

## ВЛИЯНИЕ КРАНИАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ 170 МэВ В ДОЗЕ 5 Гр НА ЗРИТЕЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И ОПТОМОТОРНЫЙ ОТВЕТ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС

© 2019 г. Ю. С. Северюхин<sup>1,4,\*</sup>, Т. Б. Фельдман<sup>2,3</sup>, М. А. Островский<sup>1,2,3</sup>, А. Г. Молоканов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия

<sup>2</sup>Кафедра молекулярной физиологии Биологического факультета,  
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>Кафедра биофизики факультета естественных и инженерных наук,  
Государственный университет "Дубна", Дубна, Россия

\*E-mail: yuscucumber@mail.ru

Поступила в редакцию 25.12.2018 г.

Произведена оценка оптомоторного рефлекса и зрительного поведения у крыс, подвергнутых воздействию протонами в дозе 5 Гр. Для оценки визуальной функции использовали оборудование, которое включало платформу и дисплей с визуальной стимуляцией. Обнаружены некоторые поведенческие изменения, индуцированные у крыс при краниальном облучении протонами с энергией 170 МэВ. Краниальное воздействие протонами на животных не привело к статистически значимому снижению оптомоторного ответа (отношения корректных и некорректных поворотов головы) у крыс на 30-е и 90-е сутки после облучения. Однако в отдаленный период после облучения были обнаружены статистически значимые изменения в зрительном поведении облученных животных. Установлено, что на 90-е сутки после облучения общее время пребывания головы животного в области, в которой оно способно сосредоточить внимание на визуальном стимуле, меньше у облученных животных.

**Ключевые слова:** крысы, оптомоторный ответ, зрение, поведенческие реакции, протоны

**DOI:** 10.1134/S0869803119050126

Изучение влияния корпускулярных видов излучений на зрительную функцию животных и человека является важной задачей общей и космической радиобиологии. Возможные нарушения в операторской деятельности космонавта, обусловленные полной или частичной утратой зрения в результате повреждения сетчатки или образования радиационной катаракты, а также возможные нарушения со стороны ЦНС могут поставить под угрозу успешное выполнение всей космической миссии [1, 2]. Выявленные молекулярные и клеточные нарушения в головном мозге, сетчатке, хрусталике при действии ионизирующего излучения свидетельствуют о специфической чувствительности зрительной системы на подобного рода воздействия [3–5]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о связи выявленных нарушений с непосредственной реализацией функций зрительного восприятия в форме изменения поведенческих реакций, зрительных рефлексов. Большинство публикаций о влиянии протонного излучения на поведенческие реакции крыс описывают применение поведенческих тест-систем

для анализа процессов обучения, воспроизведения навыков, тревожности и локомоции [6–9]. Исследования же поведения, основанного на зрительном восприятии, были проведены впервые.

Для оценки остроты зрения у крыс и мышей принято проводить измерение параметров оптомоторной реакции [10, 11]. Данный метод основан на отслеживании движений головы животного при предъявлении визуального стимула с различным уровнем контраста. В настоящем исследовании был проведен сравнительный анализ оптомоторного ответа и концентрации внимания у облученных и интактных животных на 30-е и 90-е сутки после облучения.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

*Лабораторные животные.* В эксперименте было использовано 11 аутбредных крыс SD (самцы, возраст на момент облучения – 12 нед), приобретенных в питомнике лабораторных животных "Пушино". За месяц до облучения животные были разделены на две группы: контрольная группа



Рис. 1. Расположение животных во время облучения.  
Fig. 1. Position of animals during irradiation.

(5 особей) и группа облученных животных (6 особей). Животных содержали на стандартном рационе со свободным доступом к воде и корму. Содержание и все процедуры над животными выполнялись в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и “Международным рекомендациям по проведению биомедицинских исследований с использованием животных” Совета международных медицинских организаций (CIOMS), Женева 1985 г.

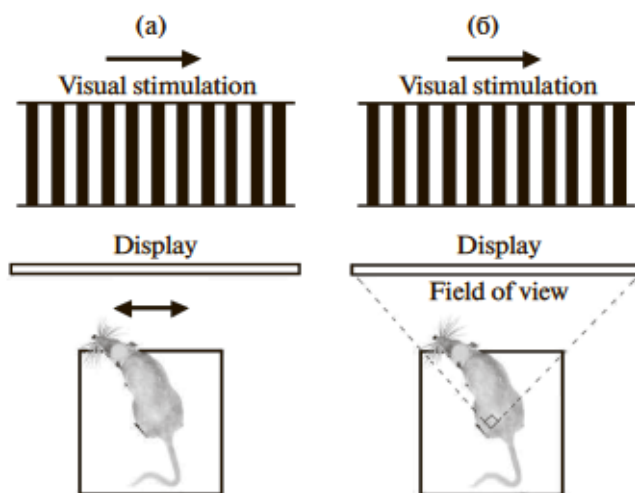


Рис. 2. Схема установки для тестирования зрительно-оптомоторного поведения крыс: (а) – анализ оптомоторных реакций, (б) – анализ параметров зрительного поведения.  
Fig. 2. Assessment of optomotor response (ratio from left to right and right to left (a) and visual behavior (tracking color head mark in “Field of view” (The triangular area, the lines to the sides of the display which form an angle of 90 degrees with the center of the platform) (b) of rats.

Крысы контрольной группы подвергались тем же процедурам (транспортировка, помещение в контейнеры, стресс), что и животные экспериментальной группы, за исключением самого облучения. Анестезирование не проводилось.

**Облучение.** Облучение протонами с энергией 170 МэВ проводили на протонном пучке фазотрона ЛЯП ОИЯИ. Доза на выходе пучка составляла 5 Гр. Мощность дозы – 1 Гр/мин. Поток частиц на выходе из коллиматора был равен  $1,276 \times 10^9$  частиц/см<sup>2</sup>. Дозиметрическую калибровку проводили ионизационной камерой ТМ30013 клинического дозиметра РТW UNIDOS-E. Облучению были подвергнуты только головы животных. В момент облучения животные располагались в пластиковых фиксирующих контейнерах, расположенных на специализированной рамке (рис. 1).

**Оценка зрительного поведения и оптомоторного ответа.** На 30-е и 90-е сутки после облучения крысы прошли предварительную адаптацию к лабораторной комнате, также была произведена маркировка голов животных раствором пикриновой кислоты за день до тестирования. Для оценки зрительного поведения животных помещали на специальную платформу (16 × 17 см), ограниченную тремя стенками (высота 15 см), сверху на платформу было установлено прозрачное стекло с целью ограничить перемещение животного за пределы установки. На расстоянии 20 см от центра платформы был установлен монитор HP 221 Series Wide LCD с частотой 60 Гц, разрешением 1920 × 1080. Видеосъемку проводили на видеокамеру Huawei Honor 13 Mpx (диафрагма F2.0, угол 27 мм), закрепленную на штативе. Схема установки представлена на рис. 2. Изменение коэффициента контраста проводили при помощи программного обеспечения Gamma Panel 1.0.0. 20. Освещенность на момент тестирования – 400 люкс.

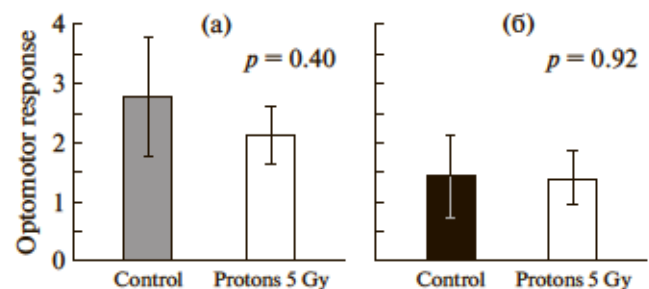


Рис. 3. Среднее значение оптомоторного ответа у крыс за все время тестирования (240 с) на 30-е и 90-е сутки после краниального облучения: (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

Fig. 3. Optomotor response in rats for the whole time of testing (240 s) after cranial irradiation: (a) – 30 days after irradiation, (b) – 90 days after irradiation.

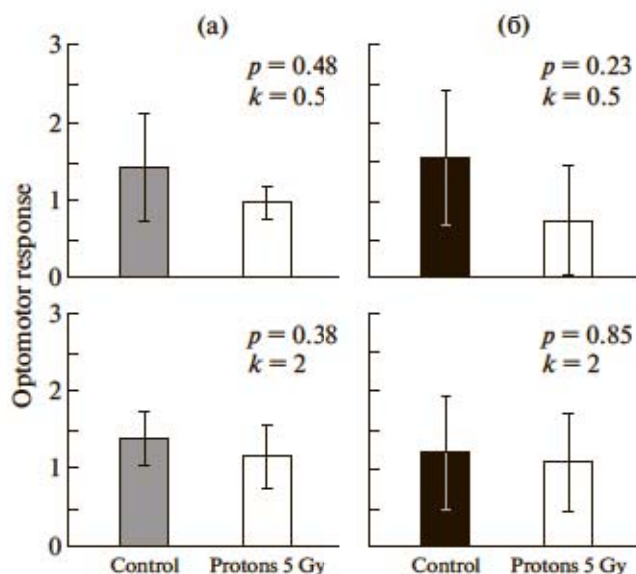


Рис. 4. Среднее значение оптомоторного ответа при различном значении коэффициента контраста зрительного стимула на 30-е и 90-е сутки после краниального облучения: (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

Fig. 4. Optomotor response with various contrast ratio after proton cranial irradiation 5 Gy: (a) – 30 days after irradiation, (b) – 90 days after irradiation;  $k$  – contrast ratio.

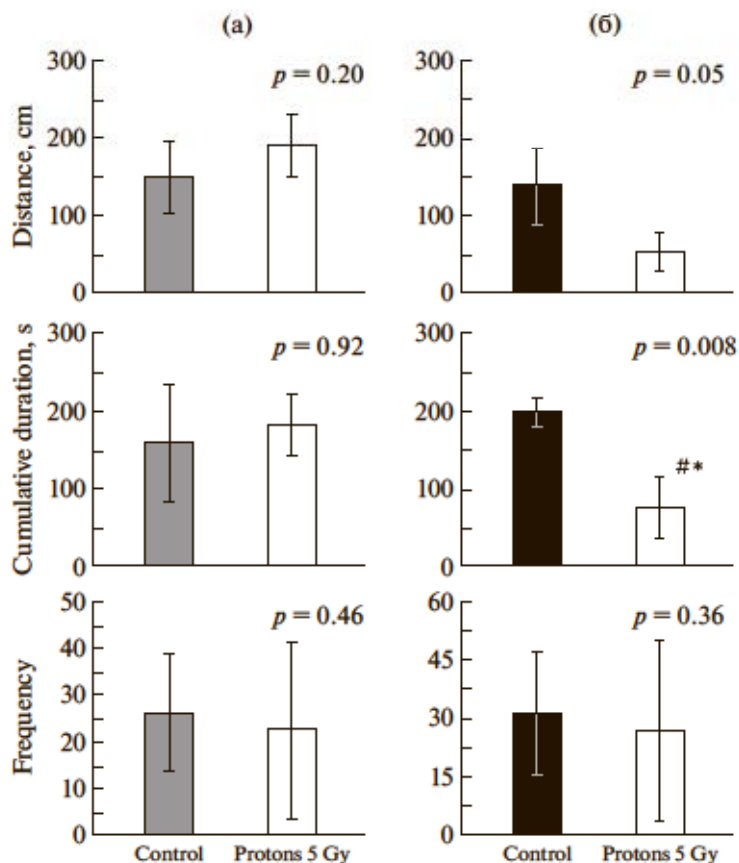
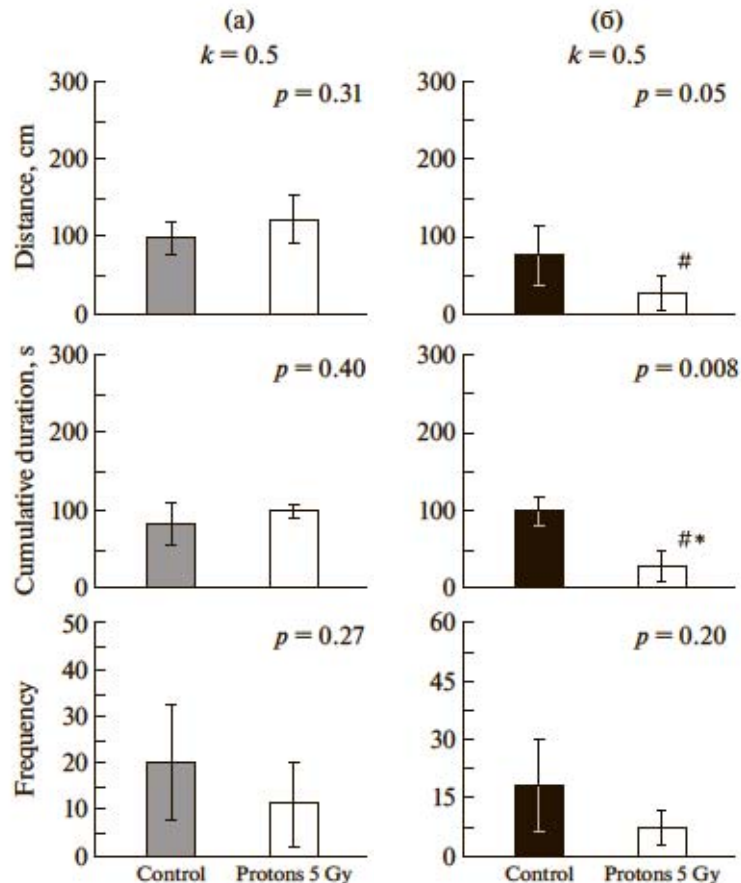


Рис. 5. Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в “Зоне наблюдения”, общее время пребывания, частота прохождения границы зоны): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения. #\* Данные статистически значимые,  $p < 0.05$ ; # данные, имеющие тенденцию к статистической значимости,  $p < 0.1$ .

Fig. 5. Parameters of visual behavior for the whole time of testing (240 s) after proton cranial irradiation 5 Gy: (a) – 30 days after irradiation, (b) – 90 days after irradiation. #\*  $p < 0.1$ , #\*  $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.



**Рис. 6.** Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в “Зоне наблюдения”, общее время пребывания, частота прохождения границы зоны) при низком значении контраста визуального стимула ( $k = 0.5$ ): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения. #\* Данные статистически значимые,  $p < 0.05$ ; # данные, имеющие тенденцию к статистической значимости,  $p < 0.1$ .

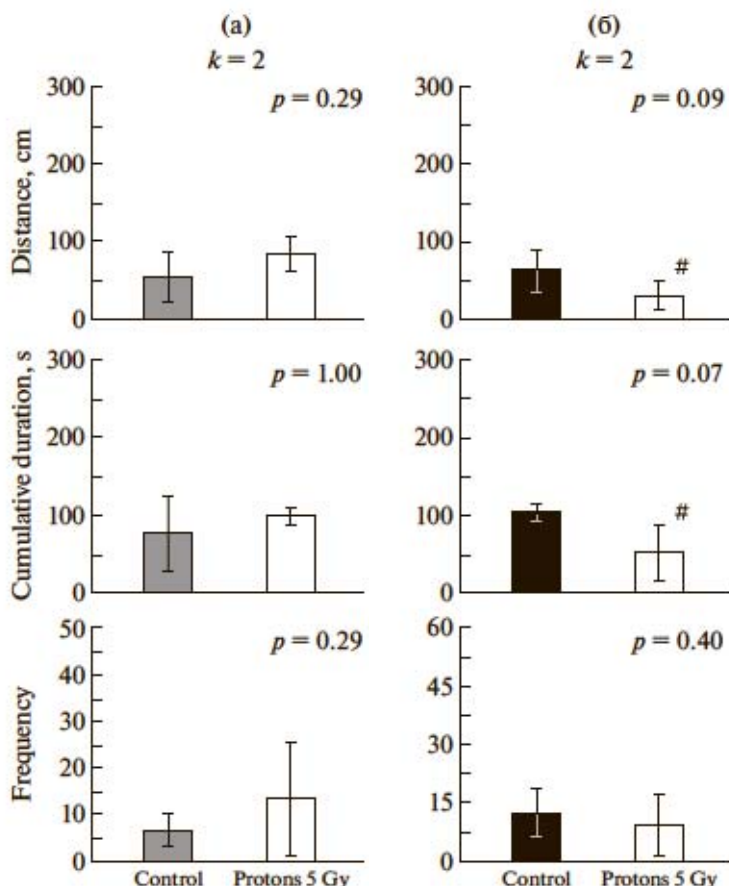
**Fig. 6.** Parameters of visual behavior after proton cranial irradiation 5 Gy. Visual stimulation with a low contrast ratio: (а) – 30 days after irradiation, (б) – 90 days after irradiation;  $k$  – contrast ratio. # $p < 0.1$ , #\* $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.

Процедура тестирования состояла из трех этапов. Первые 120 с монитор и камера были выключены, животное помещали на платформу. Этот этап проводили с целью нивелировать эффекты от первичной реакции животного на помещение в новую среду. Затем в течение 120 с была включена визуальная стимуляция в виде движущихся слева направо черно-белых полос (ширина полос – 12 мм, скорость перемещения 5 см/с) при коэффициенте контраста экрана  $k = 0.5$ . Далее коэффициент контраста был изменен на максимальный ( $k = 2$ ), и тестирование животных проходило еще 120 с. После процедуры животное помещали в клетку, платформу протирали влажной тряпкой, и проходила подготовка к тестированию следующего животного. Анализ видеозаписей проводили в программе Noldus Ethnovision XT 13.

Цветовая метка на голове животного служила объектом для отслеживания трекинга. Были проведены калибровка арены и разделение на условные зоны. Отслеживание параметров зрительного поведения проходило в “Зоне наблюдения”

(рис. 2). Это область, образующая прямой угол между линиями, выходящими из центра арены к краям дисплея. При нахождении головы животного в данной области экран с визуальной стимуляцией попадал в поле зрения крысы. Также был проведен неавтоматизированный подсчет оптомоторных реакций крысы.

**Статистический анализ.** Значение параметра оптомоторного ответа получали путем расчета отношения корректных (слева направо) поворотов головы животного к некорректным (справа налево). Для проверки нормальности распределения полученных данных использовали критерий Шапиро–Уилка [12]. Для оценки различий между группами использовали критерий Манна–Уитни при анализе оптомоторных реакций и параметров видеотрекинга. Статистический анализ проводили в программе PAST [13]. Данные считали статистически значимыми при  $p < 0.05$  и имеющими тенденцию к статистической значимости при  $p < 0.1$ .



**Рис. 7.** Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в “Зоне наблюдения”, общее время пребывания, частота прохождения границы зоны) при высоком значении контраста визуального стимула ( $k = 2$ ): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения. #\* Данные статистически значимые,  $p < 0.05$ ; # данные, имеющие тенденцию к статистической значимости,  $p < 0.1$ .

**Fig. 7.** Parameters of visual behavior after proton cranial irradiation 5 Gy. Visual stimulation with a high contrast ratio: (а) – 30 days after irradiation, (б) – 90 days after irradiation;  $k$  – contrast ratio. #\*  $p < 0.1$ , #\*  $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенного исследования были получены следующие результаты. На 30-е и 90-е сутки после облучения протонами в дозе 5 Гр не было выявлено различий в реализации оптомоторного рефлекса между контрольной и облученной группами животных. (рис. 3, рис. 4). При анализе таких значений как общая пройденная дистанция в “Зоне наблюдения”, общее время пребывания в ней, частота прохождения границы зоны было установлено снижение активности у облученных животных на 90-е сут после облучения. Особенно ярко обнаруженные различия выражены при анализе данных времени пребывания в зоне наблюдения в течение всего периода тестирования и при использовании зрительной стимуляции с низким коэффициентом контраста ( $k = 0.5$ ) (рис. 5–7).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что предложенный метод тестирования поз-

воляет количественно оценить зрительное поведение грызунов в различные сроки после воздействия.

Краниальное облучение протонами 170 МэВ в дозе 5 Гр, с мощностью дозы 1 Гр/мин, приводит к снижению общего времени нахождения головы животного в области наблюдения за визуальным стимулом в отдаленный период после облучения. Наличие подобных различий при использовании визуальной стимуляции с низким контрастом и отсутствие различий при использовании зрительного стимула с высоким контрастом могут свидетельствовать о снижении остроты зрения у облученных животных.

Полученные данные дают количественную оценку зрительному поведению крыс после облучения. При интерпретации данных, полученных в ходе проведенного тестирования, необходимо также учитывать возможные нарушения в центральной нервной системе. Эти изменения могут оказывать существенное влияние на эмоционально-мотивационное поведение животных, их исследовательскую активность и концентрацию внимания.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-01028.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grigor'ev A.I., Krasavin E.A., Ostrovskii M.A. Assessment of the Risk of the Biological Actions of Galactic Heavy Ions to Interplanetary Flight // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2014. V. 45. № 1. P. 91–95.
2. Григорьев Ю.Г., Ушаков И.Б., Красавин Е.А. и др. Космическая радиобиология за 55 лет. М.: Экономика, 2013. 303 с. [Grigoriev Yu.G., Ushakov I.B., Krasavin E.A. et al. Space radiobiology for 55 years (to the 50th anniversary of SSC of Russian Federation. M.: IMBP of Russian Academy of Sciences, 2013. 303 p. (In Russian)]
3. Tronov V.A., Vinogradova Yu.V., Poplinskaya V.A. et al. Mouse retinal adaptive response to proton irradiation: Correlation with DNA repair and photoreceptor cell death // *Physics of Particles and Nuclei Letters*. 2015. V. 12. Issue 1. P. 173–183.
4. Кабаченко А.Н., Федоренко Б.С., Смирнова О.А. Оценка катарактогенного действия протонов // *Радиобиология*. 1986. Т. 26. С. 318–322. [Kabachenko A.N., Fedorenko B.S., Smirnova O.A. Otsenka kataraktogennoogo deystviya protonov // *Radiobiologiya*. 1986. V. 26. P. 318–322. (In Russian)]
5. Archambeau J.O., Mao X.W., McMillan P.J. et al. Dose response of rat retinal microvessels to proton dose schedules used clinically: a pilot study // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000. Nov 1. V. 48. № 4. P. 1155–1166.
6. Штемберг А.С., Кохан В.С., Кудрин В.С. и др. Воздействие высокоэнергетических протонов в пике Брегга на поведение крыс и обмен моноаминов в некоторых структурах мозга // *Нейрохимия*. 2015. Т. 32. С. 78–85. [Shtemberg A.S., Kohan V.S., Kudrin V.S., Matveeva M.I., Lebedeva-Georgievskaya K.B., Timoshenko G.N., Molokanov A.G., Krasavin E.A., Narkevich V.B., Klodt P.M., Bazyan A.S. Vozdejstvie vysokoehtergeticheskikh protonov v pike Bregga na povedenie krysa i obmen monoaminov v nekotorykh strukturah mozga // *Nejrohimiya*. 2015. V. 32. P. 78–85. (In Russian)]
7. Kiffer F., Howe A.K., Carr H. et al. Late effects of (1)Hirradiation on hippocampal physiology // *Life Sci. Space Res. (Amst.)*. 2018. May. V. 17. P. 51–62.
8. Rudobek E., Bellone J.A., Szücs A. et al. Low-dose proton radiation effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease – Implications for space travel // *PLoS One*. 2017. Nov. 29. V. 12. № 11. e 0186168.
9. Bellone J.A., Rudobek 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.
10. Glen T. Prusky et al. Rapid Quantification of Adult and Developing Mouse Spatial Vision Using a Virtual Optomotor System // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. V. 45. P. 4611–4616.
11. You M., Yamane T., Tomita H. et al. A novel rat head gaze determination system based on optomotor responses // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. № 4. e0176633.
12. Shapiro S.S., Wilk M.B. Analysis of variance test for normality (complete samples) // *Biometrika*. 1965. V. 52. № 3/4. P. 591–611.
13. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // *Palaentologia. Electronica*. 2001. V. 4. № 1. P. 9.

## Effects of Cranial Exposure to 170 MeV Proton Radiation at a Dose of 5 Gy on the Visual Behavior and Optomotor Response of Adults Rats

Y. S. Severyukhin<sup>a,d,\*</sup>, T. B. Feldman<sup>b,c</sup>, M. A. Ostrovsky<sup>a,b,c</sup>, and A. G. Molokanov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Radiation Biology, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

<sup>b</sup>Department of Molecular Physiology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>c</sup>N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physic, RAS, Moscow, Russia

<sup>d</sup>Department of Biophysics, Faculty of Natural and Engineering Sciences, Dubna State University, Dubna, Russia

\*E-mail: yucucumber@mail.ru

In this experiment, the optomotor reflex and visual behavior were evaluated in the rats exposed to protons at a dose of 5 Gy. To evaluate the visual function, the equipment including a platform and a display with visual stimulation was used. Some behavioral changes induced in rats under cranial irradiation with 170 MeV protons have been detected. The cranial effect of protons on animals did not lead to a statistically significant decrease in the opto-motor response (the ratio of correct and incorrect head turns) in the rats on days 30 and 90 after irradiation. However, in the remote period after irradiation, statistically significant changes in the visual behavior of irradiated animals were detected. It has been established that the total time of the animal's head in the area where it is able to focus on the visual stimulus is decreased in the irradiated animals by the 90-th day after irradiation.

**Keywords:** rats, optomotor response, vision, behavioral responses, protons