

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 влияние 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 тау) 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 нейропатологии 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 mM Трис × HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM 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-

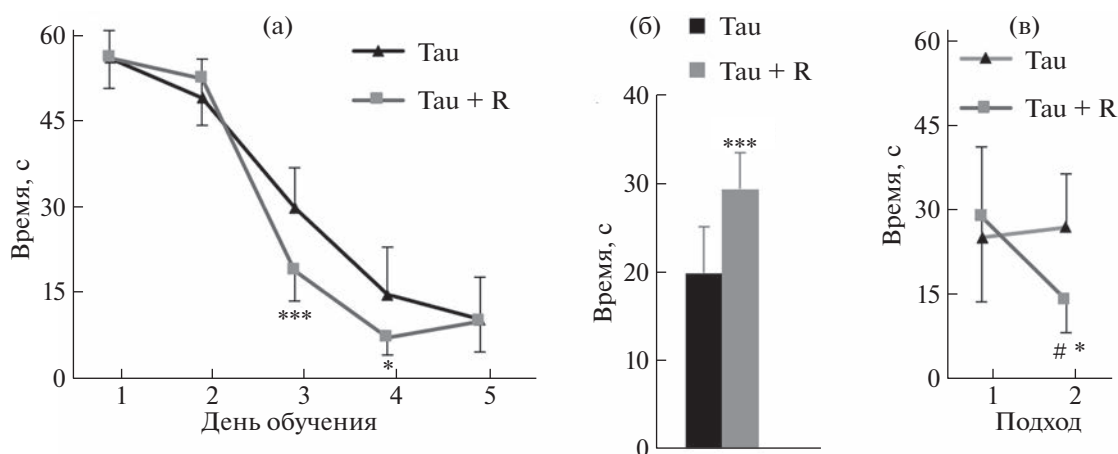


Рис. 1. Водный лабиринт Морриса. а – динамика научения (* – $p < 0.05$, *** – $p < 0.001$, апостериорный тест Дункана), б – тест без платформы (*** – $p < 0.001$, t -тест Стьюдента), в – повторное предъявление теста через 7 дней (звездочкой обозначены межгрупповые различия: * – $p < 0.05$; решеткой обозначены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

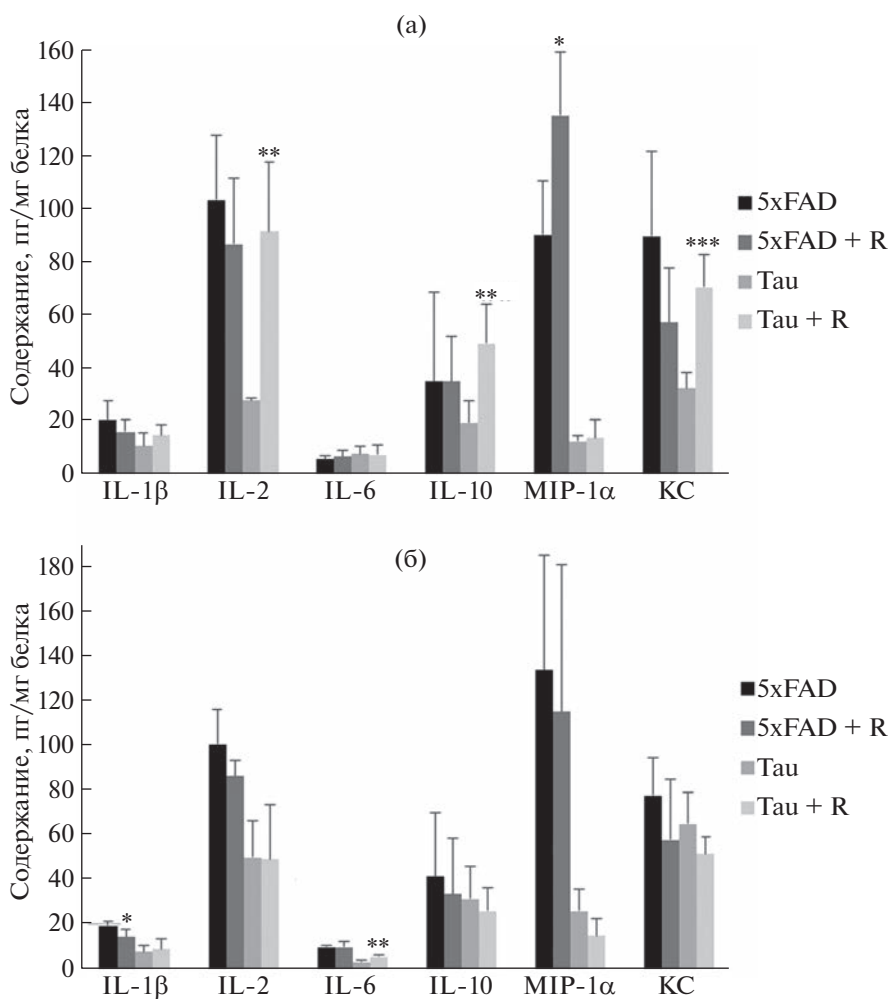


Рис. 2. Содержание избранных хемокинов и цитокинов в тканях головного мозга. а – префронтальная кора; б – гиппокамп. IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10 – интерлейкины; MIP-1 α – воспалительный белок макрофагов 1 α ; KC – хемоаттрактант кератиноцитов. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$, t -тест 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 Aβ 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., Engenhart-Cabillie 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 Aβ 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. Shafiel S.S., Kyrkanides S., Olschowka J.A., et al. Sustained hippocampal IL-1β 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