

С.С. Сорокина¹, В.А. Пикалов², Н.Р. Попова¹**ВЛИЯНИЕ ИОНОВ УГЛЕРОДА В МАЛОЙ ДОЗЕ
НА ПОВЕДЕНИЕ МЫШЕЙ В ОСТРЫЙ ПЕРИОД**¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино² Институт физики высоких энергий имени А.А. Логунова Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт», Протвино

Контактное лицо: Нелли Рустамовна Попова, e-mail: nellipopovaran@gmail.com

РЕФЕРАТ

Активное внедрение ионной терапии для лечения онкологических заболеваний, а также долгосрочные планы по освоению дальнего космоса, где экипажи будут подвергаться воздействию галактического излучения, в спектре которого преобладают протоны и ионы высоких энергий – углерода и железа, остро ставят задачу оценки влияния ионов на когнитивные функции с целью повышения эффективности радиотерапии и обеспечения безопасности космических полётов.

Цель: Исследовать влияние терапевтического пучка ионов углерода в пике Брэгга в дозе 0,7 Гр на поведение лабораторных мышей в ранний срок после облучения.

Материал и методы: Эксперименты проводили на двухмесячных самцах мышей SHK с массой тела 28–32 г. Перед облучением животных помещали на платформу в специальных контейнерах. Облучение однородным пучком ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон в пике Брэгга в дозе 0,7 Гр, сформированным воблер-магнитом, осуществляли в ЦКП РБС У-70 (г. Протвино). Через 2 сут после облучения для оценки общей активности, пространственного обучения, долговременной и кратковременной гиппокамп-зависимой памяти мышей использовали следующий набор методик: «открытое поле», лабиринт Барнс и тест на распознавание нового объекта.

Результаты: Обнаружено, что мыши, тотально облучённые ионами углерода в дозе 0,7 Гр, значимо не проявляют изменённую модель локомоторного и психоэмоционального поведения, но проявляют ухудшение памятного следа на 3-е сут после обучения в лабиринте Барнс и нарушение эпизодической памяти в тесте на распознавание нового объекта.

Заключение: Полученные результаты вносят вклад в понимание влияния малых доз тяжёлых заряженных частиц и, в частности, ускоренных ионов углерода, на когнитивные способности и поведение лабораторных животных, подчёркивая необходимость оценки наблюдаемых эффектов в динамике после воздействия.

Ключевые слова: адронная терапия, ионы углерода, малые дозы, поведение, когнитивный дефицит, радиационная безопасность, мыши

Для цитирования: Сорокина С.С., Пикалов В.А., Попова Н.Р. Влияние ионов углерода в малой дозе на поведение мышей в острый период // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2025. Т. 70. № 1. С. 16–20. DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-16-20

DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-16-20

S.S. Sorokina¹, V.A. Pikalov², N.R. Popova¹**The Behavioral Effect of Low Dose Carbon Ions Irradiation on Mice in Short-Term Period**¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Pushchino, Russia² A.A. Logunov Institute of High Energy Physics, Protvino, Russia

Contact person: N.R. Popova, e-mail: nellipopovaran@gmail.com

ABSTRACT

The active introduction of ion therapy for the treatment of oncological diseases, as well as long-term plans for the exploration of deep space, where crews will be exposed to galactic radiation, the spectrum of which is dominated by protons and high-energy ions - carbon and iron, urgently pose the task of assessing the effect of ions on cognitive functions in order to increase the effectiveness of radiotherapy and ensure the safety of space flights.

Purpose: To study the effect of a therapeutic beam of carbon ions with an energy of 450 MeV/n at the Bragg peak at a dose of 0.7 Gy on the behavior of laboratory mice in the early period after irradiation.

Material and methods: Experiments were carried out on 2-month-old male mice of the SHK (28–32 g.). Before irradiation, the animals were placed on a platform in special containers. Irradiation with a uniform beam of carbon ions with an energy of 450 MeV/n in the Bragg peak at a dose of 0.7 Gy, formed by a “wobbler” magnet, was carried out in the U-70 RBS Collective Use Center (Protvino). Two days after irradiation, the following set of methods was used to assess the general activity, spatial learning, long-term and short-term hippocampus-dependent memory of mice: “open field”, Barnes maze and a novel object recognition test.

Results: It was found that mice whole-body irradiated with a therapeutic beam of carbon ions at a dose of 0.7 Gy do not significantly exhibit an altered model of locomotor and psychoemotional behavior, but they show a deterioration in the memory trace on the 3rd day after training and a violation of episodic memory in the novel object recognition test.

Conclusion: The obtained results complement the accumulating literature data on the effects of low doses of heavy charged particles, and in particular accelerated carbon ions, on the cognitive abilities and behavior of laboratory animals, emphasizing the need to evaluate the observed effects dynamically after exposure.

Keywords: *hadron therapy, carbon ions, low doses, behavior, cognitive deficit, radiation safety, mice*

For citation: Sorokina SS, Pikalov VA, Popova NR. The Behavioral Effect of Low Dose Carbon Ions Irradiation on Mice in Short-Term Period. Medical Radiology and Radiation Safety. 2025;70(1):16–20. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2025-70-1-16-20

Введение

В настоящее время перед научным сообществом стоит ряд важных практических задач, решение которых требует детального изучения механизмов биологического действия высокоионизирующего излучения на организм. Одна из них связана с активным применением ускоренных ионов разных энергий для лечения онкологических заболеваний, на фоне чего возникла проблема оценки влияния ионов на когнитивные функции пациента с целью повышения эффективности терапии с сохранением качества жизни. Вторая задача связана с запланированными полётами на Луну и Марс для обеспечения успешного прохождения миссии и безопасности космических полётов, поскольку экипажи будут подвергаться длительному воздействию галактического излучения, в спектре которого преобладают протоны и ионы высоких энергий – углерода и железа [1, 2].

За последние годы накоплены данные, указывающие на то, что ионизирующие излучения приводят к индукции значительных когнитивных эффектов у взрослых и детей, подвергающихся лучевой терапии или оказывающихся в неблагоприятной техногенной обстановке, при этом большинство исследований сосредоточены на долгосрочных когнитивных нарушениях, связанных с функционированием гиппокампа [3, 4]. Несмотря на то, что клеточные и молекулярные мишени этих процессов остаются неизвестными, предполагается, что высокоионизирующее излучение, к которым относится и ионное излучение, может влиять на функциональные свойства нейронов и тем самым приводить к дисбалансу в нейронной сетевой активности. Такой дисбаланс приводит к неврологическим изменениям, которые могут повлиять на интеллектуальные способности и поведенческие реакции, что критично во время длительных космических полётов.

Вместе с тем, исследования по оценке биологического действия малых и средних доз ускоренных ионов углерода с различными физическими характеристиками на сегодняшний день остаются немногочисленными, в особенности на животных *in vivo*. Таким образом, целью данной работы было исследование влияния терапевтического пучка ионов углерода в пике Брэгга в дозе 0,7 Гр на поведение лабораторных мышей в ранний срок после тотального облучения.

Материал и методы

Эксперименты проводились на 2-месячных беспородных альбиносных мышах-самцах линии SHK ($n = 20$). Животных содержали в поликарбонатных клетках с подстилом из опилок по 10 особей в виварии ИТЭБ РАН (г. Пущино) при температуре 22 ± 2 °C. Режим освещённости – 12ч / 12ч. Животные имели свободный доступ к воде и полнорационному экструдированному корму для лабораторных животных (ООО «Провими», Россия). В экспериментах следовали этическим нормам по работе с лабораторными животными по протоколу, утверждённому Комиссией по биоэтике и биологической безопасности ИТЭБ РАН. Все исследования с участием животных в ИТЭБ РАН осуществляются согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях.

Облучение животных было проведено в Центре коллективного пользования «Радиобиологический стенд на углеродном пучке У-70» Института физики высоких энергий им. А.А. Логунова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Мышей помещали в прямоугольный блок из оргстекла (по две мыши в контейнере) непосредственно перед облучением. Животные ($n = 10$) были тотально облучены в дозе 0,7 Гр ускоренных ионов углерода с энергией 450 МэВ/нуклон. Для обеспечения равномерного распределения биологической дозы по объёму тела мышей облучение проводилось в пространственно расширенном пике Брэгга. Расчётное значение линейной передачи энергии (ЛПЭ) для ионов углерода в модифицированном пике Брэгга равнялось 100 кэВ/мкм. Мощность дозы составила 1,6 Гр/мин. Мыши были глубоко анестезированы во время облучения и помещены в кессон таким образом, чтобы тело мыши было перпендикулярно пучку. Координаты кессона выбирались таким образом, чтобы тело животного находилось в зоне равномерного поперечного поля облучения. Проверка профиля углеродного пучка и контроль дозы проводились с помощью нейтронного монитора, радиографических плёнок Garchromic EBT-3 и мозаичной плоскопараллельной ионизационной камеры. Необлучённые мыши ($n = 10$) подвергались тем же манипуляциям, что и экспериментальные животные, при выключенной установке. Через 2 сут после облучения для оценки общей активности, пространственного обучения, долговременной и кратковременной гиппокамп-зависимой памяти мышей использовали следующий набор методик: «открытое поле», лабиринт Барнс и тест на распознавание нового объекта по отработанной ранее схеме [4]. Для оценки достоверности различий показателей между контрольной и экспериментальными группами применялся t-тест Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Тест «открытое поле»

В течение 4 мин регистрировали суммарную скорость перемещения и суммарный пройденный путь по тестовой площадке, частоту и время пребывания в центральном и пристеночных секторах. Анализ результатов не выявил статистически значимых изменений, однако наблюдается тенденция к снижению общей локомоторной активности облучённых мышей (рис. 1а). Что касается пребывания животных в различных сегментах поля, то облучённые мыши выходят в центральную зону немного реже контрольных животных, но проводят там значительно больше времени; кроме того, эти животные заходят в пристеночные зоны существенно реже, проводя там столько же времени, как и необлучённые мыши (рис. 1б). Данная стратегия поведения говорит о преобладании исследовательского типа поведения над защитным и, вероятно, о нормальном психоэмоциональном состоянии грызунов.

Лабиринт Барнс

Изучение гиппокамп-опосредованного пространственного обучения в тесте Барнс выявило положи-

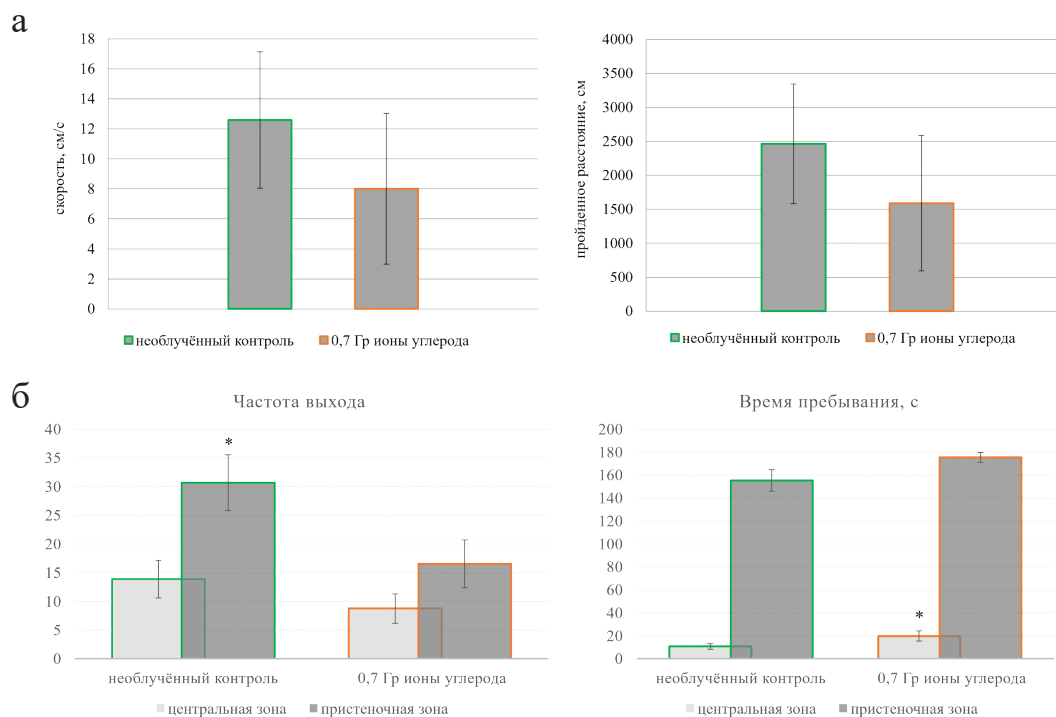


Рис. 1. Оценка исследовательского поведения в тесте «открытое поле» у мышей, подвергшихся тотальному воздействию ускоренных ионов углерода в дозе 0,7 Гр: а) скорость и пройденное расстояние; б) частота и время, проведённое в центре и на границе установки. Данные представлены в виде среднего значения \pm SEM ($n = 10$ животных в группе)

Fig. 1. Changes in exploratory behavior in the «open field» test in mice whole-body exposed to accelerated carbon ions at dose of 0.7 Gy: а) velocity and distance moved; б) frequency and time spent in the center and at the border of the setup. Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 10$ animals per group)

тельную динамику обучения в течение 9 сессий (3 сут) в обеих группах, однако задержка до поиска убежища в облучённой группе в 8 и 9 сессии была выше, что обусловлено увеличением количества животных, которые не нашли скрытую норку за время сессии, в то время как скорость нахождения убежища у остальных животных была сравнима с контролем (рис. 2а). Что касается оценки долговременной памяти, то тестирование мышей в тесте Барнс выявило значимое ухудшение памятного следа в группе мышей, тотально облучённых ионами углерода в дозе 0,7 Гр, на 3-е сут после обучения, что связано с присутствием животных, не нашедших убежище за время тестирования, в то время как на 9-е сут статистически значимых отличий не выявлено (рис. 2б).

Тест на спонтанное распознавание нового объекта

Сравнение средних значений коэффициентов дискриминации (Кд) в тесте «распознавание новых объектов» показало, что воздействие ионов углерода значительно сказывается на способности животных дифференцировать «новый» и «старый» объект. Так, Кд для облучённых мышей составил $-0,179$, что указывает на ухудшение эпизодической памяти, в то время как в контрольной группе этот коэффициент равен $0,002$ (рис. 3). Ранее нами было изучено влияние ускоренных ионов углерода в этих же условиях в той же дозе на когнитивные функции мышей и морфологию микроглии в отдалённые сроки (2 мес) после воздействия [4]. Был обнаружен измененный паттерн поведения, характеризующийся тревожностью и дефицитом гиппокамп-зависимой памяти, при этом дефицит эпизодической памяти не наблюдался. Так, через 3 мес после воздействия было отмечено снижение числа клеток в дорсальном гиппокампе облучённых мышей, при этом наиболее выражен-

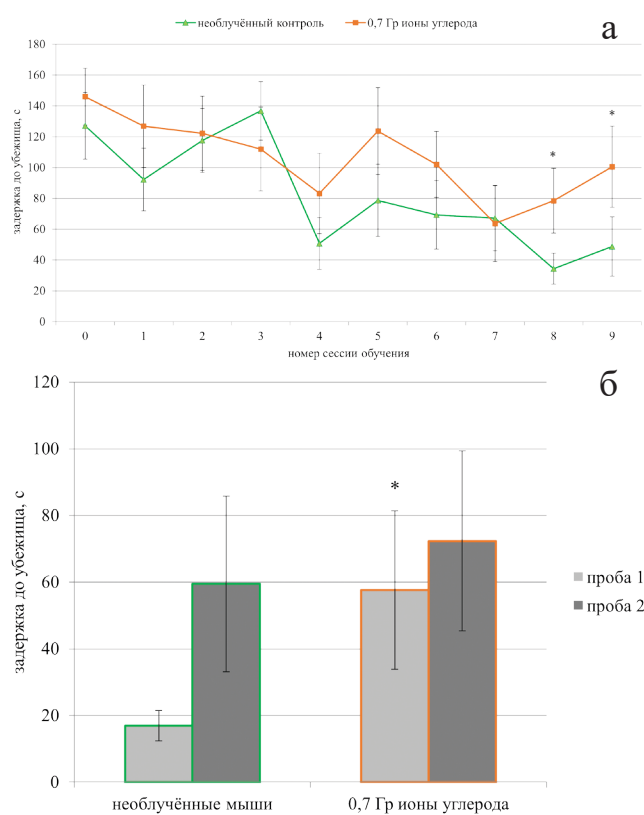


Рис. 2. Влияние тотального облучения ионами углерода в дозе 0,7 Гр на скорость обучения мышей (а) и пространственную память (б) в лабиринте Барнс. Данные представлены как среднее значение \pm SEM ($n = 10$ животных в группе)

Fig. 2. The effect of carbon ions at dose of 0.7 Gy on the mice learning rate (а) and spatial memory (б) in the Barnes maze. Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 10$ animals per group)



Рис. 3 Влияние тотального облучения ионами углерода в дозе 0,7 Гр на эпизодическую память в тесте распознавания нового объекта: коэффициент дискриминации (Кд)

Fig. 3. Effect of carbon ions on the mice episodic memory retention in the novel object recognition task: values of the discrimination index (DI). Data are shown as the mean \pm SEM ($n = 10$ animals per group)

ное снижение плотности клеток наблюдалось в воротах зубчатой извилины. Также была значительно уменьшена длина поля CA3 дорсального гиппокампа, а число клеток в нем было умеренно снижено. Эксперименты с использованием окрашивания Fluoro-Jade B (FJB) не выявили FJB-позитивных областей в дорсальном гиппокампе облучённых и контрольных животных.

Суммарно, эти результаты свидетельствовали о том, что тотальное облучение в низкой дозе ионов углерода через 2 мес после воздействия может вызывать когнитивный дефицит у взрослых мышей без признаков нейродегенеративных патологических изменений. В другой работе [5] тотальное облучение мышей в дозе 1,5 Гр не приводило к изменению модели поведения животных, демонстрирующую высокую локомоторную активность с вероятным усилением исследовательского поведения, и не проявляющих дефицита кратковременной и долгосрочной гиппокамп-зависимой памяти. В нашей последней работе [6] было изучено влияние однократного краниального облучения мышей ускоренными ионами углерода в дозе 0,7 Гр и 2 Гр. Было установлено, что через 2 мес после воздействия мыши также не проявляли изменённой модели поведения и нарушения долгосрочной гиппокамп-зависимой памяти, при этом было обнаружено ухудшение эпизодической памяти. Интересно отметить, что у облучённых животных отмечалось дозозависимое увеличение двигательной активности с преобладанием исследовательского типа поведения над защитным, а также сохранение стойкого памятного следа в лабиринте Барнес, однако эти результаты не были статистически значимы.

Что касается литературных данных, то имеются единичные исследования, в которых изучалось влияние ионов углерода на долгосрочные когнитивные дефициты

у животных или клеточный гомеостаз головного мозга. Так, в работе [7] тотальное облучение мышей в дозах 1–3 Гр показало дозозависимое снижение пролиферирующих клеток и незрелых нейронов в зубчатой субгранулярной зоне через 9 мес, что сопровождалось изменённым нейрогенезом и сильной воспалительной реакцией. Liu et al [8] показали, что у мышей, подвергшихся воздействию ионов углерода в дозе 4 Гр в течение одного месяца, наблюдались когнитивные нарушения, нейродегенерация и гибель нейрональных клеток в гиппокампе, особенно на краях областей DG и CA1. Эти изменения сопровождалось снижением митохондриальной целостности, нарушением цикла трикарбоновых кислот и активности цепи переноса электронов, а также угнетением системы антиоксидантной защиты, что в конечном итоге приводит к снижению продукции АТФ и стойкому окислительному повреждению в гиппокампе. В исследовании [9] у мышей обнаружено снижение количества пролиферирующих и незрелых нейронов через два часа после воздействия ионов углерода в дозе 1 Гр, при этом через 3 мес отсутствовала значимая разница в уровне Ki67+ и DCX+ клеток, что предполагает способность мозга восстанавливать пролиферацию клеток и увеличивать количество незрелых нейронов с течением времени. В работе [10] при локальном облучении зубчатой извилины новорожденных мышей в дозе 1 Гр, в отличие от общего облучения всего тела в той же дозе, через 3 месяца после облучения отмечено изменение клеточной дифференцировки (снижение доли клеток BrdU+/NeuN+, увеличение доли клеток BrdU+/GFAP+) и некоторое ухудшение пространственной памяти у животных. В модельных экспериментах на обезьянах [11] показано, что облучение головы обезьян в дозе 1 Гр приводит к существенному снижению когнитивных функций и концентрации метаболитов серотонина.

Заключение

Таким образом, на фоне имеющихся ограниченных и противоречивых данных о долгосрочных эффектах тяжёлых ионов в малых дозах на центральную нервную систему, наши данные по влиянию ускоренных ионов углерода на поведение и когнитивные способности мышей при тотальном облучении животных в дозе 0,7 Гр, свидетельствуют о неизменной модели локомоторного и психоэмоционального поведения у мышей в ранние сроки после воздействия с развитием тревожности в отдалённые сроки. В то же время нарушение гиппокамп-опосредованного обучения и памяти наблюдается уже в острый 2-дневный период. Что касается эпизодической памяти, то по всей видимости, её дефицит в ранние сроки после облучения носит временный характер, поскольку через 2 мес такие нарушения не наблюдаются. Вместе с тем, краниальное облучение в изученной дозе в отдалённые сроки после воздействия статистически значимо приводит только к нарушению эпизодической памяти, что, вероятно, делает тест на распознавание нового объекта наиболее чувствительным маркером острого и отсроченного радиационно-индуцированного повреждения мозга.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Krukowski K., Grue K., Becker M., Elizarraras E., Frias E.S., Halvorsen A., Koenig-Zanoff McK., Frattini V., Nimmagadda H., Feng X., Jones T., Nelson G., Ferguson A.R., Rosi S. The Impact of Deep Space Radiation on Cognitive Performance: From Biological Sex to Biomarkers to Countermeasures. *Sci Adv.* 2021;7:42:eabg6702. doi: 10.1126/sciadv.abg6702
2. Cucinotta F.A., Cacao E. Predictions of Cognitive Detriments from Galactic Cosmic Ray Exposures to Astronauts on Exploration Missions. *Life Sci Space Res (Amst).* 2020;25:129-135. doi: 10.1016/j.lssr.2019.10.004
3. Rosi S., Belarbi K., Ferguson R.A., Fishman K., Obenaus A., Raber J., Fike J.R. Trauma-Induced Alterations in Cognition and Arc Expression Are Reduced by Previous Exposure to ^{56}Fe Irradiation. *Hippocampus.* 2012;22:544-554. doi: 10.1002/hipo.20920
4. Sorokina S.S., Malkov A.E., Shubina L.V., Zaichkina S.I., Pikalov V.A., Low Dose of Carbon Ion Irradiation Induces Early Delayed Cognitive Impairments in Mice. *Radiat. Environ. Biophys.* 2021;60:61–71. doi: 10.1007/s00411-020-00889-0
5. Sorokina S.S., Zaichkina S.I., Rozanova O.M., Shemyakov A.E., Smirnova E.H., Dyukina A.R., Malkov A.E., Balakin V.E., Pikalov V.A. The Early Delayed Effect of Accelerated Carbon Ions and Protons on the Cognitive Functions of Mice. *Biol. Bull.* 2020;47: 1651–1658. doi: 10.1134/S1062359020120109
6. Sorokina S.S., Pikalov V.A., Gromova D.S., Popova N.R. Cranial Irradiation of Carbon Ions Effect on the Recognition Memory in Mice. *Biol. Bull.* 2024;12 (In press).
7. Rola R., Sarkissian V., Obenaus A., Nelson G.A., Otsuka S., Limoli C.L., Fike J.R. High-LET Radiation Induces Inflammation and Persistent Changes in Markers of Hippocampal Neurogenesis. *Radiat. Res.* 2005;164;4:556–560. doi:10.1667/RR3412.1
8. Liu Y., Yan J., Sun C., Li G., Li S., Zhang L., Di C., Gan L., Wang Y., Zhou R., Si J., Zhang H. Ameliorating Mitochondrial Dysfunction Restores Carbon Ion-Induced Cognitive Deficits via Co-activation of NRF2 and PINK1 Signaling Pathway. *Redox Biol.* 2018;17:143–157. doi:10.1016/j.redox.2018.04.012
9. Zanni G., Deutsch H., Rivera P., Shih H.-Y., LeBlanc J., Amaral W., Lucero M., Redfield R., DeSalle M., Chen B., Whoolery C., Reynolds R., Yun S., Eisch A. Whole-Body ^{12}C Irradiation Transiently Decreases Mouse Hippocampal Dentate Gyrus Proliferation and Immature Neuron Number, but does not Change New Neuron Survival Rate. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:3078. doi:10.3390/ijms19103078
10. Serrano C., Dos Santos M., Kereselidze D., Beugnies L., Les-taevael P., Poirier R., Durand C. Targeted Dorsal Dentate Gyrus or Whole Brain Irradiation in Juvenile Mice Differently Affects Spatial Memory and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Biology.* 2021;10;3:192. doi:10.3390/biology10030192
11. Belyaeva A.G., Shtemberg A.S., Nosovsky A.M., Vasil'eva O.N., Gordeev Yu.V., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Krasavin E.A., Timoshenko G.N., Lapin B.A., Bazyan A.S. Effect of High-Energy Protons and ^{12}C Carbon Ions on the Cognitive Functions of Monkeys and the Content of Monoamines and their Metabolites in Peripheral Blood. *Neurochemistry.* 2017;34;1:1–9.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Статья подготовлена в рамках выполнения государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ FFRS-2024-0019, ИТЭБ РАН).

Участие авторов. С.С. Сорокина – разработка дизайна исследования, проведение эксперимента, написание текста статьи; В.А. Пикалов – обеспечение работы и проведение сеанса облучения в ЦКП РБС У-70 (г. Протвино); Н.Р. Попова – сбор и анализ литературного материала, научное редактирование текста, научное руководство.

Поступила: 20.10.2024. Принята к публикации: 25.11.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The article was prepared as part of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (No. FFRS-2024-0019, ITEB RAS).

Contribution. S.S. Sorokina – development of the research design, conducting the experiment, writing the text of the article; V.A. Pikalov – ensuring the work and conducting an irradiation session at the RBS U-70 Central Research Laboratory (Protvino); N.R. Popova – collection and analysis of literary material, scientific editing of the text, scientific guidance.

Article received: 20.10.2024. Accepted for publication: 25.11.2024.