

И.Б. Ушаков, В.П. Федоров

**РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ДНК И РНК
В НЕЙРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА**

Федеральный медицинско-биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Федоров Владимир Петрович: fedor.vp@mail.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Исследование радиационно-индуцированных изменений содержания нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга после воздействия ионизирующего излучения в дозах 0,1 – 1,0 Гр.

Материал и методы: Исследование с соблюдением правил биоэтики выполнено на 240 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 4 мес к началу эксперимента, подвергшихся однократному воздействию γ -квантами ^{60}Co в дозах 0,1–1,0 Гр. Нейроморфологическими методиками оценивали морфометрические и тинкториальные показатели нервных клеток, а также динамику изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах в течение всей продолжительности жизни животных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов программ Statistica 6.1 и с использованием параметрических критериев.

Результаты: У контрольных и облученных животных на протяжении всей жизни происходят волнообразные изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга с постепенным снижением показателей к окончанию эксперимента. При этом изменения уровня ДНК в ядрах и РНК в ядрышках, как правило, связаны с изменениями размеров структур их локализации, а содержание РНК в цитоплазме, видимо, связано с изменениями физиологического состояния нейронов (покой, возбуждение, торможение) и соответствующей структурно-функциональной перестройкой нервных клеток. Изменения нуклеиновых кислот не имеют линейной дозовой и временной зависимости от исследованных факторов. В конце эксперимента, когда наблюдается гибель как облученных, так и контрольных животных, содержание нуклеиновых кислот в нейронах статистически значимо снижается во всех группах, причем в большей степени у облученных животных.

Заключение: Не выявлено функционально-значимых радиационно-индуцированных изменений содержания и топочимии продуктов гистохимических реакций с нуклеиновыми кислотами в структурах нейронов головного мозга. Однако в отдельные сроки наблюдения содержание нуклеиновых кислот в нейронах у облученных животных изменяется в большей степени, чем у животных возрастного контроля.

Ключевые слова: *радиация, малые и средние дозы, головной мозг, нейроны, морфометрические показатели РНК, ДНК*

Для цитирования: Ушаков И.Б., Федоров В.П. Радиационно-индуцированные изменения содержания ДНК и РНК в нейронах головного мозга. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2021;66(1):5-12.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-1-5-12

Введение

Подавляющее число работ по исследованию радиационно-индуцированных изменений содержания нуклеиновых кислот выполнено на клетках крови [1 – 6], однако в последние годы усилился интерес исследователей и к другим соматическим клеткам, в частности к нейронам головного мозга [7 – 10]. Уже в первых обзорах проблемы [11, 12] показано, что под действием ионизирующего излучения в нейронах нарушается синтез ДНК, структура ДНК-матрицы, а затем и синтез РНК. Отмечено стимулирующее действие облучения в дозах до 1 Гр на активность ДНКаз и РНКаз головного мозга [12]. По этим показателям даже предпринимались попытки оценить зависимости доза – эффект, скорость восстановления и сравнительную радиоустойчивость мозговых структур [11]. Установлено снижение содержания ДНК и РНК в первые сутки после облучения кроликов в дозе 6 Гр как в спинном, так и в головном мозге. Также показано полное восстановление разрывов нитей ДНК в нейронах мозжечка крыс в течение 38 ч после воздействия γ -излучения на голову в дозе 50 Гр [11, 12]. Сразу после облучения головы в дозах от 4 до 17 Гр в нейронах мозжечка наблюдалось снижение содержания ДНК. При этом установлена положительная корреляционная связь между степенью постлучевой деградациии ДНК и пикнозом ядер клеток. Показана линейная зависимость между поглощенной дозой и числом разрывов нитей ДНК для нейронов, глиальных и эндотелиальных клеток головного мозга крыс при дозах облучения до 18 Гр [12]. Более выраженные ранние изменения разрывов нитей ДНК и снижение скорости ее синтеза обнаружены после облучения развиваю-

щегося мозга. Интересно, что влияние облучения на синтез ДНК в мозжечке было более выражено, чем в других отделах мозга [12].

Вместе с тем, данных для интерпретации вклада изменений нуклеиновых кислот в развитие радиocereбральных эффектов пока явно недостаточно [9]. Принципиально новых данных в настоящее время не получено, а гистохимические исследования содержания и распределения нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга после радиационных воздействий описываются, как правило, попутно при изучении изменений нервных и нейроглиальных клеток [8 – 10].

Целью данной работы явилось исследование содержания и топочимии нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга крыс после γ -облучения в дозах от 0,1 до 1 Гр на всей продолжительности жизни.

Материал и методы

Исследование выполнено на 240 белых беспородных крысах-самцах в возрасте 4 мес к началу эксперимента, массой 210 ± 10 г, которых облучали гамма-квантами ^{60}Co с энергией 1,25 МэВ однократно в дозах 0,1; 0,2; 0,5 и 1,0 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч и в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 6,6 Гр/ч. Контролем служили животные, подвергшиеся ложному радиационному воздействию и исследованные в те же сроки, что и облученные. Объектом исследования являлись лобная (поле FPa) и теменная (поле PAs) кора, а также кора червя мозжечка (culmen). Материал забирали через 1 сут, 6, 12, 18 и 24 мес после облучения. Каждой группе соответствовал адекватный возрастной контроль. Прото-

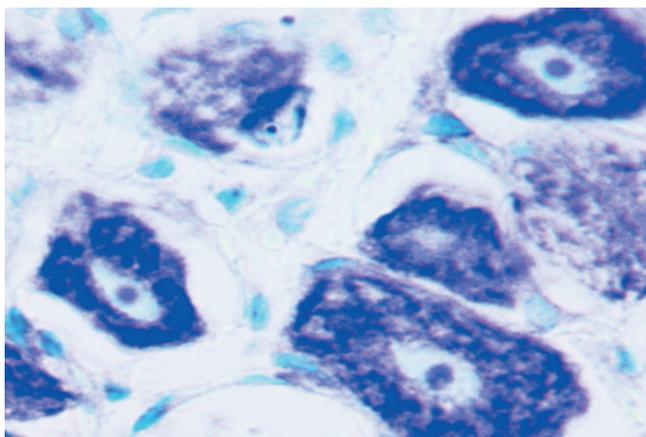


Рис. 1. Топохимия нуклеиновых кислот в нервных и глиальных клетках: ДНК в ядрах и РНК в цитоплазме и ядрышках. Метод S. Shea [13].
Микрофотография: объектив 100, окуляр 20
Fig. 1. Topochemistry of nucleic acids in nerve and glial cells: DNA in nuclei and RNA in cytoplasm and nucleoli. S. Shea method [13].
Micrograph: objective 100, eyepiece 20

кол эксперимента в разделах выбора, содержания животных и выведения их из опыта составлен в соответствии с принципами биоэтики и правилами лабораторной практики (приказ Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г. об утверждении правил лабораторной практики). Материал фиксировали в 10 %-ом растворе нейтрального формалина, 80 %-ом пропаноле или замораживали в твердой углекислоте. После стандартных гистологических процедур на парафиновых срезах, окрашенных кризелом фиолетовым по методу Ниссля, оценивали динамику морфометрических и тинкториальных показателей нейронов. Нуклеиновые кислоты выявляли на кристатных и парафиновых срезах, окрашенных по методу S. Shea [13] с соответствующим контролем РНКазой и ДНКазой, т.е. метахроматического окрашивания азуром А с предварительным ацетелированием в уксусном ангидриде и последующей дифференцировкой в третбутаноле восходящей концентрации. На рис. 1 видно, что в цитоплазме и ядрышке нейронов выявляется РНК, а в нуклеоплазме ядер ДНК, окрашиваемые в различные цвета.

Как правило, структуры, содержащие РНК, окрашиваются в интенсивно сиреневый цвет, а структуры, содержащие ДНК – в сине-зеленый, что позволяет легко их дифференцировать. При этом варианты окраски нуклеиновых кислот могут варьировать в зависимости от методов фиксации и проведения гистохимических процедур, но всегда ДНК и РНК окрашиваются в различные цвета.

Морфометрические исследования (площадь сечения цитоплазмы, ядра и ядрышка), а также содержание ДНК в ядрах, РНК в цитоплазме и ядрышках нейронов по остаточной плотности конечного продукта гистохимической реакции проводили при помощи компьютерного комплекса анализаторов изображений с использованием программы Image J 36 b Wayne Rosband (National Institutes of Health, USA). Количество нейронов у каждого животного, необходимых для определения нейроморфологических показателей, определяемое методом аккумулятированных средних, составляло от 300 до 400. В итоге рассматриваемые показатели имели распределения, близкие к нормальным. Описательную статистику с вычислением средних и доверительные интервалы осуществляли с помощью пакетов программ Statistica 6.1 при уровне значимости $p < 0,05$. На рисунках далее представлены средние значения. Алгоритм проведения эксперимента, обработки, исследования и статистического анализа материала достаточно подробно представлен нами в работе [9].

Результаты и обсуждение

Проведенные нами ранее исследования животных, подвергшихся внешнему воздействию ионизирующего излучения в дозах до 1,0 Гр, не выявили значимых структурных изменений в нейронах головного мозга. В то же время нервные клетки обладают высокой неспецифической реактивностью к воздействию ионизирующего излучения. При этом наблюдаются лишь стохастические нейроморфологические эффекты, которые, как правило, имеют функциональный характер. Такие изменения в большинстве случаев являются обратимыми, но в отдельные сроки пострadiационного периода способны нарушать баланс между процессами возбуждения и торможения в нервной системе и вызывать нестабильность структурно-функциональной организации нервных клеток. Увеличение в пострadiационном периоде количества нейронов с деструктивными изменениями не приводит к значимому снижению количества нервных клеток на площади среза. Кроме того, деструктивные нейроны встречаются изолированно, а не группами, т.е. не формируют очаги с органической патологией. Вполне возможно, что на фоне других вредных и опасных факторов среды или при увеличении дозы радиационного воздействия в нейронах головного мозга могут развиваться и патологические изменения [8, 9, 14].

В работе [8] показано, что в лобной коре площадь цитоплазмы нейронов V слоя (большие пирамидные нейроны) после радиационного воздействия в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч через сутки статистически значимо уменьшается, составляя по отношению к контролю 88,1 %. При этом содержание РНК в цитоплазме нейронов соответствует контролю. В последующие сроки наблюдения площадь цитоплазмы нейронов увеличивается и до конца эксперимента превышает таковую у животных с ложным облучением ($p < 0,05$). Содержание цитоплазматической РНК через 6 мес соответствует контролю, а через 12 мес снижается и составляет по отношению к контролю 72,4 % ($p < 0,05$). Через 18 мес содержание цитоплазматической РНК в больших пирамидных нейронах лобной коры облученных животных практически соответствует таковому у животных с ложным облучением. На фоне увеличенной площади цитоплазмы показатели содержания в ней РНК больше свидетельствуют об изменении функциональной активности нейронов в данные сроки наблюдения. Это установлено ранее и по другим нейроморфологическим показателям [9, 10, 14]. При увеличении мощности дозы радиационного воздействия до 6,6 Гр/ч площадь цитоплазмы нервных клеток лобной коры только через 6 мес превысила контроль на 13,6 % ($p < 0,05$), через 12 мес соответствовала контролю, а в конце эксперимента статистически значимо уменьшалась и составляла от возрастного контроля 83,9 %. На рис. 2 представлена динамика изменений содержания в цитоплазме нейронов лобной коры РНК после однократного радиационного воздействия в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 и 6,6 Гр/ч.

Видно, что содержание цитоплазматической РНК через 1 сут после облучения при мощности дозы в 6,6 Гр/ч увеличилось на 20 % ($p < 0,05$), а в дальнейшие сроки наблюдения соответствовало возрастному контролю. При мощности дозы облучения 0,5 Гр/ч содержание в нейронах цитоплазматической РНК через 12 мес наблюдения было статистически значимо снижено по отношению к контролю, а в остальные сроки соответствовало ему. Таким образом мощность дозы облучения в исследованном диапазоне вызывает в отдельные сроки наблюдения значимые различия содержания РНК в ци-

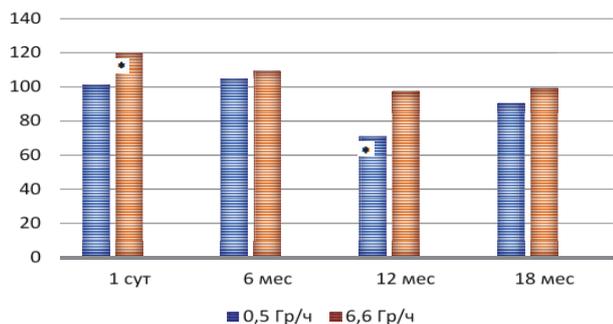


Рис. 2. Динамика изменений содержания в цитоплазме нейронов лобной коры РНК после однократного радиационного воздействия в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 и 6,6 Гр/ч. По оси абсцисс – сроки пострадиационного периода; по оси ординат – содержание РНК в процентах к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 2. Dynamics of changes in the content of RNA in the cytoplasm of neurons in the frontal cortex after a single radiation exposure at a dose of 0.5 Gy with a dose rate of 0.5 and 6.6 Gy/h. On the abscissa – the terms of the post-radiation period; ordinate - RNA content as a percentage of control.

* – differences with control are statistically significant

топлазме нейронов. Аналогичные данные установлены нами и по тинкториальным показателям нейронов в других отделах головного мозга [9, 10].

В теменной коре площадь цитоплазмы нейронов через сутки после радиационного воздействия с мощностью дозы 0,5 Гр/ч нелинейно зависела от дозы облучения. При 0,1 Гр она статистически значимо увеличивалась на 36,4 % по отношению к контролю, а при 0,2 и 1,0 Гр уменьшалась на 19,3 % ($p < 0,05$). Через 6 мес наблюдения площадь цитоплазмы при всех дозах облучения соответствовала возрастному контролю, но через 12 мес увеличивалась, причем при дозе 0,1 Гр на 63,3 % ($p < 0,05$). К концу наблюдения площадь цитоплазмы при облучении в дозах 0,1 и 0,2 Гр практически соответствовала возрастному контролю, а при 1,0 Гр уменьшалась на 30 % ($p < 0,05$). На рис. 3 представлена динамика изменений содержания РНК в цитоплазме нейронов теменной коры после радиационных воздействий в различных дозах (мощность дозы облучения 0,5 Гр/ч).

Из рис. 3 следует, что содержание РНК в цитоплазме нейронов теменной коры через сутки после радиационного воздействия нелинейно зависело от дозы облучения: при 0,1 Гр статистически значимо снижалось, при 0,2 Гр повышалось на 15,3 % ($p < 0,05$), а при 1,0 Гр не изменялось. Можно предположить, что изменения содержания

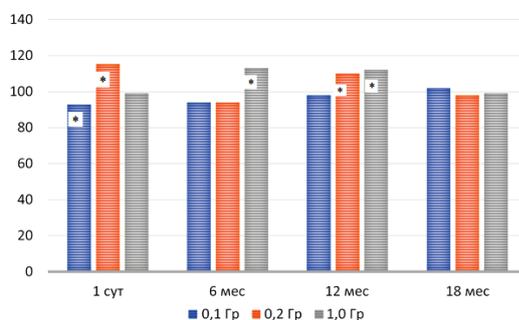


Рис. 3. Динамика изменений содержания РНК в цитоплазме нейронов теменной коры после радиационных воздействий в различных дозах с мощностью дозы 0,5 Гр/ч. Примечание: ось абсцисс – сроки после облучения; ось ординат – содержание цитоплазматической РНК в процентах по отношению к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 3. Dynamics of changes in the RNA content in the cytoplasm of neurons in the parietal cortex after radiation exposure at various doses with a dose rate of 0.5 Gy/h. The abscissa axis is the time after irradiation; the ordinate is the content of cytoplasmic RNA as a percentage relative to the control.

* – differences with control are statistically significant

РНК в этот срок наблюдения больше связаны с изменениями площади цитоплазмы, чем с изменениями функционального состояния нейронов. Через 6 мес при дозах облучения 0,1 и 0,2 Гр содержание цитоплазматической РНК соответствовало, а при дозе 1,0 Гр превышало возрастную контроль на 13,1 % ($p < 0,05$). При дозе облучения 0,1 Гр содержание цитоплазматической РНК через 12 мес наблюдения соответствовало, а при дозах 0,2 и 1,0 Гр статистически значимо превышало возрастную контроль на 10 и 12,1 % соответственно. К окончанию эксперимента содержание цитоплазматической РНК в нейронах теменной коры при всех дозах облучения соответствовало возрастному контролю (рис. 3).

После радиационного воздействия в дозах от 0,1 до 1 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч размеры нейронов коры мозжечка и, в частности площадь перикариона клеток Пуркинье до 6 мес наблюдения уменьшалась, после 12 мес имела тенденцию к увеличению и в конце наблюдения при дозе облучения 0,2 Гр соответствовала возрастному контролю. На рис. 4 представлена динамика изменений содержания РНК в цитоплазме нейронов Пуркинье в пострадиационном периоде. Видно, что через сутки после облучения в дозах 0,1 и 0,2 Гр содержание цитоплазматической РНК статистически значимо снижалось, а при больших дозах не изменялось. Видимо, снижение содержания РНК в этот срок наблюдения больше связано не с площадью цитоплазмы, а с изменением функциональной активности нейронов в ответ на радиационное воздействие [9, 15]. Через 6 мес наблюдения содержание РНК в цитоплазме при облучении в дозах 0,5 и 1,0 Гр соответствовала контролю, а при дозах 0,1 и 0,2 Гр статистически значимо превышало его. В данном случае повышение содержания цитоплазматической РНК больше связано, по-видимому, с уменьшением площади цитоплазмы. Примечательно, что при облучении в дозе 0,5 Гр оба показателя в этот срок наблюдения соответствовали возрастному контролю. При всех исследованных дозах облучения через 12 мес отмечалось статистически значимое снижение содержания РНК, причем на фоне уменьшения площади цитоплазмы. В последующий срок наблюдения показатель содержания РНК в цитоплазме увеличивался и при облучении в дозах до 0,5 Гр соответствовал контролю, а при дозе 0,1 Гр даже превышал его ($p < 0,05$). К окончанию эксперимента содержание цитоплазматической РНК в нейронах мозжечка при всех радиационных воздействиях статистически значимо

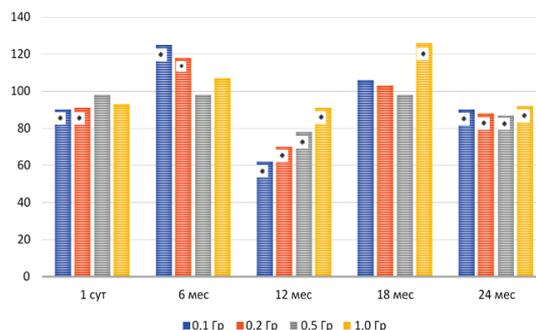


Рис. 4. Динамика изменений содержания РНК в цитоплазме клеток Пуркинье после радиационных воздействий в разных дозах с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. По оси абсцисс – время после радиационного воздействия; по оси ординат – содержание цитоплазматической РНК в процентах к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 4. Dynamics of changes in the RNA content in the cytoplasm of Purkinje cells after exposure to radiation at different doses with an irradiation dose rate of 0.5 Gy/h. Note: on the abscissa - time after radiation exposure; ordinate - content of cytoplasmic RNA as a percentage of control.

* – differences with control are statistically significant

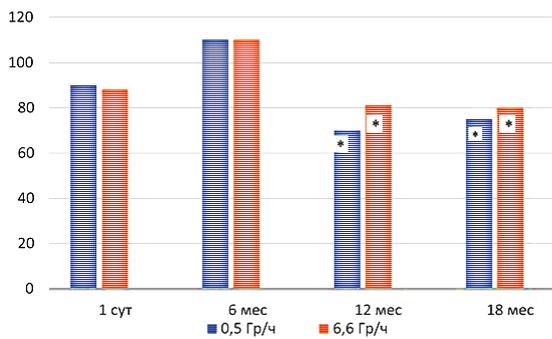


Рис. 5. Динамика изменений содержания в ядрышках нейронов V слоя лобной коры РНК после однократного облучения в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 и 6,6 Гр/ч. По оси абсцисс – сроки пострадиационного периода, по оси ординат – содержание РНК в ядрышках в % к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 5. Dynamics of changes in the content of RNA in the nucleoli of neurons in layer V of the frontal cortex after a single irradiation at a dose of 0.5 Gy with a dose rate of 0.5 and 6.6 Gy/h. On the abscissa – the terms of the post-radiation period, on the ordinate – the RNA content in the nucleoli in % to the control.

* – differences with control are statistically significant

снижалось (рис. 4). Это наблюдалось на фоне как неизменной площади цитоплазмы (доза облучения 0,2 Гр), так и при других дозах облучения, вызывающих уменьшение площади цитоплазмы. Следует обратить внимание на большую лабильность исследуемых показателей при меньших дозах облучения (0,1–0,2 Гр) по сравнению с другими дозами радиационного воздействия. Такое явление можно связать только с преобладанием при меньших дозах облучения раздражающего эффекта радиационного воздействия над модифицирующим [15].

Ранее были представлены данные о динамике изменений площади сечения ядрышек нейронов лобной коры и содержания в них РНК после радиационного воздействия в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. Показано, что через сутки после облучения площадь ядрышек и содержание в них РНК соответствовали контролю. Через 6 мес площадь ядрышек статистически значимо превышала контроль на 79 %; через 12 мес соответствовала ему, а к концу эксперимента на 22,9 % превышала возрастной контроль ($p < 0,05$) [8 – 10]. В данной работе установлено, что через 6 мес после облучения в дозе 0,5 Гр с мощностью воздействия 0,5 Гр/ч содержание РНК в ядрышках нейронов лобной коры практически соответствовало контролю, а в последующие сроки наблюдения статистически значимо снижалось.

При увеличении мощности дозы радиационного воздействия до 6,6 Гр/ч площадь ядрышек через 1 сут наблюдения увеличивалась на 28,5 % ($p < 0,05$), а через 6 мес снижалась на 38 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Через 12 мес наблюдения площадь ядрышек составляла 77,8 % ($p < 0,05$) от уровня возрастного контроля, а к концу эксперимента статистически значимо превышала его на 52,7 %. Как следует из рис. 5, содержание в ядрышках РНК через 1 сут и 6 мес наблюдения практически соответствовало контролю, а через 12 мес статистически значимо снижалось и оставалось на этом уровне до окончания эксперимента (рис. 5). Таким образом, существенных различий исследуемых показателей в данном диапазоне мощности дозы облучения не установлено. Схожие данные получены нами в аналогичном эксперименте и по другим нейроморфологическим показателям [9, 10].

В нейронах теменной коры через сутки после облучения с мощностью дозы 0,5 Гр/ч площадь ядрышек при воздействии в дозе 0,1 Гр увеличивалась на 26,7 % ($p < 0,05$) и до конца наблюдения превышало уровень воз-

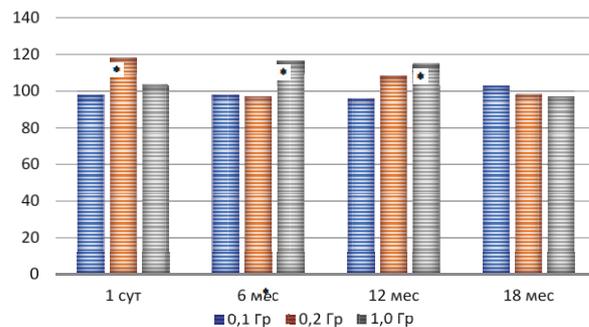


Рис. 6. Динамика изменений содержания РНК в ядрышках нейронов теменной коры после радиационных воздействий в разных дозах с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. Ось абсцисс – сроки после облучения; ось ординат – изменения содержания ядрышковой РНК в процентах по отношению контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 6. Dynamics of changes in the RNA content in the nucleoli of neurons in the parietal cortex after exposure to radiation at different doses with an irradiation dose rate of 0.5 Gy/h. The abscissa axis is the time after irradiation; the ordinate - changes in the content of nucleolar RNA in percent in relation to the control.

* – differences with control are statistically significant

растного контроля. При больших дозах облучения площадь ядрышек через сутки уменьшалась ($p < 0,05$), а в последующие сроки соответствовала возрастному контролю. На рис. 6 представлена динамика изменений содержания РНК в ядрышках нейронов теменной коры после радиационных воздействий в разных дозах с мощностью 0,5 Гр/ч.

Из рис. 6 следует, что содержание РНК в ядрышках при облучении в дозе 0,1 Гр во все сроки наблюдения соответствовало возрастному контролю. При облучении в дозе 0,2 Гр содержание ядрышковой РНК через сутки повышалось на 18,0 % ($p < 0,05$), а после 6 мес наблюдения соответствовало возрастному контролю. При дозе облучения 1,0 Гр содержание ядрышковой РНК через сутки не изменялось, через 6 и 12 мес статистически значимо повышалось на 16,3 и 14,3 % соответственно, а к окончанию эксперимента соответствовало контролю (рис. 6).

Площадь сечения ядрышек грушевидных нейронов мозжечка через сутки после радиационного воздействия (мощность дозы 0,5 Гр/ч) в дозах 0,2; 0,5 и 1,0 Гр увеличивалась ($p < 0,05$), а при дозе 0,1 Гр соответствовала контролю. Из рис. 7 следует, что содержание РНК в ядрышках через сутки после облучения в дозе 1,0 Гр не изменялось, а при меньших дозах снижалось ($p < 0,05$), что вероятно связано с увеличением площади ядрышек. Через 6 мес наблюдения площадь ядрышек и содержание в них РНК при дозе облучения 0,5 Гр соответствовали контролю. При других исследованных дозах облучения площадь ядрышек уменьшалась ($p < 0,05$), а содержание ядрышковой РНК практически соответствовало контролю. Через 12 мес эксперимента площадь ядрышек статистически значимо при всех дозах облучения уменьшалась, а содержание ядрышковой РНК при дозе облучения 0,2 Гр соответствовало контролю. При других дозах радиационного воздействия содержание РНК в ядрышках статистически значимо снижалось. Через 18 мес наблюдения при облучении в дозах до 0,2 Гр площадь ядрышек не отличалась от контроля, а при 0,5 и 1,0 Гр статистически значимо снижалась. При этом содержание ядрышковой РНК соответствовало возрастному контролю.

Через 24 мес после начала эксперимента площадь ядрышек грушевидных нейронов при дозах облучения 0,1 и 1,0 Гр была статистически значимо меньше контроля, а при дозах 0,2 и 0,5 Гр превышала его ($p < 0,05$). Содер-

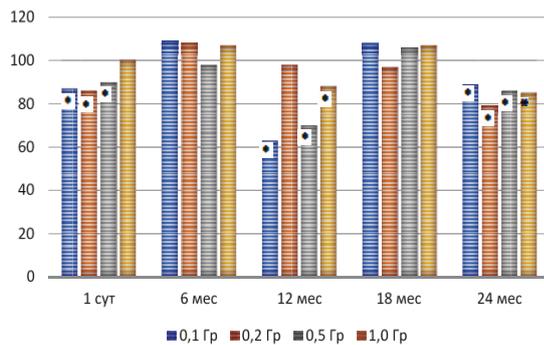


Рис. 7. Динамика изменений содержания РНК в ядрышках клеток Пуркиньи после радиационных воздействий в разных дозах с мощностью дозы 0,5 Гр/ч. По оси абсцисс – время после радиационного воздействия; по оси ординат – содержание ядрышковой РНК в % к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 7. Dynamics of changes in the RNA content in the nucleoli of Purkinje cells after radiation exposure at different doses with a dose rate of 0.5 Gy/h. On the abscissa – time after radiation exposure; ordinate – content of nucleolar RNA in% to control.

* – differences with control are statistically significant

жение РНК в ядрышках не зависимо от дозы облучения через 24 мес эксперимента статистически значимо снижалось (рис. 7).

Такие волнообразные изменения исследуемых показателей не поддаются биологической интерпретации и являются скорее случайными, тем более, что амплитуда их флюктуаций невелика.

Ранее нами было показано, что площадь сечения ядер нейронов V слоя лобной коры через сутки после облучения в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч статистически значимо уменьшалась на 20 % по сравнению с контролем, а после 6 мес наблюдения превышала его ($p < 0,05$). При этом содержание ядерной ДНК через сутки снижалось ($p < 0,05$), через 6 мес соответствовало контролю, а в последующем статистически значимо снижалось по сравнению с таковыми показателями у животных с ложным облучением [8]. В настоящем исследовании установлено, что при увеличении мощности дозы радиационного воздействия до 6,6 Гр/ч площадь сечения ядер нейронов через сутки составляла от контроля 63,5 % ($p < 0,05$), через 6 мес превышала контроль на 22,7 % ($p < 0,05$), через 12 мес – на 22,1 % , а через 18 мес статистически значимо уменьшалась, составляя от контроля 74,4 %.

Рис. 8 отражает зависимости содержания ДНК в ядрах нейронов лобной коры при радиационном воздействии в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 и 6,6 Гр/ч. Видно, что мощность дозы облучения 0,5 Гр/ч вызывает через 1 сут наблюдения значимое снижение содержания ядерной ДНК, в то время как при большей мощности дозы облучения содержание ДНК в ядрах нейронов соответствовало контролю.

Через 6 мес после начала эксперимента содержание ядерной ДНК независимо от мощности дозы облучения соответствовало возрастному контролю, а в последующие сроки пострадиационного периода статистически значимо снижалось (рис. 8). В целом исследуемые мощности дозы облучения вызывают сходные изменения содержания ядерной ДНК в больших пирамидных нейронах лобной коры.

В теменной коре площадь ядер нейронов через сутки после радиационного воздействия нелинейно зависела от дозы облучения с мощностью 0,5 Гр/ч: при дозе 0,1 Гр площадь ядер увеличивалась на 53,8 % ($p < 0,05$), при 0,2 Гр уменьшалась на 27,8 % ($p < 0,05$), а при 1,0 Гр не изменялась. При дозе облучения 0,1 Гр площадь ядер через

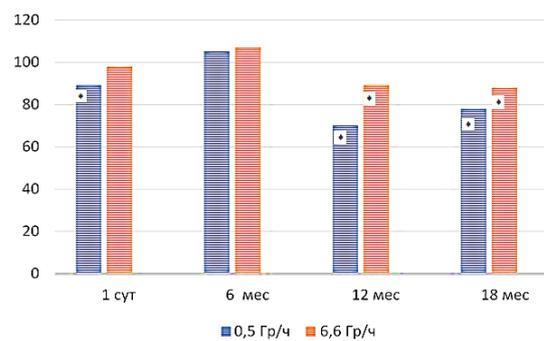


Рис. 8. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах больших пирамидных нейронов лобной коры ДНК после однократного облучения в дозе 0,5 Гр с мощностью дозы облучения 0,5 и 6,6 Гр/ч. По оси абсцисс – сроки пострадиационного периода, по оси ординат – содержание ядерной ДНК в процентах к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 8. Dynamics of changes in the content of DNA in the nuclei of large pyramidal neurons of the frontal cortex after a single irradiation at a dose of 0.5 Gy with a dose rate of 0.5 and 6.6 Gy/h. Note: on the abscissa – the terms of the post-radiation period, on the ordinate – the content of nuclear DNA as a percentage of the control.

* – differences with control are statistically significant

6 мес наблюдения статистически значимо превышала контроль на 24,5 % и через 12 мес на 50,1 % ($p < 0,05$). В группе животных, облученных в дозе 0,2 Гр, площадь ядер нейронов теменной коры через 6 мес увеличивалась на 14,6 % ($p < 0,05$), а в остальные сроки наблюдения соответствовала возрастному контролю. К окончанию эксперимента кариметрические показатели при дозах облучения 0,1 и 0,2 Гр соответствовали возрастному контролю, а при 1,0 Гр составляли от него 82,8 % ($p < 0,05$).

На рис. 9 представлена динамика изменений содержания ДНК в ядрах нейронов теменной коры после облучения в различных дозах с мощностью 0,5 Гр/ч. Видно, что при дозе облучения 0,1 Гр во все сроки наблюдения содержание ядерной ДНК не изменялось. При 0,2 Гр через сутки содержание ядерной ДНК повышалась на 12,6 % ($p < 0,05$), а в последующие сроки наблюдения соответствовало возрастному контролю. При дозе 1,0 Гр содержание ядерной ДНК через сутки не изменялось, через 6 и 12 мес статистически значимо повышалось, а через 18 мес соответствовало возрастному контролю (рис. 9).

В мозжечке при всех исследованных дозах облучения с мощностью 0,5 Гр/ч через сутки после воздействия площадь ядер грушевидных нейронов уменьшалась и оставалась ниже возрастного контроля через 6 и 12 мес

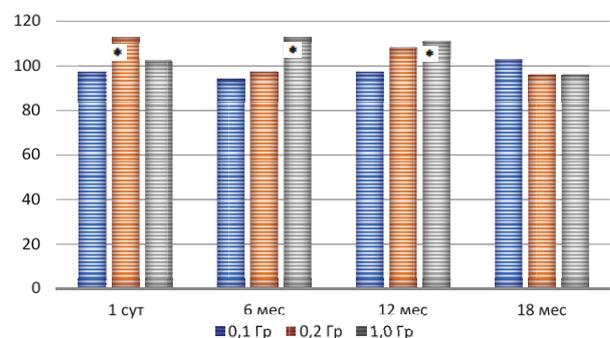


Рис. 9. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах нейронов теменной коры после радиационных воздействий в различных дозах с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. Ось абсцисс – время после облучения; ось ординат – содержание ядерной ДНК в процентах по отношению к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 9. Dynamics of changes in the DNA content in the nuclei of neurons of the parietal cortex after exposure to radiation at various doses with an irradiation dose rate of 0.5 Gy/h. Abscissa – time after irradiation; the ordinate axis is the content of nuclear DNA as a percentage in relation to the control.

* – differences with control are statistically significant

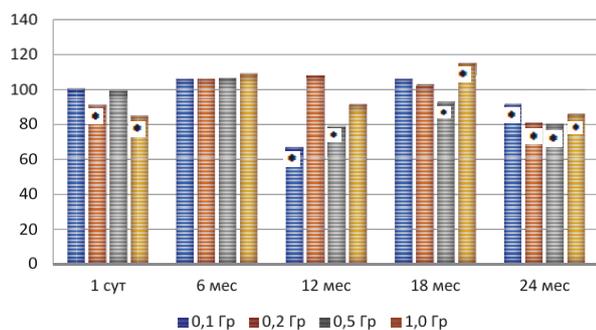


Рис. 10. Динамика изменений содержания ДНК в ядрах грушевидных нейронов мозжечка после радиационных воздействий в разных дозах с мощностью дозы облучения 0,5 Гр/ч. По оси абсцисс – время после радиационного воздействия; по оси ординат – содержание ядерной ДНК в процентах к контролю.

* – различия с контролем статистически значимы

Fig. 10. Dynamics of changes in the DNA content in the nuclei of the piriform neurons of the cerebellum after radiation exposure at different doses with an irradiation dose rate of 0.5 Gy/h. On the abscissa – time after radiation exposure; on the ordinate – the content of nuclear DNA as a percentage of the control

* – differences with control are statistically significant

наблюдения. Только при дозе облучения 0,1 Гр площадь ядер через 12 мес наблюдения соответствовала контролю, а через 18 мес уменьшалась. При других дозах облучения площадь ядер через 18 мес не отличалась от контроля. К окончанию эксперимента площадь ядер грушевидных нейронов при дозах облучения 0,1; 0,2 и 1,0 Гр статистически значимо превышала возрастной контроль, а при дозе облучения 0,5 Гр в эти сроки размер ядер был меньше контроля ($p < 0,05$). Из рис. 10 следует, что содержание ДНК в ядрах грушевидных нейронов мозжечка через сутки после облучения в дозах 0,1 и 0,5 Гр соответствовало контролю, а при дозах облучения 0,2 и 1,0 Гр необъяснимо снижалось ($p < 0,05$). Через 6 мес содержание ядерной ДНК независимо от дозы радиационного воздействия практически соответствовало контролю и оставалось на этом уровне при дозах 0,2 и 1,0 Гр и через 12 мес наблюдения. На этот срок при дозах облучения 0,1 и 0,5 Гр содержание ядерной ДНК статистически значимо снижалось. Через 18 мес после начала эксперимента изменения содержания ДНК в ядрах нейронов были неоднаправленны: при дозах облучения 0,1 и 0,2 Гр показатели практически не отличались, при 0,5 Гр были ниже, а при 1,0 Гр выше показателей контроля. Через 24 мес показатели содержания ядерной ДНК были статистически значимо меньше возрастного контроля (рис. 10).

В целом изменения содержания как ДНК, так и РНК в нейронах головного мозга при изученных режимах радиационного воздействия не имеют дозовой и временной зависимости и носят скорее случайный характер, тем более что амплитуда флюктуации их показателей как правило находится в пределах всего 10 – 20 %.

Заключение

Установлено, что ответ нейронов головного мозга на облучение определяется изменением экспрессии генов, модулирующих внутриклеточные программы трансдукции сигнала [2, 4, 7]. При облучении наблюдаются одно- и двунитевые разрывы ДНК, кластерные повреждения нитей ДНК, модификация оснований, инверсия генов и конформационные модификации ДНК [4]. Регламента-

ция мощности доз радиационного воздействия основывается на экспериментальных исследованиях полноты репарации (ДНК), а также на индукции опухолей у лабораторных животных [3, 6, 16]. В то же время экспериментальные исследования показали некорректность интерпретаций результатов опытов на клеточных культурах для возможной ситуации *in vivo* [17, 18]. Однако эксперименты, прослеживающие изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга на всем пострадиационном периоде, достаточно редки [8, 9]. Проведенные нами ранее исследования крыс, подвергнутых ложному облучению на протяжении всей жизни, показали, что возрастная перестройка нейронов головного мозга заключается в изменении соотношения функциональных типов нейронов, изменении их размеров, цитоплазмы, ядра и ядрышка, в увеличении количества деструктивно измененных нервных клеток, а также волнообразных изменениях содержания в нейронах нуклеиновых кислот [8, 9, 14]. Структурно-функциональные изменения нейронов на различных возрастных этапах постнатального онтогенеза необходимо учитывать при оценке радиационно-индуцированных эффектов в головном мозге и сопоставлять результаты исследования облученных и контрольных животных по равнозначным временным параметрам. Данное исследование показало, что у облученных животных на протяжении всего пострадиационного периода происходят волнообразные изменения содержания нуклеиновых кислот в нейронах головного мозга с постепенным снижением показателей к окончанию наблюдения. При этом модификации уровня ядерной ДНК и ядрышковой РНК больше связаны с изменениями размеров ядра и ядрышка, а изменения цитоплазматической РНК, видимо больше связаны с физиологическим состоянием нейронов (покой, возбуждение, торможение).

При увеличении мощности дозы облучения изменения содержания нуклеиновых кислот нейронах головного мозга в отдельные сроки наблюдения имели более выраженный характер, но в целом значимой зависимости изменений от мощности дозы облучения не установлено. Изменения содержания как ДНК, так и РНК не имеют линейной дозовой и временной зависимости, в целом не поддаются биологической интерпретации и имеют скорее случайный характер. Динамика изменений размеров структур нейронов (цитоплазма, ядро, ядрышко) и содержания в них нуклеиновых кислот при радиационных воздействиях колеблется вокруг нормы как правило в пределах 10 – 20 % и скорее имеет характер случайных флюктуаций. В то же время в ряде случаев изменения содержания нуклеиновых кислот являются пограничными, когда уже не норма, но еще и не патология [9, 10, 14]. Вероятно, что при увеличении дозы или мощности дозы облучения изменения уровня нуклеиновых кислот приобретут более однозначный характер.

Несмотря на значительное количество работ, описывающих нейроморфологические эквиваленты радиационного поражения головного мозга [12, 14, 19, 20], содержание нуклеиновых кислот в нейронах на протяжении всей жизни после облучения в дозах, не вызывающих детерминированных последствий, остается мало изученным, поэтому сравнить и обсудить приведенные нами данные с другими исследованиями пока не представляется возможным.

Radiation-Induced Changes in Nucleic Acids of Brain Neurons

I. B. Ushakov, V. P. Fyodorov

A.I. Burnasyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: Fyodorov Vladimir Petrovich: fedor.vp@mail.ru

ABSTRACT

Purpose: Study of radiation-induced changes in the content of nucleic acids in neurons of the brain after exposure to ionizing radiation in doses of 0.1 – 1.0 Gy.

Material and methods. The study was carried out in compliance with the rules of bioethics on 240 white outbred male rats at the age of 4 months. by the beginning of the experiment, exposed to a single exposure to γ -radiation of ^{60}Co in doses of 0.1–1.0 Gy. Neuromorphological methods were used to assess morphometric and tinctorial parameters of nerve cells, as well as the dynamics of changes in the content of nucleic acids in neurons during the entire life span of animals. Statistical processing of the results was carried out using the Statistica 6.1 software packages, using parametric criteria.

Results: In control and irradiated animals throughout their life, there are undulating changes in the content of nucleic acids in the neurons of the brain with a gradual decrease in indicators by the end of the experiment. At the same time, changes in the level of DNA in the nuclei and RNA in the nucleoli are usually associated with changes in the size of the structures of their localization, and the RNA content in the cytoplasm is apparently associated with changes in the physiological state of neurons (rest, excitation, inhibition) and the corresponding structural and functional rearrangement of nerve cells. Nucleic acid changes do not have a linear dose and time dependence on the factors investigated. At the end of the experiment, when death of both irradiated and control animals is observed, the content of nucleic acids in neurons is statistically significantly reduced in all groups, and to a greater extent in irradiated animals.

Conclusion: No functionally significant radiation-induced changes in the content and topochemistry of the products of histochemical reactions were revealed in the detection of nucleic acids in the structures of brain neurons. However, in some periods of observation, the content of nucleic acids in neurons in irradiated animal's changes to a greater extent than in animals of age control.

Keywords: radiation, low and moderate doses, brain, neurons, morphometric parameters, RNA, DNA

For citation: Ushakov I.B., Fyodorov V.P. Radiation-Induced Changes in Nucleic Acids of Brain Neurons. Medical Radiology and Radiation Safety 2021;66(1):5-12.

DOI: 10.12737/1024-6177-2021-66-1-5-12

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Даренская НГ. Реакция кроветворной системы. В кн.: Радиационная медицина. Под общ. ред. Л.А. Ильина. Т.1. Теоретические основы радиационной медицины. М.: Изд. АТ. 2004. 295-308. [Darenskaja NG. Reaction of the hematopoietic system. In: Radiation Medicine. Edited by Ilyin LA. Vol. 1. Theoretical foundations of radiation medicine. Moscow. 2004. 295-308. (In Russian)].
2. Жижина ГП. Влияние малых доз низкоинтенсивной ионизирующей радиации на структуру и функции ДНК. Радиационная биология. Радиоэкология. 2011; 51(2):218-28. [Zhizhina GP. Influence of small doses of low-intensity ionizing radiation on the structure and functions of DNA. Radiation Biology. Radioecology. 2011; 51(2): 218-28. (In Russian)].
3. Котеров АН. Малые дозы ионизирующей радиации: подходы к определению диапазона и основные радиобиологические эффекты. В кн.: Радиационная медицина. Под общ. ред. Л.А. Ильина. Т.1. Теоретические основы радиационной медицины. М.: Изд. АТ. 2004. 871-92. [Kotero AN. Small doses of ionizing radiation: approaches to determining the range and main radiobiological effects. In: Radiation Medicine. Edited by L.A. Ilyin. Vol. 1. Theoretical foundations of radiation medicine. Moscow. 2004. 871-92. (In Russian)].
4. Guida MS., et al. Thymoquinone Rescues T Lymphocytes from Gamma Irradiation-Induced Apoptosis and Exhaustion by Modulating Pro-Inflammatory Cytokine Levels and PD-1, Bax, and Bcl-2 Signaling. Cell Physiol Biochem. 2016; 38(2): 786-800.
5. Sankaranarayanan K., Chakraborty R. Ionizing radiation and genetic risks. XIII. Summary and synthesis of papers VI to XII and estimates of genetic risks in the year 2000. Mutat. Res. 2000; 453(2): 183-97.
6. United Nations. UNSCEAR 2006. Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Annex A. Epidemiological studies of radiation and cancer. United Nations. New York. 2008. 17-322.
7. Евдокимовский ЭВ, Абдуллаев СА, Митрошина ИЮ, Губина НЕ. Облучение головного мозга влияет на число копий мтДНК и ее транскриптов в необлученных тканях мышей. В сб. матер. Российской конференции «Актуальные проблемы радиобиологии и астробиологии. Генетические и эпигенетические эффекты ионизирующих излучений». Дубна, ноябрь 2016 г. 2016: 19-20. [Evdokimovskij EV, Abdullaev SA, Mitroshina IYu, Gubina NE The brain irradiation effect on the number of copies of mtDNA and its transcripts in non-irradiated tissues of mice. In: Current problems of radiobiology and astrobiology. Genetic and epigenetic effects of ionizing radiation. Dubna, 2016. 19-20. (In Russian)].
8. Сгибнева НВ, Федоров ВП, Гундарова О.П, Маслов Н.В. Пластичность нейронов сенсорной коры в условиях повышенного радиационного фона. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2017; 61(1): 20-6. [Sgibneva NV, Fyodorov V P, Gundarova OP, Maslov NV. Plasticity of sensorimotor cortex neurons in conditions of high radiation background. Medical Radiology and Radiation Safety. 2017; 61(1): 20-6. (In Russian)].
9. Рева АД. Ионизирующие излучения и нейробиология. М.: Атомиздат, 1974. 240 с. [Reva AD. Ionizing radiation and Neurochemistry. Moscow. 1974. 240 p. (In Russian)].
10. Давыдов БИ, Ушаков ИБ. Ионизирующие излучения и мозг: поведенческие и структурно-функциональные паттерны. Итоги науки и техники. Радиационная биология. М.: ВИНТИ. 1987. 336 с. [Davydov BI, Ushakov IB. Ionizing radiation and brain: behavioral and structural-functional patterns. Results of Science and Technology. Radiation Biology. Moscow: VINITI, 1987. 336 p. (In Russian)].
11. Ушаков ИБ, Федоров ВП. Малые радиационные воздействия и мозг. Воронеж: Научная книга, 2015. 536 с. [Ushakov IB, Fyodorov VP. Low radiation impacts and brain. Voronezh. 2015. 536 p. (In Russian)].
12. Ушаков ИБ, Федоров ВП, Сгибнева НВ. Нейроморфологические корреляты мощности дозы радиационного воздействия. Мед.-биол. и соц.-психол. пробл. безопасности в чрезв. ситуациях. 2019; (4): 59-69. [Ushakov IB., Fyodorov VP., Sgibneva NV. The neuromorphological correlation of radiation dose rate. Medico-Biological and Socio-Psychological Problems of Safety in Emergency Situations. 2019; (4): 59-69. (In Russian)].
13. Shea SK. A method for in situ cytophotometric estimation of absolute amount of ribonucleic acid using azure B. J. Histochem.

- Cytochem. 1970; 18(2): 143 - 52.
14. Федоров ВП, Петров АВ, Степанян НА. Экологическая нейроморфология. Классификация типовых форм морфологической изменчивости ЦНС при действии антропогенных факторов. Журнал теоретической и практической медицины. 2003;(1): 62–6. [Fyodorov VP, Petrov AV, Stepanyan NA. Ecological geomorphology. Classification of typical forms of morphological variability of the Central nervous system under the action of anthropogenic factors. Journal of Theoretical and Practical Medicine. 2003; (1): 62-6. (In Russian)].
 15. Карпов ВН, Ушаков ИБ, Давыдов БИ. Эффективная доза как раздражающее воздействие при фракционированном γ -облучения. Радиобиология. 1990; 30(1):107–12. [Karpov V.N., Ushakov IB., Davydov BI. Effective dose as an irritant in fractionated γ - irradiation. Radiobiology. 1990;30(1):107-12. (In Russian)].
 16. Бирюков АП, Котеров АН. Роль радиобиологии при оценке радиационного риска. Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2010; (1): 25-30. [Biryukov AP., Koterov AN. The role of radiobiology in the assessment of radiation risk. Medical and Biological Problems of Life. 2010;(1):25–30. In Russian)].
 17. Котеров АН. Ограничения при распространении закономерностей для клеток *in vitro* на область радиационной медицины. Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2009; 54(5):5-14. [Koterov AN. Restrictions on the distribution of laws for cells *in vitro* in the field of radiation medicine. Medical Radiology and Radiation Safety. 2009; 54(5):5-14. (In Russian)].
 18. Trott KR, Rosemann M. Molecular mechanisms of radiation carcinogenesis and the linear, nonthreshold dose response model of radiation risk estimation. In: The Effects of Low and Very Low Doses of Ionizing Radiation on Human Health. Ed. by WONUС. Amsterdam – New-York: Elsevier Sciences B.V. 2000: 65-77.
 19. Кривицкая ГН и др. Патоморфологические изменения нейронов головного мозга крыс в отдаленном периоде после облучения ионами углерода и гамма-излучением. Радиобиология. 1988; 28(5):681–5. [Krivitskaya GN, et al. Pathomorphological changes in rat brain neurons in the long-term period after exposure to carbon ions and gamma radiation. Radiobiology. 1988;28(5): 681–5. (In Russian)].
 20. Солдатова ЛП. Морфологические реакции нервных элементов лимбической области коры мозга на общее рентгеновское облучение. Радиобиология. 1986; 26(1):123-27. [Soldatova LP. Morphological reactions of the nerve elements of the limbic region of the cerebral cortex to general X-ray irradiation. Radiobiology. 1986;26(1):123-27 (In Russian)]

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 18.08.2020. Принята к публикации: 23.12.2020.

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

Financing. The study had no sponsorship.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 18.08.2020. Accepted for publication: 23.12.2020.