

РАДИАЦИОННАЯ
ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 591.88:591.18:599.323.4:57.084.1:539.125.4:539.1.047

**ВЛИЯНИЕ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ НА РЕШЕНИЕ МЫШАМИ
КОГНИТИВНОГО ТЕСТА НА ПОИСК ВХОДА В УКРЫТИЕ
И НЕЙРОГЕНЕЗ ВЗРОСЛОГО МОЗГА**

© 2019 г. И. И. Полетаева^{1,*}, О. В. Перепелкина¹, Н. А. Огиенко¹, А. Ю. Тарасова¹,
И. Г. Лильп¹, И. В. Кошлань^{3,4}, Г. В. Павлова², А. В. Ревещин²

¹Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

³Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

⁴Государственный университет “Дубна”, Дубна, Россия

*E-mail: ingapoletaeva@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2018 г.

Облучение мышей самцов F1 (СВА × С57BL/6J) пучком протонов (1, 2 и 4 Гр) вызвало неоднозначные проявления в адаптивном поведении животных. При использовании когнитивного теста на поиск входа в укрытие облученные мыши достоверно хуже, чем контроль, решали те этапы теста, где для попадания в комфортное отделение камеры надо было копать стружку. В то же время те этапы теста, где надо было удалить “пробку”, препятствовавшую переходу, они решали тест достоверно лучше контроля. У мышей облученных групп выявлено ослабление нейрогенеза в двух пролиферативных зонах переднего мозга.

Ключевые слова: облучение протонами, когнитивные способности, тест на неисчезаемость, реакция копания, нейрогенез взрослого мозга, лабораторные мыши

DOI: 10.1134/S0869803119050114

Исследование влияния на ЦНС и поведение заряженных частиц космического происхождения (в частности, протонов) в экспериментах на животных актуально в связи с перспективой полетов человека в дальний космос [1–4]. Поскольку протоны составляют значимую часть космического излучения, то их влияние на организм необходимо исследовать, используя разные биологические модели. Обнаруживаются как негативные эффекты облучения протонами (снижение показателей нейрохимических процессов, усиление тревожности и др.), так и отсутствие значимых изменений [2–5], и эти эффекты отличаются от таковых при облучении заряженными ионами тяжелых металлов [6].

В настоящей статье представлены данные по влиянию облучения протонами на решение лабораторными мышами теста на поиск входа в укрытие [7]. Этот тест позволяет оценить способность животного, стремящегося избежать пребывания в ярко освещенной части экспериментальной камеры, найти замаскированный вход (лаз) в темную часть установки. Способность решить этот тест при замаскированном лазе базируется на понимании животным правила “неисчезаемости”, т.е. понимания, что объект, который ранее был в

наличии, но более не видим, продолжает существовать, и его можно отыскать. Эту способность (впервые описанную Ж. Пиаже у маленьких детей, см. [8]) обнаруживают у животных без предварительного научения. Она базируется на наличии у животного соответствующей когнитивной способности. Данный тест на поиск входа в укрытие (в англоязычной литературе он называется puzzle-box) в модификации для мышей был предложен М. Голсуорси относительно недавно [9, 10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Экспериментальные животные. В работе были использованы самцы мышей-гибридов (СВА × С57BL/6J)F1 в возрасте 4 мес. Сравнивали поведение животных, облученных протонами ($n = 25$), и контрольных животных ($n = 39$). Использовали две контрольные группы. 1-я – группа “контроль-Дубна”, эти животные подвергались тем же манипуляциям, что и облученные, но облучения не получали, 2-я – “контроль-Москва” (интактные мыши, которые подобным манипуляциям не подвергались).

Облучение мышей проводили в лаборатории радиобиологии ОИЯИ на протонном пучке фазо-

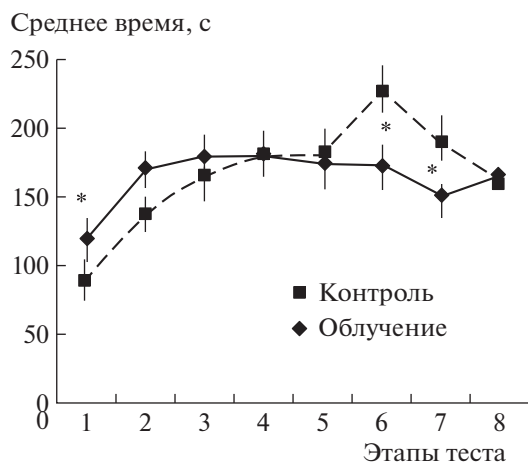


Рис. 1. Среднее время (\pm ош. средн.) решения теста на поиск входа в укрытие облученными и контрольными мышами (1-я серия экспериментов с облучением, тестирование, через 1 мес. после облучения). *Достоверно отличается от показателя контроля, $p < 0.05$ (1 факт. ANOVA, LSD *post hoc* тест по Фишеру).

Fig. 1. The time (means \pm st. error) of puzzle-box “cognitive” trials solution by irradiated (rhombs) and control (squares) mice (the 1st experimental series with irradiation, 1 month after irradiation). *Significantly different from control score, $p < 0.05$ (1 factorial ANOVA, Fisher LSD *post hoc* тест).

трона Медико-технического комплекса “Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ” (г. Дубна). Общее однократное облучение проводили в расширенном пике Брэгга с дозами: 1, 2, 4 Гр — первая серия и 4 Гр — вторая серия (мощность дозы около 1 Гр/мин, энергия протонов на входе пучка составляла 150 МэВ). Животное помещали в жесткий пластиковый контейнер, в котором оно не могло двигаться.

Тест на поиск входа в укрытие. В 1-й серии тест на поиск входа в укрытие проводили трижды. Первый раз — до облучения, при этом различий между выполнением его животными будущих экспериментальной и контрольных группами обнаружено не было, второй раз — через 2 мес., а третий — через 5.5 мес. после облучения. Во 2-й серии тест проводили через 1 мес. после облучения. Результаты выполнения данного теста мышами экспериментальных и контрольных групп в обеих сериях оказались сходными. При тестировании мышь помещают в ярко освещенную часть пластиковой камеры ($74 \times 30 \times 28$ см), в которой есть углубленный в пол “лаз” в стенке, разделяющей камеру на освещенную и темную части. Через этот лаз мышь может попасть в темную, более комфортную часть камеры. В течение 2 дней (по четыре пробы в каждый) оценивали быстроту (латентный период) перехода животного в темноту. В пробах 1 и 2 лаз открыт, и животное переходит в темноту беспрепятственно. В пробах 3 и 4 лаз за-

маскирован чистой древесной стружкой вровень с полом. На 2-й день эксперимента в пробе 5 лаз снова замаскирован стружкой, а в пробах 6 и 7 его закрывают легкой пробкой из пластика и картона, которую мышь может легко вытащить. В 8-й пробе теста вся стенка с лазом засыпана стружкой на высоту 5–7 см. Для решения проб 1–5 и 8 мыши “давалось” 3 мин, для проб 6 и 7 — 4 мин. Успешность выполнения теста оценивали по времени перехода мыши в темную часть камеры, а для группы животных — по доле мышей, решивших “когнитивные” пробы теста (т.е. пробы, когда лаз бывает закрыт и для попадания в темную часть камеры нужно “понять”, что лаз только замаскирован, а не исчез). Если животное не перешло в темную часть камеры за 3 или 4 мин (в зависимости от номера пробы), время решения теста обозначается как 180 или 240 с.

Нейрогенез взрослого мозга оценивали по числу делящихся клеток в зубчатой фасции гиппокампа и в субвентрикулярной зоне переднего мозга. Подсчет клеток проводили на коронарных срезах мозга мышей с последующей окраской на маркер делящихся клеток Ki-67 [11].

Статистическую значимость межгрупповых различий оценивали с помощью 1-факторного ANOVA с LSD *post hoc* тестом по Фишеру, значимость различий альтернативных долей — с помощью метода ϕ по Фишеру.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общее состояние животных оценивали как непосредственно после облучения, так и спустя разные сроки после него (вплоть до нескольких месяцев). Это имеет вполне серьезные основания из-за постепенного формирования последствий облучения, в частности, его воздействий на процессы нейрогенеза [12]. В течение 4 и 10 мес. после облучения не было обнаружено ни резкого снижения массы тела облученных мышей, ни изменений в адекватности их поведения.

Среднее время решения теста у мышей групп “облучение” и “контроль” (суммарно для животных обеих серий) практически не различалось, пример — на рис. 1. Время решения теста (пробы 6 и 7) у контрольных мышей было большим за счет большей доли животных, не решивших эти “когнитивные” этапы теста, поскольку им “засчитывалось” время — 240 с.

В то же время доли мышей двух групп, решивших наиболее сложные пробы теста (когда лаз в темную часть камеры замаскирован либо стружкой, либо пробкой), достоверно различались. Среди мышей облученных групп было меньше особей, решивших пробы с лазом, присыпанным стружкой, тогда как пробу с лазом, закрытым пробкой, они решали достоверно более успешно,

чем контрольные (результаты теста во 2-й серии представлены на рис. 2). В обеих сериях опытов с облучением результаты были сходными. С целью анализа причин аномалии в реакции на стружку у облученных мышей в 1-й серии опытов с ними был проведен специальный тест на реакцию “копания”. В этом опыте животное помещали в камеру, по углам которой были насыпаны кучки стружки. Оценивали число эпизодов копания, стоек и подходов к кучкам, а также число эпизодов груминга. Данные однофакторного ANOVA (для пяти групп – три группы мышей, облученных разными дозами, и две контрольные) были на грани достоверности, однако *post hoc* тест LSD (по Фишеру), несмотря на малый размер групп, выявил статистически значимые различия – меньшее число эпизодов “копания” у облученных мышей (3.4 ± 2.04 , 3.0 ± 2.63 и 4.5 ± 3.22 для групп, получивших облучение, и 10.8 ± 2.04 и 8.8 ± 1.52 для контрольных групп, $p < 0.05$). Для числа эпизодов груминга однофакторный ANOVA показал достоверное влияние фактора “группа” ($F_{1-4} = 3.4862$, $p = 0.0222$) с большим числом эпизодов у мышей облученных групп. Таким образом, у мышей, получивших облучение протонами, видоспецифическая реакция “копания” была выражена слабее, чем у контроля, возможно, в связи с более “тревожной” реакцией облученных мышей на стружку. Одним из объяснений этого феномена может быть нарушение обоняния у облученных животных. Тревожность облученных мышей при контакте со стружкой выразилась и в большем числе эпизодов груминга у облученных мышей.

Статистически значимая большая доля мышей облученной группы, решивших “когнитивные” пробы данного теста с лазом, закрытым пробкой, представляется “парадоксальной”, и этот факт показывает, что когнитивные способности этих животных не пострадали после облучения протонами. Это находится в соответствии с отсутствием негативного влияния этого воздействия на поведение животных в целом в течение нескольких месяцев после облучения.

Успешное выполнение мышами теста на ПВУ требует от животного оперирования свойством “неисчезаемости” (по Ж. Пиаже, [8]), т.е. “понимания”, что воспринимающийся объект, которого более не видно, продолжает существовать, и его можно искать. Заимствованное из психологии понятие “исполнительных функций” (executive functions) включает в себя, наряду с другими способностями, и решение элементарных логических задач, для которых у животного “нет готового решения” (по А.Р. Лурия). В наших экспериментах оказалось, что облучение протонами вызывало у животных статистически значимое улучшение решения задачи на поиск входа в укрытие при сложной маскировке лаза с помо-

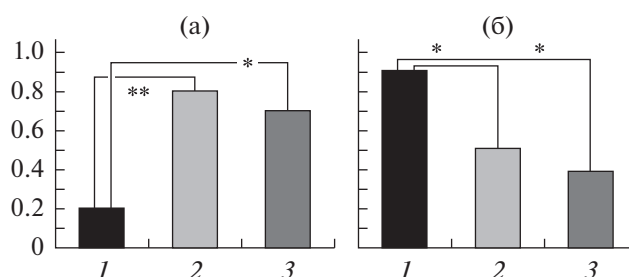


Рис. 2. Доли мышей (ось ординат), решивших “когнитивные” пробы теста на поиск входа в укрытие во 2-й серии с облучением протонами. а – пробы 3–5 (лаз засыпан стружкой), б – пробы 6 и 7 (лаз закрыт пробкой). 1 – облученные мыши, доза 4 Gy, 2 – “контроль-Дубна”, 3 – “контроль-Москва”. *, **Статистически значимые различия при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно (метод ϕ по Фишеру).

Fig. 2. The proportion of mice (ordinate), which solved the “cognitive” trials of puzzle-box test in the 2nd series with proton irradiation. а – trials 3–5 (the underpass is masked by wood shavings), б – the trials 6 and 7 (the underpass is blocked by the cork). 1 – irradiated mice, dosage 4Gy, 2 – “control Dubna” group, 3 – “control Moscow” group. *, **Statistically significant differences, $p < 0.05$ and $p < 0.001$ respectively (Fisher ϕ test).

щью пробки, выразившееся в более высокой доле мышей, которые смогли решить эти пробы теста. Данный эффект имел долговременный характер, поскольку обнаружился в тесте, который мышам предъявляли через 1, 2 и 5.5 мес. после облучения (в двух независимых сериях опытов). Одним из возможных объяснений этого эффекта может быть предположение о некоторой активации ЦНС мышей, вызванной облучением протонами. Сходный результат – отсутствие негативного влияния облучения протонами и изменение поведения животных в эмоциональном (но не когнитивном) поведении был получен другими авторами ранее [3, 5]. Результаты тестирования исследовательского поведения мышей в тестах “малое открытое поле”, приподнятый крестообразный лабиринт и др. показали некоторое усиление исследовательского поведения облученных мышей (данные не приводятся), что согласуется с предположением о некоторой активации их поведения. В то же время наши данные выявили достоверно менее успешное решение этого же теста на тех его этапах, когда от мыши для перехода в укрытие требовалось раскопать стружку, маскирующую лаз. Очевидно, что причины этого нарушения поведения “раскапывания” нуждаются в специальном анализе.

Данные по количеству новых клеток в зубчатой фации гиппокампа (FDH) и в субвентрикулярной зоне переднего мозга (SVZ) после облучения и у контрольных мышей того же возраста представлены на рис. 3. У мышей облученной группы (доза 2 и 4 Гр) число клеток иммунопози-

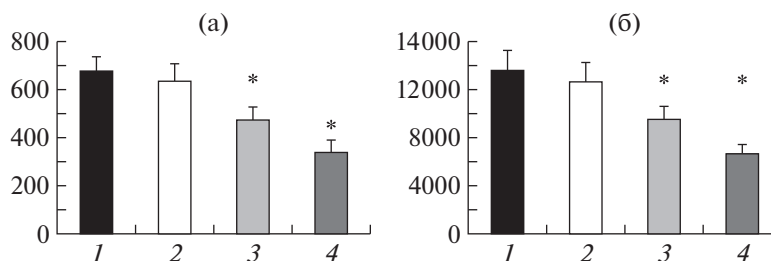


Рис. 3. Среднее число (\pm ош. средн.) новых клеток в пролиферативных зонах переднего мозга (ось ординат) в контроле (1) и после облучения протонами (2 – 1 Гр, 3 – 2 Гр и 4 – 4 Гр, по данным для 4- и 6-месячных сроков после облучения). а – субгранулярная зона (зубчатой фасции) гиппокампа, б – субвентрикулярная зона переднего мозга. * Достоверно ($p < 0.05$) отличается от показателей для контрольных животных того же возраста.

Fig. 3. The mean number (\pm st. error, ordinate) of new cells in the forebrain proliferative zones in control mice (1) and after proton irradiation (1 Gy – 2, 2 Gy – 3, 4 Gy – 4) for the 4 m and 6 m periods after the irradiation. a – subgranular area of hippocampal fascia dentata, b – subventricular forebrain area. * Significantly different ($p < 0.05$) from the scores of control animals of the same age.

тивных к Ki-67 (маркер новых клеток) в переднем мозге (FDN и SVZ) было меньше, чем в контроле. Более существенное подавление пролиферации обнаружено в SVZ. Отметим, что межсамцовая агрессия (связанная с обонятельным восприятием) у облученных мышей была нарушена (данные не приводятся).

Интенсивность нейрогенеза взрослого мозга у лабораторных грызунов и показатели успешности выполнения когнитивных тестов, как показывает сопоставление результатов большого числа исследований [13], коррелируют далеко не во всех случаях, поэтому полученные результаты демонстрируют сложность исследуемых процессов как последствий ионизирующего облучения.

Таким образом, проведенные эксперименты показали отсутствие повреждающего влияния протонного облучения в использованных условиях на поведение мышей в “когнитивном” тесте (даже с превосходством “облученных” мышей в решении “трудного” когнитивного этапа с пробкой в тесте на поиск входа в укрытие), а также постлучевое снижение нейрогенеза в переднем мозге мышей, более четкое при дозах 2 и 4 Гр.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана РФФИ, грант № 17-29-01001 и Государственной программой “Нейробиология поведения животных № NIOKTR AAAA-A16-116021660055-1”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К вопросу о радиационном барьере при пилотируемых межпланетных полетах // Вест. РАН. 2017. Т. 87. № 1. С. 65–69. [Grigoriev A.I., Krasavin E.A., Ostrovsky M.A. On the problem of radiation barrier during manned space flights // Vestn. Ac. Nauk. V. 87. № 1. P. 65–69. (In Russian)]. <https://doi.org/10.7868/S0869587317010030>
2. Shukitt-Hale B., Szprengiel A., Pluhar J. et al. The effects of proton exposure on neurochemistry and behavior // Adv. Space Res. 2004. V. 33. № 8. P. 1334–1339.
3. Штемберг А.С., Базян А.С., Лебедева-Георгиевская К.В. и др. Влияние высокоэнергетических протонов на поведение крыс и его нейрохимические механизмы // Авиакосм. и экол. мед. 2013. Т. 47. № 6. С. 54–60. [Shtemberg A.S., Basian A.I., Lebedeva-Georgievskaya K.B. et al. The influence of high energy protons on rat behavior and its neurochemical mechanisms // Aviakosm. a ecol. med. 2004. V. 47. № 6. P. 54–60 (In Russian)].
4. Davis C.M., Davis C.M., DeCicco-Skinner K.L., Roma P.G. et al. Individual differences in attentional deficits and dopaminergic protein levels following exposure to proton radiation // Radiat. Res. 2014, 181. № 3. P. 258–271. <https://doi.org/10.1667/RR13359.1>
5. Bellone J.A., Rudbeck E., Hartman R.E. et al. A single low dose of proton radiation induces long-term behavioral and electrophysiological changes in mice // Radiat. Res. 2015. V. 184. № 2. P. 193–202.
6. Rabin B.M., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. et al. Relative effectiveness of different particles and energies in disrupting behavioral performance // Radiat. Environ. Biophys. 2007. V. 46. № 2. P. 173–177.
7. Перепелкина О.В., Голибродо В.А., Лильп И. Г. и др. Селекция мышей на высокие показатели решения элементарной логической задачи // Докл. акад. наук. 2015. Т. 460. № 5. С. 617–621. [Perepelkina O.V., Golibrodo V.A., Lilp I.G. et al. Selection of mice for high scores of elementary logic task solution // Dokl. Acad. Nauk. 2015. V. 460. № 5. P. 617–621. (In Russian)].
8. Zucca P., Milos N., Vallortigara G. Piagetian object permanence and its development in Eurasian jays (*Garrulus glandarius*) // Anim. Cogn. 2007. V. 10. № 2. P. 243–258.
9. Galsworthy M.J., Paya-Cano J.L., Liu L. et al. Assessing reliability, heritability and general cognitive ability in a battery of cognitive tasks for laboratory mice // Behav. Genet. 2005. V. 35. № 5. P. 675–692.
10. Ben Abdallah N.M., Fuss J., Trusel M. et al. The puzzle box as a simple and efficient behavioral test for explo-

- ring impairments of general cognition and executive functions in mouse models of schizophrenia // *Exp. Neurol.* 2011. V. 227. № 1. P. 42–52.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2010.09.008>
11. Тимошенко Т.В., Перепелкина О.В., Маркина Н.В. и др. Аудиогенная эпилепсия у крыс двух генотипов после неонатальных воздействий, усиливающих нейрогенез в зубчатой извилине // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2009. Т. 147. № 4. С. 441–444. [Timoshenko T.V., Perepelkina O.V., Markina N.V., et al. Audiogenic epilepsy in rats of two genotypes after neonatal treatments, which increase the neurogenesis in the dentate gyrus // *Bull. exper. biol. med.* 2009. V. 147. № 4. P. 441–444. (In Russian)]
 12. Sweet T.B., Panda N., Hein A.M. et al. Central nervous system effects of whole-body proton irradiation // *Radiat. Res.* 2014. V. 182. № 1. P. 18–34.
<https://doi.org/10.1667/RR13699>
 13. Lipp H.-P. Evolutionary shaping of adult hippocampal neurogenesis in mammals—cognitive gain or developmental priming of personality traits? // *Front. Neurosci.* 2017. V. 21.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00420>

Effects of Proton Irradiation on Cognitive Puzzle-box Task Solution in Mice and Adult Brain Neurogenesis

I. I. Poletaeva^{a,#}, O. V. Perepelkina^a, N. A. Ogienko^a, A. Yu. Tarassova^a, I. G. Lilp^a, I. V. Koshlan^{c,d},
G. V. Pavlova^b, E. A. Krasavin^c, and A. V. Revishchin^b

^a*Biology Department, Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia*

^c*Joint Institute for Nuclear Researches, Dubna, Russia*

^d*Государственный университет “Дубна”, Dubna, Russia*

[#]*E-mail: ingapoletaeva@mail.ru*

Proton beam irradiation (1, 2 and 4 Gy, 150 MeV) of hybrid male mice F1 (CBA × C57BL/6J) has changed their behavior ambiguously. The irradiated mice performed significantly less successfully than control ones in the puzzle-box test at those stages, when the underpass to the safe box compartment was masked by wood shavings, and they had to dig it. At the same time, they were significantly more successful at the stages when the underpass was masked by the light cork, which should be removed as it blocked the entrance. Reduction in the neurogenesis in two proliferative forebrain zones had been demonstrated in irradiated mice.

Keywords: proton irradiation, cognitive ability, object permanence test, digging reaction, adult neurogenesis, laboratory mice