

КОМБИНИРОВАННЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

УДК 591.18:591.51:57.042:57.084.1:599.323.4:539.1.047

ОТДАЛЕННЫЕ НЕЙРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ АНТИОРТОСТАТИЧЕСКОГО ВЫВЕШИВАНИЯ И ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

© 2022 г. К. Б. Лебедева-Георгиевская¹, А. А. Перевезенцев¹, О. С. Кузнецова¹,
В. С. Кудрин^{1,2}, А. А. Масанова¹, А. С. Штемберг^{1,*}

¹Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем РАН,
Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, Москва, Россия

*E-mail: andrei_shtemberg@mail.ru

Поступила в редакцию 18.08.2021 г.

После доработки 04.11.2021 г.

Принята к публикации 09.11.2021 г.

Проведено исследование отдаленных последствий комбинированного действия синхронного квазихронического γ -облучения и антиортостатического вывешивания с дальнейшим облучением головы крыс ионами углерода ^{12}C с учетом типологических характеристик экспериментальных животных. Показано, что в течение 6 мес. интегративные эффекты изучаемых воздействий достаточно успешно нивелируются. В то же время значимые различия, связанные с типологическими особенностями животных, сохраняются и в долгосрочной перспективе. Проведено исследование спектральных и амплитудно-частотных характеристик электроэнцефалографии (ЭЭГ) крыс после указанных воздействий. Выявлены значимые различия в средних амплитудах и частотах ЭЭГ у животных с различными типологическими характеристиками высшей нервной деятельности (ВНД). Показана смена доминирующего ритма у животных, подвергнутых экспериментальным воздействиям. Так, у контрольных животных доминирующим оказывается τ -ритм, в то время как у облученных животных доминирует δ -ритм. Наиболее важным результатом стали зарегистрированные существенные изменения в электрофизиологической активности мозга крыс даже спустя полгода после облучения. Значимое смещение частот в области всех ритмов свидетельствует о длительном нарушении электрофизиологической активности головного мозга. Результаты нейрхимических исследований выявили существенные различия в метаболизме моноаминов в ключевых структурах мозга животных с различными типологическими характеристиками ВНД, сочетающиеся с их проявлением на интегративном уровне (в поведении животных).

Ключевые слова: комбинированное воздействие, γ -облучение, ионы углерода, отдаленные эффекты, ЭЭГ, поведение животных, баланс моноаминов в мозге

DOI: 10.31857/S0869803122010052

Одной из основных проблем при подготовке межпланетных миссий является радиационный барьер – опасность воздействия галактических космических лучей, в состав которых входят тяжелые ионы высоких энергий, вплоть до 10^{20} МэВ. При этом на первый план выходят возможные нарушения в центральной нервной системе (ЦНС) – так называемый эргономический риск, обусловленный возможными нарушениями операторской деятельности космонавтов, связанный с угрозой их жизни непосредственно в процессе полета. Существенные нарушения функций ЦНС при воздействии тяжелых ионов показаны в целом ряде работ [1–4]. Весьма важной, и в то же время наименее изученной проблемой являются нейробиологические эффекты комбинированного

действия ионизирующих излучений и нерадиационных факторов космического полета (ФКП), важнейшим из которых является микрогравитация. В наших предыдущих работах были исследованы различные аспекты эффектов комбинированного воздействия облучения, моделирующего космическое, и антиортостатического вывешивания (АНОВ) на поведение крыс и его нейрхимическое обеспечение [5–11]. В ряде работ [1–3] показано, что нейробиологические эффекты могут сохраняться и даже усугубляться в отдаленный период после облучения тяжелыми ионами. При этом отдаленные нейробиологические эффекты комбинированного действия моделируемой микрогравитации и ионизирующих излучений, а также электрофизиологические изменения

совершенно не изучены. Кроме того, как показано в ряде работ [12–14], важную роль в модификации нейробиологических эффектов воздействия ФКП играют индивидуальные и типологические особенности ВВД. Исходя из этого, задачами настоящей работы было изучение отдаленных эффектов комбинированного действия АНОВ и ионизирующих излучений, изучение нейробиологических его коррелятов, а также роли типологических особенностей ВВД в модификации этих эффектов

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

При создании АНОВ использовали индивидуальные секции из оргстекла размером $42 \times 42 \times 40$ см, скомпонованные в два стеллажа по 15 секций каждый. Животных вывешивали за основание хвоста под углом $30\text{--}40^\circ$ с расчетом снятия статической нагрузки с задних конечностей. При этом крыс крепили с помощью специальных карабинов, надевающихся на металлический стержень, так, чтобы они могли свободно перемещаться в пределах клетки. Таким образом, создавался антиортостаз, вызывающий перераспределение жидкостей в организме, и снималась статическая нагрузка с задних конечностей. Данная методика — принятая экспериментальная наземная модель невесомости для мелких лабораторных животных.

Стеллажи с вывешенными животными были размещены в облучательской зоне на расстоянии 3.3 м от источника излучения, с таким расчетом, чтобы облучение всех крыс было равномерным.

Эксперимент продолжался в течение 7 сут. Для облучения использовали установку ГОБО-60 с источником ^{137}Cs (72 г-экв. Ra). Мощность дозы составила 2.34 сГр/ч. В данном эксперименте было проведено квазихроническое облучение в течение всех 7 дней вывешивания, что приближает условия проведения эксперимента к реальным условиям космического полета. Доза γ -облучения составила 1.2 Гр. После окончания γ -облучения и снятия крыс с вывешивания было проведено однократное облучение головы животных ионами углерода ^{12}C с энергией 450 МэВ в дозе 0.7 Гр на ускорителе У-70 на базе Института физики высоких энергий (Протвино).

Выбор режима облучения основывался на следующем: суммарная доза 1.9 Гр для крыс (исходя из их видовой радиочувствительности) примерно соответствует расчетной дозе, которая может быть получена космонавтами в межпланетном полете. Снижение суммарной дозы было обусловлено большей эффективностью квазихронического облучения по сравнению с фракционированным.

Типологизация животных

Для типологизации животных использовали методику выработки условного рефлекса избегания закрытого (темного) пространства (“эмоционального резонанса”) по модифицированной методике П.В. Симонова). Экспериментальная камера состояла из открытой (освещенной) и закрытой (затемненной) частей. В течение 4–6 опытов каждую крысу помещали в открытую (светлую) часть камеры. Пребывание крысы в закрытом отсеке сопровождалось электрошоковым раздражением другой особи, вызывающим ее голосовые и двигательные реакции. Регистрировали общее время нахождения подопытной крысы в закрытом отсеке и частоту выходов оттуда в течение 5 мин наблюдения.

Показано, что различия в поведении животных в такой ситуации отражают индивидуальные типологические особенности их высшей нервной деятельности и дают возможность применять данную методику для исходного группирования животных по этому признаку [15, 16].

Исходно было использовано 68 самцов крыс линии LongEvans массой от 160 до 200 г, содержащихся в стандартных клетках по 7–8 особей в клетке. Доступ к корму (синтетический полнорационный) и воде свободный. Также было использовано 32 крысы линии LongEvans в качестве “актеров” (применяемых для вокализации при электрошоковом раздражении в шоковом отсеке камеры Симонова). Общее число животных в эксперименте — 100 голов.

В ходе тестирования все крысы, не задействованные в конкретный момент в тесте, были удалены из помещения с установкой и не могли слышать происходящего.

Освещенность в комнате составляла 60 лк/см², посторонние шумы, движение операторов установки и прочие раздражающие факторы сведены к минимуму.

Тестирование проводилось в течение 2 дней по 5 мин (300 с) на каждое животное. Изначально животное высаживали в дальний от входа в темный отсек угол светлого отсека. Регистрировали количество входов в темный отсек и общее время, проведенное в темном отсеке. Выяснилось, что эти параметры имеют обратную зависимость.

В первый день среднее время в темном отсеке составило 254 с (медианное — 272 с) с разбросом от 17 до 299 с при среднем количестве входов 4.4.

На второй день общая тревожность крыс снизилась и среднее время составило 278 с (медианное — 288 с) с разбросом от 172 до 297 с, что демонстрирует расхождение в поведении индивидуумов. Среднее количество входов составило 2.8.

Для дальнейшей работы из общего массива были отобраны четыре группы по восемь животных:

– группа А (“Альтруисты” по терминологии Симонова) – наименьшее время в темном отсеке, наибольшее число входов, соответственно можно сделать вывод о наивысшей тревожности;

– группа Е (“Эгоисты”) – наибольшее время в темном отсеке, наименьшее число входов;

– группа С (контроль – эгоисты) – аналогично группе Е;

– группа К (контроль – альтруисты) – аналогично группе А.

Измеренные и усредненные параметры по группам даны в табл. 1; можно видеть, что крысы группы Е вообще не реагируют на сигналы раздражаемой крысы, тогда как крысы групп А и К реагируют достаточно активно, совершая до 10 (в среднем 6 и 7 соответственно) кратковременных выходов из темного отсека.

Методы исследования поведения животных

Тестирование в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ). Приподнятый крестообразный лабиринт является общепринятым тестом для оценки тревожности экспериментальных животных. Критерием тревожности служат количество выходов в открытый отсек лабиринта и время пребывания в нем.

Используется стандартная крестообразная установка размером 1.5 м, два противоположных рукава которой закрыты по бокам черными стенками высотой 50 см. Установка расположена на высоте 70 см от пола, что исключает побег животного. Крысу первоначально высаживают в темный рукав. Тест проводится на протяжении 2 мин, в ходе которых замеряют: число перебежек между темными рукавами, латентный период выхода в светлый рукав, количество выходов и общее время, проведенное в светлом рукаве.

Выработка дифференцировочного условного рефлекса активного избегания (УРАИ) в Y-образном лабиринте. Лабиринт представляет собой три рукава (отсека) размером 25 (длина) × 20 (ширина) × 25 (высота) см из белого непрозрачного пластика, соединенных под углом 120 градусов.

В каждом отсеке установлены: управляемый светодиодный светильник, обеспечивающий освещенность 80 лк/см², управляемый источник звука различной частоты, и электропол, позволяющий стимулировать крысу импульсами с частотой 4–5 Гц энергией 0.004 Дж.

Методика основана на выработке классического условного рефлекса активного избегания, но реализация в данной установке позволяет также учитывать пространственную ориентацию (за-

Таблица 1. Параметры типологизации крыс
Table 1. Parameters of rats typologization

Параметр\Группа	общая	А	Е	С	К
Время среднее	278	234	296	278	234
Входы	2.8	6.1	1	2.8	7.0
Время медиана	288	233	296	278	232

давая “правильное” направление перехода) и использовать различные стимулы и их сочетания (например, по звуковому сигналу крыса переходит по часовой стрелке, по световому – против), формируя достаточно сложные модели дискриминантного поведения, т.е. вырабатывать дифференцировочные условные рефлексы (УР).

Крысу высаживают в произвольный отсек, после чего в отсеке загорается свет и начинается отсчет времени (6 с). Если крыса не успевает перейти в отсек, следующий по часовой стрелке от того, в котором она находится, во всех отсеках, кроме “нужного”, включается электростимуляция, вынуждающая ее совершить переход именно в “нужный”, хотя бы и путем случайного обхода. Таким образом, в отличие от стандартной методики УРАИ с “челночной камерой”, формируемый рефлекс сложнее и включает в себя пространственную ориентацию и дискриминантное поведение.

Проводилось четыре последовательных дня по 15 сеансов обучения, подсчитывалось количество “успешных” (без включения электропола) переходов, среднее время от включения света до совершения перехода (в случае “успешных” переходов), среднее время от включения электропола до совершения перехода в нужный отсек (в случае “неуспешных” переходов), а также число межсигнальных реакций – спонтанных переходов между отсеками в период, когда никакой сигнал не подается (10 с между сочетаниями).

Водный тест Морриса

Водный тест (лабиринт) Морриса предназначен для исследования пространственной памяти и ориентации животных. Подробно методика была описана в предыдущих публикациях [10, 11, 15].

Использовали стандартную установку диаметром 150 см, расположенную в полузатемненной комнате с освещением по периметру, что исключает наличие ярко выраженных ориентиров. Тестирование записывалось на видео для последующей обработки в ПО Bonsai (Open Ephys, США), определяющем временные характеристики прохождения теста, скорость, манеру поведения крысы.



Рис. 1. Расположение электродов в черепе животного.
Fig. 1. The location of the electrodes in the animal's skull.

Методы электроэнцефалографических (ЭЭГ) исследований

Для анализа возможных электрофизиологических изменений в работе головного мозга животных была проведена рутинная суммарная запись ЭЭГ. Крысам после облучения, по достижению веса 350–400 г, проводили операцию для вживления интеркорниальных энцефалографических электродов. Животное закрепляли в стереотаксической установке, операция происходила под общим наркозом (хлоралгидрат 350 мг/кг, концентрация 85 мг/мл). Голова крысы скальпировалась, после чего происходили очистка и сушка черепа. Электроды представляли собой позолоченные винты, диаметром полтора мм, закреплялись внутри кости с помощью пластмассы холодной быстрой полимеризации протакрил.

Электроды располагались в областях:

- префронтальной коры – 2шт. (координаты 1×3 мм от Брегмы);
- моторной коры – 1 шт. (1×1.5 мм от Брегмы);
- лимбической коры – 1 шт. (1×3 мм от Брегмы).

Референтный и земляной электроды объединены и расположены в затылочной кости. Было прооперировано и записано девять животных, по три из групп А, С и Е.

Для записи ЭЭГ использовали чип Neurologger (TSE, Германия), позволяющий проводить беспроводную запись, минимизируя внешнее воздействие на животных.

Пример прооперированного животного и схема расположения электродов представлены на рис. 1.

Спустя период адаптации была произведена регистрация ЭЭГ с помощью чипа Neurologger, запись проходила в свободном поведении в до-

машней клетке в течение одного часа, все животные записывались в один день, частота оцифровки составила 565 Гц. Регистрация ЭЭГ происходила спустя 6 мес. после облучения. Последующую обработку записей проводили в программах Powergraph3, Excel и Statistica. Полученные записи очищались от артефактов, разделялись в зависимости от физиологического состояния животного, после чего резались на отрезки от 7 до 10 с. Из полученных отрезков проводили построение спектров мощности и амплитуды. Значения амплитуды и частот спектра сохранялись для программы Excel, после чего статистически и математически обрабатывались. В итоге по каждому из отрезков был построен спектр мощности с определением амплитудно-частотных характеристик по двум наиболее выраженным пикам. Был произведен общий анализ средних амплитуд и частот для определения наличия тенденций каналов префронтальной коры. Последующий анализ проводили в рамках диапазонов основных ритмов. Анализировались средние частоты и амплитуды в рамках δ - (1–4 Гц), τ - (5–7 Гц) и α - (8–12 Гц) ритмов.

Всего было прооперировано и записано 15 животных, в связи с техническими особенностями работы чипов Neurologger пригодными для описания оказались семь записей – три контрольных и четыре экспериментальных животных. Анализировались значения, полученные для префронтальной коры как наиболее важной для реализации высших когнитивных функций.

Для оценки достоверности результатов был применен непараметрический критерий Уилкоксона.

Методы нейрохимических исследований

Для нейрохимических исследований контрольных и подвергнутых экспериментальным воздействиям крыс декапитировали через 10 сут, выделяли соответствующие структуры мозга: префронтальную кору, прилежащее ядро (nucleus accumbens), гипоталамус, гиппокамп и стриатум. Структуры мозга замораживали в жидком азоте и взвешивали. Выделенные структуры гомогенизировали при $+4^\circ\text{C}$ в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (0.2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об/мин. В качестве среды гомогенизации и выделения использовали 0.1 Н HClO_4 с добавлением внутреннего стандарта ДОБА (3,4-диоксибензиламин) – вещество катехоламиновой природы, но не встречающегося в нативной ткани, в концентрации 0.5 нмоль/мл. Прилежащее ядро гомогенизировали в 40 объемах, остальные структуры мозга – в 20 объемах среды выделения. Пробы центрифугировали при $+4^\circ\text{C}$, 10000 g в течение 15 мин. Супернатант использовался в дальнейшем для определения моноаминов и их метаболитов.

Концентрацию моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионпарная хроматография) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (BAS, WestLafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125, петля для нанесения образцов – 20 мкл. Изучаемые вещества разделяли на обращенно-фазной колонке Repro-Sil-Pur, ODS-3, 4 × 100 мм, 3 мкм (Dr. Majsch GMBH, “Элсико”, Москва). Насос PM-80 (BAS, США), скорость подвижной фазы 1.0 мл/мин, при давлении 200 атм. Мобильная фаза: 0.1 моль/л цитратно-фосфатный буфер, содержащий 1.1 ммоль/л октансульфоновой кислоты, 0.1 ммоль/л ЭДТА и 9% ацетонитрила (pH = 3.0). Скорость потока 1 мл/мин. Измерение проводили с помощью электрохимического детектора LC-4B (BAS, США) на стеклоугольном электроде (+0.85 V) против электрода сравнения Ag/AgCl. Регистрация образцов проводилась с применением аппаратно-программного комплекса МУЛЬТИХРОМ 1.5 (АМПЕРСЕНД). Все использованные для анализа реактивы были высокой степени чистоты: о.с.ч., х.ч. или analyticalgrade. Для калибровки хроматографа использовали смеси рабочих стандартов определяемых веществ в концентрации 500 пмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали методом “внутреннего стандарта”, исходя из отношений площади пиков в стандартной смеси и в образце. Определяли содержание норадреналина (НА), дофамина (ДА) и его метаболитов – 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), 3-метокситирамина (3-МТ), серотонина (5-окситриптамина, 5-ОТ) и его метаболита – 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК) в пяти структурах мозга: префронтальная кора, прилежащее ядро (nucleus accumbens), гипоталамус, гиппокамп и стриатум.

Результаты нейрохимических исследований выражали в виде средних величин ± стандартная ошибка среднего. Полученные результаты анализировали с помощью односторонней ANOVA и posthoc тест Дункана. Статистически значимым результатом считали величину $p <$ или $= 0.05$. (в таблицах выделены жирным шрифтом). Величину p от 0.05 до 0.099 считали тенденцией изменений (в таблицах выделены жирным *Italic*).

Программа эксперимента утверждена Комиссией по биоэтике ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование тревожности животных в приподнятом крестообразном лабиринте (ПКЛ)

Тестирование всех четырех групп было проведено дважды – в начале и в конце эксперимента, по стандартной методике приподнятого кресто-

образного лабиринта продолжительностью 5 мин. Регистрировались количество перебежек и выходов на открытое пространство, время до первой перебежки и до выхода на открытое пространство, суммарное время нахождения на открытом пространстве.

В первом тесте обнаружилась разница между экспериментальными (А и Е) и контрольными (С и К) животными. Контрольные животные активнее выходили на открытое пространство (всего вышли 14 из 16 контрольных и семь из 16 экспериментальных), проводили там больше времени (10.5 с против 3.7 с соответственно).

Аналогичная разница наблюдалась между группами А и Е: количество вышедших на открытое пространство составило два и пять, суммарное время выхода – 3.3 и 4.0 с соответственно. Результаты показаны на рис. 2.

Вместе с тем статистически достоверных различий между группами в числе перебежек, среднем количестве выходов, латентных периодах обнаружить не удалось.

Во втором тесте выходов на открытое пространство животные из групп С, Е и К не совершали, в группе А вышли только две крысы, поэтому данные о количестве выходов на открытое пространство можно считать случайными.

Вместе с тем число перебежек между рукавами лабиринта во втором тесте достоверно варьировалось: возбудимые крысы продемонстрировали большую активность, нежели тормозные, а облученные – нежели контрольные, что хорошо видно на графике (рис. 3).

Исследование когнитивных функций животных в Y-образном лабиринте

Для тестирования по методике УРАИ была выбрана одна из простейших схем, реализуемых в Y-лабиринте. Условным сигналом служил включающийся в отсеке, где находится крыса, свет; после условного сигнала у крысы было 6 с на переход в отсек, расположенный по часовой стрелке (из А в В, из В в С, из С в А). Если по истечении 6 с крыса не оказывалась в нужном отсеке, то во всех остальных отсеках (включая центральный Х) включается ток. Если по истечении 30 с крыса все же не перешла в требуемый отсек, регистрируется отказ от побежки. После перехода (отказа) включаются свет и ток во всех отсеках и следует 10-секундная пауза.

Обучение проводилось в течение пяти сеансов для каждой крысы, далее по 15 сеансов, в результате чего был сформирован исходный уровень обученности порядка 50% правильных переходов. Далее тестирование повторялось по одному дню с интервалом в месяц, по 15 сеансов для каждого животного, при этом регистрировались: количе-

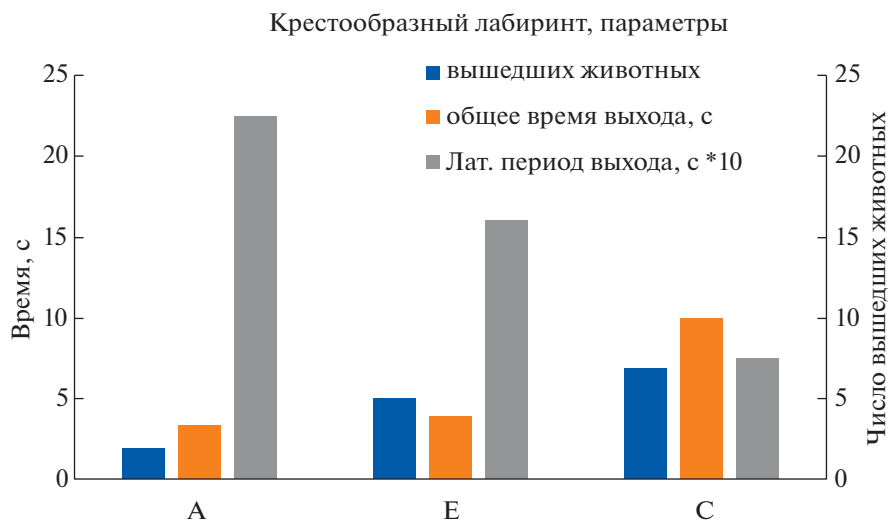


Рис. 2. Показатели выхода крыс в открытый участок ПКЛ, начало эксперимента.
Fig. 2. Indicators of the rats ' output to the open elevated crucial maze (ECM) site, the beginning of the experiment.

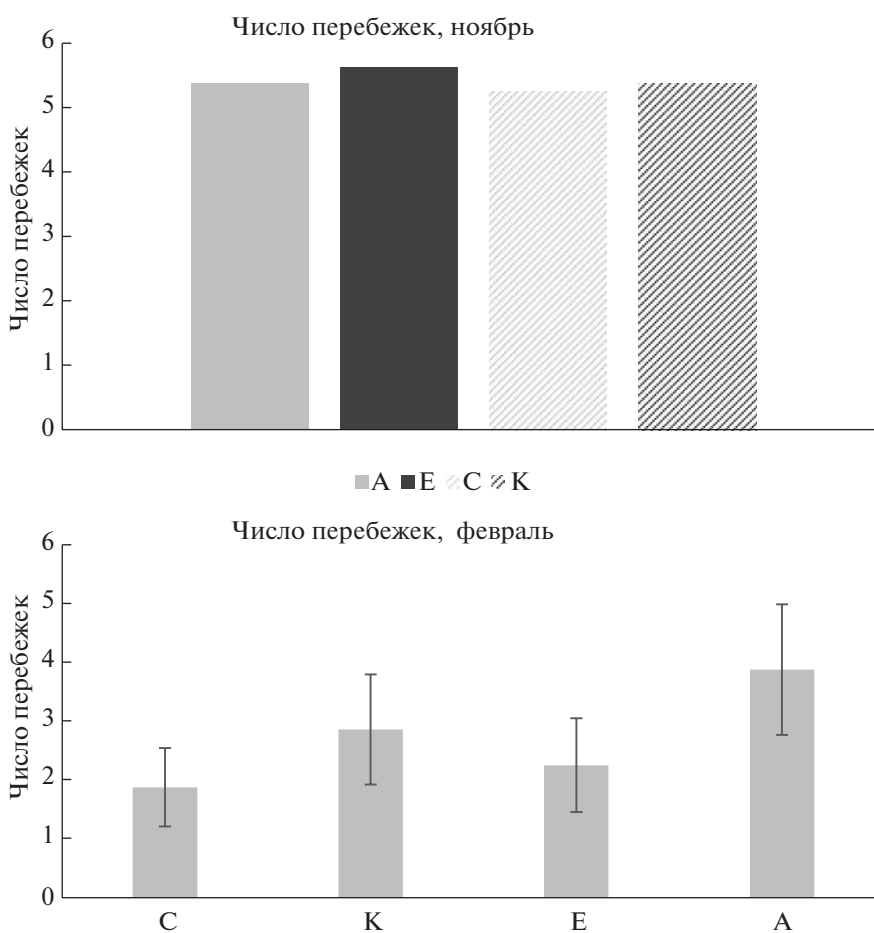


Рис. 3. Число перебежек между отсеками лабиринта в начале и в конце эксперимента.
Fig. 3. The number of runs between the compartments of the ECM at the beginning and at the end of the experiment.

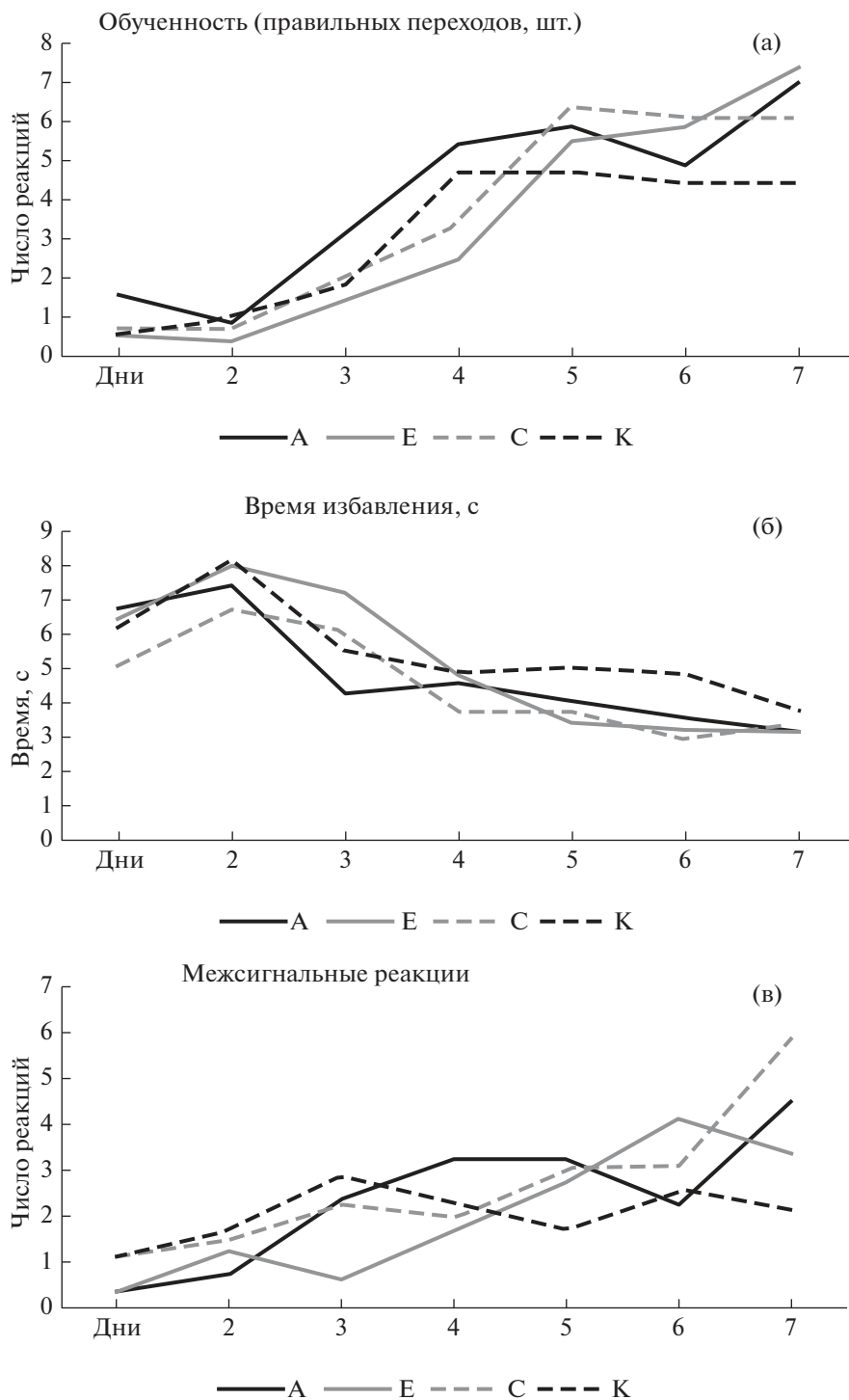


Рис. 4. Результаты обучения крыс в тесте УРАИ в течение всего тестирования.
Fig. 4. The results of training rats in the conditioned reflex of active avoidance (CRAA) test during the entire test.

ство правильных переходов, время избегания (интервал между условным сигналом и правильным переходом; среднее по дню для животного), время избавления (интервал между шоковым сигналом и правильным переходом, среднее по дню

для животного), количество отказов, количество межсигнальных реакций.

Графики, отражающие рост обученности (количества правильных переходов) по группам, а также время избавления приведены на рис. 4.

Можно видеть, что возбудимые крысы группы А за первые четыре дня тестирования достигли уровня обученности 55%, превзойдя остальные группы. Аналогично возбудимые крысы группы К (контроль – “альтруисты”) статистически достоверно превосходили тормозных крыс групп С и Е по обоим параметрам – времени избавления и скорости обучения.

Однако при последующих тестированиях крысы группы А не только медленнее обучались, но и демонстрировали частичную утрату выработанного УРАИ; аналогичный результат показала группа К. Тормозные облученные крысы группы Е демонстрировали практически линейное улучшение показателей вплоть до уровня обученности 74%. В среднем облученные крысы из групп А и Е проходили тест практически идентично с контрольными, продемонстрировав преимущество только на последнем этапе эксперимента, т.е. спустя 3 мес. после воздействий.

Сходные результаты наблюдались в ранее проводившихся тестах УРАИ с использованием “челночной камеры” [15].

Также было подсчитано количество межсигнальных реакций (спонтанных переходов в условиях отсутствия раздражителей) как характеристика генерализованного возбуждения животных, соответствующий график приведен на рис. 4, в.

Значимых различий между группами животных не было выявлено, однако можно видеть общий постепенный рост числа спонтанных перебежек, указывающий, по-видимому, на сохранение повышенной возбудимости животных.

Исследование пространственной памяти и ориентации животных в водном тесте Морриса

Тестирование в водном лабиринте Морриса (далее – ВЛМ) производилось в течение 8 дней. В первые четыре дня платформа была установлена на одном месте, крыс запускали в лабиринт по три попытки в день, с интервалом между попытками 80–90 мин, максимальная длительность одной попытки – 60 с. Животное запускалось на каждую попытку с нового места, соответственно, ориентирование производилось по внешним ориентирам. Регистрировалось время, затраченное на отыскание платформы, если 60 с не хватало для отыскания, то экспериментатор показывал платформу указкой, а время засчитывалось как 60 с.

На пятый день платформа была перемещена на другое место и в течение 4 дней производилась переделка выработанного навыка при всех прочих идентичных условиях. Все тесты записывались на видео и анализировались при помощи ПО Bonsai.

Ввиду задействования в ранее описанной методике УРАИ элементов пространственного ори-

ентирования и, как следствие, заметной схожести методик УРАИ и ВЛМ в части гиппокамп-зависимых форм поведения, полученные результаты оказались ожидаемо схожи. Следует, однако, напомнить, что испытания по методике УРАИ проводились на протяжении 6 мес. и отражают процессы восстановления ЦНС после воздействий, тогда как тест ВЛМ был выполнен фактически единоразово и больше отражает установившееся состояние ЦНС и отдаленные последствия воздействий.

Результаты обучения в ВЛМ (первые четыре дня) приведены на рис. 5, а. Значимых различий не выявляется, однако можно заметить, что возбудимые крысы групп А и К обучаются несколько быстрее тормозных Е и С.

Переделка навыка в ВЛМ (рис. 5, б) является более сложным тестом и ожидаемо привела к более интересному результату. В частности, достоверно выявлена разница между группами А и Е, причем тормозные крысы группы Е обучались успешнее, как и в тесте УРАИ. Также из графика видно, что в первый день после перемещения платформы возбудимые крысы справились с задачей ее отыскания лучше – это указывает на их более высокую активность в поиске, в частности, меньшей процент дрифта и большую среднюю скорость (по данным, полученным с помощью видеонаблюдения).

Энцефалографические исследования

Регистрация ЭЭГ происходила спустя 7 мес. после облечения.

После пятидневного периода адаптации после операции производилась рутинная суммарная запись ЭЭГ в свободном поведении в домашней клетке в течение 1 ч. Частота оцифровки составила 565 Гц. Последующая обработка записей произведена в программах Powergraph3, EDFbrowser, Excel10 и Statistica8. Для визуального сравнения всех часовых записей строились спектральные плотности в программе EDFbrowser. Далее выбиравались и анализировались отрезки без артефактов длительностью 10 с. По данным отрезкам строились спектры мощности, определялись частота и амплитуда наибольшего пика. Значения амплитуд и частот сохранялись для дальнейшей обработки в Excel. Общий анализ средних амплитуд и частот позволил определить наличие изменений в префронтальной коре. Последующий анализ проводился в рамках диапазонов основных ритмов:

- δ (1–4 Гц);
- τ (5–7 Гц);
- α (8–12 Гц).

Также оценивалась процентная доля каждого во всей записи. Наиболее важны значения, полу-

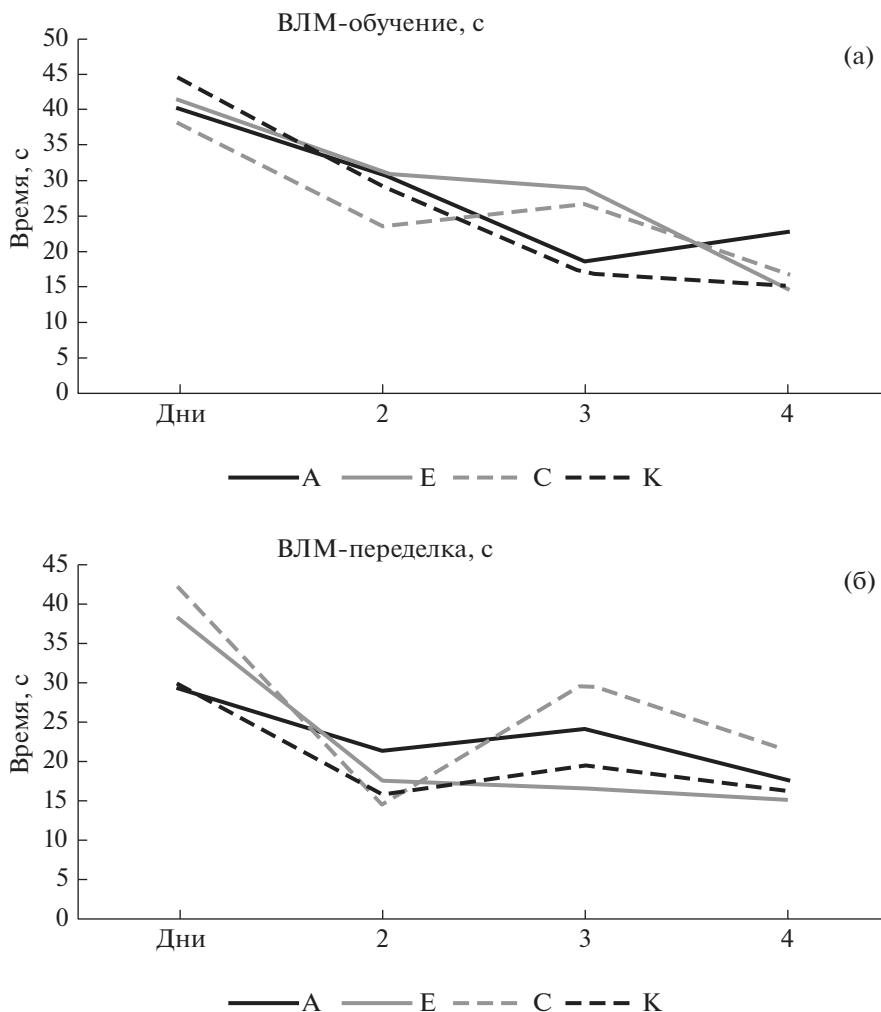


Рис. 5. Первоначальное обучение и переделка навыка в водном лабиринте Морриса.
Fig. 5. Initial training and reworking of the skill in the Morris water maze.

ченные для префронтальной коры, как ключевого участка реализации высших когнитивных функций.

У всех животных наблюдалась визуально нормальная картина ЭЭГ: при визуальном анализе записей никаких отклонений на ЭЭГ обнаружено не было, абсансная активность отсутствовала. Визуальный анализ спектральных плотностей показал предположительно более частую смену ритмов у облученных животных. Примеры спектральной плотности представлены на рис. 6 (здесь и далее – сигнал из области префронтальной коры).

Пример спектра, построенного на основе отрезка записи без артефактов длительностью в 10 с, представлен на рис. 7 (вверху дан общий вид окна программы, далее общий вид графика сигнала и на нижнем графике – спектр крупно; хорошо виден пик на частоте α -ритма 8.33 Гц).

Сравнение средних амплитуд и частот по записям, очищенным от артефактов, но не разделенным на ритмы, представлен на рис. 8. Легко видеть статистически значимые различия между группами животных С (контроль), А (альтруисты) и Е (эгоисты).

В связи с большим разбросом данных в группе Е и наличием большого количества записей с артефактами, для анализа спектров в рамках различных ритмов, группы А и Е объединены в одну общую группу “облученные животные”.

При сравнении процентного соотношения преобладающих ритмов (в рамках всех записей животных каждой из групп) значимых различий не было обнаружено. Наблюдались незначимые тенденции, заключающиеся в увеличении доли δ -ритма у облученных животных по сравнению с контролем.

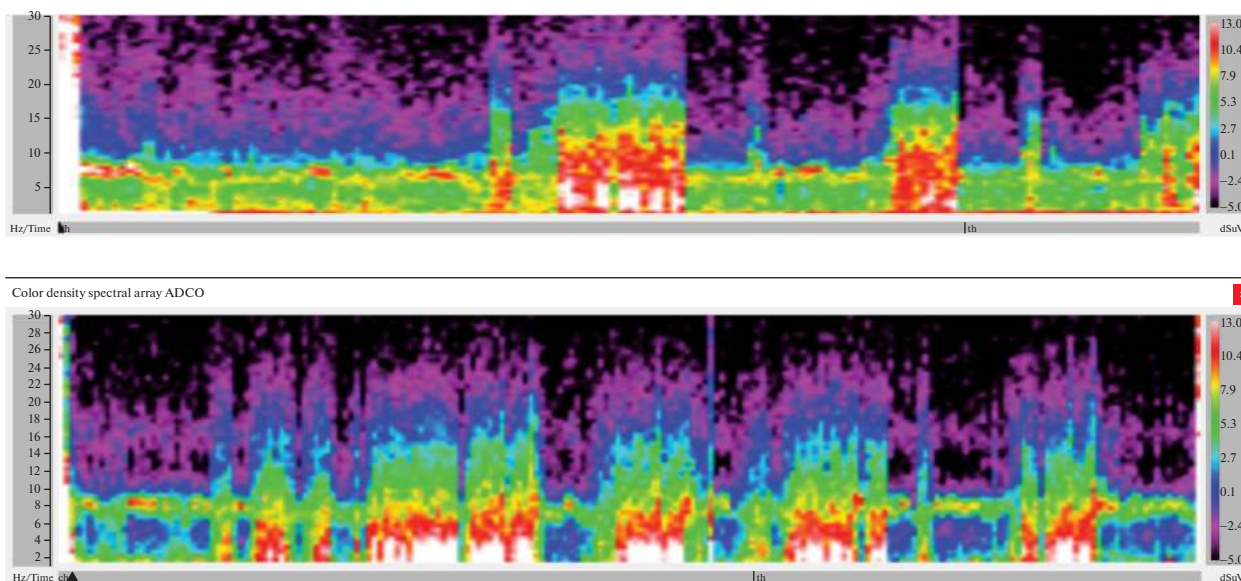


Рис. 6. Спектральная плотность записи контрольного животного.

Fig. 6. Spectral density of the recording of the control animal.

Также следует отметить смену доминирующего ритма в группе облученных животных. Так, у контрольных животных доминирующим оказывается τ -ритм, в то время как у облученных животных доминирует δ -ритм.

При сравнении средних значений амплитуд и частот в диапазонах различных ритмов наблюдаются статистически значимые изменения для δ - и τ -ритмов, показанные на рис. 9–11. Наблюдались незначимые тенденции, заключающиеся в увеличении доли δ -ритма у облученных животных по сравнению с контролем.

Также следует отметить смену доминирующего ритма в группе облученных животных. Так, у контрольных животных доминирующим оказывается τ -ритм, в то время как у облученных животных доминирует δ -ритм.

При сравнении средних значений амплитуд и частот в диапазонах различных ритмов наблюдались статистически значимые изменения для δ - и τ -ритмов, показанные на рис. 10 и 11.

Видно, что средняя частота δ -ритма у облученных животных меньше, при этом амплитуда больше. В то же время для τ -ритма у облученных животных ниже и частота, и амплитуда.

В области α -ритма наблюдалось небольшое снижение частоты (у облученных) и выраженное снижение амплитуды. Поскольку процент α -ритма относительно всех остальных других ритмов наименьший, различие в частотах получается незначимым.

Значимое смещение частот в области всех ритмов свидетельствует о нарушении электрофизио-

логической активности головного мозга, что соотносится с исследованием группы Агуари [17]. Кроме того, наблюдаются некоторые незначимые тенденции, заключающиеся, в частности, в увеличении доли δ -ритма у облученных животных по сравнению с контролем.

Нейрохимические исследования

Нейрохимические исследования включали следующие показатели (концентрации нейромедиаторов и их метаболитов):

- норадреналина (NA, НА);
- дофамина (DA, ДА);
- серотонина (5-НТБ 5-ОТ);
- 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НИАА, 5-ОИУК);
- гомованилиновой кислоты (HVA, ГВК);
- 3-метокситирамина (ЗМТ);
- диоксифенилуксусной кислоты (DOPAC, ДОФУК).

Для исследования были взяты фронтальная кора, гипоталамус и таламус головного мозга.

Наиболее существенные различия между экспериментальными группами были обнаружены в таламусе в концентрациях:

- норадреналина (2.804 гр. Е, 3.139 гр. А, 2.412 гр. С, t -критерий 0.016);
- ГВК (0.088, 0.181 и 0.092 соответственно, t -критерий 0.008).

В свою очередь, соотношения концентрации метаболитов к исходным веществам составляют:

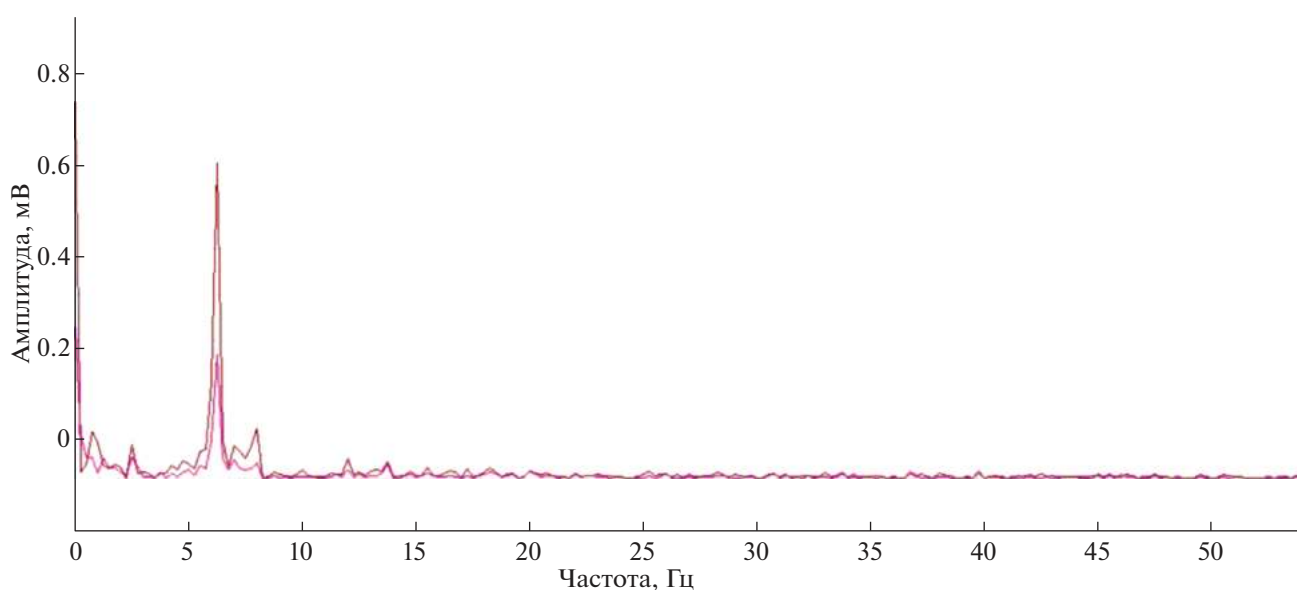
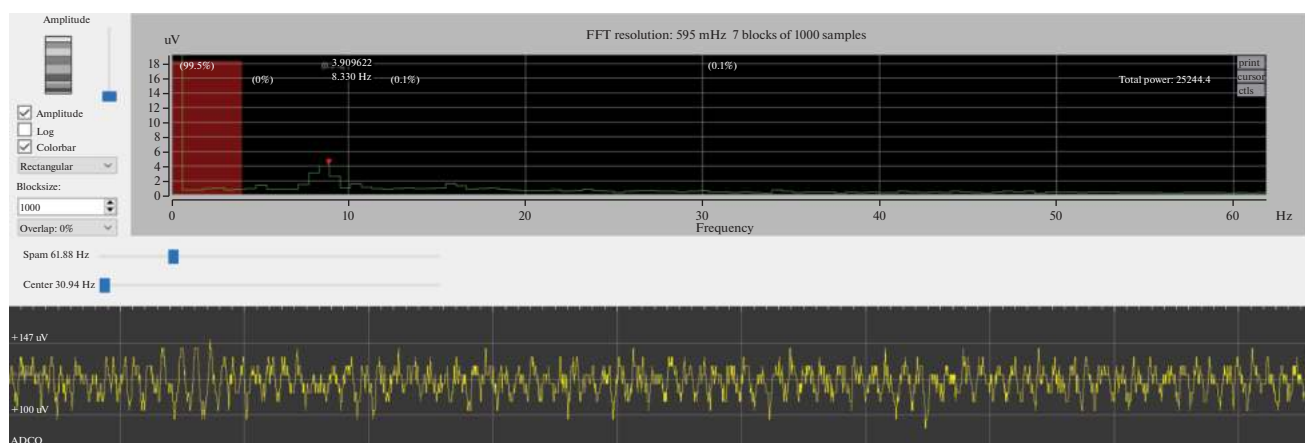


Рис. 7. Примеры спектров и отрезок записи длительностью 10 с.
 Fig. 7. Examples of spectra and a 10-second recording segment.

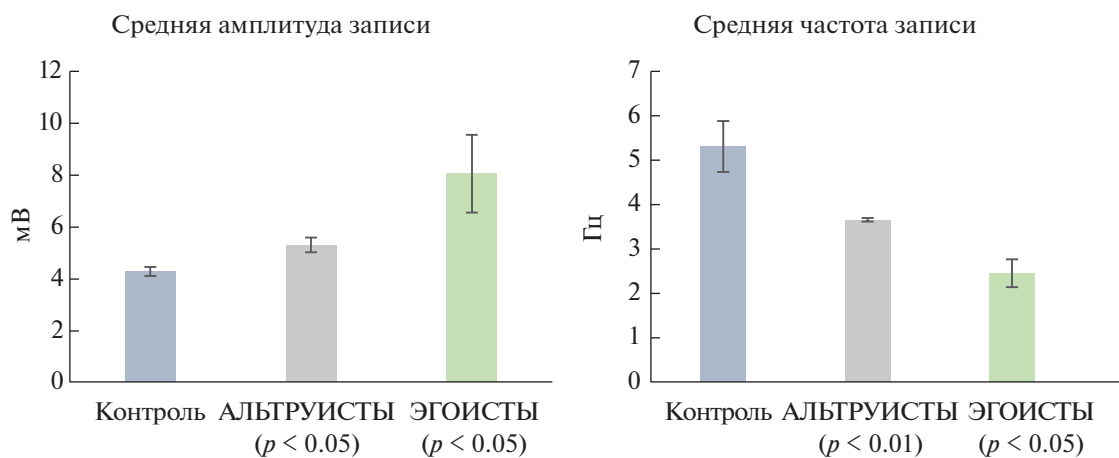


Рис. 8. Сравнение средних амплитуд и частот по записям.
 Fig. 8. Comparison of average amplitudes and frequencies by recordings.

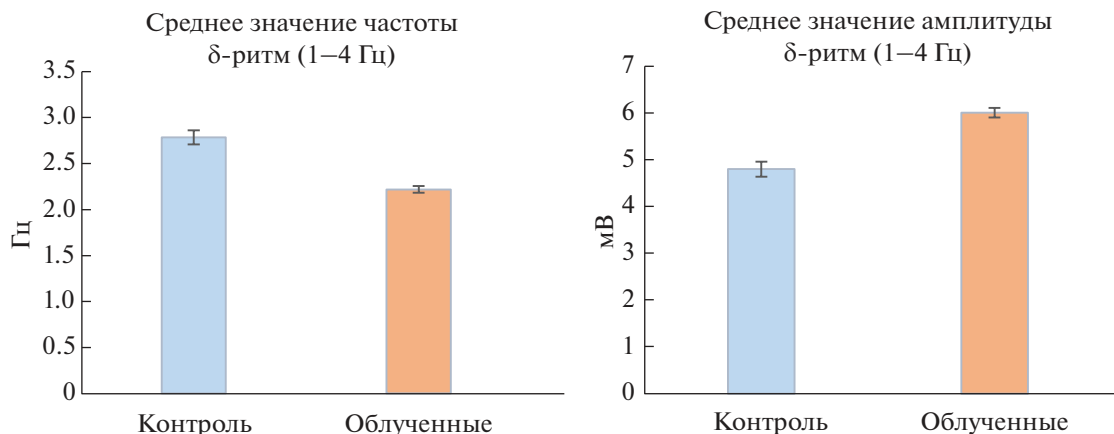


Рис. 9. Средние значения частот и амплитуд в области δ -ритма.

Fig. 9. Average values of frequencies and amplitudes in the δ -rhythm region.

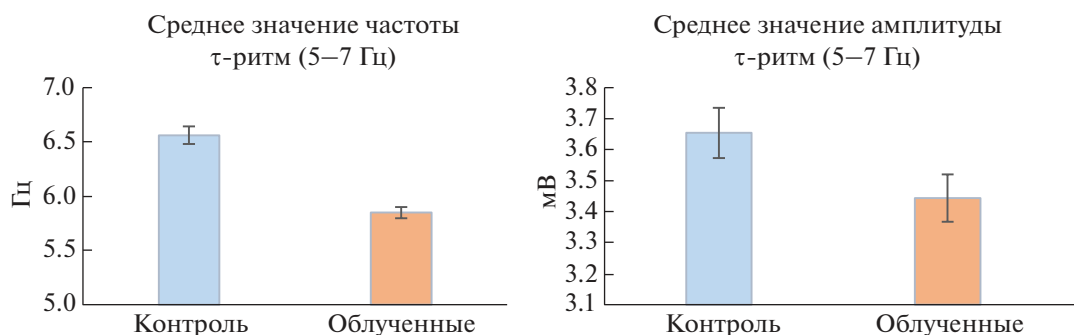


Рис. 10. Сравнение средних частот и амплитуд τ -ритма.

Fig. 10. Comparison of the average frequencies and amplitudes of the τ -rhythm.

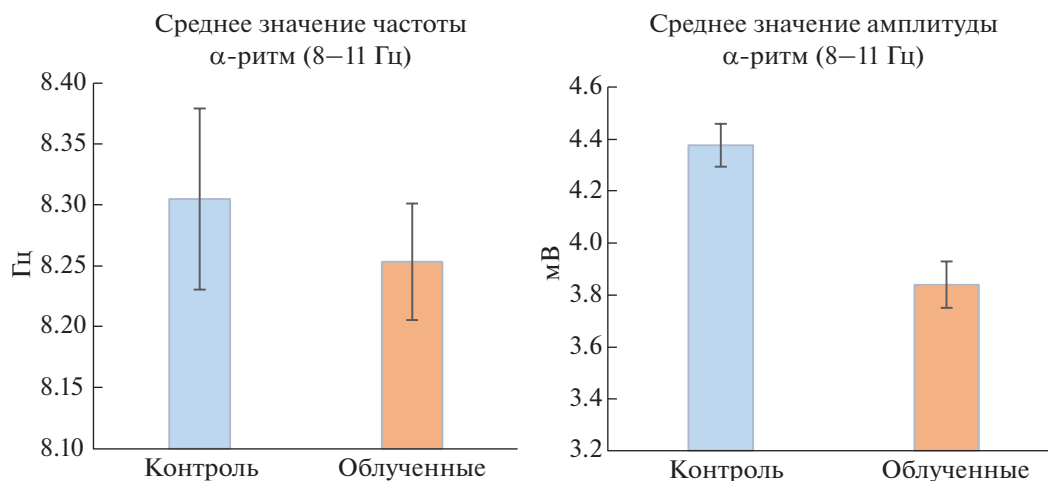


Рис. 11. Сравнение средних частот и амплитуд α -ритма.

Fig. 11. Comparison of the average frequencies and amplitudes of the α -rhythm.

– ГВК/ДА – 0.085, 0.239 и 0.118 у групп Е, А и С соответственно;

– 5-ОИУК/5-ОТ – 0.637, 0.719 и 0.580 соответственно.

Более полные данные приведены в табл. 2 (сверху вниз – группы E, A и C).

ОБСУЖДЕНИЕ

Тестирование крыс в ПКЛ показало, что экспериментальные воздействия приводят к повышению тревожности, различия между типологическими группами отчетливо выявляются в данном тесте. Эти различия, как между экспериментальными и контрольными животными, так и между крысами разных типологических групп, сохраняются через 6 мес. после экспериментальных воздействий.

По-видимому, такие результаты свидетельствуют, во-первых, о более высокой динамике нервных процессов у крыс группы А в сравнении с группой E, а во-вторых – о влиянии в долгосрочной перспективе регенерационных процессов в нервной ткани у облученных крыс (в сравнении с необлученными С и К).

Как результаты исследования поведения крыс в “открытом поле”, так и возрастающее число межсигнальных реакций при воспроизведении УРАИ в Y-образном лабиринте свидетельствуют о длительном сохранении повышенного уровня возбуждения в результате примененных воздействий. Этим можно объяснить также более успешное сохранение и воспроизведение УРАИ и более успешное обучение в тесте Морриса крыс с преобладанием торможения.

Исходя из проведенного анализа, мы видим существенные изменения в электрофизиологической активности мозга крыс даже спустя полгода после облучения. Наличие подобной длительной чувствительности было показано у людей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения. Заметим также, что пороговыми для отдаленных последствий считаются относительно небольшие дозы в 0.1–1.3 Гр. [15, 16].

Стоит отметить, что Л.П. Жаворонков и соавт. отмечают изменения коэффициента когерентности у лиц, подвергшихся ионизирующему облучению, таким образом в дальнейшем стоит использовать более детальную запись ЭЭГ с множествами отведений, для оценки и этого параметра [15].

По-видимому, животные группы А, более возбудимые и проявляющие более высокий уровень “социализации” в камере Симонова, обладают повышенным метаболизмом нейромедиаторов. Также на метаболизм, скорее всего, влияют (в сторону ускорения) процессы, вызванные регенерацией нервной ткани после облучения. Повышенный метаболизм, в свою очередь, ускоряет как формирование навыков – в частности, в тесте УРАИ – так и их утрату.

Более высокий метаболизм нейромедиаторов должен провоцировать и более высокий общий

Таблица 2. Содержание моноаминов в таламусе, нмоль/г ткани; сверху вниз – группы E, A и C
Table 2. The content of monoamines in the thalamus, nmol/g of tissue; from top to bottom – groups E, A and C

Масса	NA	DOPAC	DA	5-HIAA	HVA
83	3.3757	0.1622	1.1377	1.6255	0.1746
127	2.5028	0.1281	0.7257	1.2549	0.0570
126	2.8057	0.1728	1.1002	1.9206	0.1126
112	2.5307	0.1938	1.1106	1.6286	0.0069
х средн	2.804	0.164	1.019	1.607	0.088
ст.ош.ср.	0.175	0.012	0.085	0.118	0.031
T-тест	0.195	0.072	0.096	0.243	0.905
103	3.3447	0.1280	0.9614	2.1010	0.2392
122	2.9114	0.1373	0.7984	1.7370	0.1555
98	3.4952	0.1758	0.7656	2.1374	0.2086
108	3.2814	0.1460	0.6935	1.5838	0.1662
133	2.6646	0.1185	0.5631	1.2861	0.1350
х средн	3.139	0.141	0.756	1.769	0.181
ст.ош.ср.	0.137	0.009	0.058	0.143	0.017
T-тест	0.016	0.396	0.714	0.086	0.008
129	2.5251	0.1318	0.8962	0.9240	0.1278
167	1.9751	0.0939	0.6148	1.2465	0.1055
127	2.4687	0.1415	0.7751	1.6513	0.0349
145	3.0091	0.1183	0.6774	1.5526	0.0788
139	2.0808	0.1558	1.0008	1.4571	0.1147
х средн	2.412	0.128	0.793	1.366	0.092
ст.ош.ср.	0.164	0.009	0.063	0.116	0.015

тонус организма, что хорошо согласуется с данными, полученными в ходе тестов, не требующих обучения, таких как приподнятый крестообразный лабиринт.

Изменения в концентрации моноаминов и их метаболитов в структурах мозга (при декапитации животных после предпринятых воздействий) были показаны многократно, в частности, после облучения крыс ионами углерода ¹²C [7–10], но не в качестве отдаленных последствий. Аналогичные изменения происходили у крыс через 1 сут после облучения протонами высоких энергий как на пролете [19], так и в пике Брэгга [20].

Таким образом, отдаленные последствия примененных воздействий в наибольшей степени сказались на активности дофаминергической системы в таламусе. Таламус осуществляет важные функции, связанные с ретрансляцией информации, поступающей от сенсорных систем к коре, а также играет важную роль в регуляции концентрации внимания. Это необходимо учитывать

при оценке риска возможных нарушений в ЦНС в межпланетном полете.

Полученные данные хорошо сочетаются с данными работы [18], демонстрирующей существенные различия в метаболизме дофамина и серотонина у мышей в зависимости от социальной активности.

Работа выполнена в рамках темы РАН 65.2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B.* Heavy particle irradiation, neurochemistry and behavior: threshold, dose-response curves and recovery of function // *Adv. Space Res.* 2004. № 33. P. 1330–1333.
2. *Rabin B.M., Joseph J.A., Shukitt-Hale B.* A longitudinal study of operant responding in rats irradiated when 2 months old // *Radiat. Res.* 2005. № 64. P. 552–555.
3. *Britten R.A., Davis L.K., Johnson A.M. et al.* Low (2 cGy) doses of ^{56}Fe -particle radiation leads to a persistent reduction in the spatial learning ability of rats // *Radiat. Res.* 2012. № 177. P. 146–151.
4. *Machida M., Lonart G., Britten A.* Low (60 cGy) doses of ^{56}Fe HZE-particle radiation lead to a persistent reduction in the glutamatergic readily releasable pool in rat hippocampal synaptosomes // *Radiat. Res.* 2010. № 174. P. 618–623.
5. *Shtemberg A.S., Lebedeva-Georgievskaya K.B., Matveeva M.I. et al.* Effect of space flight factors simulated in ground-based experiments on the behavior, discriminant learning, and exchange of monoamines in different brain structures of rats // *Biol. Bull.* 2014. V. 41. № 2. P. 161–167.
6. *Штемберг А.С.* Проблемы экспериментального исследования комбинированного действия факторов космического полета на функции организма животных // *Рос. физиол. журн.* 2014. Т. 100. № 10. С. 1152–1168. [*Shtemberg A.S.* Problems of experimental research of the combined effect of space flight factors on the functions of the animal body // *Rus. Physiol. J.* 2014. V. 100. № 10. P. 1152–1168 (In Russ.)]
7. *Kokhan V.S., Matveeva M.I., Bazyan A.S. et al.* Combined effects of antiorthostatic suspension and ionizing radiation on the behaviour and neurotransmitters changes in different brain structures of rats // *Behav. Brain Res.* 2017. № 320. P. 473–483.
8. *Ushakov I.B., Shtemberg A.S., Krasavin E.A. et al.* Effects of space radiation and combined impact of radiation and other spaceflight factors on CNS in model experiments on animals // *Biol. Bull. Rev.* 2019. V. 9. P. 93–104.
9. *Kokhan V.S., Lebedeva-Georgievskaya K.B., Kudrin V.S. et al.* An investigation of the single and combined effects of hypogravity and ionizing radiation on brain monoamine metabolism and rats' behavior // *Life Sci. Space Res.* 2019. V. 20. № 1. P. 12–19.
10. *Лебедева-Георгиевская К.Б., Кохан В.С., Шуртакова А.К. и др.* Нейробиологические эффекты комбинированного воздействия антиортостатического вывешивания и ионизирующих излучений различного качества // *Нейрохимия.* 2019. Т. 36. № 3. С. 254–264. [*Lebedeva-Georgievskaya K.B., Kohan V.S., Shurtakova A.K. et al.* Neurobiological effects of combined exposure to anti-orthostatic hanging and ionizing radiation of various quality // *Neurochemistry.* 2019. V. 36. № 3. P. 254–264 (In Russ.)]
11. *Григорьев Ю.Г.* Лучевые поражения и компенсация нарушенных функций. М.: Госатомиздат, 1963. 123 с. [*Grigoriev Yu.G.* Radiation injuries and compensation of impaired functions. M.: Gosatomizdat, 1963. 123 p. (In Russ.)]
12. *Лившиц Н.Н.* Влияние ионизирующих излучений на функции центральной нервной системы. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 145 с. [*Livshits N.N.* Influence of ionizing radiation on the functions of the central nervous system. M.: Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1961. 145 p. (In Russ.)]
13. *Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Шафиркин А.В.* Реактивность и резистентность организма млекопитающих. Принципы формирования, регуляции и прогнозирования. М.: Наука, 2007. 493 с. [*Ushakov I.B., Shtemberg A.S., Shafirkin A.V.* Reactivity and resistance of the mammalian organism. Principles of formation, regulation and forecasting. M.: Nauka, 2007. 493 p. (In Russ.)]
14. *Shtemberg A.S., Perevezentsev A.A., Lebedeva-Georgievskaya K.B. et al.* The Role of Typological Characteristics of Higher Nervous Activity in Rats in the Neurobiological Effects of Combined Exposure to an Antiorthostatic Suspension, γ -Rays, Protons, and Carbon 12C Ions // *Biol. Bull.* 2020. V. 47. № 11. P. 37–45.
15. *Жаворонкова Л.А., Лаврова Т.П., Белостоцкий А.В.* Пострадиационные нарушения регионарно-частотных характеристик когерентности ЭЭГ при когнитивной деятельности (последствия аварии на Чернобыльской АЭС) // *Журн. высш. нервн. деятельности им. И.П. Павлова.* 2006. № 2. С. 193–201. [*Zhavoronkova L.A., Lavrova T.P., Belostotsky A.V.* Deviation violations of regional frequency characteristics of EEG coherence in cognitive activity (consequences of the Chernobyl accident) // *Journal of Higher Nervous Activity named after I. P. Pavlov.* 2006. № 2. P. 193–201 (In Russ.)]
16. *Логановский К.Н.* Неврологические и психопатологические синдромы в отдаленном периоде воздействия ионизирующих излучений // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2000. № 4. С. 15–21. [*Loganovsky K.N.* Neurological and psychopathological syndromes in the long-term period of exposure to ionizing radiation // *Journal of Neurology and Psychiatry named after S.S. Korsakov.* 2000. № 4. P. 15–21 (In Russ.)]
17. *Aguiar L.A.A., Silva I.M.S., Fernandes T.S., Nogueira R.A.* Long-term correlation of the electrocorticogram as a bioindicator of brain exposure to ionizing radiation // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2015. V. 48. № 10. P. 915–922.
18. *Карпова И.В., Михеев В.В., Бычков Е.Р. и др.* Асимметрия в уровнях моноаминов в головном мозге мышей линии BALB/c, выращенных в условиях социальной изоляции. // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2012. Т. 10. № 4. [*Karpova I.V., Mikheev V.V., Bychkov E.R. et al.* Asymmetry in the levels of monoamines in the brain of BALB/c mice raised in conditions of social isolation //

- Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy. 2012. V. 10. № 4 (In Russ.)]
19. *Штемберг А.С., Базян А.С., Лебедева-Георгиевская К.Б. и др.* Влияние облучения протонами высокой энергии на поведение крыс и его нейрохимические механизмы // Авиакосм. и экол. медицина. 2013. Т. 47. № 6. С. 54–60. [*Shtemberg A.S., Bazyan A.S., Lebedeva-Georgievskaya K.B. et al.* The effect of high-energy proton irradiation on rat behavior and its neurochemical mechanisms // *Aviakosm. and Ecol. the Medicine*. 2013. V. 47. № 6. P. 54–60 (In Russ.)]
20. *Shtemberg A.S., Kokhan V.S., Kudrin V.S. et al.* The effect of high-energy protons in Bragg peak on the exchange of monoamines in some brain structures // *Neurochem. J.* 2015. V. 9. № 1. P. 66–72.

Long-Term Neurobiological Effects of Combined Exposure to Anti-Orthostatic Hanging and Ionizing Radiation

**K. B. Lebedeva-Georgievskaya^a, A. A. Perevezentsev^a, O. S. Kuznetsova^a, V. S. Kudrin^{a,b},
A. A. Masanova^a, and A. S. Shtemberg^{a,#}**

^a*State Scientific Center of the Russian Federation – Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*V.V. Zakusov Research Institute of Pharmacology Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia*

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

A study of the long-term consequences of the combined effect of synchronous quasi-chronic γ -irradiation and anti-orthostatic suspension (AOS) with further irradiation of the head of rats with carbon ^{12}C ions, taking into account the typological characteristics of higher nervous activity (HNA) of experimental animals, was carried out. It is shown that within 6 months the integrative effects of the studied effects are quite successfully leveled. At the same time, significant differences related to the typological characteristics of animals persist in the long term. The study of the spectral and amplitude-frequency characteristics of the EEG of rats after these effects was carried out. Significant differences in the average amplitudes and frequencies of the EEG were revealed in animals with different typological characteristics of the HNA. The change of the dominant rhythm in animals subjected to experimental influences is shown. Thus, in control animals, the τ -rhythm is dominant, while in irradiated animals, the δ -rhythm dominates. The most important result was the registered significant changes in the electrophysiological activity of the rat brain even six months after irradiation. A significant frequency shift in the area of all rhythms indicates a long-term violation of the electrophysiological activity of the brain. The results of neurochemical studies revealed significant differences in the metabolism of monoamines in key brain structures of animals with different typological characteristics of HNA, combined with their manifestation at the integrative level (in animal behavior).

Keywords: combined exposure, γ -irradiation, carbon ions, long-term effects, EEG, animal behavior, monoamine balance in the brain