

Северюхин Юрий Сергеевич

Нейрорадиобиологические эффекты ускоренных заряженных частиц

1.5.1. Радиобиология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Дубна - 2023

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В соответствии с современной концепцией оценки рисков 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 галактических космических лучей [Красавин, 2005; Григорьев и др., 2017]. 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 [Григорьев и др., 2017]. 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 [Nelson et al., 2016] доза от ускоренных протонов может составлять 50 – 60 % от общей дозы галактического космического излучения (ГКИ). Большую опасность протоны высоких энергий несут и для членов экипажа, в программе полета для которых предусмотрена внекорабельная деятельность (ВКД). 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 [Barratt et al., 2008]. Все описанные выше риски делают чрезвычайно актуальным исследование, направленные на изучение патогенеза в различных тканях организма после воздействия заряженных частиц. При этом большое внимание необходимо уделить исследованиям воздействия ускоренных ядер на центральную нервную систему (ЦНС) и зрительный анализатор. Это объясняется тем, что нарушение работы этих важных систем организма космонавта после радиационного воздействия, может поставить под угрозу не только выполнение полетной миссии, но жизнь и здоровье всех членов экипажа.

Исследование структурно-функциональных изменений в головном мозге и зрительной системе после воздействия протонов имеет большое значение и для развития радиационной медицины. На данный момент, применение протонной лучевой терапии для лечения

опухолевых новообразований является наиболее перспективным направлением в радиационной онкологии [Забелин и др., 2018]. Несмотря на современные технические достижения и постоянное совершенствование методов лечения, при подобного рода воздействиях нормальные ткани непременно оказываются в области радиационных полей [Prasanna et al., 2012]. Важной проблемой онкорadiологии является недостаток эмпирических данных по специфике и тяжести поражений нормальных тканей [Климанов и др., 2007]. Исследования в этой области необходимы для составления оптимального плана адронной терапии небольших глубокозалегающих опухолей головного мозга, прогнозе острых и отдаленных эффектов в ЦНС. Риски облучения нервной ткани характеризуются как достаточно компактным пространственным расположением и сравнительно небольшим размером многих структур головного мозга (гиппокампальная формация, мозжечок, базальные ядра, эндокринные железы ЦНС) и зрительного анализатора, так и набором целого ряда важных функций, которые они выполняют. 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 [Григорьев, 1982]. К поведенческим нарушениям после облучения могут приводить и дисфункциональные изменения периферических эндокринных желез, наблюдаемые в отдаленные сроки после облучения [Воронцова, 2014].

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. Не более 10% исследований проходят на самках млекопитающих [Kiffer et al., 2019]. В то время как, недавние исследования указывают на четкие различия в реализации радиационно-индуцированных изменений в ЦНС у особей различного пола [Krukowski et al., 2018]. Важно отметить, что и возраст животных оказывает непосредственное влияние на многие показатели поведенческих результатов [Shoji et al., 2016]. Радиационно-индуцированные патофизиологические реакции в тканях ЦНС описаны в статье [Yang et al., 2017]. Данные нарушения включают в себя нейровоспаление, эпигенетические нарушения, индукцию апоптоза, 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. 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 [Федоренко, 2006; Kiffer et al., 2018; Григорьев Ю. Г., 1982], отмечены и более ранние биохимические и поведенческие нарушения [Штемберг и др., 2013; Штемберг и др., 2017]. Однако не так много данных получено на экспериментальных моделях в среднесрочной перспективе (1-3 месяца). Тем не менее, некоторые исследователи вообще не выявили нарушений памяти и изменений в протеоме мозга самок мышей после фракционного тотального облучения протонами [Simmons et al., 2022]. А иногда авторы наблюдают и прокогнитивный эффект [Kokhan et al., 2020].

Таким образом, исследование функциональных и морфологических изменений в центральной нервной системе и нарушений зрительных реакций у крыс после протонного облучения и воздействия ионов ^{12}C в среднесрочной перспективе имеет важное теоретическое и прикладное значение.

Цель и задачи

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

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 различной энергией. 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.

Методология и методы исследования

Для успешной реализации цели настоящего исследования использовалась современная методология, позволившая адекватно подойти к выполнению научных задач исследования. Ниже описываются основные методологические подходы и методы, которые нашли применение в рамках настоящего диссертационного исследования.

Лабораторные животные. В качестве животных моделей были выбраны крысы Sprague Dawley обоего пола. Крысы SD являются оптимальной моделью для нейробиологических исследований, в отличие от мышей [Ellenbroek B., 2016]. Питомник «Пушино» (ФИБХ РАН), из которого поступили животные, прошел аккредитацию Международной ассоциации по аттестации и аккредитации содержания лабораторных животных AAALAC.

Условия облучения. Сеансы облучения проходили на базе Объединенного института ядерных исследований (г. Дубна) на экспериментальных установках Фазотрон и Нуклотрон и ротационно-конвергентной гамма-терапевтической установке №104 (РОКУС М. Изготовлена 30.11.84). Гамма-установка соответствовала техническим условиям 1.790.001 ТУ и признана годной для эксплуатации. Источник ^{60}Co имеет сертификат-разрешение на радиоактивный материал RU/5151/S и соответствует требованиям действующих стандартов, технических условий и договоров. Ионно-пучковая дозиметрия основана на рекомендациях Международного агентства по атомной энергии [МАГАТЭ, Вена, 2004] и проведена с использованием сертифицированных клинических дозиметров.

Анализ поведенческих реакций в тест-системах. Используемые в экспериментах тест системы входят в перечень установок для выполнения психофармакологических тестов согласно приказу Минздрава России N 281 от 30.04.2013, одобрены руководством по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях [Н.Н.Каркищенко, 2010], Пособием *The Laboratory Rat (Third Edition) American College of Laboratory Animal Medicine 2020, Pages 215-242 (Analysis of Behavior in Laboratory Rats)*.

Гистологическое исследование. Эвтаназия, секция и забор органов для гистологического исследования был выполнен в соответствии со стандартными процедурами, описанными в Руководстве по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях [Н.Н.Каркищенко, 2010] и RITA (Registry of Industrial Toxicology Animal data). Для фиксации, дегидратации, пропитки парафином, нарезки и окрашивания применялись стандартные гистологические техники, описанные в *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (2015)*. Анализ изображений был произведен с использованием бесплатной программы ImageJ, которая применяется в широком спектре биомедицинских исследований по всему миру.

Статистический анализ. Статистическая обработка данных выполнялась с использованием рекомендаций Introduction to Statistical Methods in Pathology [Momeni, 2018]. Для оценки полученных данных на нормальность использовался тест Шапиро-Вилка [Shapiro et al., 1965]. Анализ полученных различий между показателями проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с попарным сравнением значений с критерием Манна-Уитни и Данна [Howell, 2002]. Для сравнения показателей чередования в Т-лабиринте использовали критерий Хи-квадрат. Статистический анализ проводили в программе PAST [Hammer et al., 2001] и OriginPro. Корреляционный анализ был проведен в программе Jamovi с использованием расчета коэффициента корреляции r-Пирсона. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

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 среднесрочной перспективе;
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.

Степень достоверности и апробация результатов

Выводы по результатам диссертационной работы основаны на достоверных результатах, полученных при использовании адекватных моделей. Достоверность результатов экспериментов обусловлена достаточным количеством наблюдений и использованием современных аналитических методов исследования. Статистическая обработка результатов

проводилась с использованием общепринятых методов анализа данных. Интерпретация результатов проводилась на основе анализа данных мировой научной литературы по соответствующей тематике.

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).

Публикации и личный вклад автора

По теме диссертации опубликовано 5 печатные работы в рецензируемых российских и иностранных изданиях, входящий в перечень ВАК Минобрнауки РФ. 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.

Связь работы с научными программами

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

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Лабораторные животные

В экспериментах было использовано 69 аутбредных крыс различного пола Sprague Dawley возрастом 8 – 15 недель приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино». Разделение животных на группы было произведено до облучения методом рандомизации по массе тела. В ходе всего периода содержания животные имели неограниченный доступ к воде и пище. Крысы контрольной группы подвергались тем же процедурам (транспортировка, помещение в контейнеры, стресс), что и животные экспериментальной группы, за исключением самого облучения. Общая схема проведенных исследований представлена в Таблице 1.

Таблица 1 - Общая схема проведенных исследований.

Название эксперимента	Вид излучения	Метод воздействия	Доза, Гр	Линия животных	Пол	Сроки исследования
Влияние краниального облучения протонами на зрительное поведение и оптомоторный ответ половозрелых крыс	Протоны	Локально	5	Крысы SD	самцы	30 и 90 сутки
Анализ поведенческих реакций и морфологических изменений в головном мозге крыс после воздействия протонов различных энергий	Гамма, протоны	Локально и тотально	1	Крысы SD	самки	30 сутки
Морфологические изменения клеток Пуркинье коры мозжечка крыс после облучения ионами углерода ^{12}C	Гамма, Ионы углерода	Тотально	1	Крысы SD	самцы	30 и 90 сутки

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].

Условия облучения

Облучение животных проводили в соответствии с условиями, описанными в Таблице 2.

Таблица 2 - Условия облучения.

Группа	Метод воздействия	Доза, Гр	Мощность Дозы, Гр/мин	Поток, частиц/см ²	ЛПЭ, кэВ/мкм
Контроль	-	-	-	-	-
Гамма ⁶⁰ Со (РИП=75 см)	тотальное	1	0,9	-	0,2
Протоны 170 МэВ	тотальное	1	0,7	1,16*10 ⁹	0,5
Протоны 170 МэВ	локальное	5	1	1,27*10 ⁹	0,5
Протоны 70 МэВ	локальное	1	1,2	1,04*10 ⁹	0,97
Ионы ¹² С 500 МэВ/нуклон	тотальное	1	0,03	6,1*10 ⁷	10,6

Непосредственно перед облучением, крысы помещались в прозрачные фиксирующие контейнеры из полиметилметакрилата длиной 160 мм. Облучение в пике Брэгга проводилось при наличии дополнительного водозквивалентного замедлителя 120 мм в кранио-каудальном расположении. Глубинное дозовое распределение протонного пучка в водозквивалентном материале показано на Рисунке 1.

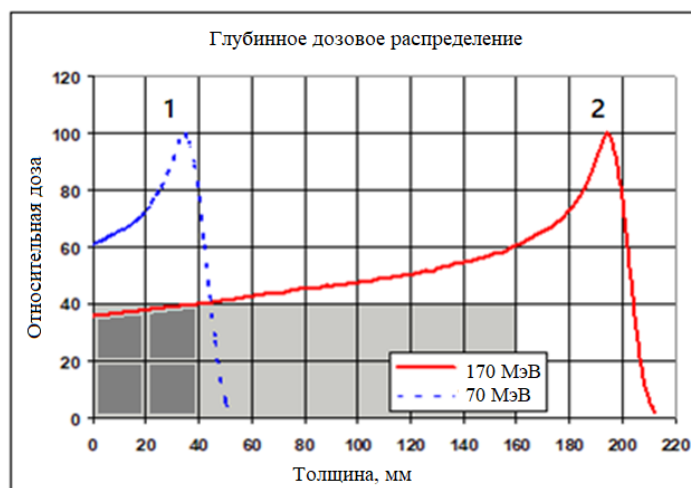


Рисунок 1 - Глубинное дозовое распределение протонного пучка в водозквивалентном материале (светло серым цветом отмечена длина контейнера с крысой, темно серым – позиция головы крысы). 1 – с замедлителем, 2 – без замедлителя.

Дозиметрическую калибровку проводили клиническим дозиметром PTW UNIDOS-E с ионизационной камерой ТМ30013. При облучении ионами углерода измерение поглощенной дозы выполнялось с помощью воздушной ионизационной камеры с размером чувствительной области $4,2 \times 4,2$ см². Ионизационная камера градуировалась для измерения потока частиц с помощью активационных детекторов или сцинтилляционных счетчиков.

Исследование поведенческих реакций

Перед проведением поведенческих тестов животные помещались в процедурную комнату для предварительной адаптации за 2 часа до начала тестирования. Регистрацию поведения животных проводили при уровне освещенности 200 и 400 люкс. Анализ трекинга проводили в программе Noldus Ethovision XT 13, так же был произведен неавтоматизированный подсчет поведенческих актов и оптомоторных реакций.

Оценка зрительных реакций и оптомоторного ответа

Для оценки зрительных реакций у грызунов проводили измерение параметров оптомоторной реакции с использованием модифицированных протоколов Prusky (2004) и You (2017). Данный метод основан на отслеживании движений головы животного при предъявлении визуального стимула с различным уровнем контраста. В ходе процедур 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. Изменение коэффициента контраста визуального стимула проводили при помощи программного обеспечения Gamma Panel 1.0.0. 20. В ходе эксперимента проходила регистрация пройденной дистанции и времени нахождения головы животного в «Поле обзора», частота прохождения границы зоны, а так же неавтоматизированный подсчет поворотов головы. Схема установки для тестирования зрительного поведения крыс представлена на **Рисунке 2**. Значение параметра оптомоторного ответа получали путем расчета отношения корректных (слева направо) поворотов головы животного к некорректным (справа налево).

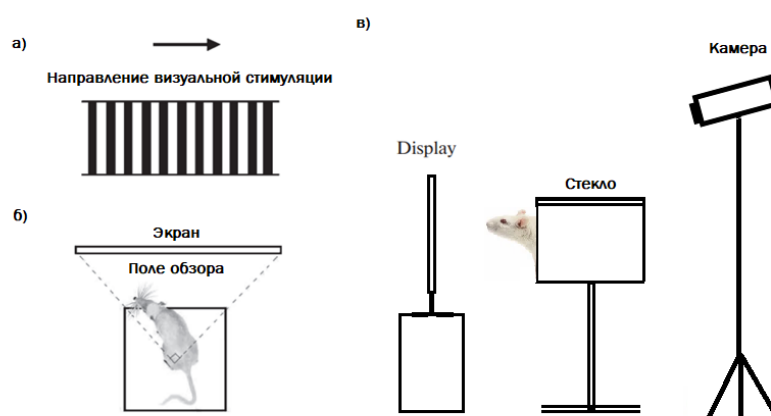


Рисунок 2 - Схема установки для тестирования зрительного поведения крыс: (а) – направление визуальной стимуляции, (б) – вид сверху, (в) – вид сбоку.

Тест спонтанного чередования в установке «Т-лабиринт»

Оценку стереотипного поведения в Т-лабиринте (TS0701-R, Установка «Т-лабиринт» для крыс, материал – не ламинированный поливинилхлорид, размер стартового рукава 50 x 16 см, размер боковых рукавов 50 x 10 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. Был проведен подсчет количества чередований, повторов в выборе рукава и отказов в прохождении лабиринта среди всех групп животных в соответствии с протоколом [Deacon et al., 2006].

Поведенческие реакции в установке «Открытое поле»

Наблюдение за различиями и динамикой ориентировочно-исследовательского поведения, 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 угашения поведенческих показателей. Наблюдение за каждой крысой в «Открытом поле» проходило в течении 6 минут. При анализе числа поведенческих элементов время тестирования было разделено на два этапа: первичный (3 минуты) и вторичный этап (с 3 до 6 минуты) в виду различий мотивационной природы поведения [Маркель, 1981]. При этом регистрировалось значение таких показателей, как количество пересеченных секторов, проходов животного через центр арены, погружения головы животного в отверстия, а так же число поднятий, замираний, актов груминга, дефекации и уринации.

Исследование морфологических изменений в ЦНС

После облучения и проведения поведенческих тестов животные были декапитированы на 30 и 90 сутки. Далее был произведен забор крови и органов для фиксации и исследования. Иммерсионная фиксация головного мозга была произведена в растворе Карнуа (60% этанола, 30% хлороформа и 10% уксусной кислоты). После обезвоживания и обезжиривания в этаноле восходящей концентрации и очистке в ксилоле правая доля головного мозга была отобрана для исследования и заключена в парафиновые блоки (Гистомикс, Биовитрум), а левая помещена в архив. Далее были приготовлены срезы головного мозга толщиной 10 и 6 мкм на ротационном микротоме Thermo Fisher Scientific HM 340E. Различий между средним значением глубины приготовленных срезов и средней массой органа у различных групп животных обнаружено не было.

Для изучения морфологических изменений в головном мозге применяли такие процедуры окрашивания препаратов, как: крезилвиолетом по методу Ниссля, Конго Красным и Fluoro Jade B. Микроскопическое исследование проводили на флуоресцентном микроскопе ЛОМО-Микмед 2 и световом Биоптик В-200. Съемка изображений была произведена камерой МС-10 (USB-3.0) 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 (в процентах) с различными видами изменений среди их общего количества в поле зрения. 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.

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 edition) (Jones, 2022) и протоколом пробоподготовки Mantz [Mantz, 1957]. Анализ числа лейкоцитов в периферической крови проводили с использованием камеры Горяева.

Статистический анализ

Для проверки полученных данных на нормальность использовался тест Шапиро-Вилка [Shapiro et al., 1965]. Анализ полученных различий между показателями проводили с применением двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с попарным сравнением значений с критерием Манна-Уитни и Данна [Howell et al., 2002]. Для сравнения показателей чередования в Т-лабиринте использовали критерий Хи-квадрат. Статистический анализ проводили в программе PAST [Hammer et al., 2001] и Origin Pro 2021. Корреляционный анализ был проведен в программе Jamovi с использованием расчета коэффициента корреляции г-Пирсона. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние краниального облучения протонами на зрительное поведение и оптомоторный ответ крыс

На 30-е и 90-е сутки после краниального облучения протонами в дозе 5 Гр не было выявлено различий в реализации оптомоторного рефлекса между контрольной и облученной группами животных. 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 поле обзора при

использовании зрительной стимуляции с низким коэффициентом контраста ($k = 0,5$) (Рисунок 3).

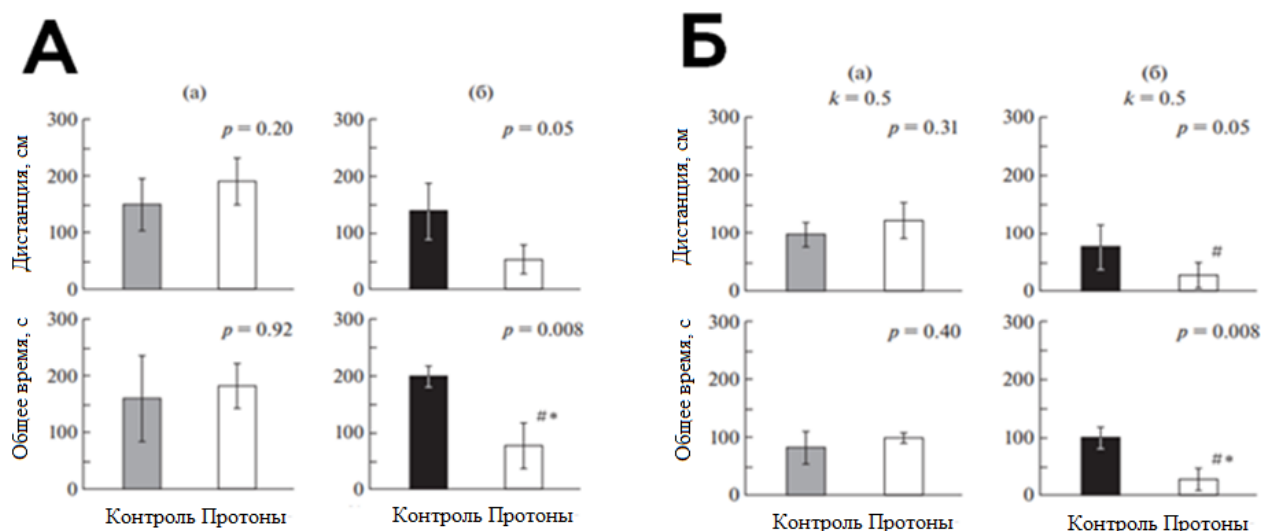


Рисунок 3 - Среднее значение параметров зрительного поведения (общая пройденная дистанция в «Поле обзора», общее время пребывания) за все время тестирования (А) и при низком значении контраста визуального стимула ($k = 0,5$) (Б): (а) – 30-е сутки после облучения, (б) – 90-е сутки после облучения. (#*) - Данные статистически значимые при $p < 0,05$.

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

Поведенческие реакции. Т-лабиринт

При анализе поведенческих реакций в Т-лабиринте при протонном и гамма-излучении были выявлены следующие различия: воздействие ИИ вне зависимости от вида излучения и энергии частиц привело к увеличению актов повторного захода в лабиринт в тесте спонтанного чередования. Данные изменения сопровождаются снижением общей мотивации животных в прохождении Т-лабиринта.

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 в

сравнении со всеми другими экспериментальными группами в оба периода тестирования (Рисунок 4).

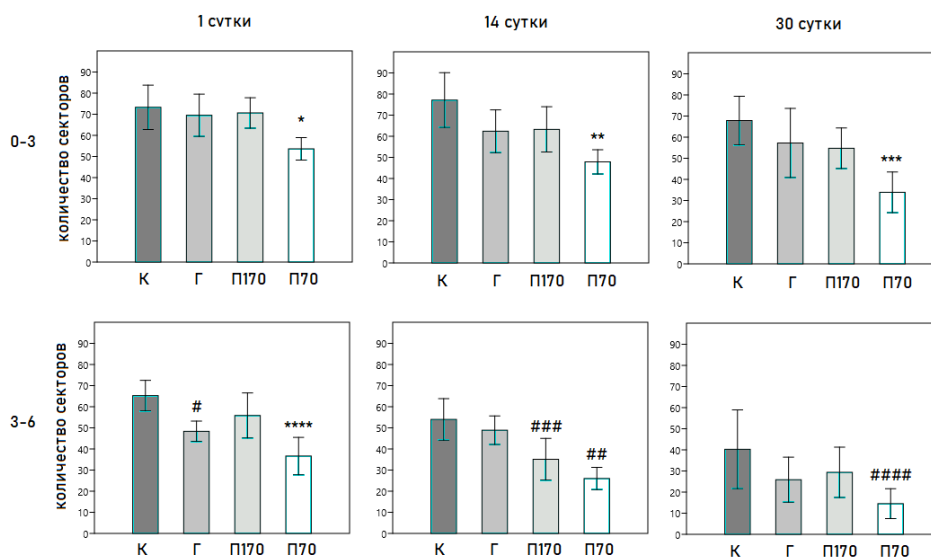


Рисунок 4 - Количество пройденных секторов Открытого поля в различные сроки после облучения. К – контроль, Г – гамма-облучение, П170 – облучение протонами с энергией 170 МэВ, П70 – облучение протонами с энергией 70 МэВ. Среднее значение ± 95% интервал. Различия статистически значимы: *- между группами 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 ($p=0,04$).

Угашение 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.

Снижение числа стоек (исследовательская активность) наблюдалось во всех группах облученных животных. Особенно ярко эти различия были выражены на 1 и 14 сутки после облучения. На 1 сутки после облучения отмечено существенное снижение проявлений норкового рефлекса в группах облученных животных. При анализе количества актов груминга и реакций замиранья отмечена неоднородность в динамике и отсутствие выраженной зависимости в данных поведенческих проявлениях при сравнении групп облученных животных. 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.

При облучении самцов крыс ионами углерода ^{12}C с энергией 500 МэВ/нуклон 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 (Рисунок 5). 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.

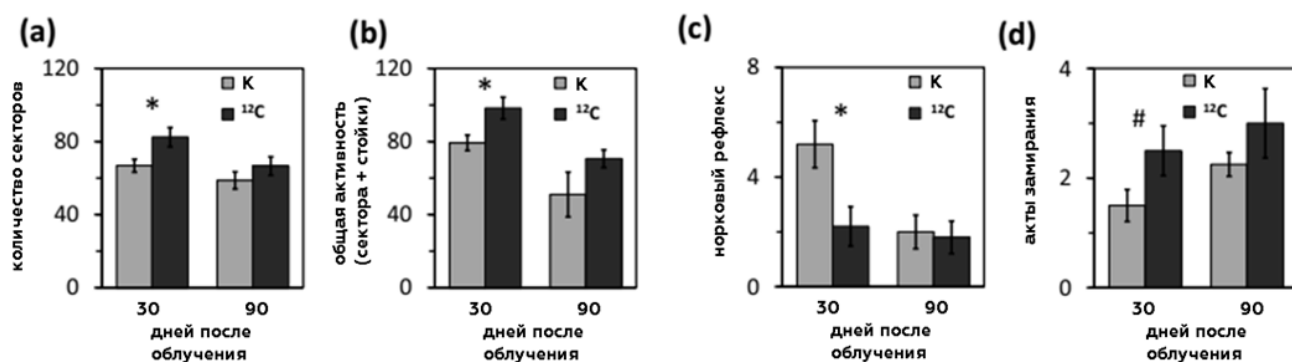


Рисунок 5 - Влияние тотального облучения ионами ^{12}C на поведенческие реакции крыс в установке «Открытое поле», количество пройденных секторов арены (а), общая активность (сектора + стойки на задних лапах) (b), норковый рефлекс (c), акты замирания (d). Среднее \pm Стандартная ошибка. (*) $p < 0,05$ и (#) $p < 0,1$.

Морфологическое исследование

Результаты анализа морфологических изменений в различных отделах головного мозга представлены в Таблицах 3,4. Применяются следующие обозначения: Относительное число нейронов без видимых изменений (1), нейронов с морфофункциональными и компенсаторно-

приспособительными изменениями (2) и клеток с дистрофическими нарушениями (3). При исследовании морфологических изменений в гранулярном слое зубчатой извилины не было выявлено статистически значимых различий между группами животных. В то же время в полиморфном хилусе гиппокампа наблюдается рост необратимых изменений нейронов (3) во всех группах облученных животных. Изменение данного показателя наблюдается на фоне увеличения числа нейронов с морфофункциональными и компенсаторно-приспособительными изменениями (2) в головном мозге животных, облученных протонами. Рост числа гиперхромных сморщенных нейронов и клеток, подверженных тотальному хроматолизу был отмечен в СА3 слое гиппокампа. В этом 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. Результаты анализа морфологических изменений Клеток Пуркинье в мозжечке крыс представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Морфологические изменения нейронов мозжечка (Клетки Пуркинье) на 30 сутки после облучения в дозе 1 Гр. Среднее значение \pm Стандартная ошибка. (*) $p < 0,05$.

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

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 в пике Брэгга. Значения относительного числа морфологических изменений в коре головного мозга крыс представлены в Таблице 4.

Таблица 4 - Морфологические изменения нейронов коры на 30 сутки после облучения в дозе 1 Гр. Среднее значение \pm Стандартная ошибка. (*) $p < 0,05$.

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*

Анализ полученных изображений коры показал значительное увеличение числа нейронов с обратимыми изменениями (2) в группе животных облученных в пике Брэгга. У животных данной группы так же наблюдается рост гиперхромных сморщенных нейронов и клеток теней (3) в виде очаговой дистрофии. При вычислении морфометрических параметров наблюдается увеличение размеров нейронов хилуса и клеток Пуркинье в группе облученных животных в пике Брэгга. При анализе размеров клеток коры, данные изменения наблюдаются в большей степени у животных, облученных тотально. При исследовании морфологических изменений в вентрикулярных областях головного мозга, были выявлены изменения в монослое эндимиоцитов 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 6 В).

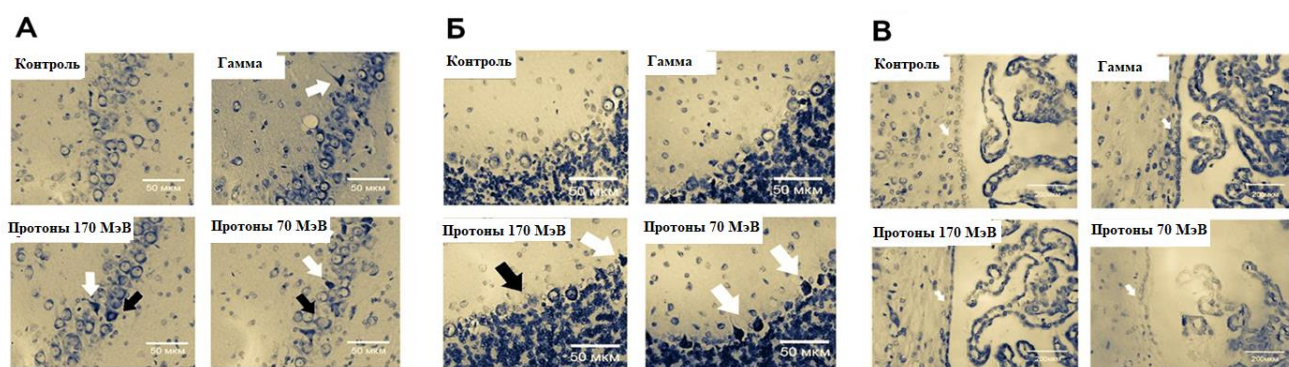


Рисунок 6 - Морфологические изменения в различных отделах головного мозга крыс: А - Обратимые и необратимые изменения в восходящем слое СА3 гиппокампа крыс; Б - клеток Пуркинье мозжечка (Увеличение X400); В - эпендимный слой четвертого желудочка (Увеличение X200). Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны. Черными стрелками обозначены морфофункциональные и компенсаторно-приспособительные морфологические изменения. Окраска – Крезилвиолет по Нисслю.

Наиболее значительные изменения при окрашивании Конго красным были выявлены в переднем мозге крыс. Воздействие гамма и протонным излучением привело к увеличению наблюдаемых амилоидных бляшек на 30 сутки после облучения (Рисунок 7).

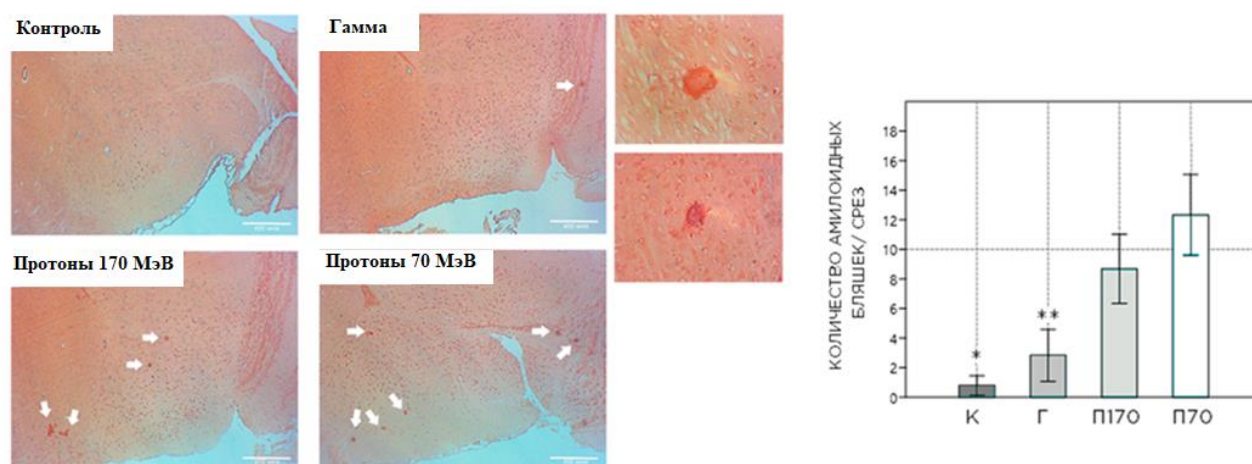


Рисунок 7 - Амилоидные бляшки в переднем мозге крыс через 30 дней после облучения (отмечены белыми стрелками). Основная зона локализации – передний мозг и обонятельные луковицы. Среднее значение \pm 95% интервал. (*, **) $p < 0,05$. Окраска – Конго Красный. Увеличение X100.

Эти различия могут свидетельствовать о развитии раннего амилоидогенеза у облученных животных.

В рамках диссертационной работы, так же был проведен корреляционный анализ данных морфологического и поведенческого исследования. 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. При анализе количества актов норкового рефлекса и вертикальных стоек не удалось обнаружить выраженной зависимости с морфологическими изменениями за исключением ранних изменений в СА3 слое гиппокампа.

Физиологические и гематологические показатели

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 снижения числа лейкоцитов в периферической крови.

Морфологические изменения клеток Пуркинье коры мозжечка крыс после облучения ионами углерода ^{12}C

Количество и динамика формирования структурных нарушений клеток Пуркинье после облучения ионами углерода ^{12}C и гамма-облучения имели существенные различия. На 30 сутки после облучения количество нейронов с дистрофическими изменениями (3) было достоверно больше в группах животных, подвергнутых действию ядер углерода ^{12}C по сравнению с группой гамма-облучения. 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 (2) могут свидетельствовать об интенсификации биологических процессов в коре мозжечка облученных животных (Таблица 5).

Таблица 5 - Морфологические изменения нейронов мозжечка (Клетки Пуркинье) на 30 и 90 сутки после облучения ионами углерода ^{12}C в дозе 1 Гр. Среднее значение \pm Стандартная ошибка. (*) $p < 0,05$.

Группа	30 сутки			90 сутки		
	Количество нейронов (%)			Количество нейронов (%)		
	1	2	3	1	2	3
Контроль	67,7 \pm 0,90*	28,13 \pm 1,01*	4,16 \pm 0,52*	75,47 \pm 0,24	20,07 \pm 0,46	4,46 \pm 0,37
Гамма	54,31 \pm 2,18	35,79 \pm 2,28	9,90 \pm 0,12*	71,00 \pm 0,99	24,05 \pm 1,01	4,95 \pm 0,24
Ионы ^{12}C	49,21 \pm 1,04	34,58 \pm 1,05	16,21 \pm 0,82	61,8 \pm 0,84*	30,28 \pm 0,53*	7,92 \pm 0,39*

Анализ полученных микропрепаратов на 90 сутки после облучения свидетельствует о том, что количество нейронов с дистрофическими изменениями статистически значимо больше в группе крыс, подверженных воздействию ионами ^{12}C по сравнению с γ -облучением и интактными животными. 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 (Рисунок 8). Все выявленные дистрофические нарушения наблюдаются на фоне повышения числа нейронов с обратимыми изменениями в группе животных, облученных ионами углерода.

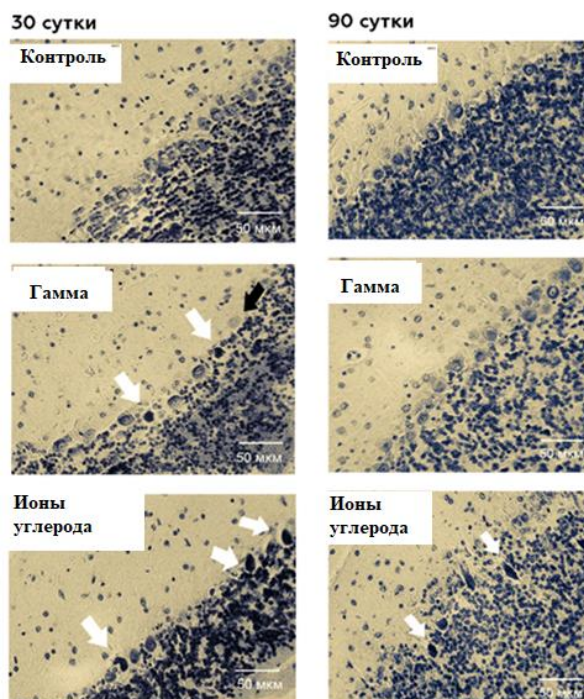


Рисунок 8 - Морфологические изменения клеток Пуркинье в коре мозжечка на 30 и 90 сутки после облучения ионами углерода ^{12}C . Белыми стрелками обозначены сморщенные гиперхромные нейроны, черной стрелкой – гипохромный нейрон. Окраска – Крезилвиолетом по Нислю. Увеличение X400.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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 том числе и данной работы. В представленном исследовании проведен анализ поведенческих реакций и морфологических изменений в ЦНС после воздействия заряженных частиц и гамма-излучения. Результаты работы указывают на то, что воздействие ускоренными ионами ^1H и ^{12}C приводит к изменению поведения животных и развитию ряда морфологических нарушений в тканях головного мозга крыс.

Неоднозначная корреляционная зависимость между морфологическими изменениями и поведением 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. Известно, 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 [Norwell et al., 2000]. 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.

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 коре, гиппокампе, мозжечке при воздействии заряженных частиц с различными физическими характеристиками.

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 выявленных 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. 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 и поведенческих альтераций, вызванных облучением.

ВЫВОДЫ

1. Тотальное и локальное воздействие ускоренными заряженными частицами водорода и углерода в дозах 1 и 5 Гр приводит к снижению исследовательского поведения, угашению адаптации к тест системе, изменению двигательной активности, нарушению внимания на зрительной стимуляции в период до 3 месяцев.
2. Воздействие ИИ вне зависимости от вида и пространственного распределения в дозе 1 Гр приводит к увеличению показателей стереотипного поведения и снижению мотивации у крыс на 30 сутки после обучения.
3. Морфологические изменения головного мозга после облучения протонами в пике Брэгга характеризуются ростом числа нейронов с аномальными тинкториальными свойствами в коре, мозжечке и СА3 слое гиппокампа, 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 с последующей элиминацией на 90 сутки и выраженным нарушением цитоархитектоники.
5. Радиобиологический эффект на 30 сутки после облучения протонами более выражен в группе животных с тотальным воздействием.
6. Морфофизиологический анализ нейробиологических эффектов после воздействия различных видов ИИ указывает на наличие зависимости между поведенческими нарушениями и патофизиологическими реакциями в ЦНС, которые имеют различную динамику формирования и степень выраженности в зависимости от физических характеристик излучения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Северюхин Ю.С. Морфологические изменения клеток Пуркинье коры мозжечка крыс после облучения ионами углерода ^{12}C / Ю.С. Северюхин, Н. Н. Буденная, Г. Н. Тимошенко, А. А. Иванов, Е. А. Красавин [Текст] // Авиакосмическая и экологическая медицина.-2017.-Том 51.- №1.-С. 46-50. (RSCI, Личное участие 90%)
2. Северюхин Ю.С. Влияние краниального облучения протонами 170 МэВ в дозе 5 Гр на зрительное поведение и оптомоторный ответ половозрелых крыс [Текст]/ Ю.С. Северюхин, Т.Б.Фельдман, М.А.Островский, А.Г. Молоканов // Радиационная биология и радиоэкология. - 2019.- Том 59.- №5.-С. 532-537. (RSCI, Личное участие 90%)
3. Severyukhin Y.S. Effects of Cranial Exposure to 170-MeV Proton Radiation at a Dose of 5 Gy on the Visual Behavior and Optomotor Response of Adults Rats [Текст]/ Y.S. Severyukhin, T.B. Feldman, M.A. Ostrovsky, A. G. Molokanov // Biology Bulletin.- 2019.-46.- P. 1605–1610. (Scopus, Личное участие 90%)
4. Severyukhin Y. S. Comparative Analysis of Behavioral Reactions and Morphological Changes in the Rat Brain After Exposure to Ionizing Radiation with Different Physical Characteristics [Текст] / Y. S. Severyukhin, M. Lalkovičová, D. M. Utina, K. N. Lyakhova, I. A. Kolesnikova, M. E. Ermolaeva, A. G. Molokanov, V. N. Gaevsky, D. A. Komarov, E. A. Krasavin // Cellular and molecular neurobiology. - 2022.- 43(1). - P. 339–353. (Scopus, Личное участие 80%)
5. Belov O.V. Exposure to (^{12}C) particles alters the normal dynamics of brain monoamine metabolism and behaviour in rats [Текст] / O.V. Belov, K.V. Belokopytova, A.S. Bazyan, V.S. Kudrin, V.B. Narkevich, A.A. Ivanov, Y.S. Severiukhin, G.N. Timoshenko, E.A. Krasavin // Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB).-2016.- 32(9).- P. 1088–1094. (Scopus, Личное участие 30%)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГКИ – галактическое космическое излучение

ВКД – внекорабельная деятельность

ЦНС – центральная нервная система

ИИ – ионизирующее излучение

ЛПЭ – линейная передача энергии

СА3 - hippocampal subfield