

УДК 57.045

КОМБИНИРОВАННОЕ ОБЛУЧЕНИЕ ГАММА-КВАНТАМИ И ЯДРАМИ УГЛЕРОДА-12 МОДУЛИРУЕТ ПРОДУКЦИЮ ХЕМОКИНОВ И ЦИТОКИНОВ МОЗГА И УЛУЧШАЕТ ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ОБУЧЕНИЕ У TAU P301S, НО НЕ 5xFAD ЛИНИЙ МЫШЕЙ

© 2023 г. В. С. Кохан^{1,*}, М. С. Нестеров², А. И. Левашова²

Представлено академиком К.В. Анохиным

Поступило 22.02.2023 г.

После доработки 21.03.2023 г.

Принято к публикации 21.03.2023 г.

Ранее нами было показано прокогнитивное действие низких доз комбинированного облучения (включая тяжелые заряженные частицы) на крысах Wistar. В настоящей работе было изучено влияющие облучения (гамма-лучи, 0.24 Гр; углерод-12, 0.18 Гр, 400 МэВ/нуклон) на течение нейродегенеративного процесса с использованием трансгенных мышей линий Tau P301S и 5xFAD – экспериментальных моделей болезни Альцгеймера. Облучение привело к росту содержания про- и противовоспалительных цитокинов и хемокинов (IL-2, IL-6, IL-10, KC) у мышей Tau P301S, но не 5xFAD. Вместе с тем только у линии Tau P301S было обнаружено радиационно-вызванное улучшение динамики пространственного научения.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, углерод-12, нейровоспаление, болезнь Альцгеймера, пространственное научение, интерлейкины, хемокины

DOI: 10.31857/S2686738923600139, **EDN:** IZUOEP

В настоящее время адронная терапия (радиотерапия тяжелыми заряженными частицами) нашла широкое применение в лечении онкологических заболеваний, невралгии тройничного нерва, эпилепсии, макулярной дистрофии, гипертонии, etc. [1]. Ряд исследований с использованием *naïve* лабораторных грызунов выявил ноотропное и прокогнитивное действие низких доз облучения нейтронами и тяжелыми заряженными частицами в различных модельных экспериментах, включая комбинированное облучение гамма-квантами и ядрами ¹²C [2–4]. Вместе с тем влияние ионизирующего излучения (включая адроны) на нейродегенеративный процесс остается не раскрытым. Ранее была высказана гипотеза о том, что воздействие ионизирующего излучения может оказывать терапевтическое действие при нейродегенеративном процессе за счет ребалансировки нейровоспаления [5]. Целью настоящей

работы было изучить влияние низких доз комбинированно ионизирующего излучения (гамма-лучи и ядра углерода-12), для которого ранее был показан прокогнитивный эффект, на когнитивные способности и содержание ряда цитокинов и хемокинов в головном мозге двух линий трансгенных мышей – моделей болезни Альцгеймера (БА): Tau P301S (патологическая агрегация белка tau) и 5xFAD (патологическая агрегация β-амилоида – Aβ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были сформированы следующие группы самцов мышей: линии Tau P301S (массой 22–24 г), контрольные (Tau, n = 11) и облученные (Tau+R, n = 8); линии 5xFAD (массой 23–24 г), контрольные (5xFAD, n = 9) и облученные (5xFAD+R, n = 9). Животные содержались в стандартных условиях вивария.

В возрасте 4 мес мыши групп Tau+R и 5xFAD+R были подвергнуты гамма-облучению на установке ГОБО-60 (ГНЦ РФ – ИМБП РАН, Москва) на все тело в поглощенной дозе 0.24 Гр (661.7 кэВ). Через 3 сут голова мышей была подвергнута облучению ядрами углерода-12 на ускорителе У-70 (НИЦ “Курчатовский институт” – ИФВЭ, г. Протвино) в поглощенной дозе 0.18 Гр

¹Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского, Москва, Россия

²Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России, п. Светлые горы, Московская область, Россия

*e-mail: viktor_kohan@hotmail.com

(400 МэВ/нуклон). Контрольные группы оставались интактными. В возрасте 5 мес проводили оценку пространственного научения в водном лабиринте Морриса в течение 5 дней. На 5 день проводили тест без платформы, а через 7 дней тест предъявляли повторно: 2 подхода к тесту. Тест был выполнен по стандартной методике [2] со следующими модификациями: диаметр бассейна составлял 80 см, диаметр платформы – 6 см.

В возрасте 9 мес, терминальной стадии развития нейрорпатологии у мышей линии Tau P301S и стадии яркого проявления симптоматики у мышей линии 5xFAD [6, 7], экспериментальные группы были умерщвлены путем декапитации. Диссекция гиппокампа (HPC) и префронтальной коры (PFC) проводилась на льду, после чего биоматериал немедленно замораживался в жидком азоте до момента анализа. Ткани гомогенизировали в буфере для выделения (20 мМ Трис × HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1 мМ фенилметилсульфонил фторид, 0.05% Твин-20 и 1% коктейль ингибиторов протеаз ab271308 (Abcam, США)), центрифугировали 20 мин при 10000 g. Полученный супернатант использовали для количественного определения белка. Иммунофлуоресцентный анализ с использованием магнитных микросфер (xMAP) для оценки содержания избранных цитокинов и хемокинов, для которых была описана в литературе экспрессия в тканях мозга, был выполнен с помощью набора Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23-plex Assay (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя на приборе Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader с использованием системы промывки Bio-PlexPro Wash Station (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Statistica v.12 (StatSoft Inc., США). Гауссово распределение выборок подтверждали W-критерием Шапиро–Уилка ($p > 0.05$). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Результаты теста водный лабиринт Морриса были проанализированы с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с повторными измерениями. Апостериорный тест Дункана был рассчитан по мере необходимости. Результаты оценки содержания целевых белков анализировались с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для групп 5xFAD и 5xFAD+R была отмечена значимая динамика научения ($F_{4,68} = 26, p = 1.1 \times 10^{-12}$) в водном лабиринте Морриса. При этом статистически значимых отличий между группами обнаружено не было (графические данные не представлены). Напротив, для групп Tau и Tau+R

было отмечено значимое влияние радиационного фактора на динамику научения ($F_{4,68} = 4.9, p = 0.001$). Так, на 3 и 4 день тестирования Tau+R-мыши демонстрировали меньшее время поиска платформы, соответственно, на 40% ($p = 0.0005$) и 52% ($p = 0.02$) по сравнению с Tau-мышами (рис. 1а). В ходе теста без платформы Tau+R-мыши проводили больше на 48% ($t = 4.3; p = 0.0005$) времени в квадранте с платформой по сравнению с Tau-мышами (рис. 1в). При повторном предъявлении теста (через 7 дней) был выявлен значимый эффект влияния облучения на динамику воспроизведения ($F_{1,17} = 5.1, p = 0.03$). Tau+R-мыши затрачивали меньшее время на поиск платформы на 2 подходе к тесту – на 48% ($p = 0.04$) по сравнению с Tau-мышами. Вместе с тем, на 2 подходе к тесту, Tau+R-мыши показали сокращение времени поиска платформы по сравнению с 1 подходом – на 52% ($p = 0.01$); для Tau-мышей такого сокращения отмечено не было (рис. 1в).

Облучение оказывало ограниченное влияние на содержание цитокинов и хемокинов у мышей линии 5xFAD. Увеличение MIP-1 α на 50% ($t = 3.2, p = 0.01$) в PFC и снижение IL-1 β на 25% ($t = 2.8, p = 0.02$) в HPC было обнаружено в группе 5xFAD+R по сравнению с группой мышей 5xFAD (рис. 2а и б). Влияние облучения на содержание цитокинов и хемокинов у Tau-мышей носило более широкий характер. В PFC мышей Tau+R было обнаружено значимое увеличение содержания следующих цитокинов и хемокинов: IL-2 – на 229% ($t = 3.8, p = 0.006$), IL-10 – на 155% ($t = 3.6; p = 0.007$), KC – на 117% ($t = 5.1, p = 0.0009$) по сравнению с Tau-мышами (рис. 2а). В то же время, в HPC мышей группы Tau+R было обнаружено увеличение содержания IL-6 на 62% ($t = 4.1, p = 0.003$) по сравнению с Tau-мышами (рис. 2б).

Комбинированное облучение не повлияло на пространственное научение мышей линии 5xFAD. Принимая во внимание тот факт, что одним из первичных проводников эффектов ионизирующего облучения выступают свободнорадикальные реакции [8], мы полагаем, что антиоксидантные свойства A β , показанными ранее [9], могут быть ответственны за крайне ограниченное влияние облучения на содержание провоспалительных цитокинов/хемокинов у 5xFAD мышей. При этом, полагаясь на литературные данные, следует отметить вероятные позитивные (нотропные) эффекты снижения IL-1 β [10] и роста MIP-1 α [11]. Мы полагаем, что водный лабиринт Морриса оказался малочувствительным в выявлении функциональных изменений, вызванных этими молекулярными изменениями.

Облучение мышей линии Tau P301S привело к отложенному (спустя 1 мес после облучения) улучшению показателей пространственного научения и долговременной пространственной па-

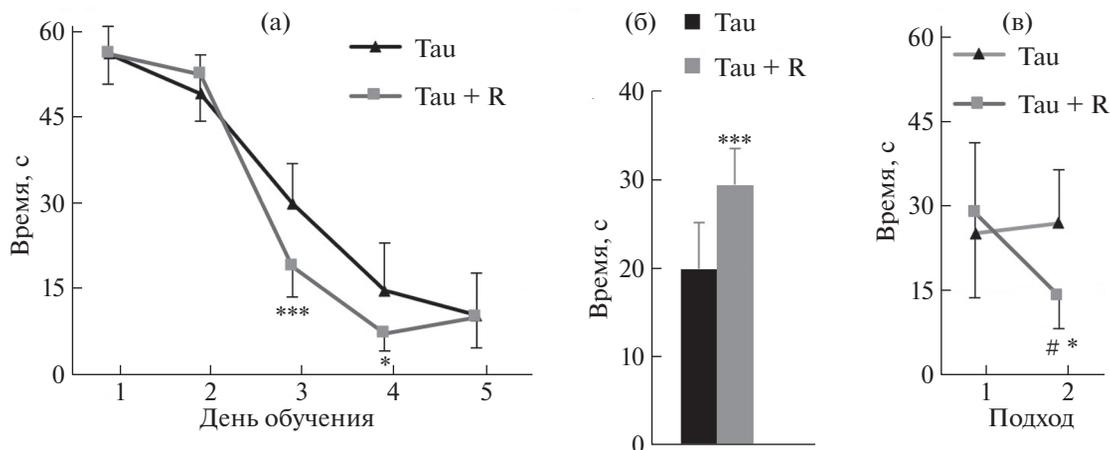


Рис. 1. Водный лабиринт Морриса. а – динамика научения (* – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$, апостериорный тест Дункана), б – тест без платформы (*** – $p < 0.001$, t -тест Стьюдента), в – повторное предъявление теста через 7 дней (звездочкой обозначены межгрупповые различия: * – $p < 0.05$; решеткой обозначены различия внутри группы по сравнению с подходом 1: # – $p < 0.05$, апостериорный тест Дункана).

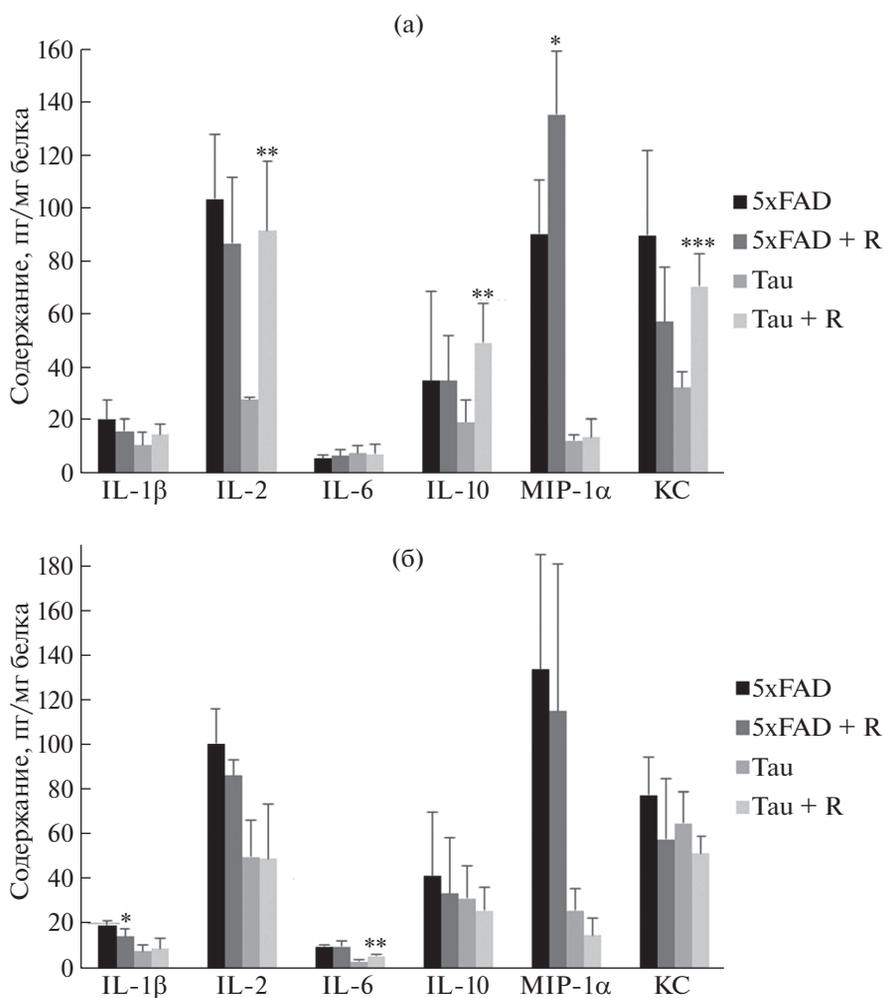


Рис. 2. Содержание избранных хемокинов и цитокинов в тканях головного мозга. а – префронтальная кора; б – гиппокамп. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 – интерлейкины; MIP-1 α – воспалительный белок макрофагов 1 α ; KC – хемоаттрактант кератиноцитов. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, t -тест Стьюдента.

мости, что согласуется с эффектом комбинированного облучения у *naïve* крыс, описанным нами ранее [2, 12]. Вместе с тем комбинированное ионизирующее излучение оказало провоспалительное действие в тканях мозга. В отличие от ранних представлений, ряд последних работ показывает положительный (ноотропный) эффект провоспалительной терапии на течение нейродегенерации. Так, с использованием трансгенной мышинной модели БА было показано, что увеличение содержания IL-2 ассоциировано со снижением A β агрегатов [13], а терапия с использованием IL-2 приводит к восстановлению пространственной памяти [14]. Несмотря на то что положительный эффект увеличения содержания IL-6 не находит литературного подтверждения [15], наблюдаемый нами рост содержания IL-10 может компенсировать его негативные эффекты, включая IL-6-вызванное гиперфосфорилирование белка тау [16].

Известно, что любое отклонение от физиологического уровня КС приводит к прогрессии нейродегенерации [17]. Мы считаем, что одновременный рост содержания про- и противовоспалительных цитокинов/хемокинов приводит к переключению нейровоспаления из патологического в физиологическое состояние, что, полагаясь на литературные данные, должно сопровождаться эффективной очисткой ткани от клеточного дебриса и белковых агрегатов [18], а также улучшением нейротрофической среды [19].

Таким образом, результаты исследования подтверждают первоначальную гипотезу о ноотропном действии комбинированного ионизирующего излучения посредством ребалансирующего влияния на неспецифическую иммунную систему на фоне нейродегенеративного процесса. Это открывает возможность рассматривать вопрос об андронной терапии как о потенциальном терапевтическом подходе для улучшения когнитивных функций при нейродегенеративных заболеваниях, особенно в тех случаях, когда ожидаемое терапевтическое воздействие заведомо превышает риски возможных побочных эффектов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-75-10036.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работы были одобрены биоэтической комиссией ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» (протокол № 4 от 16.11.2022). Работы с животными соответствовали требованиям директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22.09.2010.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bert C., Engenhardt-Cabillio R., Durante M. Particle therapy for noncancer diseases // *Medical physics*. 2012. V. 39. № 4. P. 1716–1727.
2. Kokhan V.S., Anokhin P.K., Belov O.V., et al. Cortical Glutamate/GABA Imbalance after Combined Radiation Exposure: Relevance to Human Deep-Space Missions // *Neuroscience*. 2019. V. 416. P. 295–308.
3. Perez R.E., Younger S., Bertheau E., et al. Effects of chronic exposure to a mixed field of neutrons and photons on behavioral and cognitive performance in mice // *Behavioural brain research*. 2020. V. 379. P. 112377.
4. Whoolery C.W., Yun S., Reynolds R.P., et al. Multi-domain cognitive assessment of male mice shows space radiation is not harmful to high-level cognition and actually improves pattern separation // *Scientific reports*. 2020. V. 10. № 1. P. 2737.
5. Boyd A., Byrne S., Middleton R.J., et al. Control of Neuroinflammation through Radiation-Induced Microglial Changes // *Cells*. 2021. V. 10. № 9. P. 2381.
6. Yoshiyama Y., Higuchi M., Zhang B., et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model // *Neuron*. 2007. V. 53. № 3. P. 337–351.
7. Jawhar S., Trawicka A., Jenneckens C., et al. Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease // *Neurobiology of aging*. 2012. V. 33. № 1. P. 196 e129–140.
8. Spitz D.R., Hauer-Jensen M. Ionizing radiation-induced responses: where free radical chemistry meets redox biology and medicine // *Antioxidants & redox signaling*. 2014. V. 20. № 9. P. 1407–1409.
9. Kontush A. Amyloid-beta: an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease // *Free radical biology & medicine*. 2001. V. 31. № 9. P. 1120–1131.
10. Shafiq S.S., Kyrkanides S., Olschowka J.A., et al. Sustained hippocampal IL-1 β overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology // *The Journal of clinical investigation*. 2007. V. 117. № 6. P. 1595–1604.
11. Meraz-Rios M.A., Toral-Rios D., Franco-Bocanegra D., et al. Inflammatory process in Alzheimer's Disease // *Front Integr Neurosci*. 2013. V. 7. P. 59.
12. Kokhan V.S., Mariasina S., Pikalov V.A., et al. Neurokinin-1 Receptor Antagonist Reverses Functional CNS Alteration Caused by Combined gamma-rays and Carbon Nuclei Irradiation // *CNS & neurological disorders drug targets*. 2022. V. 21. № 3. P. 278–289.
13. Chen W., Abud E.A., Yeung S.T., et al. Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid // *Acta neuropathologica communications*. 2016. V. 4. № 1. P. 63.

14. *Alves S., Churlaud G., Audrain M., et al.* Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice // *Brain: a journal of neurology*. 2017. V. 140. № 3. P. 826–842.
15. *Lyra E.S.N.M., Goncalves R.A., Pascoal T.A., et al.* Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease // *Transl Psychiatry*. 2021. V. 11. № 1. P. 251.
16. *Weston L.L., Jiang S., Chisholm D., et al.* Interleukin-10 deficiency exacerbates inflammation-induced tau pathology // *Journal of neuroinflammation*. 2021. V. 18. № 1. P. 161.
17. *Kang M.H., Jin Y.H., Kim B.S.* Effects of Keratinocyte-Derived Cytokine (CXCL-1) on the Development of Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease // *Front Cell Infect Microbiol*. 2018. V. 8. P. 9.
18. *Jin X., Yamashita T.* Microglia in central nervous system repair after injury // *Journal of biochemistry*. 2016. V. 159. № 5. P. 491–496.
19. *Parkhurst C.N., Yang G., Ninan I., et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor // *Cell*. 2013. V. 155. № 7. P. 1596–1609.

COMBINED GAMMA-RAYS AND CARBON-12 NUCLEI IRRADIATION MODULATES BRAIN CHEMOKINE AND CYTOKINE PRODUCTION AND IMPROVES SPATIAL LEARNING IN TAU P301S, BUT NOT 5xFAD MOUSE LINE

V. S. Kokhan^{a,#}, M. S. Nesterov^b, and A. I. Levashova^b

^a*V.P. Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian Federation*

^b*Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, settlement Svetlye Gory, Moscow Region, Russian Federation*

[#]*e-mail: viktor_kohan@hotmail.com*

Presented by Academician of the RAS K.V. Anokhin

Earlier we showed the pro-cognitive effect of low doses of combined irradiation (including heavy charged particles) on Wistar rats. In the present work we studied the effect of irradiation (gamma-rays, 0.24 Gy; carbon-12, 0.18 Gy, 400 MeV/nucleon) on the course of neurodegenerative process using Tau P301S and 5xFAD transgenic mice lines, experimental models of Alzheimer's disease. Irradiation led to an increase in pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines (IL-2, IL-6, IL-10, KC) in Tau P301S mice, but not in 5xFAD. At the same time, only the Tau P301S line was found to exhibit radiation-induced improvement in spatial learning.

Keywords: ionizing radiation, carbon-12, neuroinflammation, Alzheimer's disease, spatial learning, interleukins, chemokines