

ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На правах рукописи

Северюхин Юрий Сергеевич

НЕЙРОРАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ УСКОРЕННЫХ ЗАРЯЖЕННЫХ
ЧАСТИЦ

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

1.5.1. Радиобиология

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук

Лобачевский Павел Николаевич

Дубна – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Положения, выносимые на защиту	10
Апробация диссертации	11
Связь работы с научными программами	12
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	12
Публикации.....	13
Структура и объем работы	13
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Взаимодействие протонов и ядер углерода с биологическими объектами ...	14
1.2 Исследование влияния заряженных частиц на зрительный анализатор и восприятие	17
1.3 Влияние протонов на центральную нервную систему.....	17
1.4 Влияние ионов углерода на центральную нервную систему	26
1.5 Нейробиологические эффекты при облучении тяжелыми заряженными частицами.....	28
1.6 Обоснование целей научного исследования	29
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	33
2.1 Лабораторные животные.....	33
2.2 Условия облучения	34
2.3 Исследование поведенческих реакций	38

2.3.1 Оценка зрительных реакций и оптомоторного ответа.....	38
2.3.2 Исследование стереотипного поведения, двигательной и исследовательской активности, тревожности и неофилии.....	40
2.4 Исследование морфологических изменений в ЦНС	41
2.5 Исследование физиологических и гематологических показателей.....	43
2.6 Статистический анализ.....	43
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Влияние краниального облучения протонами 170 МэВ в дозе 5 Гр на зрительные реакции и оптомоторный ответ половозрелых крыс	44
3.2 Сравнительный анализ поведенческих реакций, физиологических показателей и морфологических изменений в головном мозге крыс после воздействия протонов различных энергий	49
3.2.1 Поведенческие реакции. «Т-лабиринт»	49
3.2.2 Поведенческие реакции. «Открытое поле».....	51
3.2.3 Морфологическое исследование	58
3.2.4 Физиологические показатели	82
3.3 Исследование поведенческих реакций и морфологических изменений клеток Пуркинье коры мозжечка крыс после облучения ионами углерода ^{12}C	85
3.3.1 Поведенческие реакции. Открытое поле.....	85
3.3.2 Морфологическое исследование	87
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98
БЛАГОДАРНОСТЬ.....	112

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ВКД – вне корабельная деятельности

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГКИ – галактическое космическое излучение

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучение

ИМБП – Институт Медико-биологических проблем

ЛПЭ – линейная передача энергии

ЛЯП ОИЯИ – Лаборатория ядерных проблем Объединенного института
Ядерных исследований

ОБЭ – относительная биологическая эффективность

ОИР – ориентировочно-исследовательская реакция

ПЛТ – протонная лучевая терапия

РАН – Российская академия наук

ЦНС – центральная нервная система

ЭС – эмоциональный статус

CTA - Conditioned taste aversion

NASA - National Aeronautics and Space Administration

NOR - Novel object recognition

NTCP - Normal tissue complication probability

SD - Sprague Dawley

TCP - Control probability

ВВЕДЕНИЕ

Космическое излучение (галактическое и солнечное) создают радиационную среду в космосе. Ее характеристики зависят от таких параметров, как расстояние от Земли, траектория движения космического аппарата и солнечная активность. Помимо этого, на экипаж орбитальной станции или межпланетного корабля оказывают влияние вторичные частицы, образующиеся в результате первичных взаимодействий космического излучения с обшивкой. Изучение влияния на организм частиц входящих в спектр космического излучения является важнейшей задачей космической радиобиологии. В соответствии с современной концепцией оценки рисков орбитальных и межпланетных космических полетов, на вероятность успешного выполнения миссии существенное влияние оказывает фактор радиационного поражения. При этом достоверно известно, что наибольшую опасность для космонавтов представляют тяжелые ядра галактического космического излучения [37]. Но и более легкие ядра, например ядра водорода и гелия, при определенных условиях, способны приводить к смертельному радиационному поражению, нарушению работы важных органов и систем организма, потере операторских функций членов экипажа космического корабля.

Опасность потоков этих частиц в основном обусловлена вероятностью возникновения солнечных протонных событий и штормов [37]. В результате подобных изменений солнечной активности могут возникать частицы с энергией более чем в 100 МэВ [52]. Несмотря на то, что время возникновения вспышек на Солнце можно спрогнозировать, при реализации дальнего космического полета, например на Марс, анизотропные выбросы звездного вещества могут стать серьезной проблемой. В то же время, и при нормальной солнечной активности вероятность радиационного поражения организма космонавта существенно возрастает за пределами магнитосферы Земли: в случае межпланетного транзита, освоения точек Лагранжа или, например, работе на поверхности Луны, когда

поток космических частиц может увеличиваться в тысячи и даже миллионы раз. По мнению специалистов NASA [74] доза от ускоренных протонов может составлять 50-60% от общей дозы ГКИ. Большую опасность протоны высоких энергий несут и для членов экипажа, в программе полета для которых предусмотрена внекорабельная (ВКД) деятельность. К повышенной радиационной нагрузке приводит также нахождение космического аппарата в пределах внутреннего радиационного пояса Земли. Состоящего в основном из протонов с энергией около 50 МэВ и электронов с энергией около 30 МэВ. Базовая форма этого пояса на данный момент еще четко не определена и может изменяться в зависимости от смещения геомагнитной или вращательной оси Земли [20]. Все описанные выше риски делают чрезвычайно актуальным исследование, направленные на изучение патогенеза в различных тканях организма после воздействия заряженных частиц. При этом важную роль необходимо уделить исследованиям влияния воздействия ускоренных ядер на головной мозг и зрительный анализатор. Это объясняется тем, что нарушение работы такой важной системы организма космонавта, как ЦНС, после радиационного воздействия, может поставить под угрозу не только выполнение полетной миссии, но жизнь и здоровье всех членов экипажа.

Большая часть знаний о радиационном риске в Космосе исходит из экспериментов на заряженных частицах, полученных на ускорителях [35]. Но подобного рода технические системы используются и для решения задач улучшения качества и продления жизни человека. На данный момент, применение протонной лучевой терапии для лечения опухолевых новообразований является наиболее перспективным направлением в радиационной онкологии [115].

В частности, при радиационной терапии рака головного мозга решающее значение имеют исследования структурно-функциональных изменений в тканях ЦНС и зрительной системы после воздействия частицами с высоким значением ЛПЭ.

Несмотря на современные технические достижения и постоянное совершенствование методов лечения, при подобного рода воздействиях нормальные ткани непременно оказываются в области радиационных полей [82]. В основе оптимизации процедур облучения пациентов при этом лежат два модельных понятия: вероятность контроля над опухолью (англ. tumor control probability (TCP)) и вероятность осложнения в нормальных тканях (англ. normal tissue complication probability (NTCP)). NTCP является вероятностью того, что в результате облучения нормальная ткань или орган придут в патологическое состояние (англ. “end-point”), которое относится к радиационным повреждениям нормальной ткани или органа. К таковым радиационным повреждениям относят клинически значимые осложнения (например, слепота в результате повреждения оптического нерва) или другие серьезные патологии. Важной проблемой онкорadiологии является недостаток эмпирических данных по специфике и тяжести подобного рода поражений [5]. Помимо этого, для составления оптимального плана протонной терапии небольших глубокозалегающих опухолей головного мозга, является чрезвычайно важным установить возможные морфологические и функциональные изменения в нормальных тканях ЦНС, которые могут быть вызваны подобного рода воздействиями. Это связано как с достаточно компактным пространственным расположением многих структур головного мозга (особенно в лимбической системе), так и с набором целого ряда важных функций, которыми они обладают.

Кроме того, следует учесть, что выявление корреляционной зависимости между поведенческими нарушениями и морфологическими изменениями в различных областях мозга позволит отразить истинную опасность облучения, поскольку известна неравнозначность этих отделов в регуляции жизненно важных функций организма [3].

Проведенные на данный момент исследования существенно различаются по типу используемого ионизирующего излучения, срокам в которые происходит оценка того или иного эффекта, фракционированию, пространственному

дозовому распределению и т.д. Результаты таких работ сложно сопоставимы. Важно учитывать, что многие поведенческие, биохимические и морфологические изменения у грызунов при облучении заряженными частицами наблюдаются в сроки равные нескольким неделям и месяцам [12, 50, 3], отмечены и более ранние биохимические и поведенческие нарушения [16, 17]. Однако не так много данных получено на экспериментальных моделях в среднесрочной перспективе (1-3 месяца).

Таким образом, исследование функциональных и морфологических изменений в центральной нервной системе и нарушений зрительного восприятия половозрелых крыс после протонного облучения и воздействия ионов ^{12}C в отдаленный период имеет важное научно-практическое и прикладное значение.

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования являлся морфофизиологический анализ нейробиологических эффектов после воздействия ионизирующих излучений (ИИ) с различными физическими характеристиками в экспериментах на крысах.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Изучить изменения поведенческих реакций крыс после облучения ИИ с различными физическими характеристиками;
2. Провести морфологический анализ структур головного мозга крыс после облучения гамма-излучением, протонами различных энергий и ионами углерода в период 1 и 3 месяца;
3. Сравнить радиобиологический эффект при облучении протонами различных энергий и гамма-излучением.

Научная новизна

Впервые проведен корреляционный анализ поведенческих реакций и морфологических изменений в различных отделах головного мозга крыс после

облучения гамма-излучением и заряженными частицами различных энергий. Исследованы изменения показателей стереотипии, исследовательской активности и мотивации животных при тотальном облучении организма и локальном воздействии на голову животного.

В ходе проведенного исследования установлено развитие амилоидоза в переднем мозге крыс, дистрофических изменений в коре, гиппокампе и мозжечке облученных животных в период от 1 до 3 месяцев. Проведен компьютерный морфометрический анализ нейронов головного мозга. Показано наличие областей мозга с большей радиочувствительностью. Впервые выявлены патоморфологические изменения и редукция клеточной популяции слоя эпендимоцитов головного мозга после воздействия протонами в пике Брэгга.

Установлен рост числа клеток Пуркинье с дистрофическими изменениями и их последующая элиминация в мозжечке крыс после облучения ионами углерода ^{12}C .

Предложен прецизионный метод количественной оценки зрительного восприятия лабораторных крыс. Установлено снижение концентрации внимания на зрительном стимуле у облученных протонами животных в отдаленные сроки после воздействия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проанализированы поведенческие реакции и патоморфологические изменения в головном мозге крыс в отдаленные сроки после воздействия ионизирующих излучений с различной линейной передачей энергии (ЛПЭ). Установлено, что воздействие протонов в пике Брэгга приводит к снижению двигательной активности, исследовательского поведения и увеличению стереотипии, развитию большего числа дистрофических изменений в ткани головного мозга, аналогичных воздействию ядер углерода в области плато поглощенной энергии.

Анализ полученных данных указывает на отсутствие выраженной нейродегенерации, но наличие нарушений белкового обмена (амилоидоз) и паренхиматозной дистрофии в тканях головного мозга на 30 сутки после воздействия заряженных частиц в дозе 1 Гр. Изучение морфологических изменений позволяет отнести полиморфный хилус, СА3 слой гиппокампа, мозжечок и слой эпендимоцитов желудочков головного мозга к наиболее радиочувствительным регионам.

Выявленная корреляция между относительным числом морфологических изменений, ЛПЭ и нарушениями поведения грызунов может указывать на взаимосвязь данных исследуемых параметров.

Описанные эффекты помогут лучше оценить риски межпланетных космических полетов в отдаленной перспективе и побочные эффекты адронной терапии онкологических заболеваний ЦНС.

Положения, выносимые на защиту

1. Тотальное воздействие заряженными частицами в дозе 1 и 5 Гр с различными физическими характеристиками приводит к снижению исследовательского поведения, изменению двигательной активности, нарушению внимания на зрительной стимуляции в период 1 и 3 месяца;
2. Облучение гамма-излучением и протонами различных энергий в дозе 1 Гр приводит к увеличению показателей стереотипного поведения у крыс.
3. Морфологические изменения головного мозга после облучения протонами в пике Брэгга характеризуются ростом числа нейронов с аномальными тинкториальными свойствами, гипертрофией клеток, образованием амилоидных бляшек в переднем мозге, деструкцией монослоя эпендимоцитов;
4. При облучении ионами углерода в дозе 1 Гр на 30 сутки в мозжечке крыс наблюдается рост дистрофических изменений нейронов с последующей элиминацией и выраженным нарушением цитоархитектоники;

5. Радиобиологический эффект на 30 сутки после облучения протонами более выражен в группе животных с тотальным воздействием в сравнении локальным облучением головы.

Апробация диссертации

Основные результаты работы были представлены и обсуждены на Young Scientists Conference «Perspectives for Development of Molecular and Cellular Biology-4» (Armenian Academy of Sciences, Erevan, Armenia, 2013); VII Съезде по радиационным исследованиям РАН (РАН, Москва, Россия, 2014); Первой научно-практической конференции «Природа, Общество, Человек» (Университет Дубна, Дубна, Россия, 2015); The Fourth International Conference «Modern Problems of Genetics, Radiobiology, Radioecology, and Evolution» (RAS, St.-Petersburg, Russia, 2015); Третьей ежегодной школе-конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ (Пансионат Дубна, Алушта, Россия, 2014); Международном научно-практическом форуме «Ядерных технологии на страже здоровья» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, 2016); Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия, 2017); 6-ой Школе-конференции молодых ученых и специалистов ОИЯИ (Пансионат Дубна, Алушта, Россия, 2017); Конференции «Радиобиологические основы лучевой терапии» (МРНЦ им. А.Ф. Цыба, Обнинск, Россия, 2017); XXIII Съезде Физиологического общества им. И.П. Павлова (ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия, 2017); Международной конференции «Современные проблемы общей и космической радиобиологии» (ОИЯИ, Дубна, Россия, 2017); Школе-конференции молодых учёных с международным участием «Ильинские чтения» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, 2018); Seventh International Conference on Radiation in Various Fields of Research RAD 2019 (Herceg Novi, Montenegro, 2019); JINR Young Scientists and Specialists Association Workshop «Alushta-2020» (Пансионат Дубна, Алушта, Россия, 2020);

Школе-конференции молодых учёных и специалистов «Ильинские чтения» (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия, 2020); Научной конференции OPEN BIO (Наукоград Кольцово, Россия, 2021); VIII съезде по радиационным исследованиям (ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, 2021); VII международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» – лучший доклад (УГМУ, Екатеринбург, Россия, 2022); The IV International Scientific Forum «Nuclear science and Technologies» (NAS RK, Almaty, Kazakhstan, 2022); Международной конференция «Актуальные проблемы радиационной биологии» (ОИЯИ, Дубна, Россия, 2022); IX Всероссийском с международным участием Молодежном научном форуме - победитель в секции «Биофизика, биомедицина Генетика» (ПИЯФ, Гатчина, Россия, 2022).

Связь работы с научными программами

Часть работ выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ в рамках научного проекта № 17-29-01028 и грантов ОМУС ОИЯИ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Отраженные в диссертации научные положения соответствуют области исследований специальности 1.5.1 – Радиобиология и охватывают П.4 «Механизмы формирования клеточных, молекулярных, генетических изменений в клетках млекопитающих и человека при действии различных видов излучений с разными физическими характеристиками» и П.6 «Клеточная радиобиология. Механизмы клеточной радиочувствительности и радиорезистентности; модификация радиочувствительности клеток» паспорта специальности.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатные работы в рецензируемых российских и иностранных изданиях, входящий в перечень ВАК Минобрнауки РФ (2 – RSCI, 3 – Scopus). Материалы диссертационной работы были доложены на российских и международных научных конференциях и опубликованы в 16 сборниках материалов конференций. Личный вклад автора состоит в разработке плана научных исследований, выполнении полного перечня экспериментальных работ, обработке результатов и подготовке публикаций. Экспериментальные данные диссертационного исследования получены автором лично.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, изложения полученных результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и библиографического списка. Работа изложена на 112 страницах печатного текста, включает 16 таблиц, 32 рисунка и список литературы из 116 источников, из которых 99 на иностранных языках.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Взаимодействие протонов и ядер углерода с биологическими объектами

Заряженные частицы, такие как протоны и ядра углерода, уже несколько десятилетий применяются в радиационной онкологии. Именно поэтому основной объем экспериментальных и клинических данных о взаимодействии ускоренных ядер с биологическими объектами определяют работы радиационных онкологов. Однако такая важная задача, как исследование реакций нормальных тканей на воздействие протонов и частиц с большей атомной массой, входит в спектр интересов космической радиобиологии.

Взаимодействие заряженных частиц с веществом можно рассмотреть на примере протонов. В отличие от фотонов и нейтронов протоны являются заряженными частицами, а в отличие от электронов их масса покоя во много раз больше массы покоя электронов (почти в 2000), что во многом определяет особенности дозовых распределений, создаваемых протонами. Основным видом их взаимодействия с веществом служит кулоновское рассеяние на электронах и ядрах атомов, ядерные реакции и испускание тормозного излучения, но последним в диапазоне энергий ПЛТ (протонной лучевой терапии) можно пренебречь. Из-за большой массы протоны при кулоновском рассеянии на электронах практически не отклоняются от направления своего движения. Другая ситуация имеет место при рассеянии на ядрах атомов, но такие взаимодействия происходят значительно реже. Неупругие ядерные реакции между протонами и ядрами атомов тоже относительно редкие, но они оказывают большое влияние на судьбу конкретного протона. При ядерной реакции налетающий протон проникает внутрь ядра, после чего такое составное ядро может испустить протон, дейтрон, тритон или тяжелый ион или один, или несколько нейтронов [55]. На молекулярном уровне, воздействие протонов приводит к образованию сложных повреждений ДНК, которые включают окислительные повреждения, апуриновые

и апиримидиновые сайты и одонитевые разрывы. Образование двунитевых разрывов ДНК и комплексных кластерных повреждений ДНК наблюдаются менее часто в сравнении с другими повреждениями, однако приводит к гибели клетки [110]. Известно, что протоны в пике Брэгга образуют большее количество летальных повреждений по сравнению с протонами, энергия которых выражается в плато на глубинном дозовом распределении. При этом снижается кинетика репарации и чаще образуются более сложные повреждения ДНК [76].

На клеточном уровне воздействие ускоренных протонов может приводить к апоптотической гибели клеток [34], некрозу [60], аутофагии [46], остановке клеточного цикла [111]. Облучение протонами в низких дозах индуцирует мутации в клетках головного мозга трансгенных мышей [25]. Подобного рода эффекты требуют качественной и количественной оценки, проведения комплексных исследований *in vivo*.

На организменном уровне при оценке радиобиологических эффектов необходимо учитывать глубинное дозовое распределение ускоренных заряженных частиц. На Рисунке 1 отражена зависимость относительной глубинной дозы от глубины проникновения частицы в организм пациента. При взаимодействии заряженных частиц с веществом за счет специфики энергопоглощения график потери энергии частицы описывается как кривая Брэгга с максимумом, называемым Пиком Брэгга.

В случае рентгеновских лучей (фотонов) дозы накапливаются на поверхности кожи, и поглощенные дозы являются максимальными примерно на 1-3 см непосредственно под кожей, а затем постепенно уменьшаются. Радиотерапия частицами с использованием таких частиц, как протон или углерод, характеризуется пиками Брэгга, в которых низкие поглощенные дозы наблюдаются до определенной глубины от кожи, а основная энергия излучения концентрируется в определенной зоне. В этом случае, если глубина рассчитана хорошо, излучение может эффективно доставляться к цели (например, опухоли) с более высокими значениями доз, чем те которые получают нормальные ткани.

Протоны выгодно использовать потому, что энергия излучения почти полностью рассеивается после пика Брэгга. В случае ионов углерода при прохождении нормальных тканей дозы излучения ниже, чем для протонов [27]. Исходя из представленных особенностей взаимодействия заряженных частиц с биологическими объектами, является чрезвычайно важной оценка радиобиологических эффектов ионизирующего излучений подобного рода.

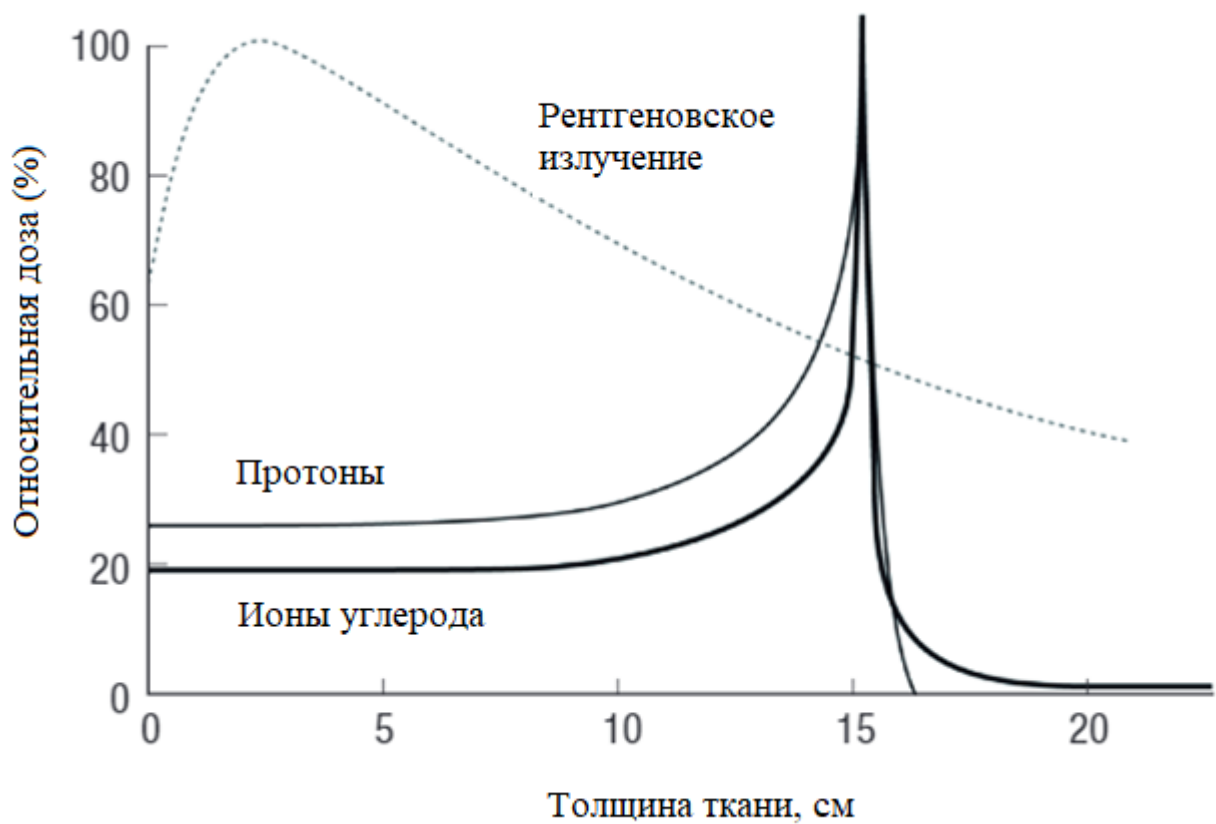


Рисунок 1 - Глубинное дозовое распределение рентгеновского излучения, протонов и ионов углерода (Choi and Cho, 2016, Journal of Korean Medical Science).

1.2 Исследование влияния заряженных частиц на зрительный анализатор и восприятие

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. Выявленные молекулярные и клеточные нарушения в сетчатке, хрусталике при действии ионизирующего излучения свидетельствуют о специфической чувствительности зрительной системы на подобного рода воздействия [109, 4, 19, 113]. Однако до сих пор остается открытым вопрос о связи выявленных нарушений с непосредственной реализацией функций зрительного восприятия в форме изменения поведенческих реакций, зрительных рефлексов [106]. Большинство публикаций о влиянии протонного излучения на поведенческие реакции крыс описывают применение поведенческих тест-систем для анализа процессов обучения, воспроизведения навыков, тревожности и локомоции. Исследования же поведения грызунов, основанного на зрительном восприятии, никогда не проводились.

1.3 Влияние протонов на центральную нервную систему

Важное место в отдаленной лучевой патологии принадлежит структурным изменениям центральной нервной системы млекопитающих. Первые исследования реакции ЦНС на воздействие протонами были проведены еще в 1950-х годах с целью оценить возможность использования их для лечения новообразований головного мозга. Разрушительное воздействие протонов на клетки мозга наблюдалось в известных экспериментах с использованием протонных пучков для хирургического рассечения [108, 62]. Экспериментальные

исследования с облучением крыс протонами 10 МэВ с поглощенной дозой 50 Гр в области пика ионизации выявили развитие некрозов, дистрофических изменений нейронов, и других структурно-функциональных нарушений в тканях головного мозга спустя 10 недель после облучения. Низкая проникающая способность протонов данной энергии обусловила поверхностную локализацию выявленных повреждений в головном мозге [69]. Аналогичные изменения тканей головного и спинного мозга обнаружены у кроликов и коз облученных протонами с энергией 185 МэВ в дозах до 400 Гр [63, 66, 88]. Воздействие протонами на спинной мозг в дозе порядка 200 Гр приводило к развитию прогрессирующих проводниковых расстройств, а после облучения кроликов в дозе 400 Гр уже на вторые сутки после облучения у животных развивались паралич задних конечностей и нарушение функций тазовых органов. Так же, было отмечено, что в остром периоде развития радиационных эффектов после локального облучения протонами в дозах 200-400 Гр у экспериментальных животных возникали обширные некрозы тканей головного мозга с перифокальной деструкцией и периваскулярными геморрагиями [18]. В этих исследованиях была показана зависимость развивающихся структурных изменений тканей нервной системы от поглощенной дозы протонов, а так же более раннее развитие морфологических изменений с увеличением дозы. В экспериментах на приматах, которые были подвергнуты воздействию пучка протонов диаметром около 7 мм, поглощенная доза в 5 Гр была признана толерантной по отношению к нервной ткани. Но, в тоже время, облучение в дозе 100 Гр приводило к некрозу облученных участков мозга через 1,5-2 месяца после воздействия [54]. Однократное и многократное общее облучение собак протонами с энергией 510 МэВ в дозах от 2,5 до 7 Гр приводило к развитию дистрофических изменений в различных отделах центральной и периферической нервной системы [1]. Обнаруженные в ходе данного исследования нарушения, были сходны с изменениями, вызванными рентгеновским и гамма-излучением. Вместе с тем, у животных, подвергнутых воздействию пучка ускоренных протонов, развивались субарахноидальные и

внутричерепные кровоизлияния, у некоторых собак возникали очаговые некрозы вещества мозга, которые не встречались после воздействия стандартного излучения. Так же было отмечено, что изменения ЦНС, развивающиеся после фракционного облучения были выражены в большей степени, чем после однократного воздействия излучений с одинаковой поглощенной дозой. Наличие патоморфологических изменений в сосудах и глиальных элементах указывало на расстройство трофики ЦНС.

В более поздних работах, при исследовании радиобиологических эффектов в ЦНС в острой фазе лучевой болезни, вызванной однократным и фракционным воздействием протонов высоких энергий (126 и 510 МэВ) в дозах от 2,5-6,7 Гр, отмечено наличие ярко выраженных признаков геморрагических гемостазиопатий с массивными кровоизлияниями в подболочечные пространства и вещество мозга [13, 14]. В то же время другие исследователи приходят к выводу о полной тождественности дистрофических изменений нервных и глиальных клеток в головном мозге животных (мышей, крыс, кроликов, собак) через 6-8 часов после радиационного воздействия протонами 660 МэВ, нейтронами с энергией от 25 КэВ до 10 МэВ и гамма-излучением ^{60}Co в дозах порядка 3 Гр. При этом отмечено, что на характер выявленных патоморфологических изменений не влияли ни вид животного, ни физические особенности ионизирующего излучения [2]. Большинство проводимых исследований долгое время носили описательный характер, что затрудняло оценку радиационных эффектов в ЦНС при воздействии различными видами излучений.

Изучение структурных нарушений в тканях головного мозга *Macaca mulatta* через две недели после облучения протонами в широком диапазоне доз и энергий выявило наличие некрозов в коре головного мозга, пикноза гранулярных клеток и воспалительных реакций в тканях ЦНС. У животных подвергнутых облучению, так же было отмечено накопление гликогена в астроцитах. Все обнаруженные нарушения проявлялись при облучении с меньшей поглощенной дозой в сравнении с гамма-излучением, однако не имели характерных особенностей [40].

При изучении количественных и качественных особенностей при поражении зернистых клеток коры мозжечка крыс в первые дни постнатального развития в различные периоды после воздействия протонов с энергией 25 и 50 МэВ была отмечена тенденция к нивелированию радиочувствительности нейронов наружного и внутреннего слоев коры мозжечка [6]. В данном исследовании при анализе структурных нарушений в слое клеток Пуркинье не было обнаружено существенных изменений после воздействия всеми видами излучений (гамма-излучение ^{60}Co , рентгеновское излучение и ускоренные протоны). Однако выдвигается гипотеза об обнаружении явлений деструкции этих высокодифференцированных клеток при воздействии излучением с большим ЛПЭ.

Целая серия работ по исследованию биологического действия частиц с различными физическими характеристиками была проведена на базе лаборатории радиобиологии тяжелых ионов Института медико-биологических проблем РАН в 1980-х годах. Количественный анализ дистрофических изменений нейронов коры головного мозга у крыс в различные сроки после облучения протонами (50, 645 МэВ и 9 ГэВ), ионами гелия (4 ГэВ/нуклон) и гамма-излучением ^{60}Co при поглощенных дозах от 1 до 6 Гр свидетельствует о нарастании количества дистрофически измененных нейронов с увеличением поглощенной дозы излучения и времени прошедшего после облучения. Протоны и ионы гелия релятивистских энергий обладают большей ОБЭ по сравнению с протонами высоких энергий и гамма-излучением. Через 1 месяц после облучения, поглощенная доза протонов и ионов гелия 1 Гр вызывала эффект, равный эффекту от поглощенной дозы гамма-излучения 4 Гр. Такая же закономерность развивающихся структурных нарушений в нейронах при действии протонов 9 ГэВ и ионов гелия сохранялась и в последующие сроки наблюдения. Анализ дистрофических изменений в нейронах, проведенный через 3 месяца после воздействия излучений, показал, что протоны и ионы гелия при поглощенной дозе 1 Гр к этому сроку вызывали по степени тяжести такие же повреждения, какие

были обусловлены гамма-излучением при поглощенной дозе 6 Гр. Дистрофические изменения нарастали к 6-месячному сроку наблюдения в большей степени после воздействия ускоренных заряженных частиц, чем после гамма-облучения. В данных экспериментах проявлялась временная неравномерность развития дистрофических изменений в нейронах ЦНС. Характерной особенностью воздействия всех использованных видов излучений на нейроны ЦНС экспериментальных животных являлось прогрессивное увеличение количества дистрофически измененных нейронов во времени. Морфологические изменения нейронов сенсомоторной коры головного мозга крыс сопровождались не только количественными, но и качественными изменениями тканей и клеток других отделов ЦНС. Выраженные изменения наблюдались и в гипоталамусе. Особенно часто встречались клетки с гипер- и гипохромно окрашенными ядрами, грубой зернистостью цитоплазмы, а также так называемые «исчезающие нейроны». В различных отделах головного мозга можно было наблюдать нейроны и глиальные клетки с пикнотичными ядрами. Эти изменения сопровождались утолщением сосудистых стенок и их гомогенизацией, набуханием клеток эндотелия. Однако описанные выше нарушения касались относительно небольшого числа клеточных элементов. Дистрофические изменения нейронов встречались так же и у необлученных животных, но были выявлены в меньшей степени [11, 12].

Дальнейшие исследования влияния воздействия тяжелых ионов ^{12}C , ^{16}O , ^{19}F , на структурные изменения в ЦНС, морфометрические характеристики нервных и глиальных клеток свидетельствуют о наличии деструктивных изменений в нейронах коры головного мозга крыс, выраженных в большей степени в сравнении со стандартным (гамма) излучением [12]. Автор обращает внимание на наличие определенных компенсаторно-приспособительных изменений в ЦНС после воздействия тяжелыми заряженными частицами и специфическую динамику развития постлучевых повреждений. Отмечено, что для объективной оценки радиационной опасности заряженных частиц требуются длительные

наблюдения. Отсутствие выраженных патоморфологических изменений в нервной ткани в остром периоде лучевого поражения при относительно низких дозах не означает, что воздействие прошло без последствий. Для реализации лучевого повреждения в тканях головного мозга млекопитающих требуется определенное время (более 3 недель). Автор считает, что подобного рода динамика характерна для клеточных систем, утративших в ходе эволюции способность к обновлению.

Развитие протонной терапии рака и возросший интерес к межпланетным космическим полетам привели к возрождению интереса к исследованиям в области радиационной нейрофизиологии заряженных частиц. За последние 20 лет количество публикаций по всему миру по данной проблеме увеличилось более чем в 15 раз. Причем только 18% из них посвящены изучению влияния протонов на центральную нервную систему [51]. Изменились так же и представления о физиологии самого головного мозга млекопитающих, методология научного исследования и технологические приемы. Все чаще в работах авторы проводят оценку поведенческих реакций животных, используют современные достижения клеточной и молекулярной биологии, информационных технологий.

В первых экспериментах по исследованию поведенческих реакций после облучения протонами была проведена оценка стриатум-зависимого аддиктивного поведения. При изучении условно-рефлекторно выработанной пищевой аверсии (Conditioned taste aversion (CTA)) у самцов крыс после облучения протонами было выявлено дозозависимое увеличение интенсивности пищевого отторжения у облученных животных в дозах от 0,2 до 5 Гр (энергия частиц 155 МэВ) [87]. Облучение животных частицами с существенно большей энергией (1000 МэВ) в дозах от 0,5 до 1,25 Гр привело к снижению оперантного научения через 1-3 месяца после воздействия [86]. В тоже время, воздействие протонами в дозах от 1,5 до 4 Гр (энергия – 250 МэВ) не привело к появлению различий в оперантном поведении в протоколе с фиксированной пропорцией [85]. Так же не было обнаружено различий между облученными животными и контрольной группой

при изучении пространственной памяти (тест Морриса) и индуцированного метамфетамином отвращения к пище (СТА) [99].

При изучении показателей внимания, скорости моторных реакций в тесте rPVT (The Rodent Psychomotor Vigilance Test) у крыс после краниального воздействия протонами в дозах от 0,25 до 2 Гр с энергией 150 МэВ было отмечено, что облучение приводит к развитию поведенческого дефицита. Данные нарушения сопровождались изменением в активности транспортера дофамина и экспрессии рецептора дофамина D2 [30, 31]. Неоднозначные эффекты наблюдались при изучении пространственной памяти в водном тесте Морриса. Через 2 недели после воздействия протонами в дозе 1 Гр мыши провели меньше времени в целевом квадранте во время первого пробного испытания [43]. Через 6 месяцев после облучения ускоренными протонами в дозах 0,1-1 Гр у мышей были выявлены нарушения в формировании пространственного передела навыка (Reversal learning). При этом отмечено, что облучение привело к отложению бета-амилоидов в тканях головного мозга и изменениям электрофизиологических показателей. Нарушения пространственной памяти (оценку которой производили в лабиринте Барнс через 3-6 месяцев после облучения) наблюдались после воздействия протонами с энергией 150 МэВ в дозах от 0,1 до 1 Гр [92, 21].

Поиск дефектов гиппокамп-зависимой памяти не ограничивался исследованием пространственной памяти. У животных было выявлено снижение реакции к распознаванию нового объекта (Novel object recognition) NOR через 3 месяца после облучения в дозах 0,25, 0,5 и 2 Гр [86,83, 77] или через 2 недели после воздействия протонами в дозе 1 Гр [43]. Определенные изменения активности мышей в тест-системе «Открытое поле» происходили через 1-3 месяца после облучения ^1H в дозах 3 или 4 Гр с алюминиевым экранированием с плотностью 15 гр/см², а также без экранирования в существенно меньших дозах 0,5 и 1 Гр через 9 месяцев после облучения [80, 50]. Стоит отметить, что исследования памяти в экспериментах на грызунах не показали достоверных различий между этими показателями в группах облученных (протоны 0,1-2 Гр) и

интактных животных. Однако при морфологических исследованиях наблюдалась активация микроглии, угнетение нейрогенеза и нарушение пролиферации в субгранулярной зоне гиппокампа [83, 84, 104]. Другие изменения поведенческих реакций при облучении организма протонами описываются как снижение двигательной активности на установке Ротарод через 2 недели после облучения в дозе 4 Гр и развитие рвотного рефлекса у хорьков после облучения в дозе 2,5 Гр [80, 53]. Исследование отдаленных эффектов воздействия на ЦНС частиц с различной ЛПЭ в относительно малых дозах 10 до 250 сГр представлены в работе Пателя [79]. Результаты которой показывают, что воздействие на ЦНС заряженных частиц ведет к дефициту поведенческих характеристик в долгосрочной перспективе (5 и 9 месяцев). Что может быть обусловлено развитием структурных нарушений в головном мозге грызунов. В ходе исследований реакций предимпульсного ингибирования и испуга не было обнаружено различий между облученными ^1H в дозах от 0 до 5 Гр и интактными животными [38]. При комплексном изучении эффектов воздействия протонов высоких энергий на двигательную, ориентировочно-исследовательскую активность, скорость дискриминантного обучения, долговременную память, а также содержание моноаминов и их метаболитов в ключевых структурах мозга самцов крыс было показано достоверное снижение двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, ухудшение обучения и снижение концентрации катехоламинов в префронтальной коре и концентрации 3-МТ в стриатуме при облучении животных в пике Брэгга [17, 98]. При этом важно отметить, что изучение поведенческих реакций животных происходило в существенно более короткие сроки после облучения, чем у других исследователей. Возможно, именно этим и объясняется неоднозначность полученных ранее результатов: протонное облучение в дозах 1,5 и 3 Гр (энергия частиц 165 МэВ) приводило к достоверному снижению двигательной и ориентировочно-исследовательской активности и возрастанию пассивно-оборонительных реакций крыс в тесте «Открытого поля», однако не вызывало

существенных изменений в скорости обучения животных в лабиринте и в обмене моноаминов в исследованных структурах мозга. По-видимому, данные изменения в большей степени затрагивали эмоционально-мотивационную систему, а не когнитивные функции [16]. При изучении доза–эффект и время–эффект зависимостей при облучении протонами было установлено, что в период 1-8 сутки после протонного облучения мышей и крыс в нелетальных дозах (0,5-5,0 Гр) происходит дозозависимое снижение основных показателей спонтанной двигательной активности грызунов. К 90 суткам после облучения отмечается повышенный уровень показателей ориентировочно-исследовательской реакции (ОИР) и эмоционального статуса (ЭС) во всех группах облученных животных по сравнению с контролем. Нарушение двигательной активности облученных протонами грызунов в ранний период и её относительная нормализация в отдаленный после облучения период происходят на фоне увеличения числа нейронов с дистрофическими изменениями в гиппокампе и мозжечке мышей [7]. Облучение мышей самцов F1 (CBA×C57BL/6J) пучком протонов (1, 2 и 4 Гр) вызвало неоднозначные проявления в адаптивном поведении животных. При использовании когнитивного теста на поиск входа в укрытие облученные мыши достоверно хуже, чем контроль, решали те этапы теста, где для попадания в комфортное отделение камеры надо было копать стружку. В то же время те этапы теста, где надо было удалить «пробку», препятствовавшую переходу, они решали тест достоверно лучше контроля. У мышей облученных групп выявлено ослабление нейрогенеза в двух пролиферативных зонах переднего мозга [10].

Воздействие ядрами ^1H даже в низких дозах 0,5-2 Гр приводит к существенной деградации дендритов в различных отделах гиппокампальной формации [77]. При воздействии протонного излучения на головной мозг в относительно больших дозах 11-20 Гр наблюдаются дефицит памяти, снижены уровни переносчика дофамина, тирозингидроксилазы и дофаминового рецептора D1 в полосатом теле [112].

Наблюдаются так же и электрофизиологические изменения в возбуждающей и тормозящих сетях гиппокампа после облучения протонами. Через 3 месяца после облучения в дозе 1 Гр группой исследователей наблюдалась гиперполяризация покоящихся мембран, уменьшение входного сопротивления, увеличение постоянного тока натрия и увеличение скорости миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов в СА1 слое, а также к повышению синаптической возбудимости в зубчатой извилине [77, 72, 101]. Воздействие протонами в дозе 0,5 Гр значительно увеличивает возбуждающие постсинаптические потенциалы, уменьшает спонтанные колебания и снижает СВ1-зависимое тоническое ингибирование высвобождения ГАМК в СА1 [21, 77, 78, 64]. Молекулярные изменения, вызванные облучением ^1H , указывают на измененную экспрессию глутаматергического рецептора (Nr1, GluR1, Syn1, SAP97 и маркеров синаптической плотности в гиппокампе [50, 77, 26]. Стоит отметить, что неблагоприятное воздействие протонами на ЦНС снижается или вовсе отсутствует в экспериментах на животных моделях устойчивых к оксидативному стрессу [78, 26, 68].

Тем не менее, некоторые исследователи вообще не обнаруживают изменения в памяти и протеоме мозга самок мышей после фракционного тотального облучения протонами [100].

1.4 Влияние ионов углерода на центральную нервную систему

Ионы углерода, кислорода и железа являются наиболее распространенными тяжелыми заряженными частицами в спектре ГКЛ [73]. По оценкам специалистов NASA частицы с $Z > 9$ вносят от 5 до 10% общей дозы в ходе марсианской экспедиции. Допустимые пределы воздействия частиц с $Z > 9$ в течение одного года составляет 10 сГр а для всей карьеры 25 сГр [74].

Терапия онкологических заболеваний с использованием ионов углерода имеет ряд преимуществ: это более низкая токсичность для нормальных тканей,

высокой ОБЭ в области локализации опухоли, пониженным коэффициентом кислородного усиления. Некоторые радиобиологические свойства плотно ионизирующих ионов углерода настолько отличаются от рентгеновских лучей и протонов, что могут вызывать благоприятные реакции, такие как усиление иммунного ответа и снижение ангиогенеза и метастатического потенциала [107].

В исследованиях *in vivo* на ионах углерода ^{12}C наблюдаются следующие изменения: снижение нейрогенеза в тканях ЦНС, элиминация пролиферирующих клеток. Выявленные нарушения восстанавливаются в течение 3 месяцев и тяжесть поражения имеет дозозависимый характер [91, 116]. В отчетах японских исследователей из National Institute of Radiological Sciences, Chiba представлены данные об изменении поведенческих реакций и морфологии нейронов гиппокампа после облучения ионами углерода в дозе 30 Гр. Через 16 недель после облучения у облученных мышей наблюдались выраженные нарушения обучения, по сравнению с контрольными животными того же возраста. Так же у облученных мышей наблюдалось существенное ухудшение рабочей памяти. Гистопатологическое исследование не выявило каких-либо аномалий в облученном мозге через 36 часов после облучения, хотя у облученных мышей наблюдалась выраженная дегенерация нейронов в гиппокампе в пределах слоев CA1-CA3 через 16 недель после облучения. В группе облучения ионами углерода нейроны в областях CA1-CA3 гиппокампа были уменьшены на 30-49% [105]. Исследования с применением существенно более низких доз (140 мГр) показывали улучшение когнитивных функций крыс после комбинированного воздействия ионами углерода и гамма-облучением. Подобный прокогнитивный эффект связывают с изменениями в серотонинергической системе [56]. При исследовании влияния облучения ионами углерода 13 кэВ/мкм на смешанные культуры астроцитов и микроглии, полученных из головного мозга новорожденных мышей было обнаружено уменьшение количества микроглии и астроцитов при дозе 2 Гр [75].

Исследования морфологических изменений головного мозга при пренатальном облучении крыс выявили целый ряд патологий развития. Влияние облучения ионами углерода в дозе 1,5 Гр на развитие мозжечка было сильнее, чем влияние рентгеновского облучения в такой же дозе и аналогично рентгеновскому облучению в дозах 2,0-2,5 Гр [44]. Подобные нарушения наблюдались и в коре головного мозга животных [45].

1.5 Нейробиологические эффекты при облучении тяжелыми заряженными частицами

Специфика взаимодействия с веществом корпускулярных видов излучений с высоким значением ЛПЭ состоит в следующем: энергия тяжелого иона высвобождается вдоль центра трека, где ионизационные события являются достаточно плотными. Ширина ядра может достигать нескольких нанометров. Вокруг ядра находится облако дельта-электронов, где плотность ионизационных событий намного меньше, чем в ядре, но простирается на значительные расстояния. Эти особенности позволяют даже одной частице тяжелых ионов воздействовать на множество клеток в облучаемой ткани, что делает биологическое воздействие тяжелых ионов отличным от воздействия других радиационных явлений [20].

Из обзора Киффера следует, что более половины исследований о влиянии тяжелых заряженных частиц на ЦНС проводится с использованием потоков ионов железа ^{56}Fe . Остальные результаты получены с использованием протонов ^1H , ядер гелия ^4He , углерода ^{12}C , кислорода ^{16}O , неона ^{20}Ne , кремния ^{28}Si , аргона ^{40}Ar , титана ^{48}Ti и смешанных полей. Из выявленных нейробиологических эффектов при экспозиции с использованием ионов железа можно выделить наблюдаемую после облучения пищевую аверсию, снижение способности к обучению, снижение памяти, поведенческий дефицит в различных лабиринтах и установке “Открытое поле”, тесте распознавания нового объекта. При воздействии ионов

кислорода наблюдалось повышение памяти о страхе, нарушения социальной памяти, повышение уровня тревоги и эффекты сходные с теми, которые наблюдались при воздействии ядер других химических элементов. Аналогичные нарушения наблюдались даже при воздействии сравнительно малых доз (0,1-5 Гр) ионов гелия [51].

Ранние исследования морфологических изменений в головном и спинном мозге на ионах неона и углерода показали развитие некроза олигодендроцитов, через несколько часов после облучения, к 4-5 неделе наблюдался пик образования некротических нейронов, развитие миелопатии проходило сильнее при облучении в пике Брэгга [59, 65].

Примечательны результаты серии экспериментов, описанных в монографии Б. С. Федоренко [12]. Морфологические изменения в нервной ткани при экспозиции на искусственных спутниках Земли с детекторами частиц и в наземных экспериментах на ионах железа, углерода, аргона, кислорода, гелия, фтора имеют много общих закономерностей. В частности, это касается значительных структурных изменений в сетчатке глаза, тканях ЦНС (в отношении нервных и глиальных клеток), образовании клеточных включений различного происхождения после облучения, изменении морфометрических характеристик. Были выявлены различия и в динамике образования нарушений в головном мозге после воздействия излучений с различным значением ЛПЭ. Стоит отметить, что обработка данных в упомянутых экспериментах проходила без применения компьютерных технологий и программ для анализа микроскопических изображений.

1.6 Обоснование целей научного исследования

Таким образом, анализ литературных данных показывает, что, несмотря на большое количество экспериментальных работ, до сих пор нет полного представления о морфологических изменениях и нейродегенеративных процессах

в ЦНС после воздействия протонами и ионами углерода. Не всегда очевидной является связь между пострадиационными структурными и функциональными нарушениями. Так же нет объективной оценки наличия прокогнитивных эффектов в некоторых экспериментальных работах [56]. Не более 10% исследований проходят на самках млекопитающих [51]. В то время как, недавние исследования указывают на четкие различия в реализации радиационно-индуцированных изменений в ЦНС у особей различного пола [61]. Важно отметить, что и возраст животных оказывает непосредственное влияние на многие показатели поведенческих результатов [97].

На данный момент радиационно-индуцированные патофизиологические реакции в тканях ЦНС описываются схемой представленной на Рисунке 2 [114].

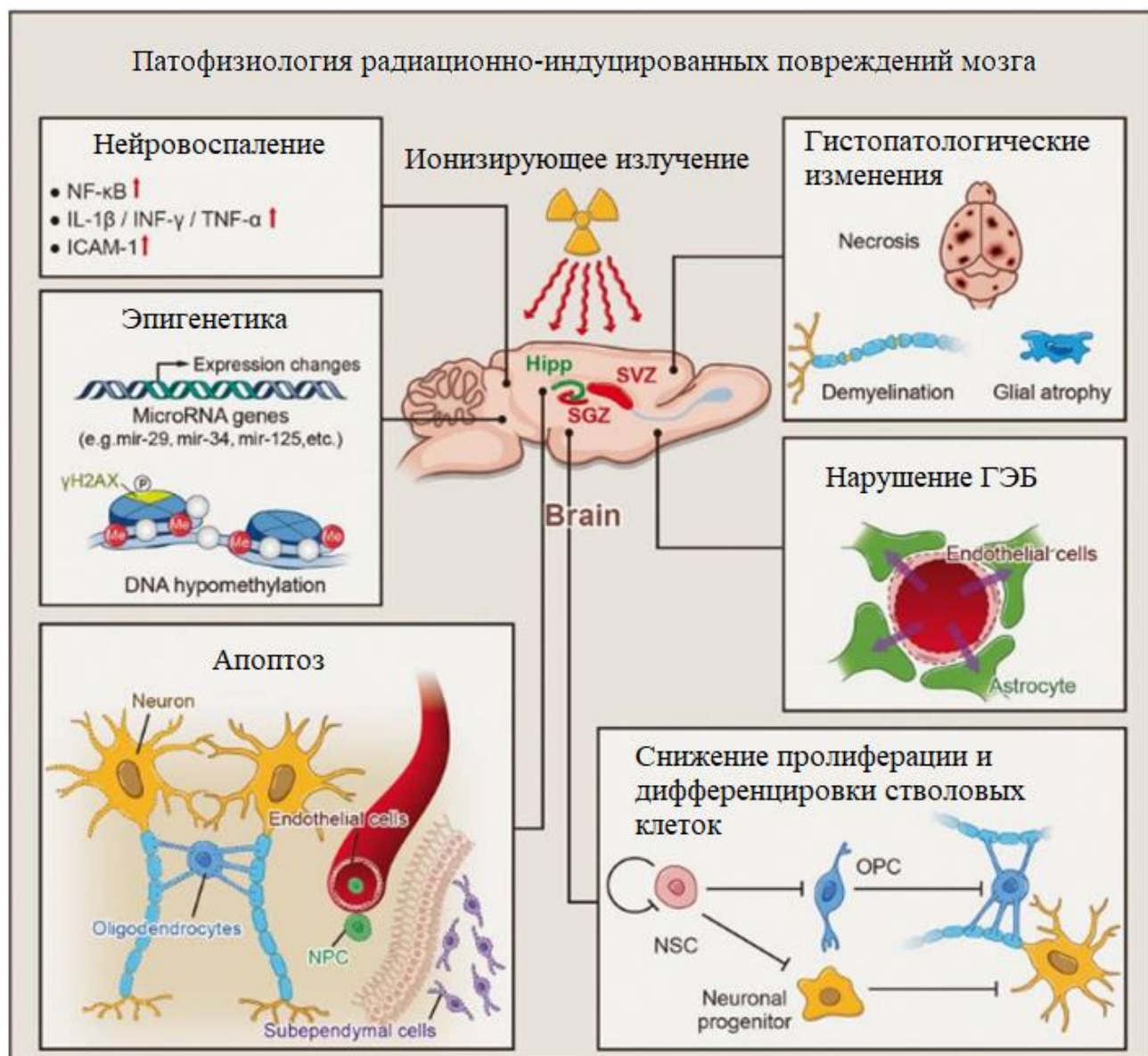


Рисунок 2 - Патоморфологические изменения в головном мозге после воздействия ионизирующего излучения (Yang et al., 2016).

Данные нарушения включают в себя нейровоспаление, эпигенетические нарушения, индукцию апоптоза в мозге, некроз, демиелинизацию, глиальную атрофию, нарушения гематоэнцефалического барьера и угнетение нейрогенеза. Однако в большинстве исследований применялись достаточно большие дозы в диапазоне от 5 до 40 Гр. Проведенные исследования существенно различаются по типу используемого ионизирующего излучения, срокам в которые происходит оценка того или иного эффекта, фракционированию, пространственному

дозовому распределению и т.д. Кроме того следует учесть что выявление корреляционной зависимости между поведенческими нарушениями и морфологическими изменениями в различных областях мозга позволит отразить истинную опасность облучения, поскольку известна неравнозначность этих отделов в регуляции жизненно важных функций организма [3].

Важно учитывать, что многие поведенческие, биохимические и морфологические изменения у грызунов при облучении заряженными частицами наблюдаются в сроки равные нескольким неделям и месяцам [12, 50, 3]. Однако не так много данных получено на экспериментальных моделях в среднесрочной перспективе (1-3 месяца).

Все вышеизложенное указывает на то, что проблема оценки поведенческих реакций и морфологических изменений в ЦНС половозрелых крыс после облучения заряженными частицами является открытой и имеет важное научно-практическое и прикладное значение.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Лабораторные животные

В экспериментах было использовано 69 аутбредных крысы SD (Sprague Dawley) (38 самцов и 31 самка), приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино». Возраст животных составлял от 8 до 15 недель, масса тела от 190 до 245 гр. Животных содержали на стандартном рационе с доступом к воде и корму *ad libitum*. Все животные прошли предварительную адаптацию к условиям вивария в течение 2 недель. Разделение животных на группы было произведено до облучения методом рандомизации. Поведенческие тесты были проведены на 1, 14, 30 и 90 сутки после облучения. На 30 и 90 сутки после облучения была произведена декапитация, аутопсия и отбор органов для исследования. Крысы контрольных групп подвергались тем же процедурам (транспортировка, помещение в контейнеры, стресс), что и животные экспериментальной группы, за исключением самого облучения. Анестезирование не проводилось.

Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях EST № 123 от 18 марта 1986 г. и «Правилам надлежащей лабораторной практики», утвержденные приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016). Процедуры, проводимые крысами, соответствовали правилам работы, утвержденными биоэтической комиссией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра РФ – Института Медико-Биологических проблем РАН и протоколом НТС ЛРБ ОИЯИ № 119-3.

2.2 Условия облучения

Гамма-облучение проводили с использованием источника ^{60}Co на установке РОКУС-М Медико-технического комплекса ОИЯИ в кранио-каудальном и дорзo-вентральном направлении. Мощность дозы составляла 0,869 Гр/мин. Значение РИП – 75 см.

Облучение протонами с энергией 170 МэВ проводили на протонном пучке фазотрона ЛЯП ОИЯИ. Непосредственно перед облучением, крысы были помещены в прозрачные фиксирующие контейнеры из полиметилметакрилата (ООО «НПК Открытая Наука») при этом голова и туловище животных располагались в цилиндре длиной 160 мм. Доза на выходе пучка составляла 1 и 5 Гр (для эксперимента по исследованию зрительного восприятия). Мощность дозы – 1 Гр/мин. Поток частиц на выходе из коллиматора был равен $1,276 \times 10^9$ частиц/см². Дозиметрическую калибровку проводили ионизационной камерой ТМ30013 клинического дозиметра PTW UNIDOS-E. При исследовании зрительного восприятия облучению были подвергнуты только головы животных при этом, в момент облучения животные располагались в контейнерах, прикрепленных к специализированной рамке, при моделировании тотального воздействия животные всех групп были облучены в кранио-каудальном направлении (Рисунок 3).



Рисунок 3 - Расположение контейнера с лабораторными животными во время экспозиции на гамма-терапевтической установке РОКУС М (А) и Фазотроне ЛЯП ОИЯИ (Б, В). А, Б – в ходе эксперимента с тотальным воздействием, В – при краниальном облучении в дозе 5 Гр.

Для контроля облучения использовали радиохромную пленку (Рисунок 4).

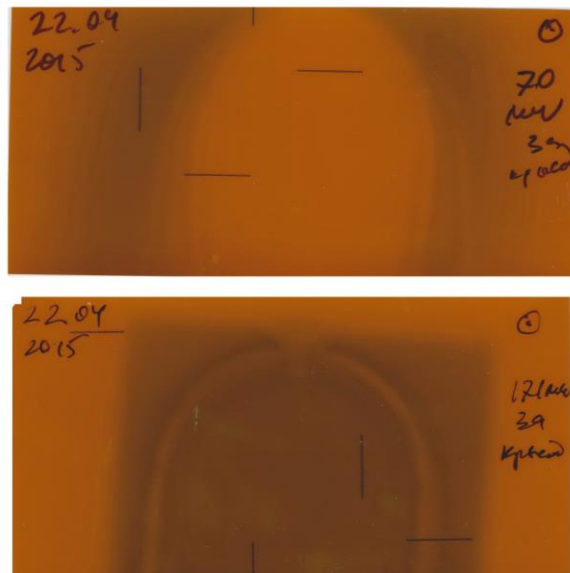


Рисунок 4 - Изображения на радиохромной пленке после облучения контейнера с животными протонами с энергией 70 МэВ и 171 МэВ

Глубинное дозовое распределение используемого пучка для водозвивалетного материала, рассчитанное в относительных единицах, указано на Рисунок 5.

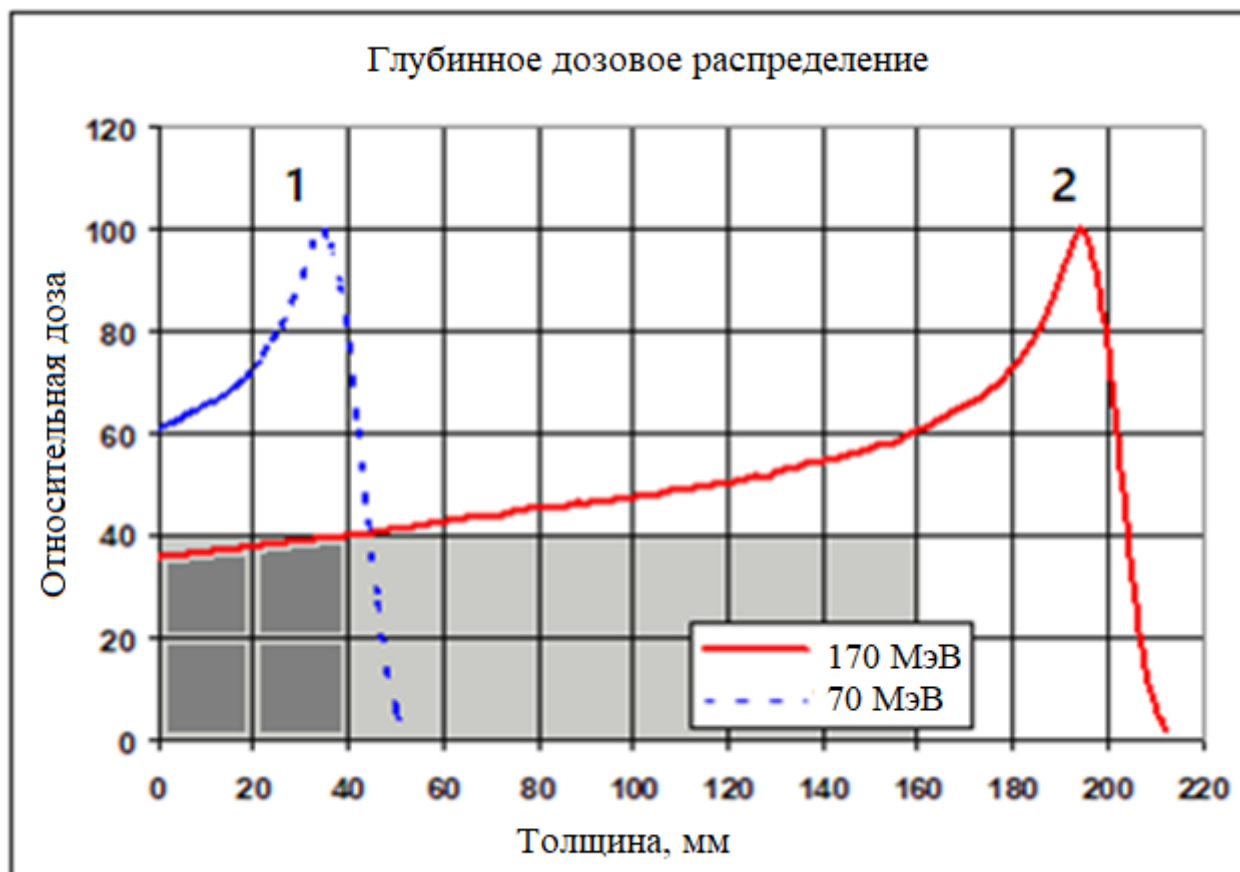


Рисунок 5 - Глубинное дозовое распределение протонного пучка в водозвивалетном материале (светло серым цветом отмечена длина контейнера с крысой, темно серым – позиция головы крысы).

1 – с замедлителем, 2 – без замедлителя.

Облучение в пике Брэгга проводилось при наличии дополнительного водозвивалетного замедлителя 120 мм. Поток частиц на выходе из коллиматора составлял $1,16 \times 10^9$ частиц/см². Дозиметрическая калибровка проводилась ионизационной камерой ТМ30013 клинического дозиметра РТW UNIDOS-E. Распределение животных по группам и условия облучения отражены в Таблице 1.

Таблица 1 - Условия облучения.

Группа	Доза, Гр	Мощность Дозы, Гр/мин	Поток, частиц/см ²	ЛПЭ, кэВ/мкм	Число животных
Контроль	-	-	-	-	7
Гамма	1	0,8	-	0,2	8
Протоны 170	1	0,7	$1,16 \cdot 10^9$	0,5	8
Протоны 70	1	1,2	$1,04 \cdot 10^9$	0,97	8

Облучение животных ионами ^{12}C с энергией 500 МэВ/нуклон, линейной передачей энергии (ЛПЭ) 10,6 кэВ/мкм и мощностью дозы 0,03 Гр/мин проводилось на пучке ускорителя «Нуклотрон» в Объединенном институте ядерных исследований (г. Дубна). Крысы в количестве 10 особей подвергались однократному тотальному облучению в дозе 1 Гр в кранио-каудальном направлении. Контейнеры с животными располагались последовательно по ходу пучка частиц. За один сеанс подвергались воздействию ионами углерода ^{12}C две особи. Поток частиц через контейнер на входе пучка составлял $1,16 \times 10^7$ ядер/см², через второй контейнер $5,53 \times 10^7$ ядер/см². Измерение поглощенной дозы выполнялось с помощью воздушной ионизационной камеры с размером чувствительной области $4,2 \times 4,2$ см². Для создания квазиоднородного поля излучения пучок ионов ^{12}C расфокусировался магнитными линзами перед местом облучения. Неоднородность поля, по координатам X и Y не превышала $\pm 5\%$ в пределах области облучения. Ионизационная камера градуировалась для измерения потока частиц с помощью активационных детекторов или сцинтилляционных счетчиков. Суммарная погрешность определения поглощенной дозы не превышала 10%. Условия облучения в ходе эксперимента представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Условия облучения.

Группа	Доза, Гр	Мощность Дозы, Гр/мин	Поток, частиц/см ²	ЛПЭ, кэВ/мкм	Число животных
Контроль	-	-	-	-	8
Гамма	1	0,8	-	0,2	9
Ионы ¹² C	1	0,03	6,1 *10 ⁷	10,6	10

2.3 Исследование поведенческих реакций

2.3.1 Оценка зрительных реакций 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, перед животным, был установлен монитор HP 221 Series Wide LCD с частотой 60 Гц, разрешением 1920×1080. Видеосъемку активности крысы проводили на видеокамеру Huawei Honor 13 Mpx (диафрагма F2.0. угол 27 мм), закрепленную на штативе. Схема установки представлена на Рисунке 6. Изменение коэффициента контраста проводили при помощи программного обеспечения Gamma Panel 1.0.0.20. Освещенность на момент тестирования – 400 люкс.

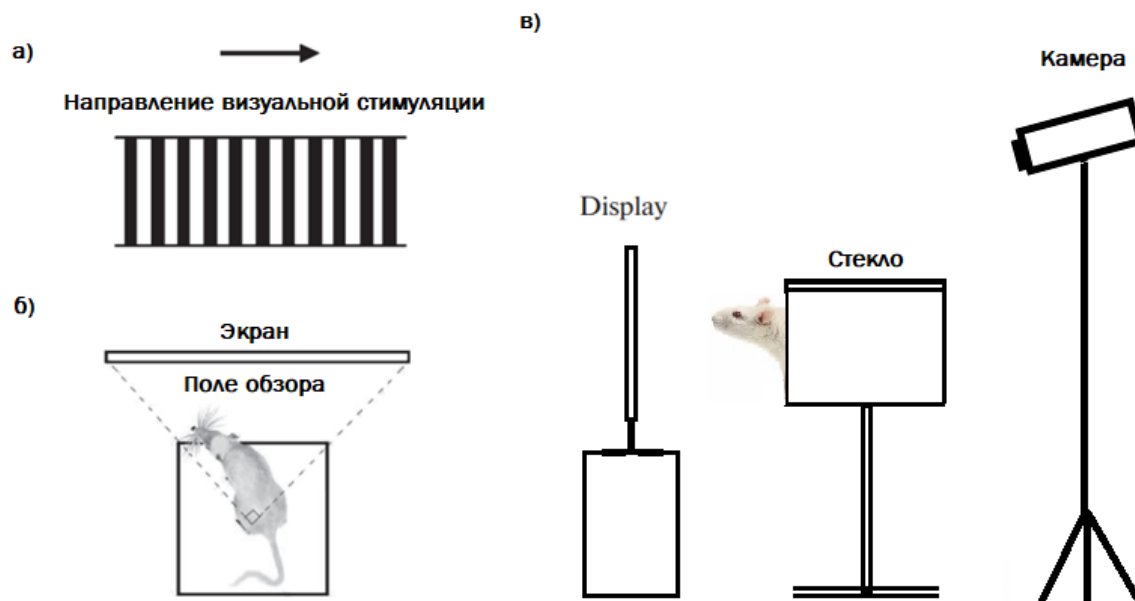


Рисунок 6 - Схема установки для тестирования зрительного поведения крыс:
(а) направление визуальной стимуляции, (б) – вид сверху, (в) – вид сбоку.

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 деление на условные зоны. Отслеживание параметров зрительного поведения проходило в «Поле обзора» (Рисунок 6). 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 крыс. Значение параметра оптомоторного ответа получали путем расчета отношения корректных (слева направо) поворотов головы животного к некорректным (справа налево).

2.3.2 Исследование стереотипного поведения, двигательной и исследовательской активности, тревожности и неофилии

В течение 3 недель до облучения с животными всех групп ежедневно проводили процедуры хэндлинга. За 2 часа до начала каждого тестирования клетки с крысами помещались в процедурную комнату. Исследование поведенческих реакций проводили при освещенности 200 люкс. Фотографии используемых поведенческих установок представлены на Рисунке 7.

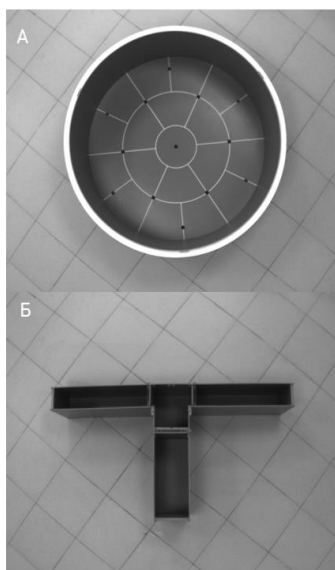


Рисунок 7 - Тест системы «Открытое поле» (А) и «Т-лабиринт» (Б).

Оценка значений показателя спонтанного чередования в Т-лабиринте (TS0701-R, Установка «Т-лабиринт» для крыс, материал – не ламинированный поливинилхлорид, размер стартового рукава 50x16 см, размер боковых рукавов 50x10 см, высота стенок 32 см, цвет – серый, ООО «НПК Открытая Наука»)

проводили в течение 4 дней за неделю до облучения и на 27, 28, 29, 30 сутки после облучения. Одна проба состояла из двух посадок. Время на выбор рукава составляло 90 секунд, если животное не перемещалось в какой-либо рукав лабиринта, попытка регистрировалась как «отказ». После перехода в рукав, животное находилось в нем в течение 60 секунд, после чего извлекалось и помещалось обратно в стартовый рукав Т-лабиринта [33]. Был проведен подсчет количества чередований, повторов в выборе рукава и отказов в прохождении лабиринта среди всех групп животных.

Наблюдение за различиями и динамикой ориентировочно-исследовательского поведения и уровнем эмоциональной реактивности проходило с использованием тест-системы «Открытое поле» (TS0501-RG, Установка «Открытое поле для крыс», круглое с разметкой, материал – не ламинированный поливинилхлорид, цвет – серый, диаметр арены 97 см, высота стенок 42 см, диаметр отверстий в полу 2 см, ООО «НПК Открытая Наука») на 1, 14 и 30 и 90 сутки после облучения. Была оценена динамика изменения поведенческих показателей. Наблюдение за каждой крысой в «Открытом поле» проходило в течение 6 минут. При этом регистрировалось значение таких показателей, как количество пересеченных секторов, проходов животного через центр арены, заглядываний в отверстия, а также число стоек, замираний, актов груминга, дефекации и урикации. При анализе числа поведенческих элементов время тестирования было разделено на два этапа: первичный (3 минуты) и вторичный этап (с 3 до 6 минуты). Что позволяет разделить поведенческие реакции на периоды, имеющие двойственную мотивационную природу согласно работе Маркеля [9].

2.4 Исследование морфологических изменений в ЦНС

На 30 сутки и 90 сутки (в эксперименте с ионами ^{12}C) после облучения животные были декапитированы. Далее был произведен забор крови для

гематологического исследования. Головной мозг животного был помещен в фиксатор (Раствор Карнуа (60% этанола, 30% хлороформа и 10% уксусной кислоты). После обезвоживания и обезжиривания правая доля головного мозга была отобрана для исследования и заключена в парафиновые блоки, а левая помещена в архив. Далее были приготовлены срезы головного мозга толщиной 10 и 6 мкм на микротоме (Thermo Fisher Scientific HM 340E Electronic Rotary Microtome). Различий между средним значением глубины приготовленных срезов и массой мозга у различных групп животных обнаружено не было.

Для изучения морфологических изменений в головном мозге применяли такие процедуры окрашивания препаратов, как: крезилвиолетом по методу Ниссля, Congo Red – окрашивание и Fluoro Jade B. Исследование проводили во всех структурах головного мозга на флуоресцентном микроскопе ЛОМО-Микмед 2 (Производитель «ЛОМО-Микросистемы», Санкт-Петербург, Россия) с возбуждающим фильтром CC15-6 (450-480 нм) и барьерным фильтром OC11-2 (520-560 нм) и световом «Биоптик В-200». Съемку изображений проводили камерой MC-10 (USB-3.0) (Производитель «ЛОМО-Микросистемы», Санкт-Петербург, Россия). Из каждого органа было получено 30 срезов методом простой случайной выборки. По 10 срезов были окрашены с использованием элективных методов (Конго красный и Fluoro Jade B) и 10 отобраны для рутинного окрашивания. На каждый срез было получено 10 изображений коры и мозжечка и по 5 изображений области гиппокампа. Для оценки морфологических изменений нейронов был проведен расчет относительного числа клеток с различными видами изменений среди их общего количества. При анализе препаратов окрашенных крезилвиолетом по методу Ниссля определялось количество нейронов без видимых изменений (1), нейронов с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями (2) и клеток с дистрофическими нарушениями (3). Исследование морфометрических характеристик, таких как площадь сечения перикариона и площадь сечения ядра нейрона проводили с использованием программы ImageJ и плагина Cell Counter.

2.5 Исследование физиологических и гематологических показателей

Для более полной оценки радиобиологического эффекта на 30 сутки после облучения протонами была проведена оценка таких показателей, как масса тела крыс, масса селезенки, масса тимуса, количество кариоцитов в костном мозге, количество лейкоцитов в периферической крови. Массу тела животных определяли на электронных весах Zelmer с погрешностью измерений 1 г, массу внутренних органов на электронных весах OHAUS с погрешностью измерений 1 мг. Анализ числа кариоцитов проводили в соответствии с рекомендациями *Practical skills in biology* (7th ed,) [47] и протоколом пробоподготовки Mantz [70]. Анализ числа лейкоцитов в периферической крови проводили с использованием камеры Горяева.

2.6 Статистический анализ

Для проверки полученных данных на нормальность использовался тест Шапиро-Вилка [96]. Анализ полученных различий между показателями проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с попарным сравнением значений с применением критериев Манна-Уитни и Данна [42]. Для сравнения показателей чередования в Т-лабиринте использовали критерий Хи-квадрат. Статистический анализ проводили в программе PAST [39] и OriginPro. Корреляционный анализ был проведен в программе Jamovi с использованием расчета коэффициента корреляции r-Пирсона. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние краниального облучения протонами 170 МэВ в дозе 5 Гр на зрительные реакции и оптомоторный ответ половозрелых крыс

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 (Рисунок 8, Рисунок 9). При анализе таких значений как общая пройденная дистанция в «Поле обзора», общее время пребывания в ней, частота прохождения границы зоны было установлено снижение активности у облученных животных на 90-е сутки 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 ($k=0,5$) (Рисунок 10, Рисунок 11) и в меньшей степени с высоким значением данного коэффициента (Рисунок 12).

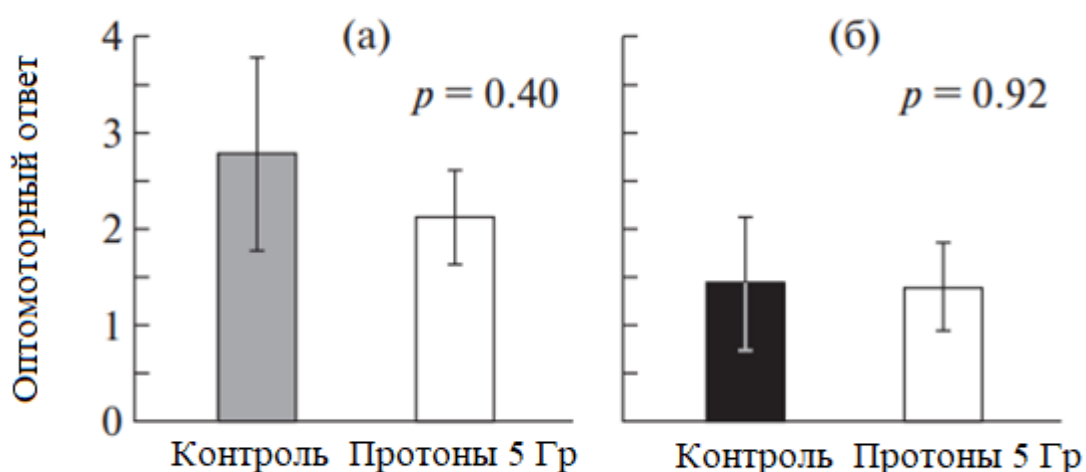


Рисунок 8 - Среднее значение оптомоторного ответа у крыс за все время тестирования (240 с) на 30-е и 90-е сутки после краниального облучения:

(а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

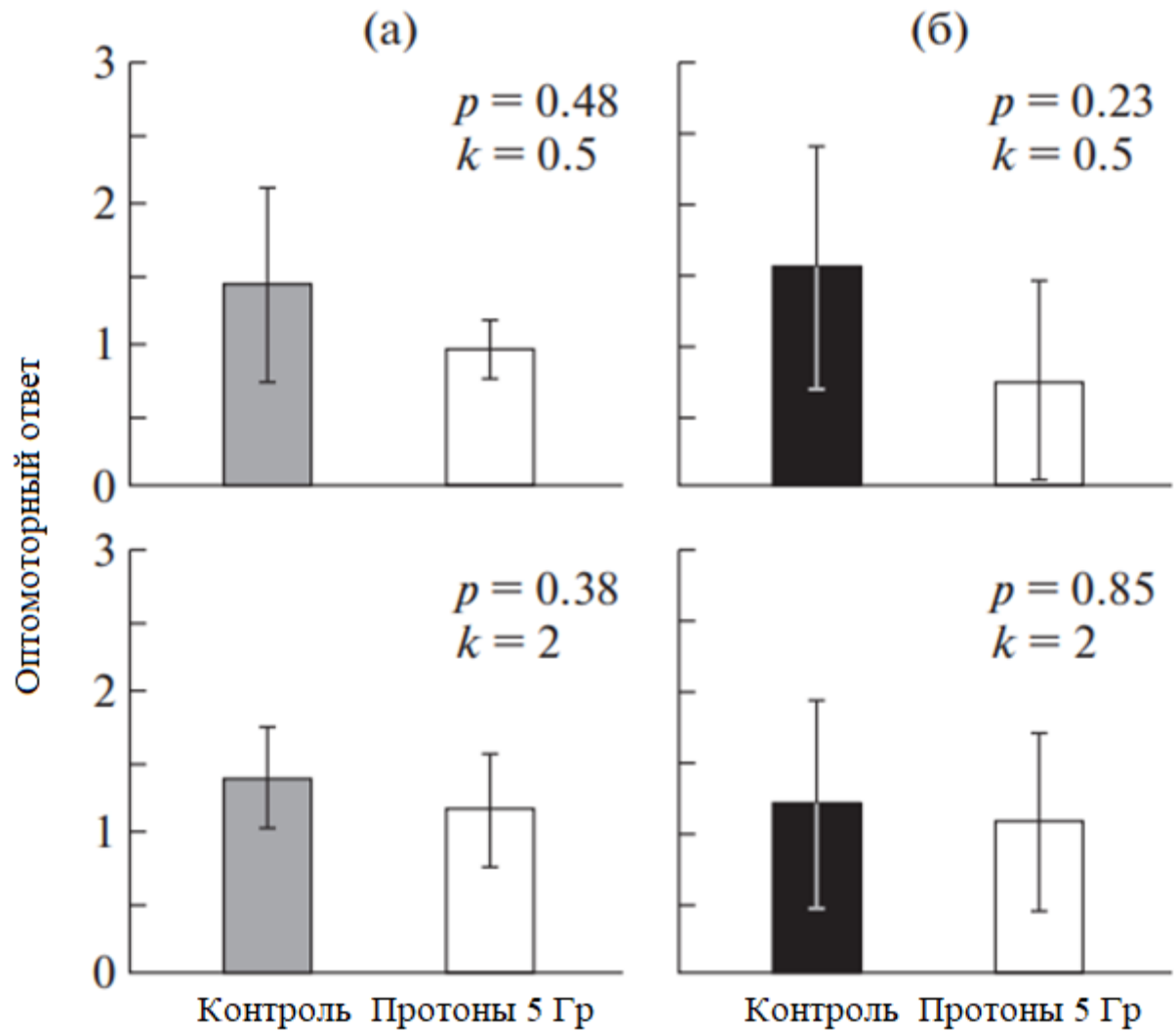


Рисунок 9 - Среднее значение оптомоторного ответа при различном значении коэффициента контраста зрительного стимула на 30-е и 90-е сутки после краниального облучения: (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

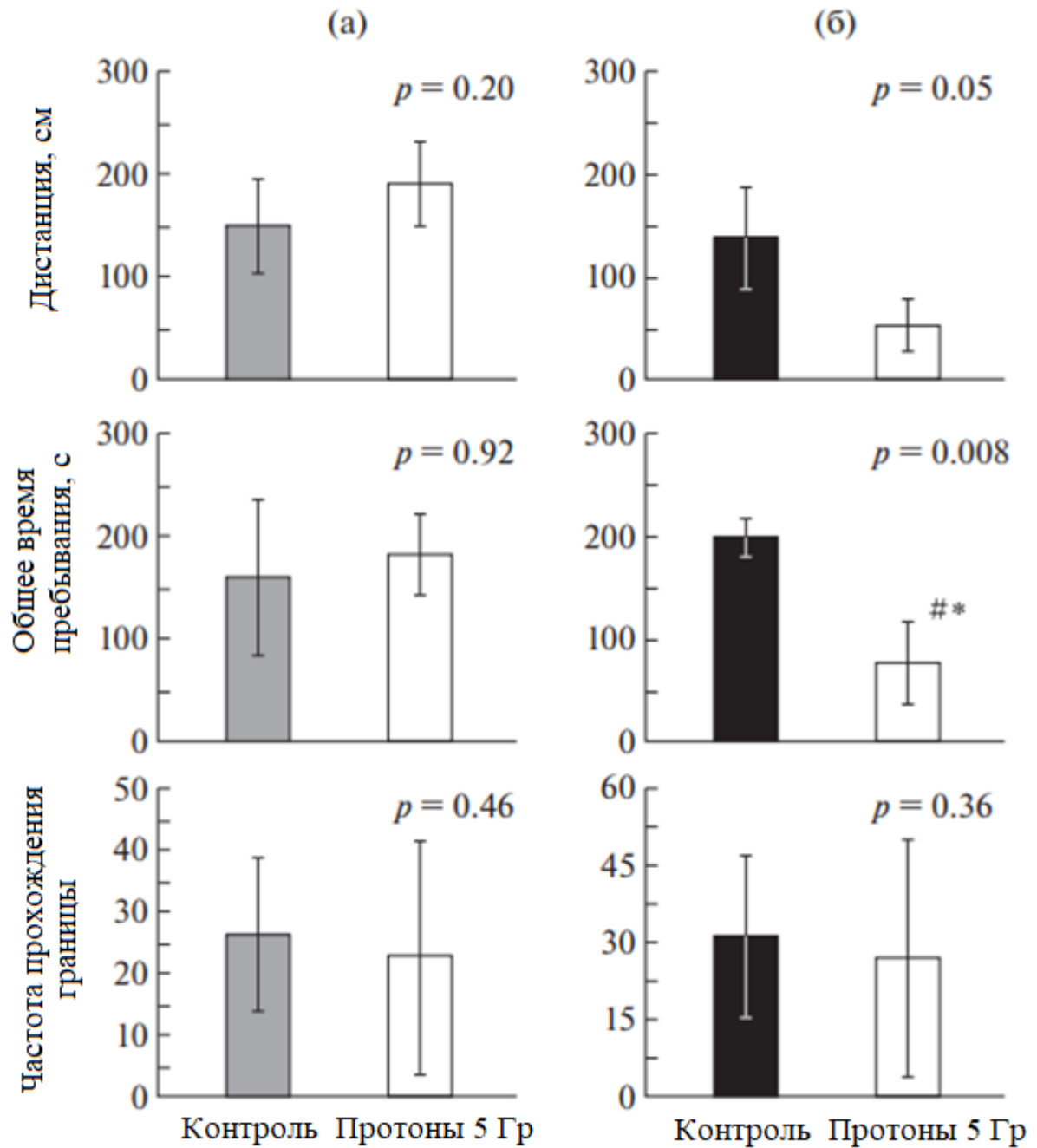


Рисунок 10 - Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в «Зоне наблюдения», общее время пребывания, частота прохождения границы зоны): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения. (#*) - $p < 0,05$.

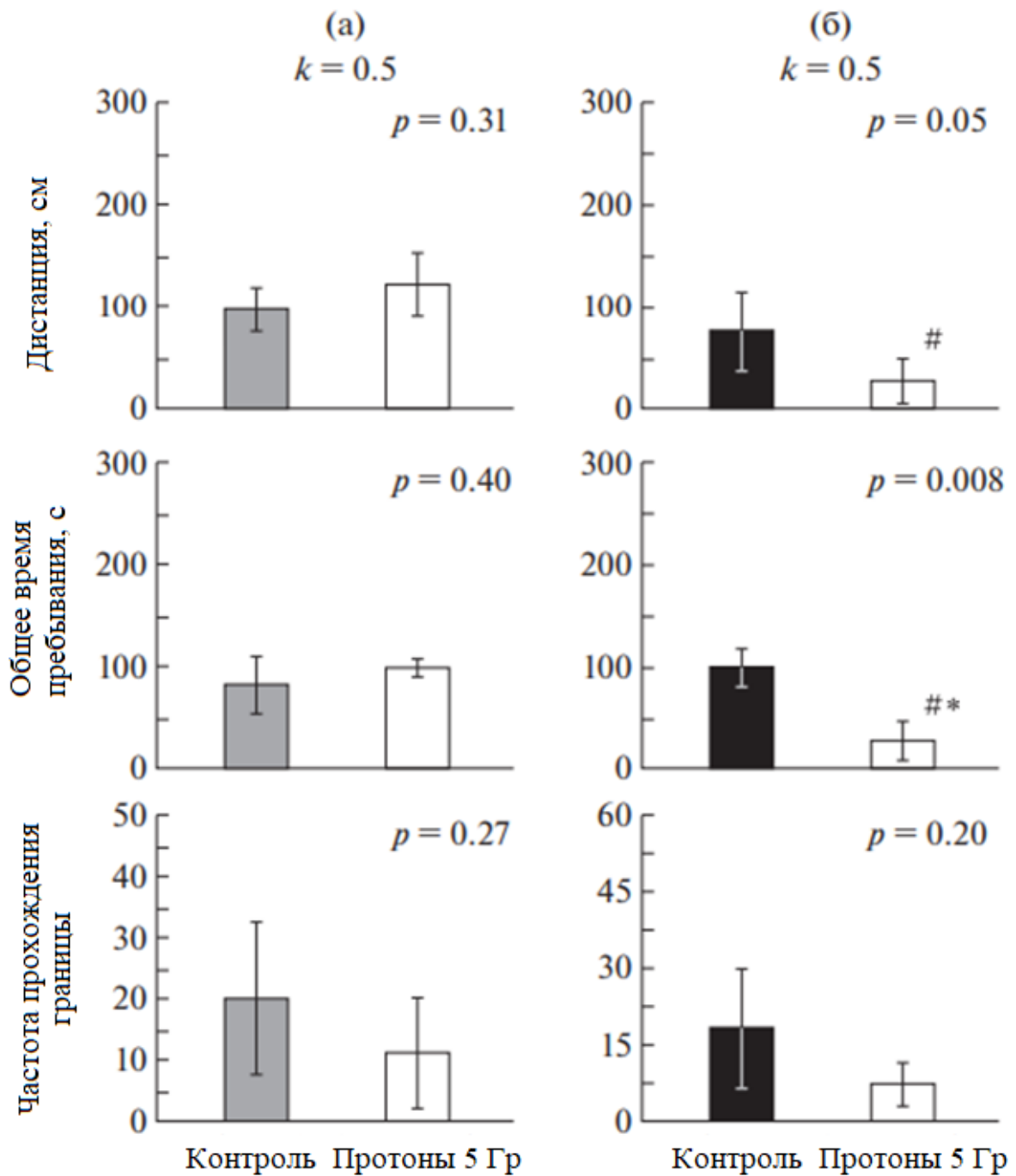


Рисунок 11 - Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в «Зоне наблюдения», общее время пребывания, частота прохождения границы зоны) при низком значении контраста визуального стимула ($k=0,5$): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

(#*) – $p < 0,05$; (#) – $p < 0,1$.

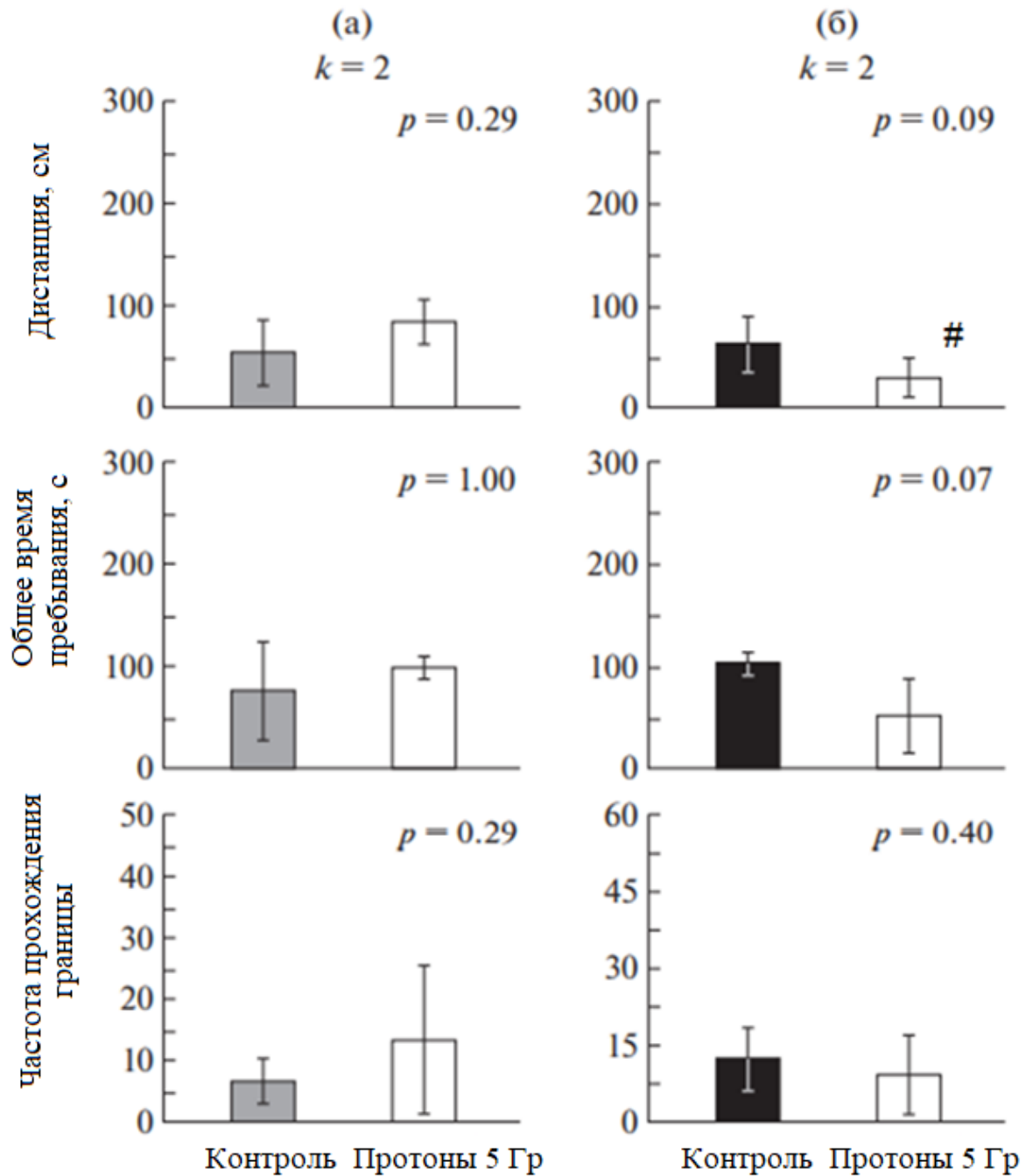


Рисунок 12 - Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в «Зоне наблюдения», общее время пребывания, частота прохождения границы зоны) при высоком значении контраста визуального стимула ($k=2$): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения.

(#) – $p < 0,1$.

3.2 Сравнительный анализ поведенческих реакций, физиологических показателей и морфологических изменений в головном мозге крыс после воздействия протонов различных энергий

3.2.1 Поведенческие реакции. «Т-лабиринт»

При анализе поведенческих реакций в Т-лабиринте были выявлены следующие различия: воздействие ионизирующим излучением с различным ЛПЭ привело к увеличению актов повторного захода в лабиринт в тесте спонтанного чередования и увеличению числа попыток без выбора рукава лабиринта (отказов).

Это свидетельствует о снижении пространственной исследовательской активности и росту стереотипии [102, 32], дисфункциональных изменений в гиппокампальной формации, снижении мотивации животного исследовать окружающую среду, определять наличие ресурсов, еды, воды, убежища [33]. Данные изменения косвенным образом подтверждаются снижением общей мотивации животных в прохождении Т-лабиринта. Подобные различия на 30 сутки после облучения отмечены во всех группах облученных животных вне зависимости от вида излучения и энергии частиц (Таблица 3). Альтернативное объяснение спонтанного чередования основано на врожденной склонности грызунов к перемене мест. Вне зависимости от рассматриваемой концепции тест считается оптимальным методом для оценки пространственной рабочей памяти крыс [36].

Наблюдаемые в эксперименте различия в реализации гиппокамп-зависимой модели поведения и отмеченная большинством исследователей выраженная радиочувствительность данного региона мозга подтверждают существующие парадигмы.

Таблица 3 - Соотношение различных поведенческих элементов, выявленных среди групп экспериментальных животных при прохождении установки

Т-лабиринт. 1 проба = 2 посадки.

Группа	14 дней до облучения			
	Общее число проб за 4 дня	Чередования	Повторные заходы	Отказы
Контроль	28	20	8	0
Гамма-облучение	32	24	8	0
Протоны (170 МэВ)	32	24	8	0
Протоны (70 МэВ)	32	22	10	0
Группа	30ые сутки после облучения			
	Общее число проб за 4 дня	Чередования	Повторные заходы	Отказы
Контроль	28	24	3*	1**
Гамма-облучение	32	14	10	8
Протоны (170 МэВ)	32	13	10	9
Протоны (70 МэВ)	32	16	9	7

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,01$); Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,009$); Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,03$)

** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,02$); Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,01$); Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,037$).

3.2.2 Поведенческие реакции. «Открытое поле»

Анализ адаптации животных к установке «Открытое поле» выявил ряд изменений поведенческих реакций на 1,14 и 30 сутки после облучения. Так в группе облученных животных (протоны 70 МэВ в пике Брэгга) отмечено снижение общей двигательной активности, которая выражается в количестве пересеченных особью секторов установки. Данные различия сохраняются в течение всего времени исследования и наблюдаются при сравнении со всеми другими экспериментальными группами в оба периода тестирования (Рисунок 13).

Полученные данные соотносятся с результатами ранее проведенных исследований [17]. Скорость угашения ориентировочно-исследовательских реакций свидетельствует о силе внутреннего торможения и в комплексе с другими показателями может в целом характеризовать выраженность основных нервных процессов в коре головного мозга [15]. Снижение общей активности в «Открытом поле» к 30 суткам составило: 22% для контрольных животных, 29% для облученных гамма-излучением, 34% для облученных протонами с энергией 170 МэВ и 47% для облученных в пике Брэгга.

На вторичном этапе тестирования (3-6 минута) через сутки после облучения было выявлено снижение числа заходов в центральную зону арены у животных, подвергнутых облучению протонами с энергией 70 МэВ в сравнении с группой Протоны 170 МэВ. С развитием адаптации животного к тест-системе эти различия нивелировались, однако тенденция сохранялась (Рисунок 14).

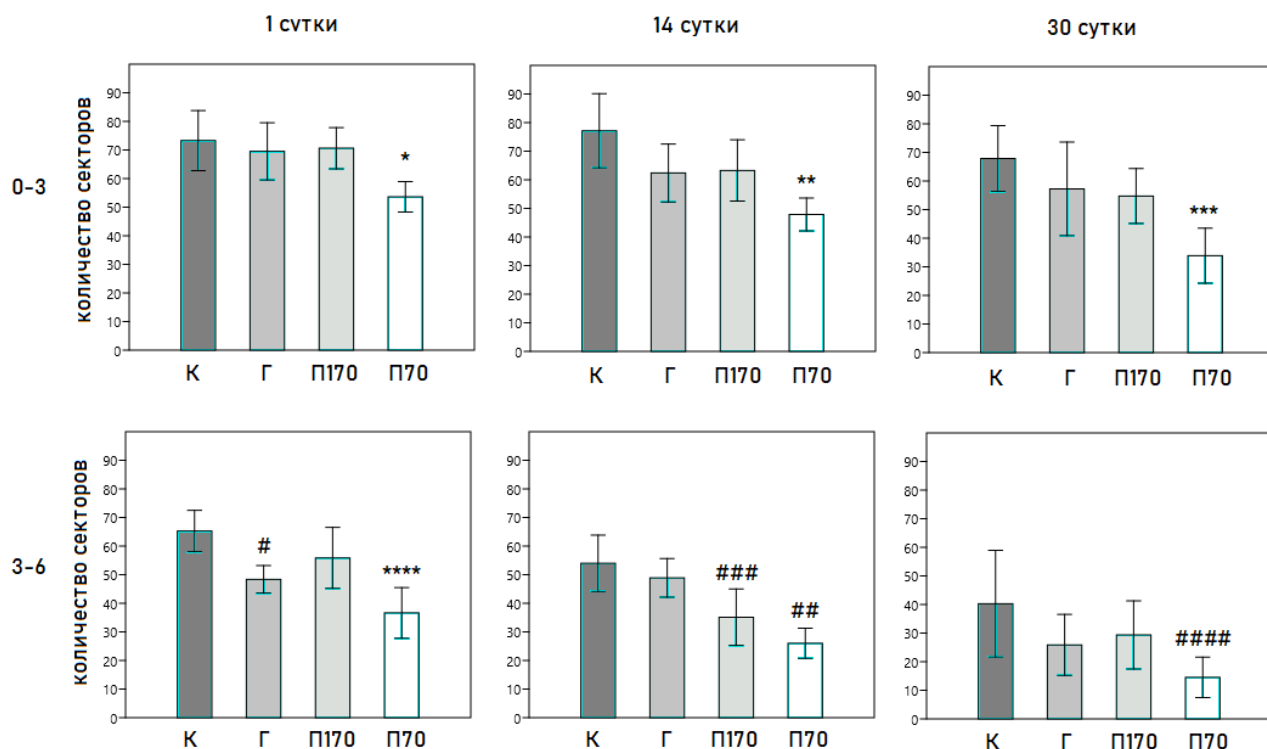


Рисунок 13 - Двигательная активность (количество пройденных секторов) крыс в различные сроки после облучения. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр. Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

Различия статистически значимы:

* – между группами К и П70 ($p=0,02$), Г и П70 ($p=0,03$), П170 и П70 ($p=0,008$);

** – между группами К и П70 ($p=0,003$), Г и П70 ($p=0,04$), П170 и П70 ($p=0,01$);

*** – между группами К и П70 ($p=0,003$), П170 и П70 ($p=0,01$);

**** – между группами К и П70 ($p=0,003$), П170 и П70 ($p=0,03$);

– между группами К и Г ($p=0,003$);

– между группами К и П70 ($p=0,003$), Г и П70 ($p=0,001$);

– между группами К и П170 ($p=0,02$);

– между группами К и П70 ($p=0,04$).

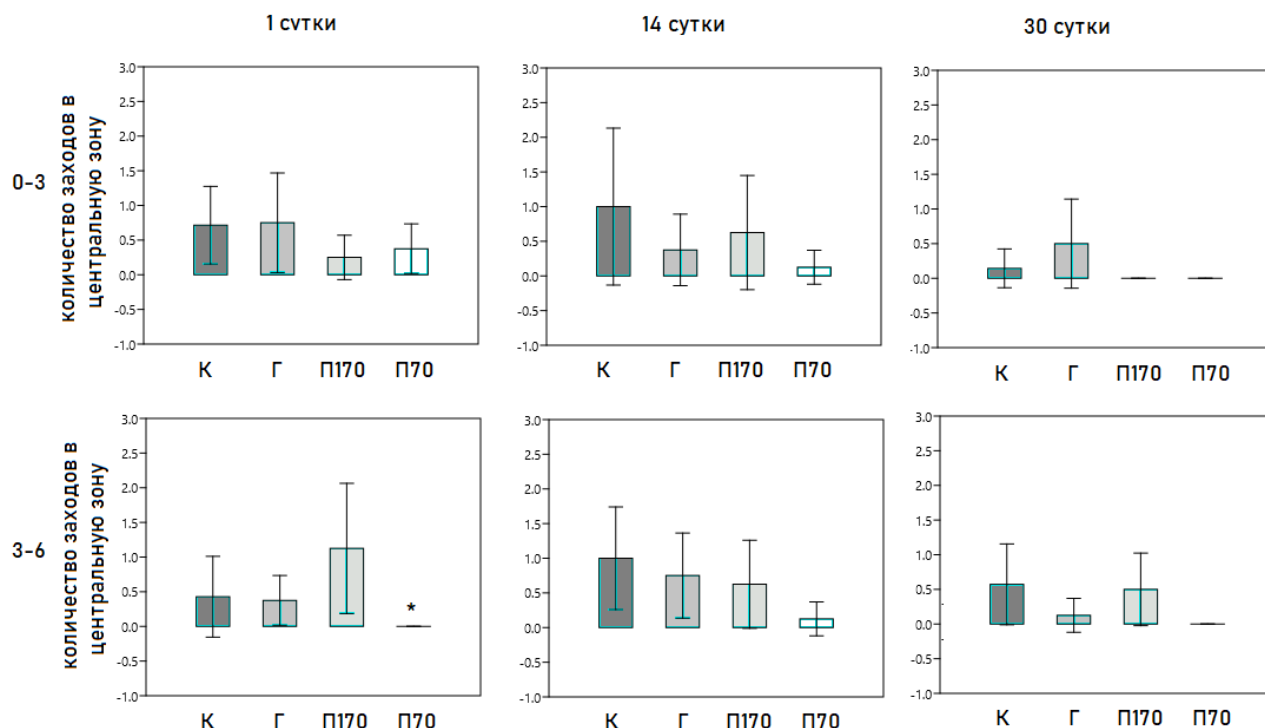


Рисунок 14 - Количество заходов в центральную зону арены. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр.

Среднее значение $\pm 95\%$ интервал. Различия статистически значимы:

* – между группами П170 и П70 ($p=0,012$).

Это может свидетельствовать об увеличении избегающего поведения грызунов в установке «Открытое поле» [94]. Подобное пассивное избегание может являться частью некоторых поведенческих расстройств, развитием тревожного поведения [103]. Снижение числа стоек (исследовательская активность) наблюдалось во всех группах облученных животных. Особенно ярко эти различия были выражены на 1 и 14 сутки после облучения (Рисунок 15).

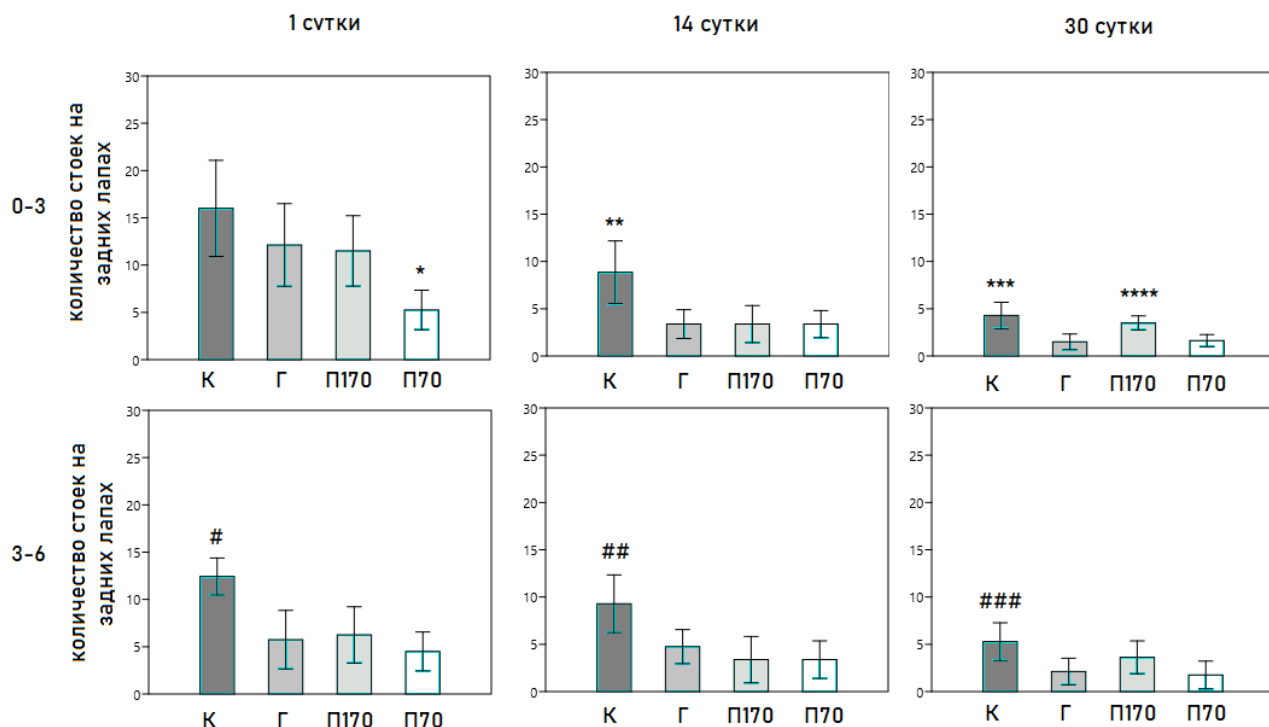


Рисунок 15 - Вертикальная двигательная активность. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр. Среднее значение $\pm 95\%$ интервал. Различия статистически значимы:

* – между группами К и П70 ($p=0,005$), П170 и П70 ($p=0,023$);

** – между группами К и Г ($p=0,02$), К и П170 ($p=0,04$), К и П70 ($p=0,02$);

*** – между группами К и Г ($p=0,008$), К и П70 ($p=0,01$);

**** – между группами П170 и Г ($p=0,007$), П170 и П70 ($p=0,004$);

– между группами К и Г ($p=0,007$), К и П170 ($p=0,017$), К и П70 ($p=0,002$);

– между группами К и Г ($p=0,047$), К и П170 ($p=0,014$), К и П70 ($p=0,017$);

– между группами К и Г ($p=0,04$), К и П70 ($p=0,02$).

Стойки на задних лапах ассоциируются у млекопитающих как реакция на новизну, исследовательская активность, поведение, отражающее сбор поступающей сенсорной информации. В некоторых формах стойки могут быть ассоциированы и с мотивацией к побегу, избеганию в период аверсии [67].

Полученные в эксперименте данные могут свидетельствовать как о выраженном снижении мотивации к побегу (в группе животных, облученных протонами с энергией 70 МэВ на 1 стуки после облучения и во всех облученных группах на 14 сутки), так и о снижении исследовательского поведения.

На 1 сутки после облучения отмечено существенное снижение проявлений норкового рефлекс в группах облученных животных (Рисунок 16). На 14 сутки после облучения подобные различия менее выражены, однако наблюдаются при сравнении группы П170 и П70 в первый период тестирования (0-3 мин) и при сравнении групп К и Г с П70 во второй период тестирования (3-6 мин).

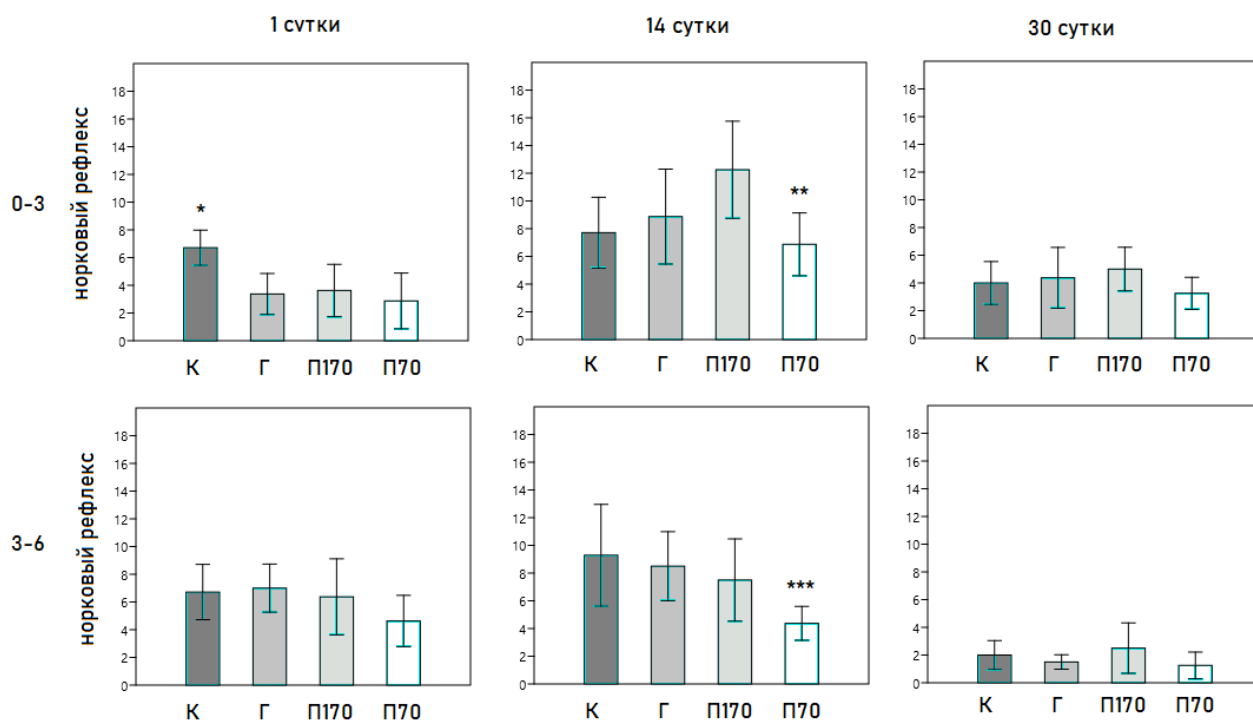


Рисунок 16 - Норковый рефлекс. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр. Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

Различия статистически значимы:

* – между группами К и Г ($p=0,01$), К и П170 ($p=0,03$), К и П70 ($p=0,02$);

** – между группами П170 и П70 ($p=0,045$);

*** – между группами К и П70 ($p=0,03$), Г и П70 ($p=0,01$).

Норковый рефлекс обычно рассматривается исследователями как показатель неофилии. Однако корректнее рассматривать его в такой интерпретации в период, когда животное более спокойно и стрессовая реакция на новую среду менее выражена [24]. На начальном этапе тестирования (0-3 мин) через 24 часа после облучения подобная реакция может быть обусловлена реакцией бегства. Наблюдаемые поведенческие изменения указывают на выраженное снижение реакции исследования отверстия арены у животных, облученных протонами в Пике Брэгга. С развитием адаптации крыс к установке эти различия нивелируются.

При анализе количества актов груминга и реакций замирания отмечена неоднородность в динамике и отсутствие выраженной зависимости в подобного рода поведенческих проявлениях в сравнении групп облученных животных (Рисунок 17, Рисунок 18).

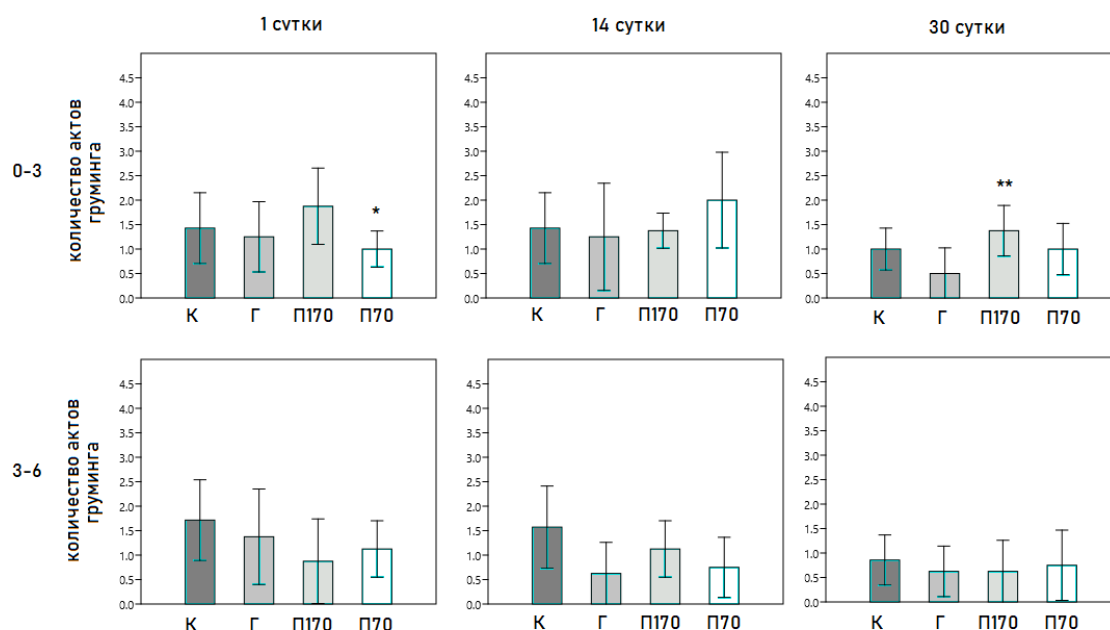


Рисунок 17 - Акты груминга. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр. Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

Различия статистически значимы:

* – между группами П170 и П70 ($p=0,048$);

** – между группами Г и П170 ($p=0,045$).

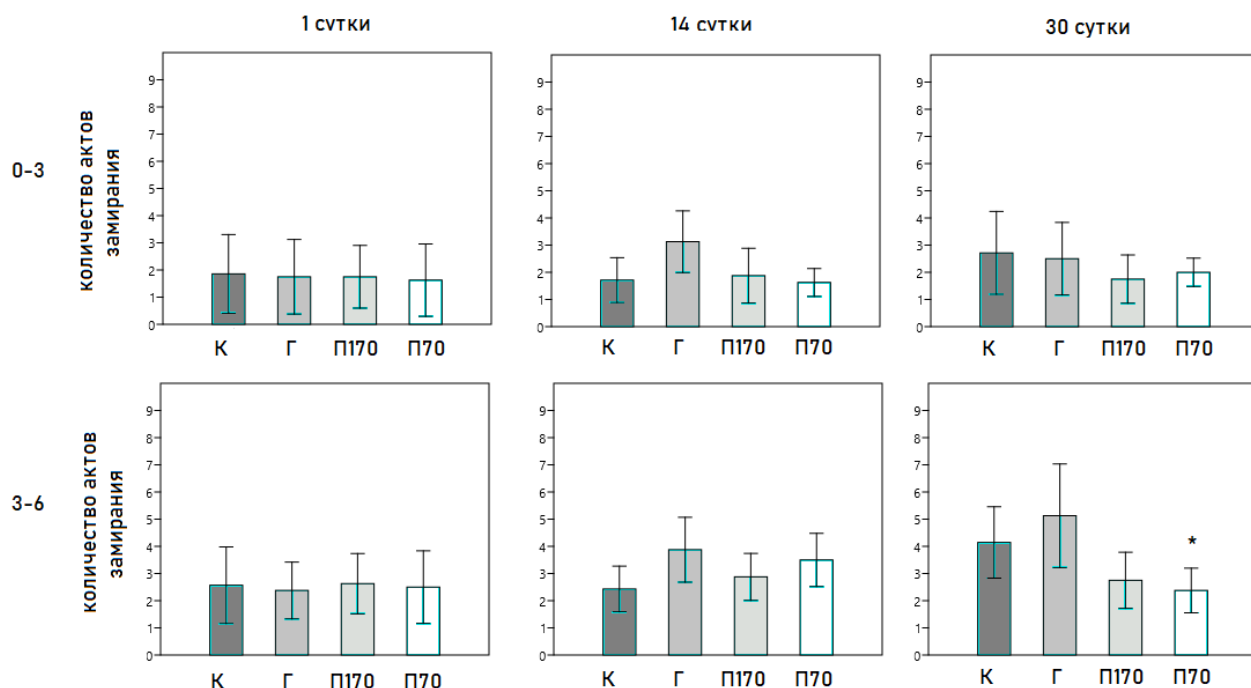


Рисунок 18 - Акты замирания. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр. Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

Различия статистически значимы:

* – между группами Г и П70 ($p=0,015$).

На 1 сутки после облучения в первый период тестирования наблюдается снижение числа актов груминга в группе П70 в сравнении с группой П170. На 30 сутки после облучения наблюдается незначительное увеличение актов груминга в группе П170 в сравнении с группой Г на фоне снижения реакций замирания в период с 3-6 мин. Груминг, как поведенческий паттерн, может служить способом очистки сенсорных органов от накопившейся грязи и пыли, иметь значение в терморегуляции организма грызунов, облегчении болевых ощущений, социальном взаимодействии, эмоциональных проявлениях. Также груминг может быть ответом на стресс или проявлением тревоги в искусственных и естественных условиях [89]. Замирание животных, описанное как полное отсутствие движений тела животного, за исключением дыхательных движений, считается одним из

главных проявлений тревоги и страха. Подобное поведение необходимо рассматривать как защитное и имеет важное адаптивное значение [23]. Снижение рассмотренного поведенческого паттерна на 30 сутки после облучения в группе П70 в сравнении с группой Г может свидетельствовать о развитии функциональных изменений в лимбической системе головного мозга (связанных с поведением замирания) при воздействии протонов в пике Брэгга.

Незначительное число актов дефекации и уринации наблюдалось только через 24 часа после облучения и, предположительно, было связано с перенесенным особью стрессом при транспортировке и фиксации в контейнере.

3.2.3 Морфологическое исследование

Результаты анализа морфологических изменений в различных регионах гиппокампальной формации представлены в Таблицах 4, 5, 6, 7 и проиллюстрированы на Рисунках 19 и 20.

Таблица 4 - Морфологические изменения нейронов гиппокампа (гранулярный слой зубчатой извилины) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). (-) – нейроны не идентифицируются. Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	99,65 $\pm$ 0,29	-	0,35 $\pm$ 0,24
Гамма	99,02 $\pm$ 0,36	-	0,98 $\pm$ 0,36
Протоны 170 МэВ	99,55 $\pm$ 0,19	-	0,45 $\pm$ 0,19
Протоны 70 МэВ	99,63 $\pm$ 0,15	-	0,37 $\pm$ 0,15

Таблица 5 - Морфологические изменения нейронов гиппокампа (хилус) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	93,03 $\pm$ 2,20*	2,09 $\pm$ 0,77**	4,88 $\pm$ 1,74****
Гамма	80,55 $\pm$ 2,14	1,03 $\pm$ 0,55***	18,42 $\pm$ 2,13
Протоны 170 МэВ	79,58 $\pm$ 3,33	6,73 $\pm$ 1,88	13,70 $\pm$ 2,27
Протоны 70 МэВ	78,17 $\pm$ 3,20	5,75 $\pm$ 1,20	16,08 $\pm$ 2,31

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,001$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,008$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,002$);

** – различия статистически значимы между группами Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,02$);

*** – различия статистически значимы между группами Гамма и Протоны 170 МэВ ($p=0,001$), Гамма и Протоны 70 МэВ ($p=0,0001$);

**** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,0003$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,017$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,001$).

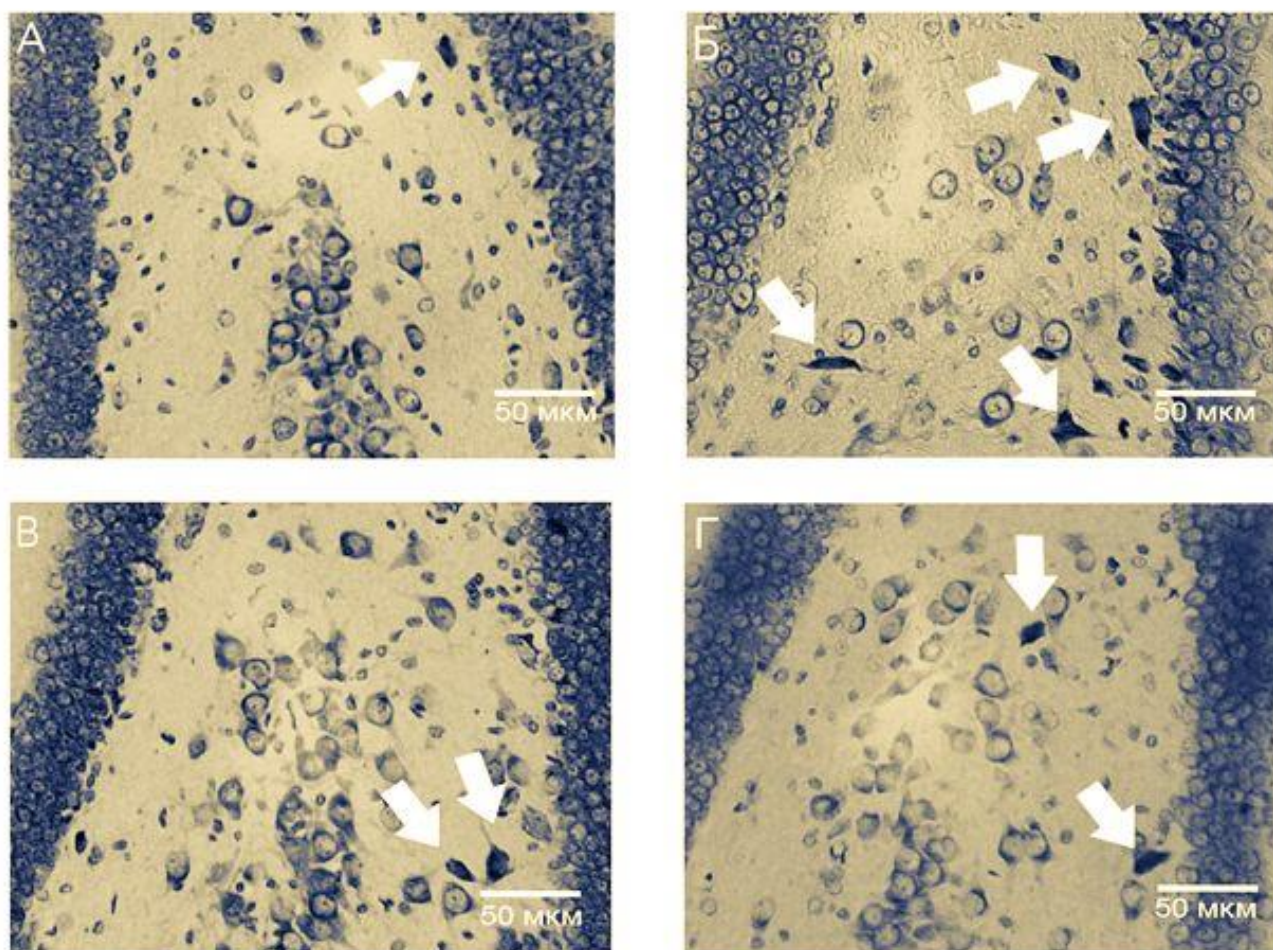


Рисунок 19 - Необратимые изменения в области полиморфного хилуса гиппокампа переходящего в слой СА3. Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

Таблица 6 - Морфологические изменения нейронов гиппокампа (CA3 слой) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	97,92 $\pm$ 0,89	1,14 $\pm$ 0,55	0,93 $\pm$ 0,41**
Гамма	96,72 $\pm$ 0,62	0,23 $\pm$ 0,14*	3,04 $\pm$ 0,62
Протоны 170 МэВ	92,75 $\pm$ 1,58	3,34 $\pm$ 0,83	3,91 $\pm$ 0,85
Протоны 70 МэВ	93,27 $\pm$ 1,56	2,10 $\pm$ 0,43	4,63 $\pm$ 1,32

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Гамма и Протоны 170 МэВ ($p=0,0004$), Гамма и Протоны 70 МэВ ($p=0,0005$);

** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,02$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,04$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,03$).

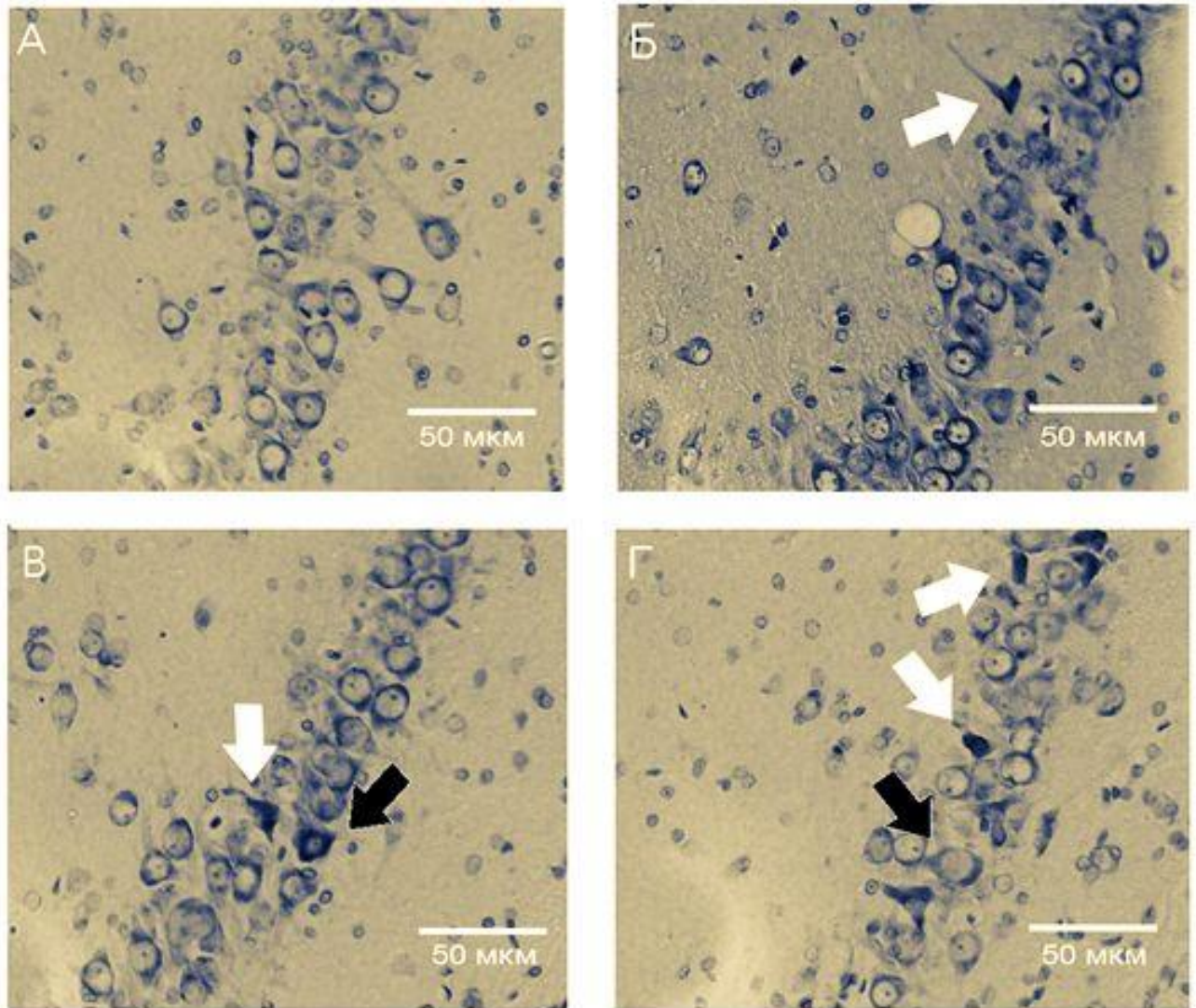


Рисунок 20 - Обратимые и необратимые изменения в восходящем слое СА3 гиппокампа крыс. Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. Черными стрелками обозначены обратимые морфологические изменения (гиперхромный нейрон (В) и гипертрофия нейрона (Г))

А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ.

Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

Таблица 7 - Морфологические изменения нейронов гиппокампа (CA1 слой) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	99,36 $\pm$ 0,44	0,14 $\pm$ 0,10**	0,50 $\pm$ 0,34
Гамма	99,55 $\pm$ 0,26*	0,06 $\pm$ 0,06***	0,39 $\pm$ 0,22
Протоны 170 МэВ	98,41 $\pm$ 0,51	1,21 $\pm$ 0,40	0,38 $\pm$ 0,17
Протоны 70 МэВ	95,63 $\pm$ 2,03	0,77 $\pm$ 0,27	3,60 $\pm$ 2,05

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Гамма и Протоны 170 МэВ ($p=0,02$), Гамма и Протоны 70 МэВ ($p=0,04$);
 ** – различия статистически значимы между группами Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,03$);
 *** – различия статистически значимы между группами Гамма и протоны 170 МэВ ($p=0,001$), Гамма и Протоны 70 МэВ. ($p=0,01$);

При исследовании морфологических изменений в гранулярном слое зубчатой извилины (Таблица 4) не было выявлено статистически значимых различий между группами животных. Рост необратимых изменений (3) в виде тенденции отмечен лишь группе гамма-облучения. Из-за сложности распознавания нейронов с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями (2) данные изменения не были представлены.

В то же время в полиморфном хилусе гиппокампа (Таблица 5, Рисунок 19) наблюдается рост необратимых изменений нейронов (3) во всех группах облученных животных. Изменение данного показателя наблюдается на фоне увеличения числа нейронов с обратимыми морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными (2) изменениями в головном мозге животных, облученных протонами. Существенно больший уровень относительного числа нейронов с необратимыми изменениями в полиморфном хилусе, в сравнении с другими регионами гиппокампа, вероятно связан с важным местом данного региона в системе нейрогенеза и наличием делящихся клеток предшественников [90]. Рост числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеток, подверженных тотальному хроматолизу был отмечен в СА3 слое гиппокампа после облучения (Таблица 6, Рисунок 20). В это же регионе наблюдается увеличение относительного числа нейронов с морфофункциональными изменениями и дезорганизацией хроматофильного вещества в цитоплазме в группах животных облученных протонами в сравнении с гамма-облучением. Особая чувствительность нейронов СА3 слоя отмечена в работах по рентгеновскому пренатальному облучению крыс [93]. При облучении протонами различных энергий наблюдалось статистически значимое увеличение морфофункциональных изменений также в слое СА1 (Таблица 7). При этом увеличение относительного числа нейронов с необратимыми нарушениями в виде тенденции отмечено в группе животных облученных протонами 70 МэВ. Результаты анализа морфологических изменений Клеток Пуркинье в мозжечке крыс представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Морфологические изменения нейронов мозжечка (Клетки Пуркинье) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	82,66 $\pm$ 1,24*	11,41 $\pm$ 0,93***	5,93 $\pm$ 1,45****
Гамма	72,30 $\pm$ 2,25**	20,37 $\pm$ 1,67	7,33 $\pm$ 2,13
Протоны 170 МэВ	65,84 $\pm$ 2,98	23,43 $\pm$ 1,56	10,72 $\pm$ 2,36
Протоны 70 МэВ	59,46 $\pm$ 4,69	20,70 $\pm$ 1,67	19,83 $\pm$ 5,13

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,002$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,0001$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,0001$);

** – различия статистически значимы между группами Гамма и Протоны 70 МэВ ($p=0,046$);

*** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,0002$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p<0,0001$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,0005$);

**** – различия статистически значимы между группами Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,046$).

Во всех группах облученных животных наблюдается значительное увеличение относительного числа нейронов с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями. Данная зависимость наблюдается на фоне существенного роста числа нейронов с необратимыми нарушениями в группе животных облученных протонами 70 МэВ (Рисунок 21).

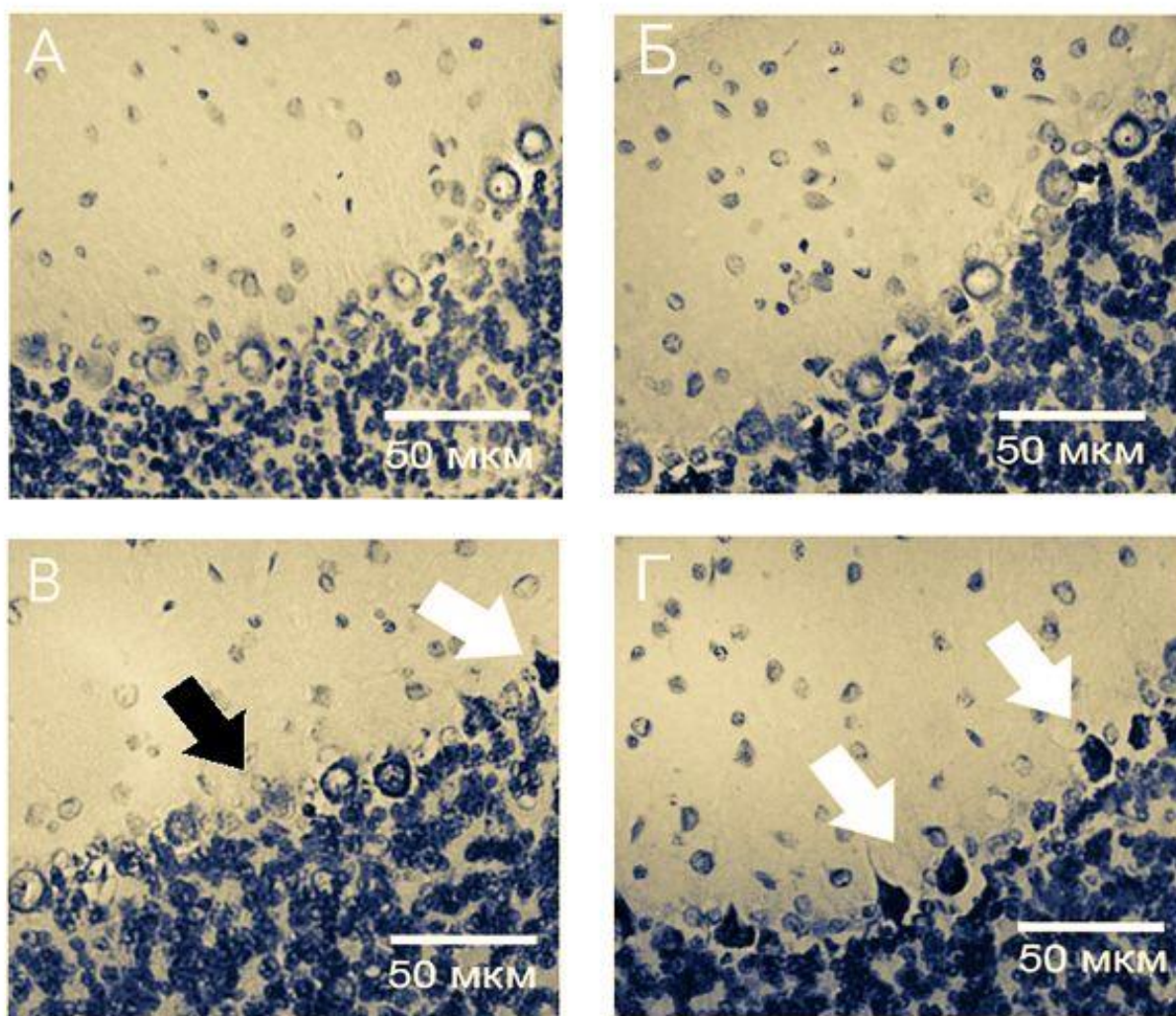


Рис 21 - Обратимые и необратимые изменения клеток Пуркинье мозжечка крыс. Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. Черной стрелкой обозначены обратимые морфологические изменения (гипохромный нейрон) А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

Выявленные морфологические изменения в клетках Пуркинье могут являться субстратом для двигательных нарушений у облученных животных, описанных выше (Рисунок 13).

Значения относительного числа морфологических изменений в коре головного мозга крыс представлены в Таблице 9. Анализ полученных изображений коры показал значительное увеличение числа нейронов с обратимыми изменениями (2) в группе животных облученных в пике Брэгга. В то же время у животных данной группы наблюдается рост гиперхромных сморщенных нейронов и клеток теней (3). Выявленные нарушения в виде очаговой дистрофии наблюдаются у всех лабораторных животных облученных протонами с энергией 70 МэВ (Рисунок 22).

Таблица 9 - Морфологические изменения нейронов коры на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	90,23 $\pm$ 0,72	9,36 $\pm$ 0,71	0,41 $\pm$ 0,07
Гамма	88,70 $\pm$ 0,62	9,97 $\pm$ 0,64	1,33 $\pm$ 0,25***
Протоны 170 МэВ	88,44 $\pm$ 0,73	10,25 $\pm$ 0,63	1,30 $\pm$ 0,38
Протоны 70 МэВ	81,21 $\pm$ 1,09*	14,43 $\pm$ 0,69**	4,36 $\pm$ 0,67*****

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Протоны 70 МэВ и Контроль ($p < 0,0001$), Протоны 70 МэВ и Гамма ($p < 0,0001$), Протоны 70 МэВ и Протоны 170 МэВ ($p < 0,0001$);

** – различия статистически значимы между группами Протоны 70 МэВ и Контроль ($p = 0,00011$), Протоны 70 МэВ и Гамма ($p < 0,0001$), Протоны 70 МэВ и Протоны 170 МэВ ($p < 0,0001$);

*** – различия статистически значимы между группами Гамма и Контроль ($p=0,0039$);

**** – различия статистически значимы между группами Протоны 70 МэВ и Контроль ($p<0,0001$), Протоны 70 МэВ и Гамма ($p=0,0014$), Протоны 70 МэВ и Протоны 170 МэВ ($p=0,0017$).

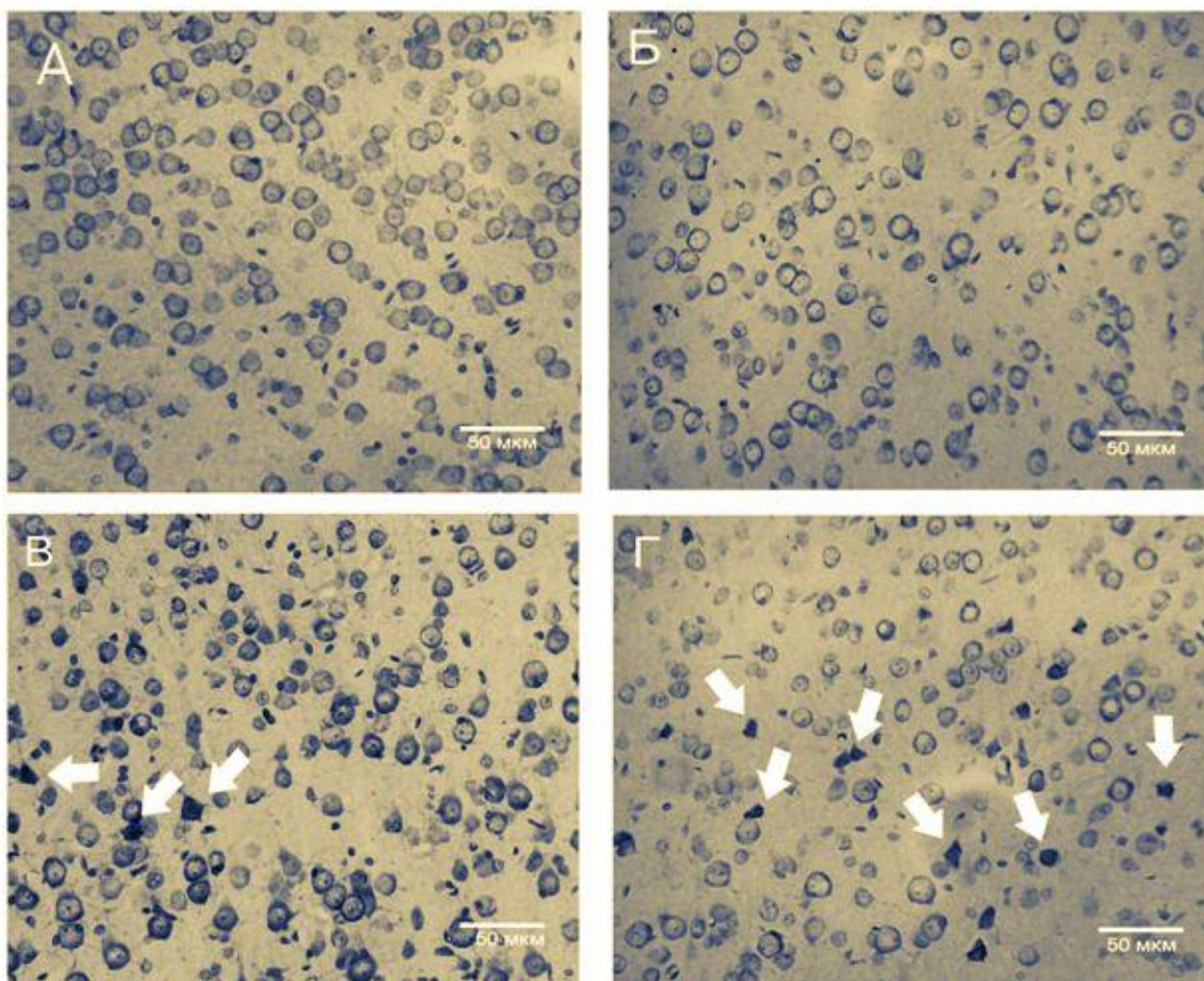


Рисунок 22 - Необратимые изменения нейронов горы головного мозга крыс (отмечены белыми стрелками). А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

Анализ морфометрических характеристик нейронов в полиморфном хилусе, мозжечке и коре (площадь сечения перикариона и площадь сечения ядра) представлен в Таблицах 10, 11, 12.

Таблица 10 - Площадь сечения перикариона и ядра нейронов на 30 сутки после облучения в дозе 1 Гр (Увеличение X200, n – количество особей). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Регион	Показатель площади (мкм ²)	К (n=7)	Г (n=8)	П170 (n=8)	П70 (n=8)
Хилус гиппокампа	Тело	59,03 $\pm$ 1,08	60,48 $\pm$ 0,76	62,80 $\pm$ 0,47	64,85 $\pm$ 0,57
	Ядро	22,05 $\pm$ 0,5	22,06 $\pm$ 0,34	21,09 $\pm$ 0,21	22,87 $\pm$ 0,23

Примечания: Тело: различия статистически значимы между группами К и П170 ($p=0,001$), К и П70 ($p<0,0001$), Г и П170 ($p=0,035$), Г и П70 ($p<0,0001$), П170 и П70 ($p=0,002$); Ядро: различия статистически значимы между группами К и П70 ($p=0,04$), Г и П170 ($p=0,023$), П170 и П70 ($p<0,0001$).

Таблица 11 - Площадь сечения перикариона и ядра нейронов на 30 сутки после облучения в дозе 1 Гр (Увеличение X200, n – количество особей). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Регион	Показатель площади (мкм ²)	К (n=7)	Г (n=8)	П170 (n=8)	П70 (n=8)
Кора мозжечка (клетки Пуркинье)	Тело	64,53 $\pm$ 0,58	62,59 $\pm$ 0,59	61,07 $\pm$ 0,53	67,09 $\pm$ 0,49
	Ядро	23,03 $\pm$ 0,30	22,16 $\pm$ 0,44	19,66 $\pm$ 0,25	23,39 $\pm$ 0,30

Примечания: Тело: различия статистически значимы между группами К и П170 ($p < 0,0001$), К и П70 ($p = 0,001$), Г и П170 ($p = 0,011$), Г и П70 ($p < 0,0001$), П170 и П70 ($p < 0,0001$); Ядро: различия статистически значимы между группами К и Г ($p = 0,0007$), К и П170 ($p < 0,0001$), Г и П170 ($p < 0,0001$), Г и П70 ($p < 0,0001$), П170 и П70 ($p < 0,0001$).

Таблица 12 - Площадь сечения перикариона и ядра нейронов на 30 сутки после облучения в дозе 1 Гр (Увеличение X200, n – количество особей). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Регион	Показатель площади (мкм ²)	К (n=7)	Г (n=8)	П170 (n=8)	П70 (n=8)
Кора	Тело	47,58 $\pm$ 0,34	44,19 $\pm$ 0,23	50,69 $\pm$ 0,29	47,75 $\pm$ 0,25
	Ядро	17,18 $\pm$ 0,15	15,69 $\pm$ 0,09	17,56 $\pm$ 0,13	16,44 $\pm$ 0,11

Примечания: Тело: различия статистически значимы между группами К и Г ($p < 0,0001$), К и П170 ($p < 0,0001$), Г и П170 ($p < 0,0001$), Г и П70 ($p < 0,0001$), П170 и П70 ($p < 0,0001$); Ядро: различия статистически значимы между группами К и Г ($p < 0,0001$), К и П70 ($p < 0,0001$), Г и П170 ($p < 0,0001$), Г и П70 ($p < 0,0001$), П170 и П70 ($p < 0,0001$).

При вычислении морфометрических параметров наблюдается ЛПЭ-зависимое увеличение размеров нейронов хилуса. Однако корреляция с размерами ядра при рассмотрении данного параметра не наблюдается. В то же время гипертрофия клеток Пуркинье на 30 сутки после облучения была выявлена в группе животных облученных протонами с энергией 70 МэВ. При анализе размеров клеток коры, данные изменения наблюдаются в большей степени у животных, облученных протонами с энергией 170 МэВ. Одна четко выраженная зависимость от ЛПЭ при рассмотрении размеров ядра отсутствует. Наблюдаемые изменения размеров клеток свидетельствуют о значительном увеличении уровня метаболизма и развитии компенсаторно-приспособительных реакций в данных клеточных популяциях на 30 сутки после облучения [8]. Гипертрофия клетки, в основе которой лежит внутриклеточная гиперплазия органелл, направленная на восстановление нарушенных функций – это явление, которое приводит к последующему истощению, развитию декомпенсации и дистрофических изменений нейронов [12].

При исследовании морфологических изменений в вентрикулярных областях головного мозга, были выявлены изменения в монослое эпендимоцитов четвертого и второго бокового желудочка. Воздействие гамма-излучения и протонов с энергией 170 МэВ привело к увеличению числа хроматофильных клеток и развитию субэпендимального отека при наблюдаемой общей редукции клеточной популяции. Очаги деструкции и тотального хроматолиза особенно заметны в нервной ткани животных подвергнутых воздействию протонов с энергией 70 МэВ (Рисунок 23, Рисунок 24).

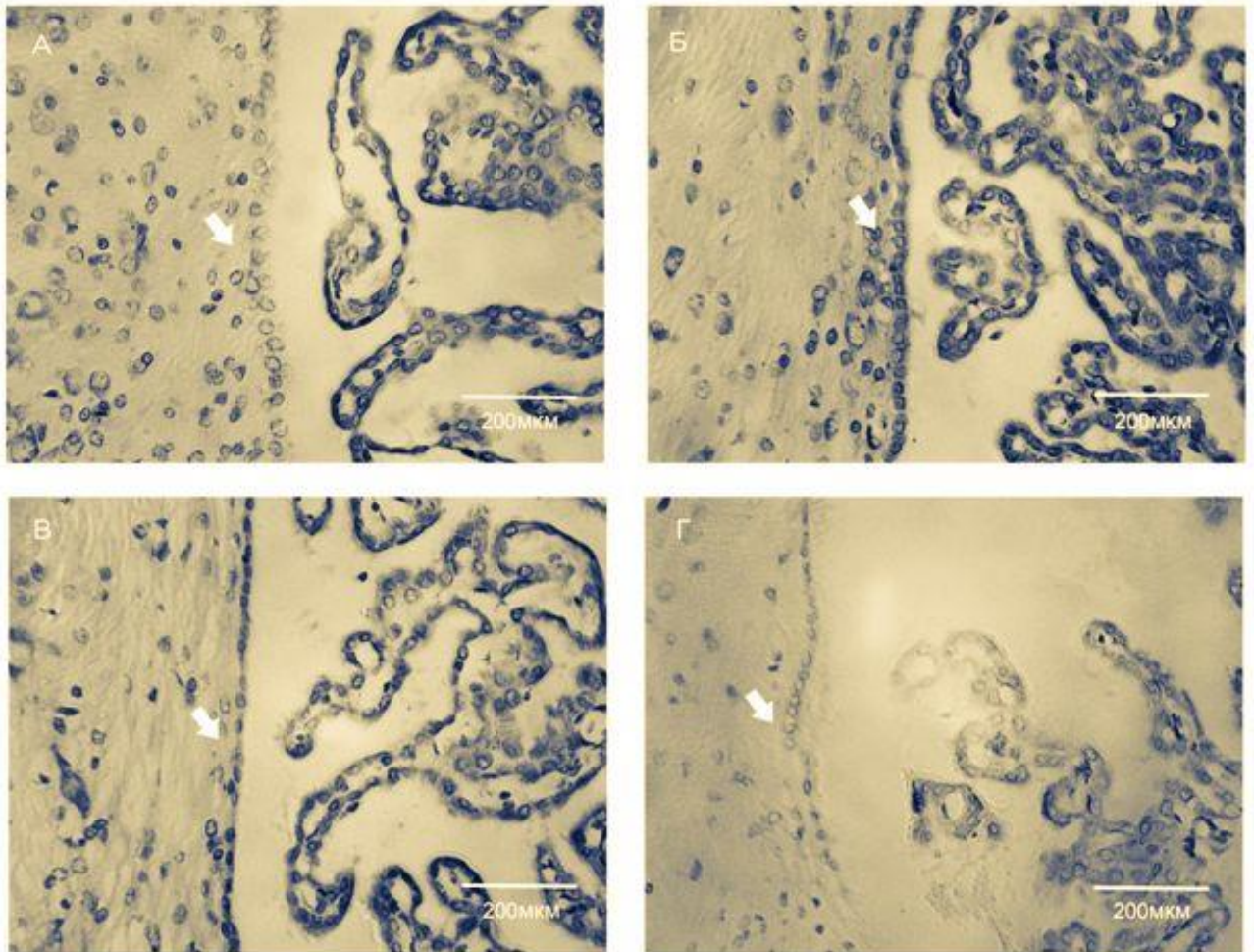


Рисунок 23 - Эпендимный слой четвертого желудочка головного мозга крыс (обозначен белой стрелкой). В группе облученных животных чаще наблюдаются хромотофильные сморщенные эпендимоциты на фоне общей редукции клеточной популяции. В группе животных облученных протонами с энергией 70 МэВ наблюдается хромотолиз. А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X200.

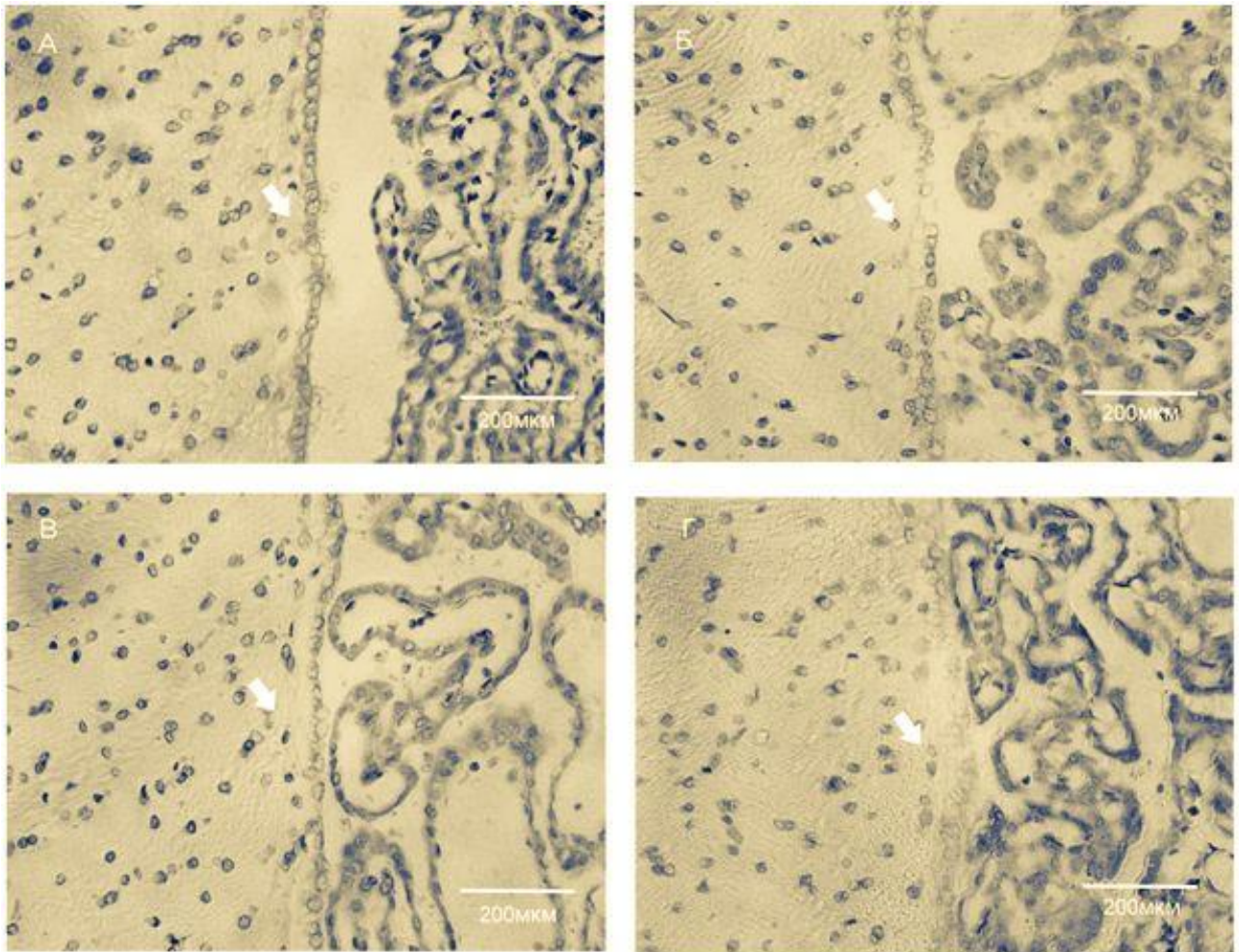


Рисунок 24 - Эпендимный слой второго бокового желудочка головного мозга крыс (обозначен белой стрелкой). В группе животных, облученных протонами с энергией 170 МэВ, наблюдается выраженный субэпендимальный отек. В группе животных облученных протонами с энергией 70 МэВ наблюдается хроматолиз. А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Крезилвиолет по Нислю. Увеличение X200.

Для количественной оценки выявленных изменений было подсчитано число эпендимоцитов в монослое разграничивающем сосудистое сплетение и мозжечок в одном поле зрения (X200). Полученные данные представлены на Рисунок 25.

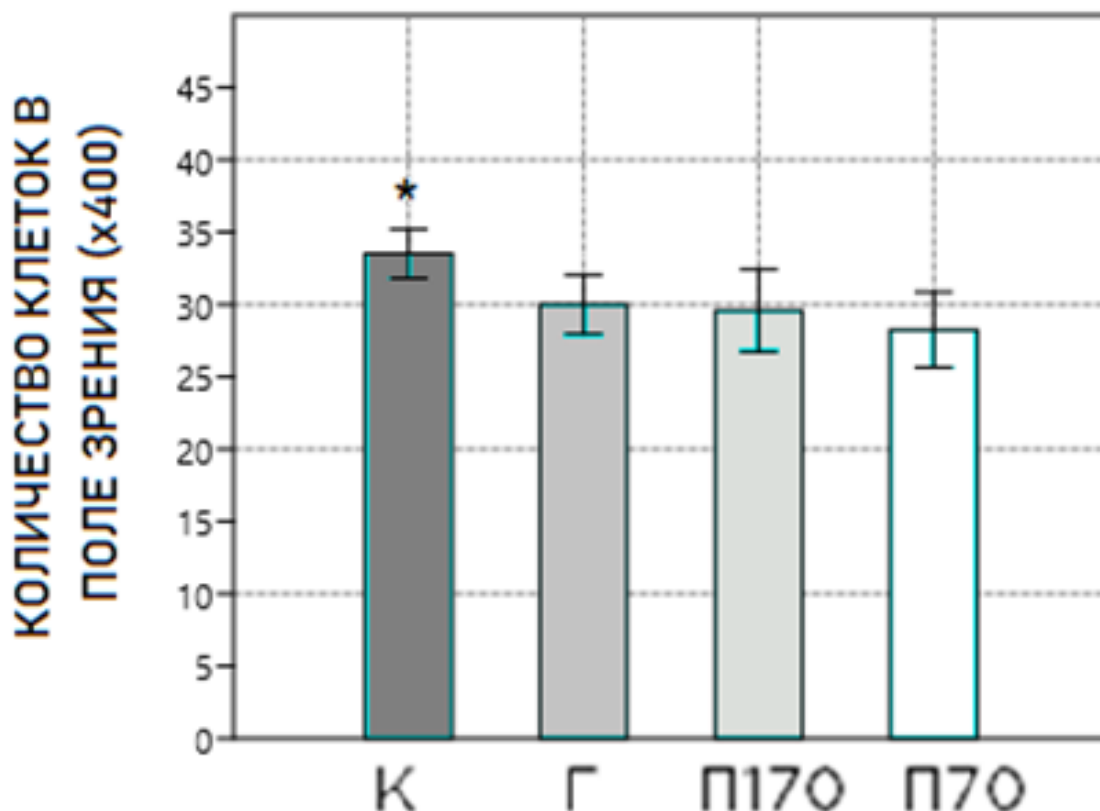


Рисунок 25 - Среднее значение числа эпендимоцитов в монослое 4-го желудочка головного мозга крыс в поле зрения (Увеличение X200). К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр.

* – различия статистически значимы между группами К и Г ($p=0,041$), К и П70 ($p=0,006$). Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

Редукция эпендимоцитов и патоморфологические изменения в их монослое могут привести к развитию отдаленных нарушений функций нейроликворного барьера, нарушению гомеостаза мозга, накоплению в нервной ткани нейротоксических веществ, амилоидных бляшек.

Наиболее значительные изменения при окрашивании Конго красным были выявлены в переднем мозге крыс. Воздействие гамма и протонным излучением привело к ЛПЭ-зависимому увеличению наблюдаемых амилоидных бляшек на 30 сутки после облучения (Рисунок 26, Рисунок 27). Эти различия могу

свидетельствовать о развитии раннего амилоидогенеза у облученных животных. Несмотря на выявленные изменения в научном сообществе нет общепринятого мнения на этот счет. Так некоторые исследования с использованием низких доз ИИ приводят к редукции амилоидных образований и улучшению когнитивных функций грызунов [28, 71]. В это же время данные клинических исследований свидетельствуют о развитии амилоидной ангиопатии после процедур радиационной терапии [22].

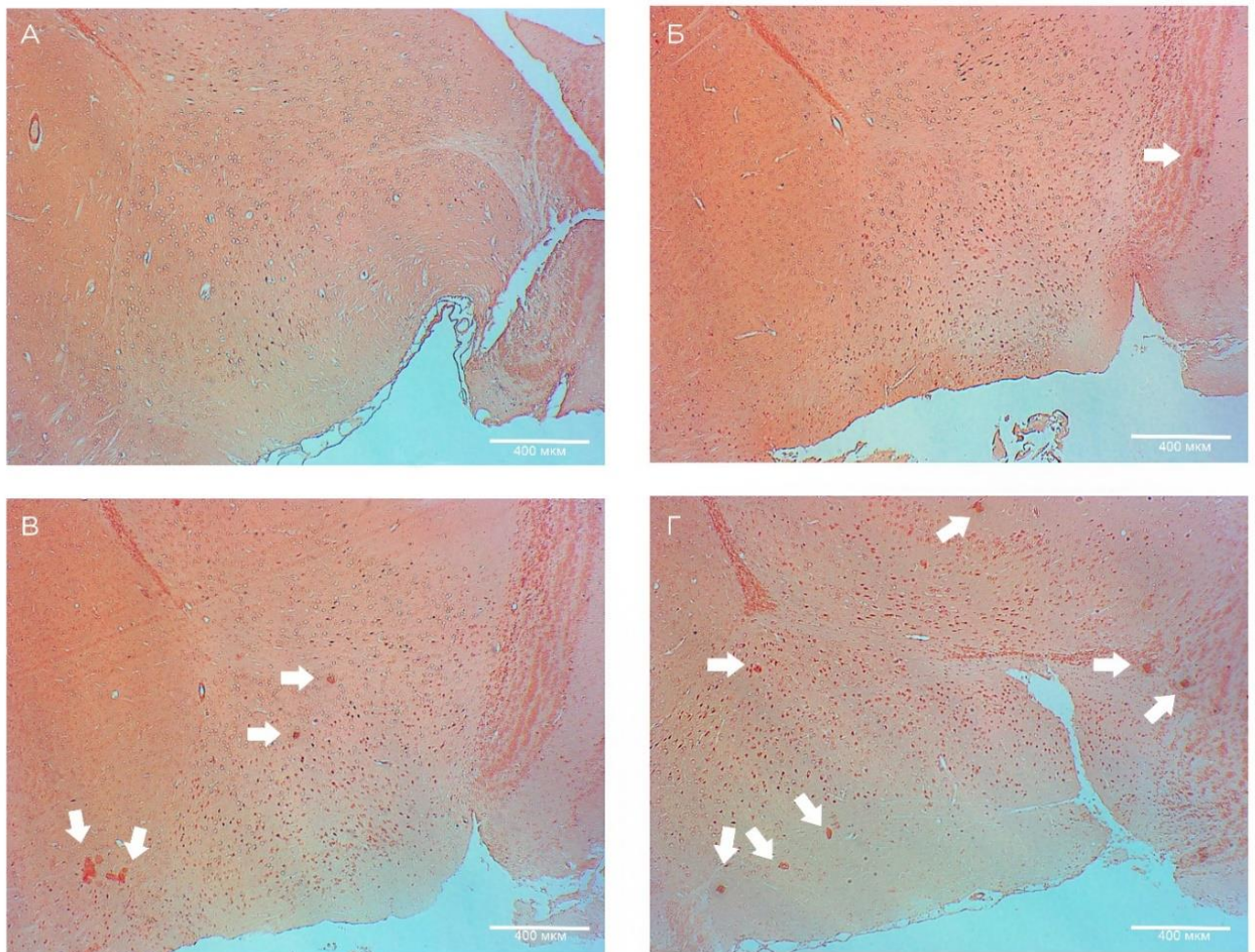


Рисунок 26 - Амилоидные бляшки в переднем мозге крыс через 30 дней после облучения (отмечены белыми стрелками). А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 170 МэВ, Г – группа, подверженная воздействию протонов с энергией 70 МэВ. Окраска – Конго красный.

Увеличение X100.

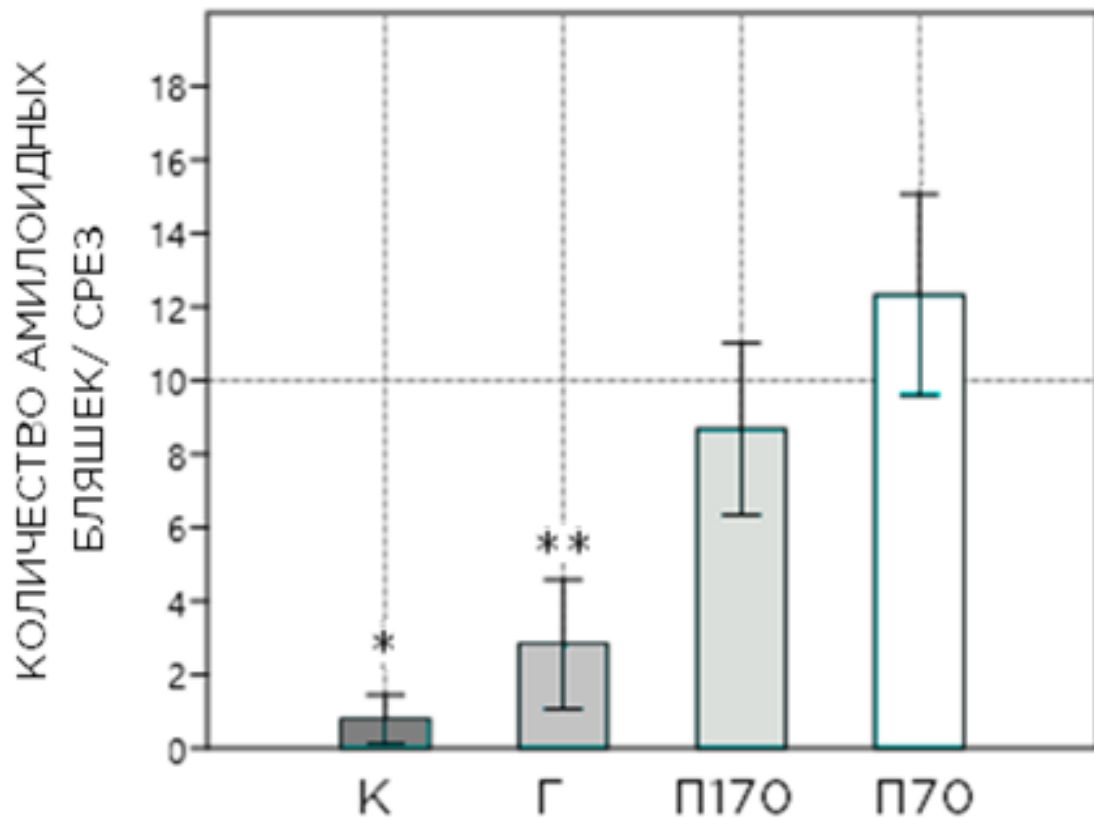


Рисунок 27 - Среднее значение количества амилоидных бляшек на 30 сутки после облучения в ткани срезов головного мозга крыс. К – контроль, Г – гамма-облучение в дозе 1 Гр, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ в дозе 1 Гр, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ в дозе 1 Гр.

* – различия статистически значимы между группами К и Г ($p=0,003$); К и П170 ($p<0,0001$); К и П70 ($p<0,0001$);

** – различия статистически значимы между группами Г и К ($p=0,003$), Г и П170 ($p<0,0001$); Г и П70 ($p<0,0001$).

Основная зона локализации – передний мозг и обонятельные луковицы.

Среднее значение $\pm 95\%$ интервал.

При окрашивании Fluoro Jade В через месяц после облучения не было выявлено значимых признаков нейродегенерации (Рисунок 28). Отсутствие реакции на данный флуорохром тем не менее дает значимую информацию о развитии патологического процесса в ЦНС после облучения. Для интерпретации

необходимо понимание специфики Fluoro-Jade окрашивания. Традиционно, данный флуоресцентный краситель применяют как альтернативу окрашиванию нитратом серебра, гематоксилин-эозином и крезилвиолетом для маркировки дегенерирующих нейронов [95]. Гистологические процедуры с Fluoro Jade B и его аналогами используют для исследований повреждения нейронов головного мозга при черепно-мозговых травмах, воздействии алкоголя и наркотиков, нейротоксинов, острой ишемии, болезни Альцгеймера. Тем не менее, механизм действия вещества не изучен, как и неизвестен молекулярный субстрат при реакции мечения.

Есть свидетельства, что мечение Fluoro Jade B специфично только для более поздних стадий дегенеративных процессов в нейронах [81]. В работах некоторых исследователей воздействие ионизирующим излучением в сравнительно больших дозах приводило к метаболической адаптации нейронов и даже снижению числа Fluoro Jade B положительных клеток после облучения и последующей ишемии [57].

Отсутствие признаков нейродегенерации при окрашивании Fluoro Jade B в эксперименте, представленном в данной диссертационной работе, может свидетельствовать либо о развитии дегенеративных процессов в более ранние сроки после воздействия частиц, либо о более ранней стадии этих процессов в клетках ЦНС крыс в выбранный период.

Именно поэтому при характеристике наблюдаемых гиперхромных сморщенных нейронов и клеток теней (3 группа) правильнее говорить о наблюдаемой дистрофии, как о нарушении клеточного метаболизма, трофики. Образование «темных нейронов», наблюдаемое на 30 сутки после облучения, по современным представлениям и данным электронной микроскопии, может быть связано не столько с некротической гибелью и артефактами сжатия образца, сколько с изменением осморегуляции нейрона, энергетической депривацией, деполяризацией клетки или высвобождением глутаминовой кислоты [49, 29, 48].

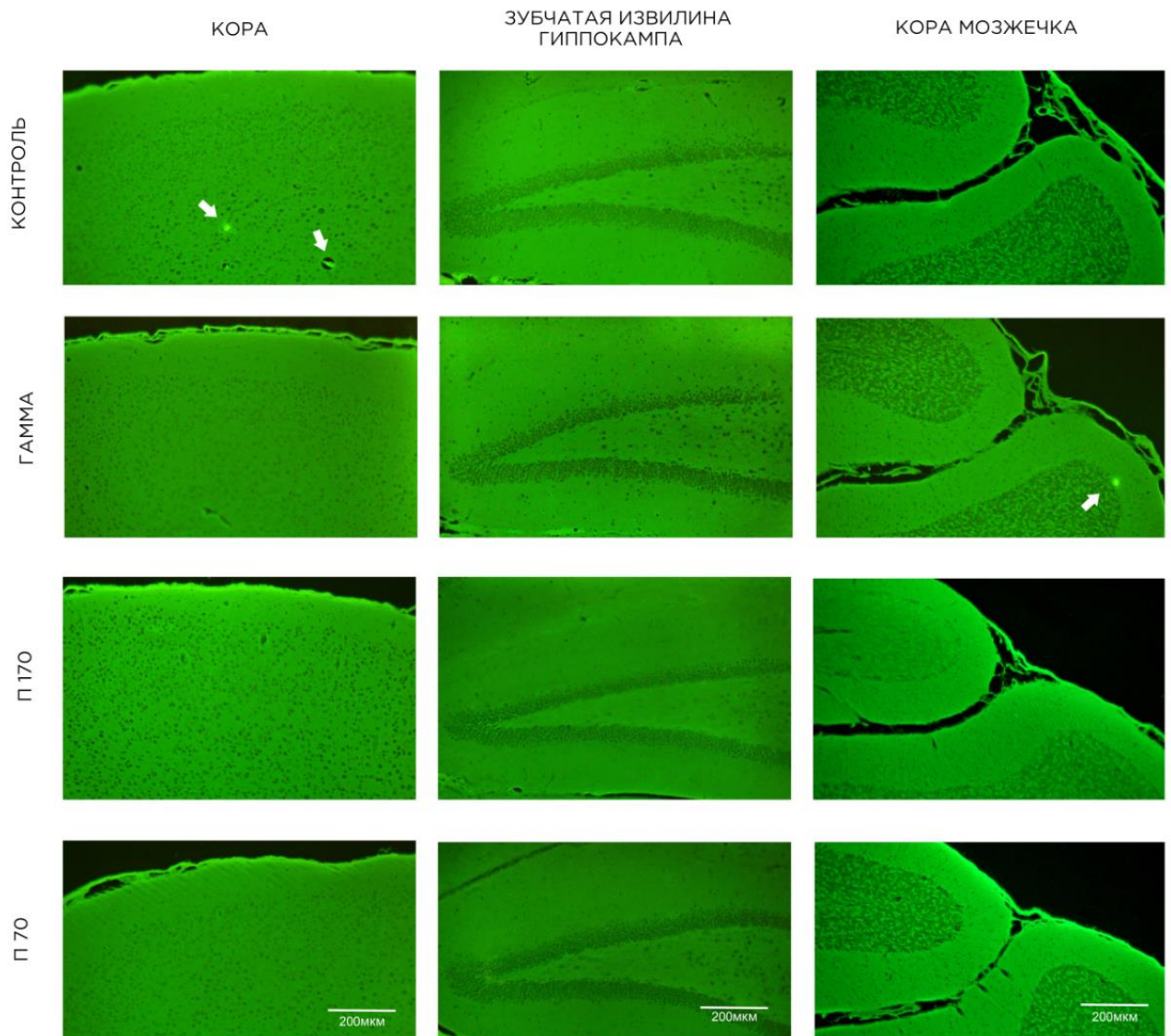


Рисунок 28 - Единичные Fluoro Jade В позитивные нейроны в различных структурах головного мозга крыс через 30 дней после облучения (отмечены белыми стрелками). Увеличение X200.

В рамках диссертационной работы, так же был проведен корреляционный анализ данных морфологического и поведенческого исследования. Из представленных матриц видно, что наиболее выраженная зависимость от ЛПЭ наблюдается при подсчете числа амилоидных бляшек и дистрофических

изменений в мозжечке. Значимая корреляция между локомоторными нарушениями на 1 и 30 сутки после облучения и дистрофическими изменениями нейронов в коре и мозжечке указывает на зависимость поведенческих реакций от морфологических изменений в данных структурах (Таблица 13). При анализе норкового рефлекса и числа вертикальных стоек не удалось обнаружить выраженной корреляции с морфологическими изменениями за исключением ранних изменений в СА3 слое гиппокампа (Таблица 14 и 15).

Таблица 13 – Матрица корреляции для двигательной активности.

Матрица корреляции		Двигательная активность			
		ЛПЭ	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Зубчатая извилина	Коэффициент корреляции	-0.312	0.233	-0.038	0.169
	Значение p	0.688	0.767	0.962	0.831
Хилус	Коэффициент корреляции	0.530	-0.481	-0.773	-0.617
	Значение p	0.470	0.519	0.227	0.383
СА3	Коэффициент корреляции	0.903	-0.732	-0.931	-0.883
	Значение p	0.097	0.268	0.069	0.117
СА1	Коэффициент корреляции	0.859	-0.978 *	-0.806	-0.903
	Значение p	0.141	0.022	0.194	0.097
Мозжечок (Клетки Пуркинье)	Коэффициент корреляции	0.982 *	-0.960 *	-0.906	-0.976 *
	Значение p	0.018	0.040	0.094	0.024
Кора	Коэффициент корреляции	0.941	-0.996 **	-0.939	-0.985 *
	Значение p	0.059	0.004	0.061	0.015
Амилоидные бляшки	Коэффициент корреляции	0.980 *	-0.814	-0.873	-0.915
	Значение p	0.020	0.186	0.127	0.085

Примечания: * – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,05$

** – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,01$

Таблица 14 - Матрица корреляции для норкового рефлекса.

Матрица корреляции		Норковый рефлекс			
		ЛПЭ	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Зубчатая извилина	Коэффициент корреляции	-0.312	-0.019	0.275	0.069
	Значение p	0.688	0.981	0.725	0.931
Хилус	Коэффициент корреляции	0.530	-0.780	-0.199	-0.188
	Значение p	0.470	0.220	0.801	0.812
CA3	Коэффициент корреляции	0.903	-0.969 *	-0.370	-0.182
	Значение p	0.097	0.031	0.630	0.818
CA1	Коэффициент корреляции	0.859	-0.757	-0.947	-0.812
	Значение p	0.141	0.243	0.053	0.188
Мозжечок (Клетки Пуркинье)	Коэффициент корреляции	0.982 *	-0.898	-0.780	-0.579
	Значение p	0.018	0.102	0.220	0.421
Кора	Коэффициент корреляции	0.941	-0.908	-0.860	-0.715
	Значение p	0.059	0.092	0.140	0.285
Амилоидные бляшки	Коэффициент корреляции	0.980 *	-0.908	-0.511	-0.260
	Значение p	0.020	0.092	0.489	0.740

Примечания: * – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,05$

** – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,01$

Таблица 15 - Матрица корреляции для стоек на задних лапах.

Матрица корреляции

		ЛПЭ	1 сутки	14 сутки	30 сутки
Зубчатая извилина	Коэффициент корреляции	-0.312	-0.088	-0.316	-0.524
	Значение p	0.688	0.912	0.684	0.476
Хилус	Коэффициент корреляции	0.530	-0.819	-0.908	-0.934
	Значение p	0.470	0.181	0.092	0.066
СА3	Коэффициент корреляции	0.903	-0.963 *	-0.949	-0.750
	Значение p	0.097	0.037	0.051	0.250
СА1	Коэффициент корреляции	0.859	-0.735	-0.352	-0.543
	Значение p	0.141	0.265	0.648	0.457
Мозжечок (Клетки Пуркинье)	Коэффициент корреляции	0.982 *	-0.871	-0.599	-0.585
	Значение p	0.018	0.129	0.401	0.415
Кора	Коэффициент корреляции	0.941	-0.896	-0.598	-0.716
	Значение p	0.059	0.104	0.402	0.284
Амилоидные бляшки	Коэффициент корреляции	0.980 *	-0.877	-0.746	-0.515
	Значение p	0.020	0.123	0.254	0.485

Примечания: * – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,05$

** – значения имеют статистическую значимость при $p < 0,01$

3.2.4 Физиологические показатели

Животные, которые были подвергнуты облучению на гамма-терапевтической установке в дозе 1 Гр обладали большей массой на 30 сутки после облучения в сравнении с аналогичными показателями у животных, подвергнутых облучению протонами (Таблица 16). Это может быть обусловлено активацией липогенеза после воздействия гамма-излучения ^{60}Co [58]. При

анализе показателей массы селезенки и тимуса были выявлены статистически значимые различия в массе селезенки в группе животных, подверженных облучению протонами с энергией 170 МэВ (облучение всего тела). Так же в группах облученных животных была выявлена гиперрегенерация ядродержащих клеток костного мозга к 30 суткам после облучения на фоне общего падения числа лейкоцитов в периферической крови (Таблица 17). Предполагается, что комплексные нарушения метаболизма могут оказать влияние на афферентацию и привести к морфологическим и функциональным изменениям и в головном мозге.

Таблица 16 - Среднее значение массы тела и массы центрального органа иммуногенеза (тимус) и периферического (селезенка) в различных группах экспериментальных животных. Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество животных	Масса тела до облучения, г	Масса тела на 30 сутки после облучения, г	Масса селезенки на 30 сутки после облучения, мг	Масса тимуса на 30 сутки после облучения, мг
Контроль	7	20,8 $\pm$ 3,9	38,3 $\pm$ 2,3	659,4 $\pm$ 13,3	288,8 $\pm$ 32,1
Гамма	8	22,6 $\pm$ 5,3	48,1 $\pm$ 4,6*	666,0 $\pm$ 28,2	296,3 $\pm$ 23,8
Протоны 170 МэВ	8	23,0 $\pm$ 6,7	30,6 $\pm$ 5,6	554,6 $\pm$ 18,5**	273,9 $\pm$ 21,8
Протоны 70 МэВ	8	22,3 $\pm$ 4,2	31,3 $\pm$ 3,8	627,6 $\pm$ 20,1	278,8 $\pm$ 12,5

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Гамма и Протоны 170 МэВ ($p=0,04$) и между группами Гамма и Протоны 70 МэВ ($p=0,03$);

** – различия статистически значимы между группами Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,004$), Гамма и Протоны 170 МэВ ($p=0,01$), Протоны 70 и Протоны 170 МэВ ($p=0,03$).

Таблица 17 - Среднее значение количества ядросодержащих клеток костного мозга и лейкоцитов периферической крови на 30 сутки после облучения в различных группах экспериментальных животных. Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество животных	Количество ядросодержащих клеток костного мозга, $n \cdot 10^6/\text{бедро}$	Количество лейкоцитов в периферической крови, $n \cdot 10^9/\text{л}$
Контроль	7	$49,9 \pm 2,5^*$	$7 \pm 0,8^{***}$
Гамма	8	$61,4 \pm 2,1$	$5,3 \pm 0,4$
Протоны 170 МэВ	8	$55,2 \pm 1,4^{**}$	$3,9 \pm 0,4$
Протоны 70 МэВ	8	$64,4 \pm 2,7$	$4,8 \pm 0,9$

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма-облучение ($p=0,009$), Контроль и Протоны 70 МэВ ($p=0,003$);

** – различия статистически значимы между группами Протоны 170 МэВ и Протоны 70 МэВ ($p=0,02$);

*** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма-облучения ($p=0,04$), Контроль и Протоны 170 МэВ ($p=0,01$), Контроль и протоны 70 МэВ ($p=0,03$).

3.3 Исследование поведенческих реакций и морфологических изменений клеток Пуркинье коры мозжечка крыс после облучения ионами углерода ^{12}C

3.3.1 Поведенческие реакции. Открытое поле.

Результаты исследования поведенческих реакций крыс в тест-системе «Открытое поле» представлены на Рисунке 29 и Рисунке 30.

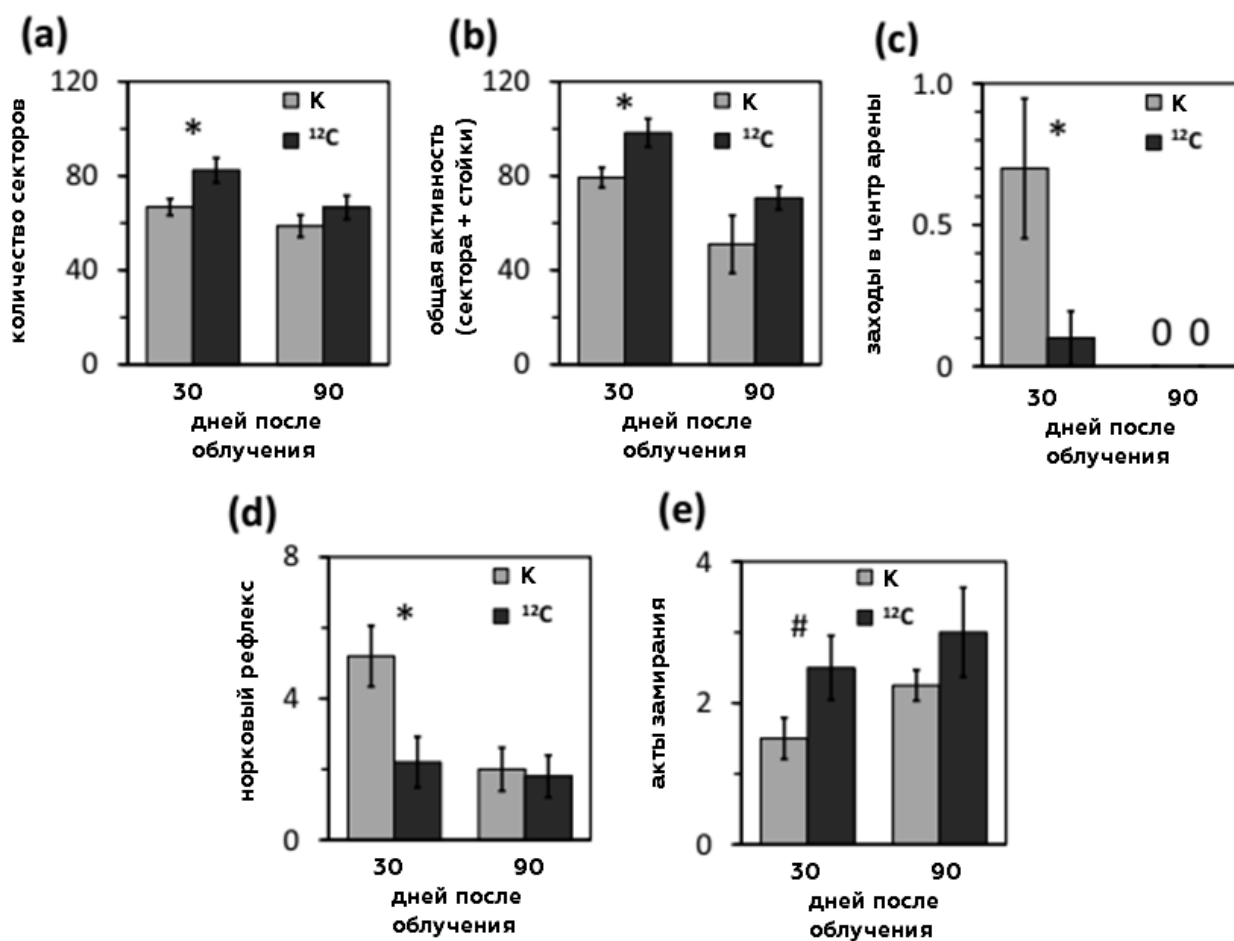


Рисунок 29 - Влияние тотального облучения ионами ^{12}C на поведенческие реакции крыс в установке “Открытое поле”, количество пройденных секторов арены (a), общая активность (сектора + стойки на задних лапах) (b), проходы через центральный сектор арены (c), норковый рефлекс (d), акты замиранья (e).

Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка. (*) p < 0,05 и (#) p < 0,1

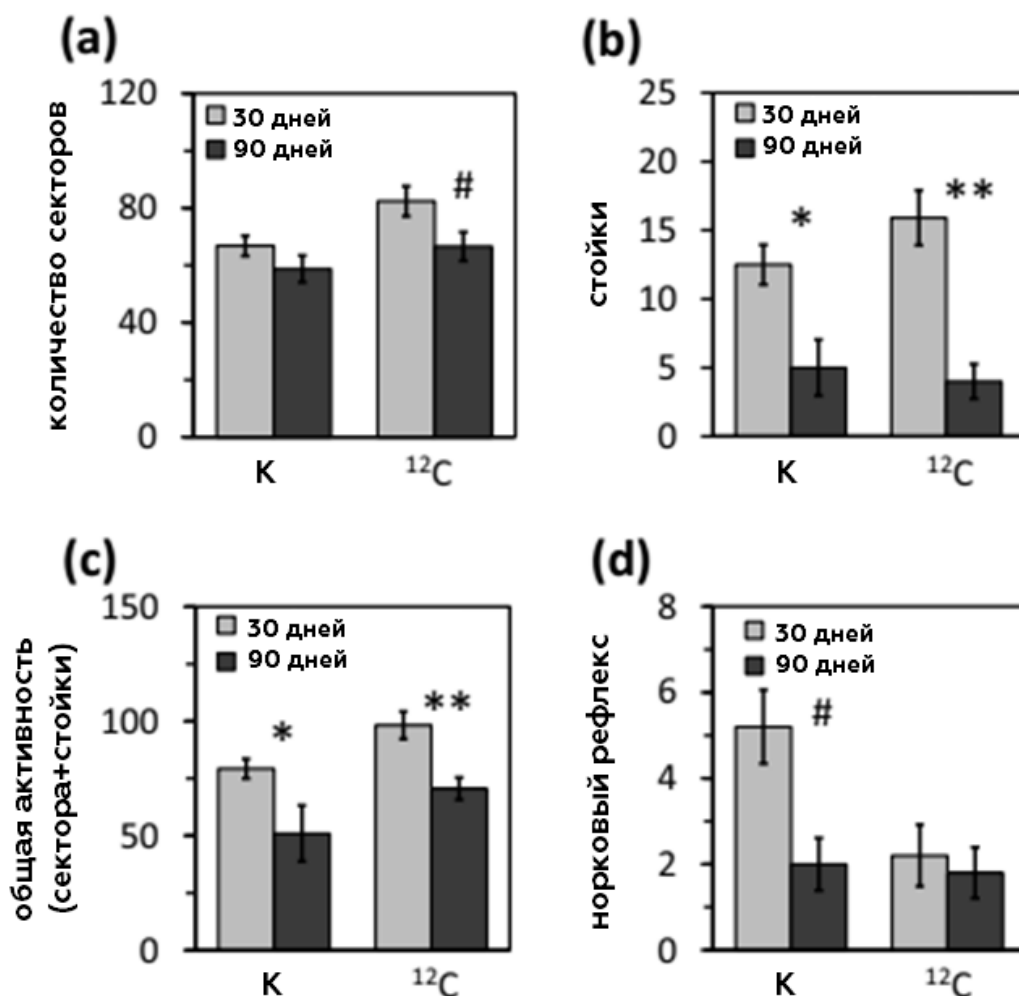


Рисунок 30 - Влияние тотального облучения ионами ^{12}C на динамику поведенческих реакции крыс в установке “Открытое поле”, количество пройденных секторов арены (а), стойки на задних лапах (б), общая активность (с), норковый рефлекс (д). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

(*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ и (#) $p < 0,1$.

Наиболее выраженные различия наблюдались на 30 сутки после воздействия. В этот период облученные крысы проявляли более высокую двигательную активность, чем контрольные. Снижение числа заходов в центральную зону ($p=0,045$) и проявлений норкового рефлекса ($p=0,020$) на фоне увеличения числа замираний ($p=0,094$) свидетельствовало об увеличении тревожности и снижении исследовательского поведения. Между тем, не было

никаких существенных различий в количестве стоек на задних лапах и актов груминга между экспонированными и контрольными крысами. Через 90 дней после облучения мы не обнаружили каких-либо заметных изменений параметров теста открытого поля. При анализе динамики изменения поведенческих реакций в различные сроки после облучения было отмечено более заметное снижение показателей общей активности ($p=0,009$) и вертикальных стоек ($p=0,002$) в группе облученных животных. Показатель норкового рефлекса у облученных животных не изменился с течением времени, в то время как у контрольных животных имел тенденцию к снижению. Не было обнаружено значимых изменений при анализе числа актов замирания, груминга и заходов в центральную зону.

3.3.2 Морфологическое исследование

Анализ относительного числа морфологических изменений нейронов мозжечка через месяц и 3 месяца после облучения представлен в данной главе. Количество и динамика формирования структурных нарушений имели существенные различия между выделенными группами. На 30 сутки после облучения количество нейронов с дистрофическими изменениями было достоверно больше в группах животных, подверженных действию ядер углерода ^{12}C по сравнению с группой гамма-облучения (Таблица 18, Рисунок 31). Во всех группах облученных животных наблюдался рост морфофункциональных и компенсаторно-приспособительных изменений. Обнаруженные нами участки ганглиозного слоя, с высокой долей гипо- и гиперхромных нейронов, клеток, с сегментарным или апикальным хроматолизом, умеренной гипертрофией ядра и ядрышка могут свидетельствовать об интенсификации биологических процессов в коре мозжечка облученных животных.

Таблица 18 - Морфологические изменения нейронов мозжечка (Клетки Пуркинье) на 30 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	67,7 $\pm$ 0,90*	28,13 $\pm$ 1,01**	4,16 $\pm$ 0,52***
Гамма	54,31 $\pm$ 2,18	35,79 $\pm$ 2,28	9,90 $\pm$ 0,12****
Ионы ^{12}C	49,21 $\pm$ 1,04	34,58 $\pm$ 1,05	16,21 $\pm$ 0,82

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,012$) и Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,012$);
 ** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,012$) и Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,012$);
 *** – различия статистически значимы между группами Контроль и Гамма ($p=0,0119$) и Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,0119$);
 **** – различия статистически значимы между группами Гамма и Ионы ^{12}C ($p=0,012$).

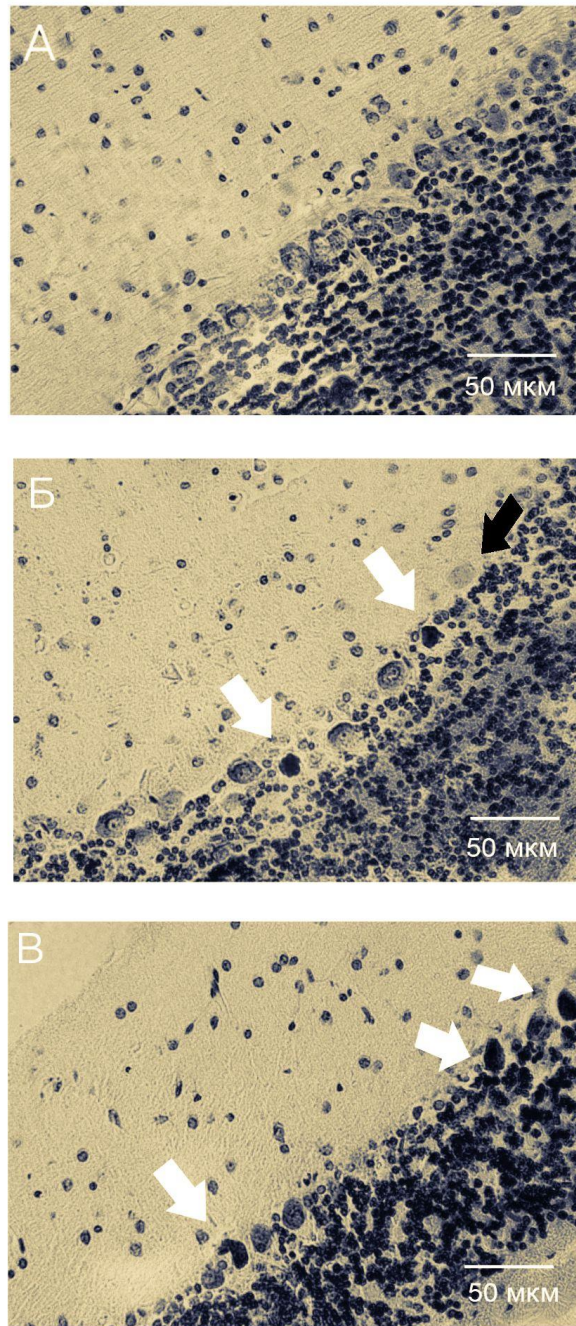


Рисунок 31 - Морфологические изменения клеток Пуркинье в коре мозжечка на 30 сутки после облучения. А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию ионов углерода ^{12}C в дозе 1 Гр. Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. Черной стрелкой обозначен гипохромный нейрон (морфофункциональные изменения). Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

Анализ полученных микропрепаратов на 90 сутки после облучения свидетельствует о том, что количество нейронов с дистрофическими изменениями достоверно больше в группе крыс, подверженных воздействию ионами ^{12}C по сравнению с γ -облучением и интактными животными (Таблица 19, Рисунок 32). Тем не менее, вклад клеток с дистрофическими нарушениями в общее число измененных нейронов становится меньше. Изменение значений этих показателей может быть обусловлено тем, что количество клеток, имеющих необратимые дистрофические изменения в первом периоде наблюдения (30 сутки), уменьшилось в результате их элиминации. При качественном анализе препаратов мозжечка крыс, облученных заряженными частицами, обнаруживаются выраженные изменения цитоархитектоники на 90 сутки после облучения.

Все выявленные дистрофические нарушения наблюдаются на фоне повышения числа нейронов с обратимыми изменениями в группе животных облученных ионами углерода.

Таблица 16 - Морфологические изменения нейронов мозжечка (Клетки Пуркинье) на 90 сутки после облучения. (1 – нормохромные нейроны, 2 – нейроны с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями, 3 – нейроны с дистрофическими изменениями). Среднее значение $\pm$ Стандартная ошибка.

Группа	Количество нейронов (%)		
	1	2	3
Контроль	75,47 $\pm$ 0,24	20,07 $\pm$ 0,46	4,46 $\pm$ 0,37
Гамма	71,00 $\pm$ 0,99	24,05 $\pm$ 1,01	4,95 $\pm$ 0,24
Ионы ^{12}C	61,8 $\pm$ 0,84*	30,28 $\pm$ 0,53**	7,92 $\pm$ 0,39***

Примечания: * – различия статистически значимы между группами Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,037$) и Гамма и Ионы ^{12}C ($p=0,02$);

** – различия статистически значимы между группами Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,037$) и Гамма и Ионы ^{12}C ($p=0,02$);

*** – различия статистически значимы между группами Контроль и Ионы ^{12}C ($p=0,037$) и Гамма и Ионы ^{12}C ($p=0,019$).

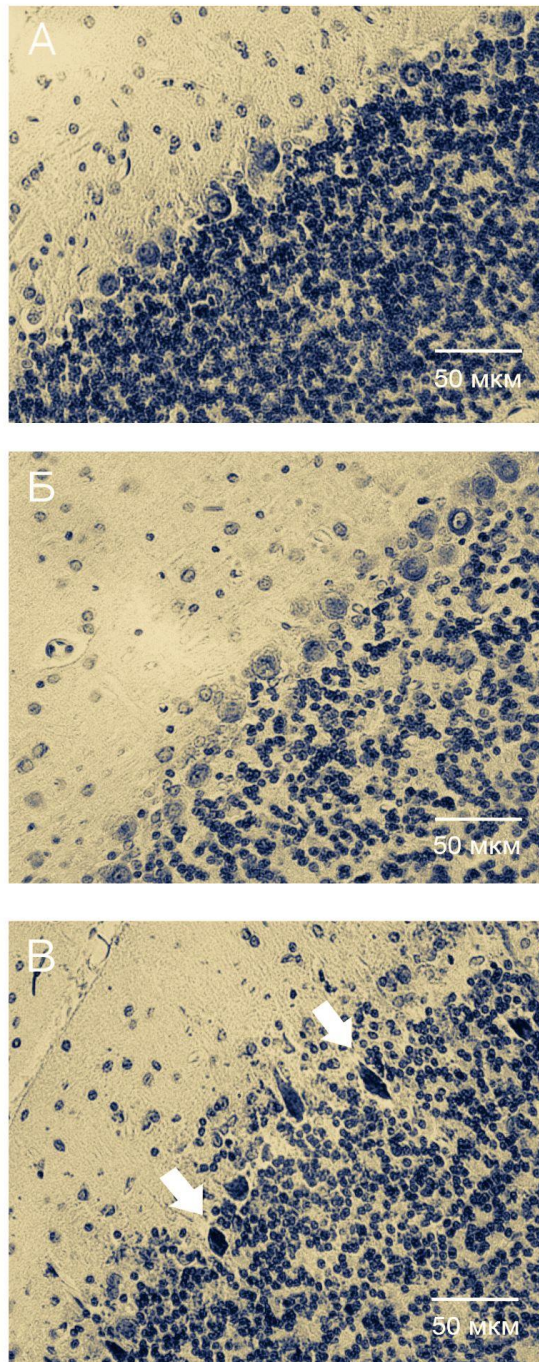


Рисунок 32 - Морфологические изменения клеток Пуркинье в коре мозжечка на 90 сутки после облучения. А – контрольная группа, Б – группа, подверженная гамма-облучению в дозе 1 Гр, В – группа, подверженная воздействию ионов углерода ^{12}C в дозе 1 Гр. Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. Заметно выраженное нарушение citoархитектоники слоя клеток Пуркинье. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю. Увеличение X400.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Развитие адронной терапии и перспективы освоения дальнего космического пространства послужили стимулом для проведения целого ряда радиобиологических исследований с применением заряженных частиц различных энергий и физических характеристик. В данном исследовании проведен глубокий сравнительный анализ поведенческих реакций и морфологических изменений в центральной нервной системе после воздействия заряженных частиц и гамма-излучения. Анализ полученных данных показывает, что воздействие ионами ^1H и ^{12}C приводит к изменению поведения животных и развитию ряда морфологических нарушений в тканях головного мозга крыс.

Краниальное однократное облучение протонами в дозе 5 Гр не приводит к нарушению оптомоторного рефлекса на 30 и 90 сутки после облучения, однако вызывает снижение концентрации внимания на динамической зрительной стимуляции в отделенные сроки после экспозиции. Максимальные различия в зрительных реакциях наблюдаются при использовании стимуляции с низким значением контраста $k=0,5$. Полученные данные дают количественную оценку зрительному поведению крыс после облучения.

Воздействие гамма-излучением, протонами с энергией 170 МэВ и протонами с энергией 70 МэВ в пике Брэгга в кранио-каудальном направлении в дозе 1 Гр приводит к снижению исследовательского поведения и росту стереотипии в тесте спонтанного чередования в Т-лабиринте на 30 сутки после воздействия.

Анализ поведенческих реакций в «Открытом поле» указывает на выраженное снижение двигательной и исследовательской активности (в виде показателя стоек на задних лапах) у самок крыс, облученных в пике Брэгга в дозе 1 Гр с первых суток после воздействия. Через 24 часа после облучения протонами наблюдается снижение реакции бегства (норкового рефлекса) во всех группах облученных животных. Угашение общей двигательной активности (6 минут

тестирования) в «Открытом поле» к 30 суткам составило: 22% для контрольных животных, 29% для облученных гамма-излучением, 34% для облученных протонами с энергией 170 МэВ и 47% для облученных в пике Брэгга.

Исследование морфологических изменений нейронов в гиппокампе через месяц после воздействия различными типами ИИ показало рост числа клеток с морфофункциональными и дистрофическими изменениями в полиморфном хилусе и слое СА3. Рост дистрофических изменений в слое СА1 наблюдается только при воздействии протонов с большей ЛПЭ.

При анализе дистрофических изменений клеток Пуркинье мозжечка и нейронов коры был выявлен значительный рост относительного числа нейронов с аномальными тинкториальными свойствами при облучении протонами в пике Брэгга. Наблюдаемые морфологические изменения при этом сопровождались нейрональной гипертрофией. Это может являться следствием интенсификации биологических процессов в клетке в ответ на поражающий фактор.

При исследовании морфологических изменений в вентрикулярных областях головного мозга, были выявлены изменения в монослое эпендимоцитов четвертого и второго бокового желудочка. Воздействие гамма-излучения и протонов с энергией 170 МэВ привело к увеличению числа хроматофильных клеток и развитию субэпендимального отека при наблюдаемой общей редукции клеточной популяции. Очаги деструкции и тотального хроматолиза особенно заметны в нервной ткани животных подвергнутых воздействию протонов с энергией 70 МэВ.

В данной работе было подтверждено, что различные элементы в одном и том же органе могут проявлять различную радиочувствительность, а взаимосвязь между объемом и тяжестью лучевого поражения очень сложна и зависит от анатомических и физиологических свойств облучаемой области [41]. Возможно, именно это обстоятельство объясняет более существенный рост относительного числа клеток с дистрофическими изменениями в гиппокампе и мозжечке.

Анатомически эти регионы располагаются ближе к желудочкам головного мозга, в которых были выявлены морфологические изменения слоя эпендимоцитов.

Воздействие гамма и протонным излучением привело к ЛПЭ-зависимому увеличению наблюдаемых амилоидных бляшек на 30 сутки после облучения.

Результаты Fluoro Jade В окрашивания могут свидетельствовать либо о развитии дегенеративных процессов в более ранние сроки после воздействия частиц, либо о более ранней стадии этих процессов в клетках ЦНС крыс на 30 сутки.

Корреляционный анализ показал зависимость числа реакций на амилоид и дистрофических изменений клеток Пуркинье в мозжечке от ЛПЭ излучений. Также была установлена взаимосвязь между морфологическими изменениями в коре и мозжечке и нарушениями двигательной активности. При этом изменения других поведенческих характеристик (норкового рефлекса и стоек) в ранние сроки наблюдаются в корреляционной зависимости с дистрофическими нарушениями в СА3 слое гиппокампа. Это может свидетельствовать о том, что наблюдаемые при воздействии различных типов ИИ поведенческие нарушения в различные сроки имеют разный субстрат, обусловленный динамикой патогенеза и радиочувствительностью отдельных областей мозга.

При анализе показателей массы селезенки и тимуса были выявлены статистически значимые различия в массе селезенки в группе животных, подверженных облучению протонами с энергией 170 МэВ (облучение всего тела). Также в группах облученных животных была выявлена гиперрегенерация ядродержащих клеток костного мозга к 30 суткам после облучения на фоне общего падения числа лейкоцитов в периферической крови.

При исследовании поведенческих реакций самцов крыс в Открытом поле при облучении ионами углерода ^{12}C в дозе 1 Гр наиболее выраженные различия наблюдались на 30 сутки после воздействия. В этот период облученные крысы проявляли более высокую двигательную активность, чем контрольные. Снижение числа заходов в центральную зону и проявлений норкового рефлекса на фоне

увеличения числа замираний свидетельствовало об увеличении тревожности и снижении исследовательского поведения. При анализе динамики изменения поведенческих реакций в различные сроки после облучения было отмечено более заметное снижение показателей общей активности и вертикальных стоек в группе облученных животных.

Количество и динамика формирования структурных нарушений в нервной ткани при воздействии ионами ^{12}C имели существенные различия между группами. На 30 сутки после облучения количество нейронов с дистрофическими изменениями было достоверно больше в группах животных, подверженных действию ядер углерода ^{12}C по сравнению с группой гамма-облучения. Во всех группах облученных животных наблюдался рост морфофункциональных и компенсаторно-приспособительных изменений. К 90 суткам у животных облученных гамма-излучением наблюдалась элиминация дистрофических нейронов, в отличие от группы, подвергнутых воздействию корпускулярного излучения.

Подводя итог всему вышеизложенному можно заключить, что цель данного исследования достигнута посредством решения поставленных задач. Проведен подробный комплексный анализ поведенческих реакций и морфологических изменений в головном мозге при воздействии заряженных частиц с различными физическими характеристиками. Установлено, что заряженные ядра водорода и углерода приводят к развитию патологий в ЦНС и нарушению важных поведенческих паттернов. Выявленные патологии проявляются тем острее, чем выше линейная передача энергии частиц.

Однако дискуссионным остается вопрос об отсутствии изменений после облучения в поведении, связанном с эмоциональной реактивностью животного и такими показателями, как оптомоторный ответ, наличия полового диморфизма в реализации поведенческих нарушений, обратимости патоморфологических изменений. По всей видимости, воздействие ИИ влияет на сложные интегративные процессы в головном мозге крыс, при этом в меньшей степени

затрагивая прямые механизмы проявления рефлексов. Так же, однократное воздействие заряженными частицами в дозах, сравнимых с суммарными дозами при моделировании дальних космических полетов, приводит к развитию декомпенсации и увеличению дистрофических изменений в нейронах головного мозга, нарушению цитоархитектоники, метаболизма и трофики в тканях ЦНС. Более глубокое понимание данных патологических процессов и дальнейшие исследования в этой области помогут не только правильно оценить существующие риски, но и определить наиболее эффективные пути профилактики физиологических альтераций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бибикова, А. Ф. Морфологические изменения нервной системы собак при действии протонов высоких энергий / А. Ф. Бибикова, Б. И. Лебедев // Радиобиология. – 1965. – Т. 5. – № 4. – С. 562-565.
2. Гайдамакин, Н. А. Ранние патоморфологические изменения в головном мозге животных при общем облучении протонами и быстрыми нейтронами / Н. А. Гайдамакин // Радиобиология. – 1970. – Т. 10. – № 6. – С. 892-894.
3. Григорьев, Ю. Г. Космическая радиобиология / Ю. Г. Григорьев. – Москва: Энергоиздат, 1982. – С. 166.
4. Кабаченко, А. Н. Оценка катарактогенного действия протонов / А. Н. Кабаченко, Б. С. Федоренко, О. А. Смирнова // Радиобиология. – 1986. – Т. 26. – № 3. – С. 318-322.
5. Климанов, В. А. Дозиметрическое планирование лучевой терапии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / В. А. Климанов, Т. А. Крылова. – Москва: МИФИ, 2007. – С. 94.
6. Красавин, Е. А. Исследование повреждающего действия излучения с различными потерями энергии на нервные клетки мозжечка крыс / Е. А. Красавин, Т. Е. Машинская, Н. И. Рыжов // Космическая биология и авиакосмическая медицина. – 1978. – Т. 12. . – №1– С. 38-42.
7. Морфофункциональные показатели воздействия протонов на центральную нервную систему / К. Н. Ляхова, И. А. Колесникова, Д. М. Утина [и др.] // Медицинская радиология и радиационная безопасность. – 2019. – Т. 64. – № 2. – С. 75-81.
8. Максимова, К. Ю. Морфологические изменения нейронов в гиппокампе крыс при преждевременном старении / К. Ю. Максимова, Н. А. Стефанова, С. В. Логвинов // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 13. – № 1. – С. 56-61.

9. Маркель, А. Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в «Открытом поле» / А. Л. Маркель // Журнал высшей нервной деятельности. – 1981. – Т. 31. – № 2. – С. 301-307.
10. Влияние облучения протонами на решение мышами когнитивного теста на поиск входа в укрытие и нейрогенез взрослого мозга / И. И. Полетаева, О. В. Перепелкина, Н. А. Огиенко [и др.] // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2019. – Т. 59. – № 5. – С. 512-516.
11. Исследование радиационных поражений в тканях головного мозга крыс / Б. С. Федоренко, А. Л. Карповский, Н. И. Рыжов, Е. А. Красавин // Биологические исследования на орбитальных станциях “Салют” / Г. С. Нечитайло, А. Л. Машинский, С. А. Панова [и др.]; Отв. ред. Н. П. Дубинин. – Москва: Наука, 1984. – С. 152-158.
12. Федоренко, Б. С. Радиобиологические эффекты корпускулярных излучений: радиационная безопасность космических полетов / Б. С. Федоренко; под ред. В. В. Шиходырова; РАН, ИМБП. – Москва: Наука, 2006. – С. 115-133.
13. Шиходыров, В. В. Особенности патоморфологической картины лучевой болезни при облучении животных протонами высоких энергий / В. В. Шиходыров, Б. И. Лебедев // Космическая биология и медицина. – 1968. – Т. 2. – № 5. – С. 8-11.
14. Шиходыров, В. В. Морфологические изменения в органах собак при однократном облучении протонами высоких энергий / В. В. Шиходыров, В. И. Пономарьков // Биологическое действие протонов высоких энергий: К оценке радиац. опасности космич. полетов / Под ред. и с предисл. проф. Ю. Г. Григорьева. – Москва: Атомиздат, 1967. – С. 182-186.
15. Штемберг, А. С. Острое угашение ориентировочно-исследовательских реакций у крыс разных линий в тесте “Открытого поля” / А. С. Штемберг // Журнал высшей нервной деятельности. – 1982. – Т. 32. – № 4. – С. 760-762.
16. Влияние облучения протонами высокой энергии на поведение крыс и его нейрохимические механизмы / А. С. Штемберг, А. С. Базян, К. Б. Лебедева-

- Георгиевская [и др.] // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2013. – Т. 47. – № 6. – С. 54-60.
17. Эффекты воздействия протонов высокой энергии на поведение, когнитивные функции и обмен моноаминов и их метаболитов в ключевых структурах мозга крыс / А. С. Штемберг, В. С. Кохан, К. Б. Лебедева-Георгиевская [и др.] // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И. П. Павлова с международным участием. – Москва: Издательство Истоки, 2017. – С. 787-789.
 18. Effect of local irradiation of the central nervous system with high energy protons. Response of the nervous system to ionizing radiation / B. Andersson, B. Larsson, L. Leksell [et al.]. – New York: Academic Press, 1962. – P. 345-358.
 19. Dose response of rat retinal microvessels to proton dose schedules used clinically: a pilot study / J. O. Archambeau, X. W. Mao, P. J. McMillan [et al.] // International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics. – 2000. – V. 48. – № 4. – P. 1155-1166.
 20. Barratt, S. L. Pool Principles of Clinical Medicine for Space Flight / S. L. Barratt. – New York: Springer, 2008. – P. 21-22.
 21. A single low dose of proton radiation induces long-term behavioral and electrophysiological changes in mice / J. A. Bellone, E. Rudbeck, R. E. Hartman [et al.] // Radiation Research. – 2015. – V. 184. – № 2. – P. 193-202.
 22. Bhattad, M. Cranial Irradiation Linked to Cerebral Amyloid Angiopathy // M. Bhattad, V. Krishnaswami // Age and Ageing. – 2018. – V. 47. – № 5. – P. v13-v60.
 23. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety / M. L. Brandão, J. M. Zanoveli, R. C. Ruiz-Martinez [et al.] // Behavioural Brain Research. – 2008. – V. 188. – № 1. – P. 1-13.

24. Brown, G. R. The exploratory behaviour of rats in the hole-board apparatus: Is head-dipping a valid measure of neophilia? / G. R. Brown, C. Nemes // *Behavioural Processes*. – 2008. – V. 78. – № 3. – P. 442-448.
25. Proton-induced genetic damage in lacZ transgenic mice / P. Y. Chang, J. Bakke, J. Orduna [et al.] // *Radiation Research*. – 2005. – V. 164. – № 4, Pt 2. – P. 481-486.
26. Contrasting the effects of proton irradiation on dendritic complexity of subiculum neurons in wild type and MCAT mice / N. N. Chmielewski, C. Caressi, E. Giedzinski [et al.] // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2016. – V. 57. – № 5. – P. 364-371.
27. Choi, W. H. Evolving Clinical Cancer Radiotherapy: Concerns Regarding Normal Tissue Protection and Quality Assurance / W. H. Choi, J. Cho // *Journal of Korean Medical Science*. – 2016. – V. 31. – № 1. – P. 75-87.
28. The Effect of Low Dose Radiation on Alzheimer's Disease-Induced TG Mice / S. Y. Choi, N. Kwon, S. T. Kim [et al.] // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2018. – V. 102. – № 3. – P. e210-e211.
29. Csordás, A. Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations / A. Csordás, M. Mázló, F. Gallyas // *Acta Neuropathologica*. – 2003. – V. 106. – № 1. – P. 37-49.
30. Davis, C. M. Deficits in sustained attention and changes in dopaminergic protein levels following exposure to proton radiation are related to basal dopaminergic function / C. M. Davis, K. L. DeCicco-Skinner, R. D. Hienz // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 12. – Article: e0144556.
31. Individual differences in attentional deficits and dopaminergic protein levels following exposure to proton radiation / C. M. Davis, K. L. DeCicco-Skinner, P. G. Roma, R. D. Hienz // *Radiation Research*. – 2014. – V. 181. – № 3. – P. 258-271.

32. Stereotypy and spontaneous alternation in deer mice and its response to anti-adenosinergic intervention / G. De Brouwer, J. Engelbrecht, D. C. Mograbi [et al.] // *Journal of Neuroscience Research*. – 2021. – V. 99. – № 10. – P. 2706-2720.
33. Deacon, R. M. J. T-maze alternation in the rodent / R. M. J. Deacon, J. N. P. Rawlins // *Nature Protocols*. – 2006. – V. 1. – № 1. – P. 7-12.
34. Cellular and molecular effects of protons: Apoptosis induction and potential implications for cancer therapy / C. Di Pietro, S. Piro, G. Tabbi [et al.] // *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. – 2006. – V. 11. – № 1. – P. 57-66.
35. Durante, M. Ground-based research with heavy ions for space radiation protection / M. Durante, A. Kronenberg // *Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*. – 2005. – V. 35. – № 2. – P. 180-184.
36. D'Isa, R. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze / R. D'Isa, G. Comi, L. Leocani // *Scientific Reports*. – 2021. – V. 11. – № 1. – Article: 21177.
37. Grigor'ev, A. I. The problem of the radiation barrier during piloted interplanetary flights / A. I. Grigor'ev, E. A. Krasavin, M. A. Ostrovsky // *Herald of the Russian Academy of Sciences*. – 2017. – V. 87. – № 1. – P. 63-66.
38. Haerich, P. Investigation of the effects of head irradiation with gamma rays and protons on startle and prepulse inhibition behavior in mice / P. Haerich, C. Eggers, M. J. Pecaut // *Radiation Research*. – 2012. – V. 177. – № 5. – P. 685-692.
39. Hammer, Ø. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis / Ø. Hammer, D. A. T. Harper, P. D. Ryan // *Palaeontologia Electronica*. – 2001. – V. 4. – № 1. – P. 9.

40. Acute changes in the central nervous system of monkeys exposed to protons / W. Haymaker, M. Z. Ibrahim, J. Miguel [et al.] // Journal of neuropathology and experimental neurology. – 1972. – V. 31. – № 1. – P. 72-101.
41. Hopewell, J. W. Volume effects in radiobiology as applied to radiotherapy / J. W. Hopewell, K. R. Trott // Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. – 2000. – V. 56. – № 3. – P. 283-288.
42. Howell, D. Statistical methods for psychology / D. Howell. – 5th ed. – Duxbury: Pacific Grove, 2002. – 824 p.
43. Bi-directional and shared epigenomic signatures following proton and ^{56}Fe irradiation / S. Impey, T. Jopson, C. Pelz [et al.] // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – № 1. – Article: 10227.
44. A comparison of effects between accelerated heavy ion irradiation and X-irradiation on the development of rat cerebellum / M. Inouye, S. Hayasaka, S. Takahashi [et al.] // Environmental medicine: annual report of the Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University. – 1999. – V. 43. – № 1. – P. 69-71.
45. Similarity between the effects of carbon-ion irradiation and X-irradiation on the development of rat brain / M. Inouye, S. Hayasaka, S. Takahashi [et al.] // Journal of Radiation Research. – 2000. – V. 41. – № 3. – P. 303-311.
46. Carbon ions induce autophagy effectively through stimulating the unfolded protein response and subsequent inhibiting Akt phosphorylation in tumor cells / X. Jin, F. Li, X. Zheng [et al.] // Scientific Reports. – 2015. – V. 5. – № 1. – Article: 13815.
47. Jones, A. Practical skills in biology / A. Jones, R. Reed, J. Weyers. – 7th ed. – Harlow: Pearson, 2022. – P. 331.
48. Jortner, B. S. The return of the dark neuron. A histological artifact complicating contemporary neurotoxicologic evaluation / B. S. Jortner // Neurotoxicology. – 2006. – V. 27. – № 4. – P. 628-634.

49. Kherani, Z. S. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex / Z. S. Kherani, R. N. Auer // *Acta Neuropathologica*. – 2008. – V. 116. – № 4. – P. 447-452.
50. Late effects of 1H irradiation on hippocampal physiology / F. Kiffer, A. K. Howe, H. Carr [et al.] // *Life sciences in space research*. – 2018. – V. 17. – P. 51-62.
51. Kiffer, F. Behavioral effects of space radiation: A comprehensive review of animal studies / F. Kiffer, M. Boerma, A. Allen // *Life Sciences in Space Research*. – 2019. – V. 21. – P. 1-21.
52. Contribution of High Charge and Energy (HZE) Ions During Solar-Particle Event of September 29, 1989 / M. H. Y. Kim, J. W. Wilson, F. A. Cucinotta [et al.] // *Report of NASA Johnson Space Center*. – 1999. – P. 1-14.
53. King, G. L. 5-HT₃ receptor antagonists ameliorate emesis in the ferret evoked by neutron or proton radiation / G. L. King, B. M. Rabin, J. K. Weatherspoon // *Aviation, space, and environmental medicine*. – 1999. – V. 70. – № 5. – P. 485-492.
54. The Bragg peak of a proton beam in intracranial therapy of tumors / R. N. Kjellberg, W. H. Sweet, W. M. Preston, A. M. Koehler // *Transactions of the American Neurological Association*. – 1962. – V. 87. – P. 216-218.
55. Klimanov, V. A. Proton Radiotherapy: Current Status and Future Prospects. Part 1. Physical and Technical Aspects / V. A. Klimanov, J. J. Galjautdinova, M. V. Zabelin // *Journal of oncology: diagnostic radiology and radiotherapy*. – 2018. – V. 1. – № 4. – P. 14-33.
56. Kokhan, V. S. Some Aspects of the Effect of Combined Irradiation by Gamma-Rays and Carbon Nuclei (¹²C) on the Serotonergic System in Rat Brain / V. S. Kokhan // *Journal of Biomedicine*. – 2020. – V. 16. – № 3. – P. 68-72.
57. Ionizing radiation as preconditioning against transient cerebral ischemia in rats / N. Kokošová, V. Danielisová, B. Smajda, J. Burda // *General physiology and biophysics*. – 2014. – V. 33. – № 4. – P. 403-410.

58. The effect of ionizing radiation on lipid metabolism in lymphoid cells / I. K. Kolomiytseva, E. G. Novoselova, T. P. Kulagina, A. M. Kuzin // International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine. – 1987. – V. 51. – № 1. – P. 53-58.
59. Effects of high-LET neon (20Ne) particle radiation on the brain, eyes and other head structures of the pocket mouse: a histological study / L. M. Kraft, M. A. Kelly, J. E. Johnson [et al.] // International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine. – 1979. – V. 35. – № 1. – P. 33-61.
60. Radiation Necrosis in Pediatric Patients with Brain Tumors Treated with Proton Radiotherapy / S. F. Kralik, C. Y. Ho, W. Finke [et al.] // American Journal of Neuroradiology. – 2015. – V. 36. – № 8. – P. 1572-1578.
61. Female mice are protected from space radiation-induced maladaptive responses // K. Krukowski, K. Grue, E. S. Frias [et al.] // Brain, behavior, and immunity. – 2018. – V. 74. – P. 106-120.
62. The high-energy proton beam as a neurosurgical tool / B. Larsson, L. Leksell, B. Rexed [et al.] // Nature. – 1958. – V. 182. – № 4644. – P. 1222-1223.
63. Effect of high energy protons on the spinal cord / B. Larsson, L. Leksell, B. Rexed, P. Sourander // Acta radiologica. – 1959. – V. 51. – № 1. – P. 52-64.
64. Neurophysiology of space travel: energetic solar particles cause cell type-specific plasticity of neurotransmission / S. H. Lee, B. Dudok, V. K. Parihar [et al.] // Brain structure & function. – 2017. – V. 222. – № 5. – P. 2345-2357.
65. Response of rat spinal cord to single and fractionated doses of accelerated heavy ions / J. T. Leith, M. McDonald, P. Powers-Risius [et al.] // Radiation research. – 1982. – V. 89. – № 1. – P. 176-193.
66. Lesions in the depth of the brain produced by a beam of high energy protons / L. Leksell, B. Larsson, B. Andersson [et al.] // Acta radiologica. – 1960. – V. 54. – P. 251-264.

67. Lever, C. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation / C. Lever, S. Burton, J. O'Keefe // *Reviews in the neurosciences*. – 2006. – V. 17. – № 1-2. – P. 111-133.
68. Mitochondrial-targeted human catalase affords neuroprotection from proton irradiation / A. C. Liao, B. M. Craver, B. P. Tseng [et al.] // *Radiation research*. – 2013. – V. 180. – № 1. – P. 1-6.
69. Production of Laminar Lesions in the Cerebral Cortex by Heavy Ionizing Particles / L. I. Malis, R. Loevinger, L. Kruger, J. E. Rose // *Science*. – 1957. – V. 126. – № 3268. – P. 302-303.
70. Mantz, J. M. Method for the quantitative examination of the bone marrow of white rats / J. M. Mantz // *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*. – 1957. – V. 151. – № 11. – P. 1957-1960.
71. Cranial irradiation significantly reduces beta amyloid plaques in the brain and improves cognition in a murine model of Alzheimer's Disease / B. Marples, M. McGee, S. Callan [et al.] // *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. – 2016. – V. 118. – № 1. – P. 43-51.
72. Radiation-induced alterations in synaptic neurotransmission of dentate granule cells depend on the dose and species of charged particles / V. N. Marty, R. Vlkolinsky, N. Minassian [et al.] // *Radiation research*. – 2014. – V. 182. – № 6. – P. 653-665.
73. Mewaldt, R. A. Galactic cosmic ray composition and energy spectra / R. A. Mewaldt // *Advances in Space Research*. – 1994. – V. 14. – № 10. – P. 737-747.
74. Nelson, L. C. Risk of Acute and Late Central Nervous System Effects from Radiation Exposure / L. C. Nelson, L. Simonsen, J. L. Huff // *Houston: NASA's Evidence Report*. – 2016. – 68 p.

75. Effects of carbon ions on primary cultures of mouse brain cells / K. Nojima, K. Ando, H. Fujiwara, S. Ando // *Advances in Space Research.* – 2000. – V. 25. – № 10. – P. 2051-2056.
76. Relating Linear Energy Transfer to the Formation and Resolution of DNA Repair Foci After Irradiation with Equal Doses of X-ray Photons, Plateau, or Bragg-Peak Protons / S. Oeck, K. Szymonowicz, G. Wiel [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2018. – V. 19. – № 12. – P. 3779.
77. Persistent changes in neuronal structure and synaptic plasticity caused by proton irradiation / V. K. Parihar, J. Pasha, K. K. Tran [et al.] // *Brain structure & function.* – 2015. – V. 220. – № 2. – P. 1161-1171.
78. Targeted overexpression of mitochondrial catalase prevents radiation-induced cognitive dysfunction / V. K. Parihar, B. D. Allen, K. K. Tran [et al.] // *Antioxidants & redox signaling.* – 2015. – V. 22. – № 1. – P. 78-91.
79. Long-Term Deficits in Behavior Performances Caused by Low- and High-Linear Energy Transfer Radiation / R. Patel, H. Arakawa, T. Radivoyevitch [et al.] // *Radiation research.* – 2017. – V. 188. – № 6. – P. 672-680.
80. Behavioral consequences of radiation exposure to simulated space radiation in the C57BL/6 mouse: open field, rotorod, and acoustic startle / M. J. Pecaut, P. Haerich, C. N. Zuccarelli [et al.] // *Cognitive, affective & behavioral neuroscience.* – 2002. – V. 2. – № 4. – P. 329-340.
81. Poirier, J. L. Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus / J. L. Poirier, R. Čapek, Y. De Koninck // *Neuroscience.* – 2000. – V. 97. – № 1. – P. 59-68.
82. Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the Gaps? / P. G. Prasanna, H. B. Stone, R. S. Wong [et al.] // *Translational cancer research.* – 2012. – V. 1. – № 1. – P. 35-48.

83. Effects of proton and combined proton and ^{56}Fe Radiation on the Hippocampus / J. Raber, A. R. Allen, S. Sharma [et al.] // Radiation research. – 2016. – V. 185. – № 1. – P. 20-30.
84. 28 Silicon Irradiation Impairs Contextual Fear Memory in B6D2F1 Mice / J. Raber, T. Marzulla, B. Stewart [et al.] // Radiation research. – 2015. – V. 183. – № 6. – P. 708-712.
85. Effects of exposure to ^{56}Fe particles or protons on fixed-ratio operant responding in rats / B. M. Rabin, L. L. Buhler, J. A. Joseph [et al.] // Journal of radiation research. – 2002. – V. 43. – Suppl. – P. S225-S228.
86. Lack of reliability in the disruption of cognitive performance following exposure to protons / B. M. Rabin, N. A. Heroux, B. Shukitt-Hale [et al.] // Radiation and environmental biophysics. – 2015. – V. 54. – № 3. – P. 285-295.
87. Relationship between linear energy transfer and behavioral toxicity in rats following exposure to protons and heavy particles / B. M. Rabin, W. A. Hunt, J. A. Joseph [et al.] // Radiation research. – 1991. – V. 128. – № 2. – P. 216-221.
88. Effect of High Energy Protons on the Brain of the Rabbit / B. Rexed, W. Mair, P. Sourander [et al.] // Acta radiologica. – 1960. – V. 53. – № 4. – P. 289-299.
89. Testing experience and environmental enrichment potentiated open-field habituation and grooming behaviour in rats / M. Rojas-Carvajal, J. Fornaguera, A. Mora-Gallegos, J. C. Brenes // Animal Behaviour. – 2018. – V. 137. – P. 225-235.
90. Hippocampal neurogenesis and neuroinflammation after cranial irradiation with (^{56}Fe) particles / R. Rola, K. Fishman, J. Baure [et al.] // Radiation Research. – 2008. – V. 169. – № 6. – P. 626-632.
91. High-LET Radiation Induces Inflammation and Persistent Changes in Markers of Hippocampal Neurogenesis / R. Rola, V. Sarkissian, A. Obenaus [et al.] // Radiation Research. – 2005. – V. 164. – P. 556-560.

92. Low-dose proton radiation effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease – implications for space travel / E. Rudobek, J. A. Bellone, A. Szücs [et al.] // PLoS One. – 2017. – V. 12. – № 11. – Article: e0186168.
93. Saito, S. Prenatal Irradiation-Induced Hippocampal Abnormalities in Rats Evaluated Using Manganese-Enhanced MRI / S. Saito, K. Sawada, I. Aoki // Frontiers in neural circuits. – 2018. – V. 12. – P. 112.
94. Differential effects of diazepam and MPEP on habituation and neuro-behavioural processes in inbred mice / A. R. Salomons, N. E. Pinzon, H. Boleij [et al.] // Behavioral and brain functions. – 2012. – V. 8. – P. 30.
95. Schmued, L. C. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration / L. C. Schmued, C. Albertson, W. Slikker // Brain Research. – 1997. – V. 751. – № 1. – P. 37-46.
96. Shapiro, S. S. Analysis of variance test for normality (complete samples) / S. S. Shapiro, M. B. Wilk // Biometrika. – 1965. – V. 52. – № 3/4. – P. 591-611.
97. Shoji, H. Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age / H. Shoji, K. Takao, S. Hattori, T. Miyakawa // Molecular brain. – 2016. – V. 9. – P. 11.
98. The effect of high-energy protons in the Bragg Peak on the behavior of rats and the exchange of monoamines in some brain structures / A. S. Shtemberg, V. S. Kokhan, V. S. Kudrin [et al.] // Neurochemical Journal. – 2015. – V. 9. – № 1. – P. 66-72.
99. The effects of proton exposure on neurochemistry and behavior / B. Shukitt-Hale, A. Szprengiel, J. Pluhar [et al.] // Advances in space research: the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR). – 2004. – V. 33. – № 8. – P. 1334-1339.
100. Simmons, P. Fractionated Proton Irradiation Does Not Impair Hippocampal-Dependent Short-Term or Spatial Memory in Female Mice / P. Simmons, C. Corley, A. R. Allen // Toxics. – 2022. – V. 10. – P. 507.

101. Proton radiation alters intrinsic and synaptic properties of ca1 pyramidal neurons of the mouse hippocampus / I. V. Sokolova, C. J. Schneider, M. Bezaire [et al.] // Radiation Research. – 2015. – V. 183. – № 2. – P. 208-218.
102. Spowart-Manning, L. The T-maze continuous alternation task for assessing the effects of putative cognition enhancers in the mouse / L. Spowart-Manning, F. J. van der Staay // Behavioural brain research. – 2004. – V. 151. – № 1-2. – P. 37-46.
103. Steimer, T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues / T. Steimer // Dialogues in clinical neuroscience. – 2011. – V. 13. – № 4. – P. 495-506.
104. Central nervous system effects of whole-body proton irradiation / T. B. Sweet, N. Panda, A. M. Hein [et al.] // Radiation Research. – 2014. – V. 182. – № 1. – P. 18-34.
105. The early effects in the brain after irradiation with carbon ions using mice / N. Takai, S. Nakamura, Y. Ohba [et al.] // Report NIRS-M-244. – Chiba (Japan): National Institute of Radiological Sciences, 2011. – P. 45-46.
106. Early Effects of Cranial Irradiation by High Energy Protons on Visuomotor behavior in Nonhuman Primates / L. V. Tereshchenko, I. D. Shamsiev, M. A. Kadochnikova [et al.] // Biophysics. – 2022. – V. 67. – № 2. – P. 257-264.
107. Tinganelli, W. Carbon Ion Radiobiology / W. Tinganelli, M. Durante // Cancers. – 2020. – V. 12. – № 10. – Article: 3022.
108. Radiation Hypophysectomy with High-Energy Proton Beams: Report 3035 / C. A. Tobias, J. E. Roberts, J. H. Lawrence [et al.]. – Berkeley: University of California Radiation Laboratory, 1955. – 50 p.
109. Mouse retinal adaptive response to proton irradiation: Correlation with DNA repair and photoreceptor cell death / V. A. Tronov, Yu. V. Vinogradova, V. A. Poplinskaya [et al.] // Physics of Particles and Nuclei Letters. – 2015. – V. 12. – № 1. – P. 173-183.

110. Vitti, E. T. The Radiobiological Effects of Proton Beam Therapy: Impact on DNA Damage and Repair / E. T. Vitti, J. L. Parsons // *Cancers*. – 2019. – V. 11. – № 7. – P. 946.
111. Patterns of protein expression in human head and neck cancer cell lines differ after proton vs photon radiotherapy / L. Wang, L. Yang, S. Han [et al.] // *Head & neck*. – 2020. – V. 42. – № 2. – P. 289-301.
112. Whole brain proton irradiation in adult Sprague Dawley rats produces dose dependent and non-dependent cognitive, behavioral, and dopaminergic effects / M. T. Williams, C. Sugimoto, S. L. Regan // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10. – Article: 21584.
113. Ionized Radiation-Mediated Retinoid Oxidation in the Retina and Retinal Pigment Epithelium of the Murine Eye / M. A. Yakovleva, T. B. Feldman, K. N. Lyakhova [et al.] // *Radiation Research*. – 2022. – V. 197. – № 3. – P. 270-279.
114. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury / L. Yang, J. Yang, G. Li [et al.] // *Molecular neurobiology*. – 2016. – V. 54. – № 2. – P. 1022-1032.
115. Proton radiation therapy: clinical application opportunities and research prospects / M. V. Zabelin, V. A. Klimanov, J. J. Galyautdinova [et al.] // *Research and Practical Medicine Journal*. – 2018. – V. 5. – № 1. – P. 82-95.
116. Whole-Body ^{12}C Irradiation Transiently Decreases Mouse Hippocampal Dentate Gyrus Proliferation and Immature Neuron Number, but Does Not Change New Neuron Survival Rate / G. Zanni, H. M. Deutsch, P. D. Rivera [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – V. 19. – № 10. – Article: 3078.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает особую благодарность за огромную помощь и поддержку Иванову Александру Александровичу и Красавину Евгению Александровичу!

А так же своему научному руководителю Лобачевскому Павлу Николаевичу и всем коллегам, принявшим участие в подготовке диссертационной работы и проведении экспериментов. А именно: Тимошенко Геннадия Николаевичу, Гаевскому Виктору Николаевичу, Молоканову Александру Григорьевичу, Буденной Наталье Николаевне, Лалковичевой Марии, Утиной Дине Михайловне, Колесниковой Инне Александровне, Голиковой Кристине Николаевне, Островскому Михаилу Аркадьевичу, Фельдман Татьяне Борисовне, Штембергу Андрею Сергеевичу, Бугаю Александру Николаевичу, Ермолаевой Марии Евгеньевне, Комарову Денису Александровичу, Бычковой Таисии Михайловне!

Автор так же выражает большую признательность председателю и членам диссертационного совета за возможность предоставления работы! И своей семье за опору и веру в лучшее!