rays. Moscow: Science. 2006; 25-8. (Russian).
- Grigoriev AI, Krasavin EA, Ostrovsky MA. On the risk assessment of the biological action of galactic heavy ions under interplanetary flight conditions. *Russian J. Physiology.* 2013;99(3):273-80. (Russian).
- Krasavin EA. VII Congress on Radiation Research (radiobiology, radioecology, radiation safety): Abstracts of reports. Moscow: RUDN University, 2014;21–24:456. (Russian).
- Buresh J, Buresova O, Houston JP. Methods and basic experiments on the study of the brain and behavior. Moscow: Science. 1992;159-245. (Russian).
- Hall CS. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comparative Psychology.* 1936;22(3):345.
- Merkulov GA. The course of pathologic histological techniques. *Medgiz.* 1961;162-65. (Russian).
- Tashke K. Introduction to Quantitative Cytohistological Morphology. Publishing House of the Academy of the Socialist Republic of Romania. 1980;191. (Russian).
- Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicologic Pathology.* 2011;39(1):22-35.
- Lyakhova KN, et al. Preclinical study of the neuropeptide “Semax” in radiation pathology. Problems of chemical protection and repair during radiation exposure. Abstract of reports. Dubna, JINR, 2018 May 30-31;99-101. (Russian).
- Mizumatsu S, Monje ML, Morhardt DR, Rola R, Palmer TD, Fike JR. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):4021-7.
- Matson MP, Kater SB. Development and selective neurodegeneration in cell cultures from different hippocampal regions. *Brain Res.* 1989. Jun 19;490(1):110-25.

For citation: Lyakhova KN, Kolesnikova IA, Utina DM, Severyukhin YuS, Budennaya NN, Abrosimova AN, Molokanov AG, Lalkovičova M, Ivanov AA. Morphofunctional Indicators of the Effects of Protons on the Central Nervous System. *Medical Radiology and Radiation Safety.* 2019;64(2):75-81. (Russian).

DOI: 10.12737/article_5ca60c7bba45e9.77708543