

На правах рукописи

ЛЕБЕДЕВА-ГЕОРГИЕВСКАЯ КСЕНИЯ БОРИСОВНА

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИЙ ЦНС МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ
ЖИВОТНЫХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ РАДИАЦИОННЫХ И
ГРАВИТАЦИОННЫХ ФАКТОРОВ**

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2019

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: **Штемберг Андрей Сергеевич**, доктор биологических наук, заведующий отделом космической радиобиологии и фармакологии ГНЦ РФ ИМБП РАН.

Официальные оппоненты: **Жаворонков Леонид Петрович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией радиопатологии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба.

Раевский Владимир Вячеславович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией нейроонтогенеза Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,

Защита диссертации состоится «___» _____ 201_ г. ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ - ИМБП РАН) по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ - ИМБП РАН и на сайте <http://www.imbp.ru/WebPages/win1251/Science/DisserSov/Lebedeva-Georgievskaya2019/Lebedeva-Georgievskaya.html>

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Самыми существенными факторами межпланетного космического полета можно назвать ионизирующие излучения и измененную гравитацию. Подобные воздействия могут оказывать серьезное негативное влияние на работу организма в целом и на деятельность центральной нервной системы (ЦНС) в частности. Существующая в настоящее время парадигма радиационного риска, разработанная для орбитальных полетов, ставит во главу угла возможные стохастические эффекты, вызванные влиянием преимущественно солнечных космических лучей (СКЛ), однако с выходом за пределы магнитосферы Земли риски негативного воздействия ионизирующих излучений (ИИ) существенно увеличиваются, главным образом за счет влияния на экипаж галактических космических лучей (ГКЛ), в состав которых входят тяжелые заряженные частицы (ТЗЧ), представляющие существенную опасность для ЦНС. Таким образом, возникает необходимость пересмотра концепции радиационного риска при планировании межпланетных полетов (Григорьев, Красавин, Островский, 2017).

Наземное моделирование невесомости на данный момент технически сложно осуществимо, однако остается возможность имитации некоторых ее эффектов, в частности таких, как перераспределение жидкостей в организме, гипокинезия и гиподинамия.

До настоящего времени исследований нейробиологических эффектов синхронного комбинированного воздействия радиационных и гравитационных факторов космического полета (ФКП) в мире не проводилось, хотя в условиях реальных миссий экипаж всегда находится под совокупным воздействием различных факторов, которые могут существенно модифицировать эффекты друг друга.

Цель работы: Целью данной работы является выявление нейробиологических эффектов воздействия разных видов ионизирующего

излучения и измененной гравитации, моделирующих факторы межпланетного полета, при их изолированном и синхронном комбинированном действии на молекулярные, нейрохимические и интегративные процессы в ЦНС мелких лабораторных животных.

Задачи исследования: 1. Изучение эффектов воздействия ИИ с различными значениями линейной передачи энергии (ЛПЭ) на поведение животных и нейрохимические процессы работы головного мозга крыс.

2. Изучение эффектов воздействия измененной гравитации на когнитивные функции и нейрохимические механизмы работы головного мозга в экспериментальных моделях на мышах и крысах.

3. Исследование нейробиологических (молекулярных, нейрохимических и интегративных) эффектов синхронного комбинированного воздействия моделируемой невесомости и различных видов ионизирующих излучений при разной длительности воздействий.

Научная новизна работы Впервые были изучены нейробиологические эффекты как изолированного, так и синхронного комбинированного действия ионизирующих излучений и моделируемых эффектов гипогравитации, наиболее адекватно моделирующих радиационную ситуацию межпланетного полета, на разных уровнях организации ЦНС: молекулярном, нейрохимическом и интегративном.

Впервые проведено исследование эффектов воздействия на функции ЦНС излучений, входящих в состав ГКЛ, в разных дозах и при различных условиях: высокоэнергетических протонов на пролете и в пике Брэгга и ионов углерода ^{12}C .

Впервые были исследованы нейробиологические эффекты комбинированного действия ионизирующих излучений и антиортостатического вывешивания (АнОВ) при различных сроках воздействий: 7, 14 и 30 суток.

Теоретическая и практическая значимость. Проведено комплексное исследование нейробиологических эффектов синхронного комбинированного

действия различных видов ионизирующих излучений и моделируемой измененной гравитации, чего никогда ранее не проводилось. Подобные данные совершенно необходимы для понимания проявлений и механизмов возможных нарушений функций ЦНС, оценки взаимного модифицирующего влияния этих факторов и их относительной опасности. Эти данные могут быть использованы для оценки эргономического риска в межпланетных полетах, связанного с возможными нарушениями работоспособности и операторской деятельности космонавтов.

Положения, выносимые на защиту

1. Воздействие протонов высокой 170 МэВ, а также низкой энергией в пике Брэгга с более высоким значением плотности ионизации в различных поглощенных дозах в пределах от 1 до 3 Гр вызывает нарушения в процессах обучения и усиление тревожности, сопровождающиеся изменениями в моноаминергической системе мозга, значимость которых существенно возрастает при облучении в пике Брэгга. Облучение ионами углерода ^{12}C вызывает угнетение метаболизма моноаминов, наиболее выраженное в префронтальной коре и гиппокампе.

2. Воздействие антиортостатического вывешивания вызывает увеличение тревожности, наблюдаемое как в поведении, так и в небольших отклонениях в работе серотонинергической системы префронтальной коры. Наблюдаемый компенсаторный эффект после воздействия центрифуги на влияние АНОВ говорит о разной направленности действия данных факторов.

3. При комбинированном воздействии АНОВ и ионизирующих излучений АНОВ оказывает более выраженное влияние на функции ЦНС, чем ИИ с изученными характеристиками. При этом нарушения в большей степени затрагивают эмоционально-мотивационную сферу, нежели когнитивные функции.

4. Эффекты воздействия ИИ зависят в большей степени от общей поглощенной дозы, нежели от длительности облучения, в то время как характер и степень нарушений, возникающих в результате

комбинированного действия АНОВ и ИИ в значительной степени зависят от длительности воздействия. Так, наибольший эффект наблюдается при вывешивании сроком в один месяц, в то время как при воздействии продолжительностью две недели наступает адаптация к данному фактору.

Апробация работы

Результаты исследований были доложены и обсуждены на российских и международных конференциях: IX Международный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» 2013 г. (Крым, Судак); XXII Съезд Физиологического общества им. И.П. Павлова 2013 г, (Волгоград); XIV конференция по космической биологии и авиакосмической медицине, посвященная 50-летию ГНЦ РФ Института медико-биологических проблем РАН, 2013 г. (Москва); X Международный конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» 2014 г. (Крым, Судак); VII съезд по радиационным исследованиям (радиобиология, радиозэкология, радиационная безопасность), 2014 г (Москва); XI Международный конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» 2015 г. (Крым, Судак); XII Международный конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» 2016 г.(Судак); Международная конференция «Современные направления общей и космической радиобиологии» 2017, (Дубна); XIV Международный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» 2018 г.(Судак); IX Международный Аэрокосмический Конгресс IAC'18, 2018 (Москва); Международная конференция «Современные направления общей и космической радиобиологии и астробиологии, 2018 (Дубна); XVII Конференция по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, 2018 (Москва).

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 141 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований с обсуждением, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. В диссертации приведены 22

рисунка и 10 таблиц. Список использованной литературы включает 189 источников, из которых 166 на английском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования и моделируемые факторы космического полета. Исследование влияния изучаемых факторов проводилось в нескольких независимых сериях экспериментов. В качестве тестируемых животных использовались самцы крыс линии Wistar (120-180 г, общее число за все серии экспериментов - 180 крыс), а также самцы мышей линии C57\BL6 (20-25г, общее число за все серии экспериментов - 40 мышей). Воздействию ИИ, комбинированному воздействию (ИИ + АНОВ) - подвергались только крысы. Воздействию АНОВ, комбинированному воздействию без облучения (АНОВ + ЦФ) – подвергались только мыши. Эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ГНЦ РФ ИМБП РАН. **Структура экспериментов**

Схема экспериментов с крысами представлена на рисунке 1. Цифрами указан порядок манипуляций и характер воздействий моделируемых факторов космического полета.



Рисунок 1 схема экспериментов с крысами

Облучение крыс. Облучение крыс протонами «на пролете» (1.5 и 3.0 Гр, 165 МэВ), в пике Брэгга (1.0 и 2.0 Гр, 165МэВ) и в экспериментах с

комбинированным воздействием (1.5 Гр, 170 МэВ) проводилось на установке «Фазотрон» в Объединенном Институте Ядерных Исследований (Дубна). Животных начинали исследовать на 2 сутки после облучения. Облучение крыс ионами ^{12}C (1.0 Гр, 500 МэВ/н) проводилось на ускорителе У-70 на базе Института физики высоких энергий (Протвино), поглощенная доза излучения приходилась на голову животных. Гамма-облучение в экспериментах с комбинированным воздействием проводили в установке Гобо-60 с сертифицированной активностью источника 72 г-экв ^{137}Cs (661,7 КэВ). ***Антиортостатическое вывешивание (АнОВ)***. При проведении АнОВ крыс и мышей подвешивали за основание хвоста к горизонтальной металлической перекладине под углом в 30 градусов с помощью стержня, закрепленного на подвижных роликах, в стеллажах с индивидуальными ячейками размером 42х42х40 см.

Комбинированное воздействие. В экспериментах с ИИ все животные находились в помещении с источником. Животные, подвергнутые АнОВ и ИИ, были подвешены в стеллажах в зоне облучения. Животные, подвергнутые ИИ – в домашних клетках в зоне облучения. Животные, подвергнутые только АнОВ, были подвешены в стеллажах вне зоны облучения. Контрольные животные находились в домашних клетках вне зоны облучения. Было проведено 3 эксперимента с различными сроками АнОВ – 7, 14 и 30 суток. Суммарная доза гамма облучения 3.0 Гр была равномерно распределена на весь период комбинированного воздействия.

Для моделирования перегрузки у мышей, животных подвергали однократному вращению на центрифуге ЦФ-30, плечо 7.5 м в Институте военной медицины МО РФ, что соответствует перегрузке в 8 g на протяжении 10 мин с градиентом нарастания и снижения перегрузки 0.4 g.

Тестирование поведения животных

Для оценки исследовательской активности и тревожности крыс и мышей были использованы стандартные методики: «открытое поле» (ОП) диаметр 100 см у крыс и 80 см у мышей, время тестирования составляло

5 минут, и приподнятый крестообразный лабиринт (50x10x1.2/40 см) время тестирования составляло 5 минут. **Оценку когнитивных функций проводили с помощью следующих методик:** Водный лабиринт Морриса. Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ). Обучение в Y-образном лабиринте с электрооборонительным подкреплением. Правильными реакциями считались реакция избегания или избавления в правый отсек лабиринта; ошибочными - побежки в левый отсек лабиринта; «отказом» -отсутствие побежки в течение всего времени сочетания.

Вырабатывание дифференцировочного двигательного-пищевого условного рефлекса по методике, предложенной Григорьяном (Григорьян, 2005). Вырабатывание двигательного-пищевого условного рефлекса в T-образном лабиринте (OpenScience, Россия). **Для оценки активности мышей и стереотипии поведения использовали установку Intellicage (NewBehavior TSE Германия),** предназначенную для автоматического сбора и анализа данных о поведении и обучении мелких лабораторных животных. При анализе компонентов поведения оценивались посещения углов с поилками (визиты) и попытки дотянуться до поилки (касание створки поилки)

Тестирование нейрохимических и молекулярных изменений в работе структур головного мозга. Концентрацию моноаминов и их метаболитов определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ионная хроматография) с электрохимической детекцией на хроматографе LC-304T (BAS, West Lafayette, США) с инжектором Rheodyne 7125. **Анализ молекулярных механизмов** нейробиологических эффектов комбинированного действия АНОВ и ионизирующих излучений проводили методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с использованием MMLV RT kit с рандомными гексамерными праймерами (Евроген, Россия).

Обработка данных. Для математической обработки и статистического анализа данных использовали программы Microsoft Excel 2010 и Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Данные представлены как среднее±S.E.M.

Внутригрупповое обучение в тесте выработки рефлекса пассивного избегания было проанализировано с помощью t-теста Стьюдента и U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни для зависимых выборок. Другие данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA). Апостериорный тест Дункана рассчитывался в случае обнаружения различия дисперсии. Уровень значимости во всех тестах был принят как $p < 0,05$.

Данные, полученные в системе Intellicage, были предварительно математически приведены к единой системе сравнения между группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние облучения с различными характеристиками линейной передачи энергии (ЛПЭ) на когнитивные функции и нейрохимические процессы в головном мозге крыс.

После облучения крыс протонами на пролете двигательная активность в ОП снижалась при облучении в дозе 1.5 Гр на 65%, при облучении в дозе 3 Гр - на 90%. У крыс, облученных в дозе 3 Гр, увеличивалось количество реакций замиранья в 3 раза, а латентный период выхода в центр уменьшался в 3 раза (рис.2).

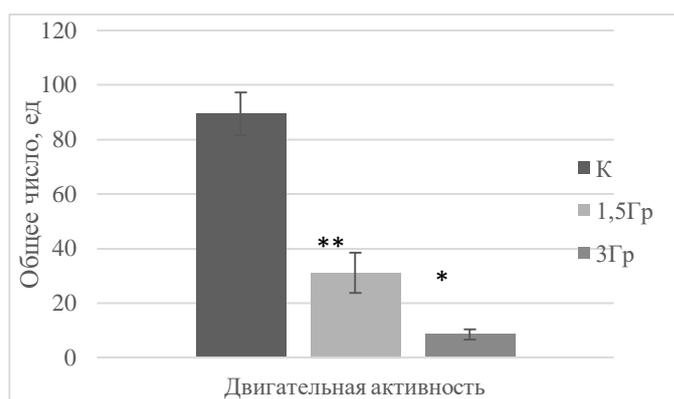


Рисунок 2 Двигательная активность в тесте «открытое поле» у крыс, облученных протонами на пролете.

Примечание * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что облучение протонами приводит к усилению пассивно-оборонительного поведения и

реакции страха (Whimbeу, Denenberg, 1967; Маркель, 1981).

Число правильных реакций избегания у крыс, подвергшиеся облучению протонами в дозе 1.5 Гр, увеличивалось быстрее чем у контрольных животных, а число правильных реакций избавления у контрольных животных достигло значений экспериментальной группы только к концу обучения. (Рис 3). Данный результат можно объяснить эффектом сужения внимания, который заключается в улучшении условно-рефлекторной деятельности после воздействия ионизирующих излучений за счет подавления исполнительных механизмов двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, снижающих афферентную генерализацию (Ушаков, Штемберг, 2007).

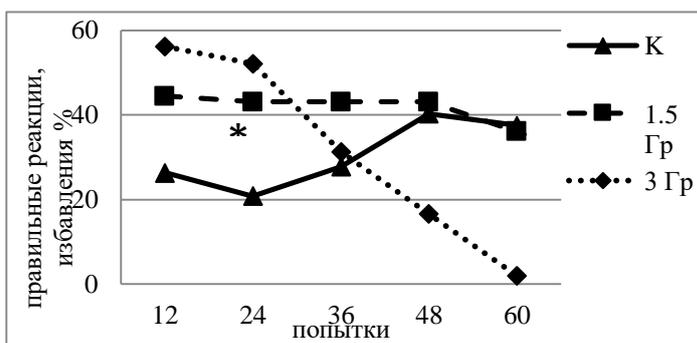


Рисунок 3. Кривая обучения в Y-образном лабиринте, крыс, облученных протонами на пролете, правильные реакции. *Примечание* * - $p < 0.05$

В то же время, по числу ошибочных реакций избегания облученные крысы превышали показатели контроля. У крыс, облученных в дозе 3 Гр, напротив, показатели обучения были в целом ниже контрольных по числу правильных реакций как избегания, так и избавления, и выше - по числу ошибочных реакций. Стоит отметить, что у облученных крыс было существенно меньшее количество отказов от выполнения задачи, (рис. 4), что может быть связано с эффектом возбуждения в результате воздействия ионизирующих излучений в небольших дозах (Григорьев, 1958; Кимельдорф, Хант, 1969)

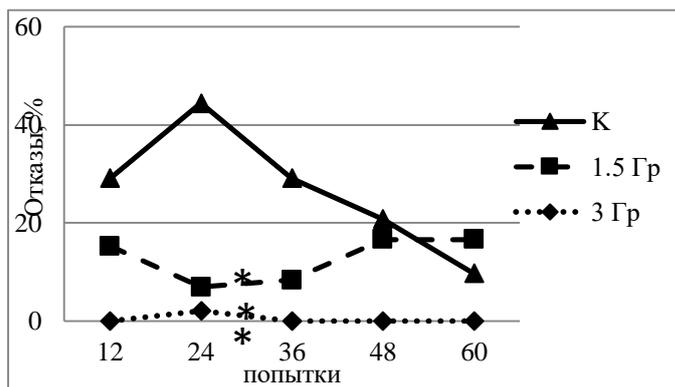


Рисунок 4. Кривая обучения в Y-образном лабиринте крыс, облученных протонами на пролете. Динамика реакций отказа. *Примечание* * - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$.

Исследование концентрации моноаминов и их метаболитов выявило эффект, соотносящийся с результатами поведения крыс в ОП и их обучения в Y-лабиринте. Воздействие протонов в использованных дозах незначительно повлияло на концентрацию моноаминов и их метаболитов в исследованных структурах мозга. Так, при облучении 1.5 Гр в префронтальной коре происходит статически значимое уменьшение по сравнению с контролем концентрации серотонина в 1.2 раза ($p < 0.05$) и увеличение концентрации метаболита дофамина - 3-МТ более чем в 10 раз ($p < 0.05$). Концентрация ДА при этом незначимо увеличивается. У животных, облученных в дозе 3 Гр, происходит достоверное повышение концентрации метаболита ДА - 3-МТ в гиппокампе (табл. 1).

Таблица 1. Влияние облучения протонами в дозах 1,5 и 3 Гр на концентрацию моноаминов (нмоль/мг ткани) в префронтальной коре и гиппокампе крыс.

Группы	Контроль	1,5 Гр.	3 Гр.
Префронтальная кора			
3-МТ	0,003±0,01	0,013±0,006	0,035±0,01*
5-ОИУК	0,68±0,06	0,52±0,05	2,80±0,20*
5-ОТ	3,52±0,25	2,80±0,20*	3,16±0,34

Гиппокамп			
3-МТ	0,008±0,002	0,007±0,002	0,003±0,001*

Во втором эксперименте на 5 день обучения животных в Т-лабиринте, при среднем показателе более 50% правильных реакций, провели облучение протонами в пике Брэгга. (Рис 5).

После облучения крысы, получившие дозу в 2 Гр, продемонстрировали снижение числа правильных реакций на 25% ($p=0.01$) по сравнению с животными контрольной группы.

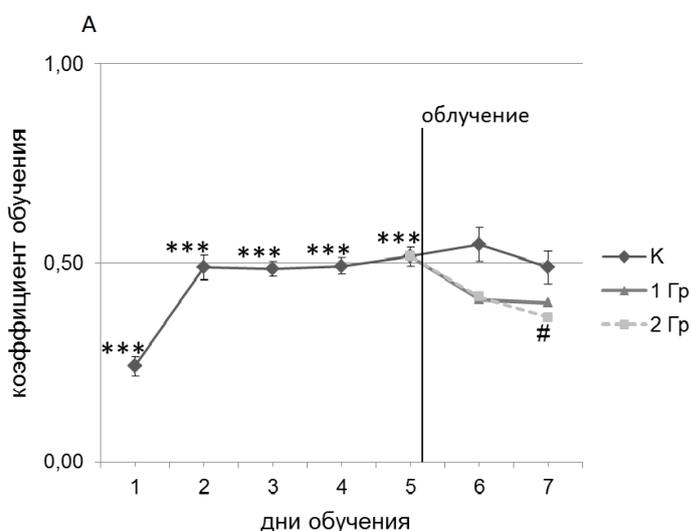


Рисунок 5. Кривая обучения в Т-образном лабиринте животных, облученных в пике Брэгга. Примечание *** – $p<0.001$ (*t*-критерий Стьюдента для одной выборки); # – $p<0.016$ (*t*-критерий Стьюдента).

Выработка УРПИ происходила на 2 день после облучения протонами в пике Брэгга. Спустя 30 мин после выработки УРПИ время пребывания в светлом отсеке у контрольных и экспериментальных крыс достоверно увеличилось. ($p<0.001$). Спустя 7 дней со дня обучения УРПИ снижение времени пребывания в освещённом отсеке не происходит у крыс, облученных в дозе 2 Гр, тогда как животные, облученные в дозе 1 Гр, и крысы контрольной группы проводят в темном отсеке больше времени на 42% ($p=0.035$) и 41% ($p=0.03$) соответственно, по сравнению с результатами, полученными спустя 30 минут после обучения. (рис. 6).

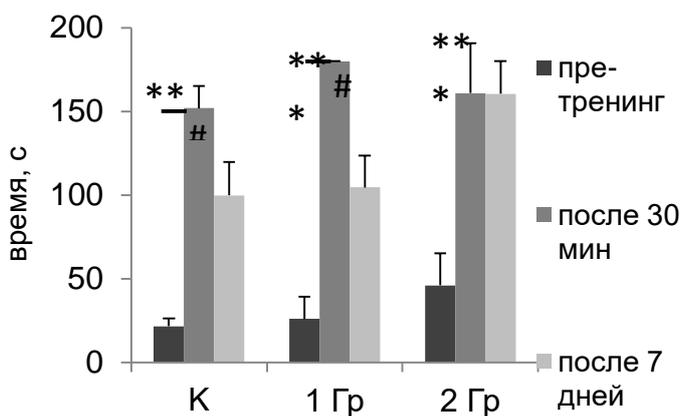


Рисунок 6. Выработка и воспроизведение УРПИ животных, облученных в пике Брэгга. *Примечание* *** – $p < 0.001$ (*t*-критерий Стьюдента); # – $p < 0.05$ (*t*-критерий Стьюдента для зависимых выборок).

Таким образом, при облучении в дозе 2 Гр наблюдается статистически значимое нарушение функционирования долговременной рабочей памяти, уже сформированной к моменту облучения, при этом хранение и воспроизведение вновь образованного после облучения памятного следа не страдает. Нейрохимический анализ содержания моноаминов и их метаболитов в избранных структурах головного мозга животных, облученных в пике Брэгга, (табл. 2) показал снижение содержания серотонина (СТ) и дофамина (ДА) в префронтальной коре.

Таблица 2 Концентрация моноаминов и их метаболитов (нмоль/мг ткани) на 2 сутки после облучения протонами в пике Брэгга. $n=6$.

Группы	Контроль	1 Гр.	2 Гр.	$p_t =$	$p_t =$	$p_t =$
Префронтальная кора						
НА	0,99±0,04	0,84±0,04	0,92±0,05	<u>0,046</u>	0,358	0,258
ДА	0,34±0,02	0,27±0,02	0,28±0,02	<u>0,016</u>	<u>0,040</u>	0,753
Стриатум						
3-МТ	0,32±0,02	0,3±0,04	0,26±0,02	0,427	<u>0,023</u>	0,523

Воздействие ионов ^{12}C показало (табл. 3) однонаправленное снижение концентрации ДА в прилежащем ядре достоверно до 45.3%. Концентрации НА, ДОФУК, ГВК и ЗМТ в префронтальной коре под влиянием облучения

ионами углерода снижались (табл. 3). В других структурах также происходило снижение концентрации исследуемых веществ, но эти изменения в большинстве случаев были недостоверны.

Таблица 3. Влияние облучения головы крыс ионами углерода (^{12}C , 1Гр) на концентрацию моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре и прилежащем ядре крыс (нмоль/мг ткани). К- контроль, О- облученные.

	Группа	НА	ДОФУК	ДА	5-ОУИК	СТ
Префронтальная кора	1 К (n = 6)	1.26 ± 0.1	0.26 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.93 ± 0.07	3.31 ± 0.13
	2 О (n = 6)	0.89 ± 0.11* P = 0.05	0.18 ± 0.03 P = 0.015	0.33 ± 0.05	0.70 ± 0.06 P = 0.021	2.27 ± 0.43
Прилежащее ядро	1 К (n = 6)	3.36 ± 0.99	3.62 ± 0.81	35.16 ± 6.2	3.46 ± 0.32	6.39 ± 1.12
	2 О (n = 6)	4.60 ± 0.99	2.66 ± 0.43	15.91 ± 4.7 P = 0.048	3.09 ± 0.26	6.22 ± 0.85

Таким образом, после облучения головы крыс ионами ^{12}C выявлена высокая чувствительность и реактивность префронтальной коры относительно других структур мозга.

В итоге, и при облучении протонами на пролете, и при облучении в пике Брэгга, мы наблюдаем эффекты, зависимые от дозы облучения, на когнитивные процессы, в том числе на формирование долговременной памяти. Воздействие протонов в пике Брэгга вызывает более серьезные нарушения в моноаминергической системе по сравнению с облучением протонами на пролете даже при меньших значениях доз, что связано с возрастанием относительной биологической эффективности (ОБЭ) при торможении частиц в пике Брэгга.

Изменение поведения мышей и концентрации моноаминов при влиянии АНОВ и однократной перегрузке. В двух независимых сериях

экспериментов у мышей после АНОВ длительностью 30 суток в результатах теста ОП происходит снижение горизонтальной двигательной активности. Среднее число выходов в центр уменьшалось по сравнению с контролем у группы АНОВ в 2.4 раза ($p=0.02$) и у группы АНОВ+ЦФ в 1.9 раз ($p=0.037$).

За время адаптации в системе Intellicage у мышей группы АНОВ наблюдалось значительное (на 46 % по сравнению с контролем) снижение общей двигательной активности, связанной с посещением углов с поилками, в то время как у животных группы «АНОВ+ЦФ» этого не произошло.

В первый день происходит наибольшее количество посещений углов (37% от общего числа посещений за время адаптации) у мышей группы АНОВ в первой серии, что достоверно отличается от показателей как контрольной группы в первый и второй дни, так и от группы АНОВ во второй день ($p=0.006$, 0.02 , 0.001 , соответственно). Однако во второй серии эксперимента большинство визитов у группы АНОВ происходит во второй день (35% от общего числа), что достоверно больше, чем показатели в первый и любой другой день в контроле и группе АНОВ+ЦФ ($p= 0.02$, 0.002 соответственно).

Рис. 7.

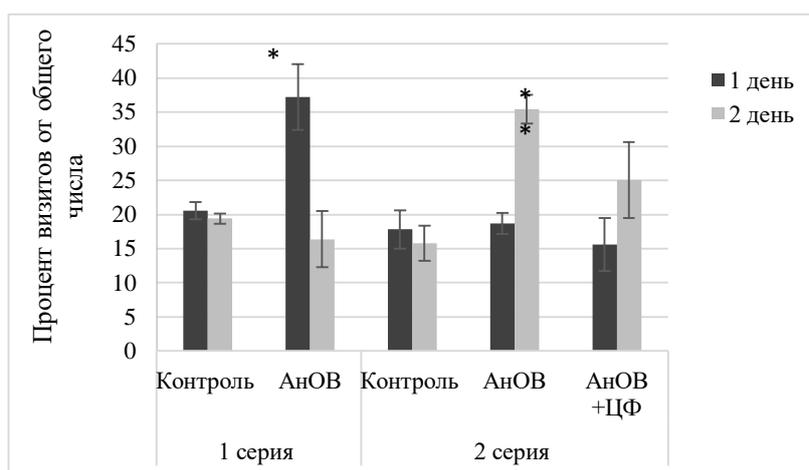


Рисунок 7. Усредненные данные активности мышей в системе Intellicage в первые дни адаптации к новой среде.

Примечание * - $p<0.05$, ** – $p<0.001$

Исходя из проведенного математического анализа стереотипии, как показателя предпочтения определенного угла, следует, что наибольшую

стереотипию проявляют мыши группы АНОВ во второй день первой серии эксперимента ($p= 0.01, 0.001, 0.0002, 0.004$). Рис. 8.

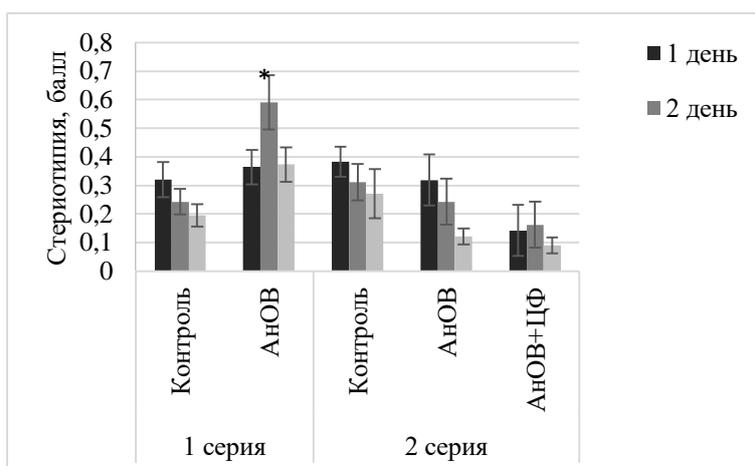


Рисунок 8. Стереотипия в поведении мышей в системе Intellicage, анализ предпочтений за первые дни адаптации и за весь период. *Примечание* * - $p < 0.05$, # – $p < 0.05$, отличие внутри группы.

Сравнение процессов локомоторной адаптации в системе Intellicage, также как и данные по поведению в ОП, показывают усиление тревожности у мышей группы АНОВ. Снижение исследовательской активности животных может быть расценено как реакция на стресс (Krackow et al., 2010).

По результатам первой серии эксперимента в исследованных структурах мозга мышей обнаружены незначительные достоверные изменения, которые относятся к метаболизму серотонина в стриатуме. В то же время, во второй серии эксперимента наблюдаются более существенные изменения. Статистически значимые различия присутствуют как в концентрации моноаминов и их метаболитов, так и в их соотношениях (рис 9).

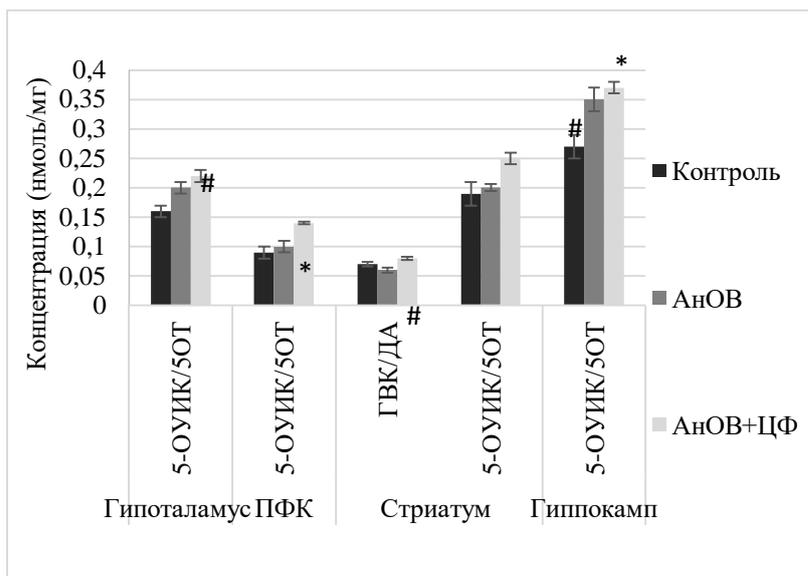


Рисунок 9. Содержание моноаминов и их метаболитов в тканях головного мозга мышей второй серии эксперимента. *Примечание* * - $p < 0.05$, # – $p < 0.05$ различия между группами АнОВ и АнОВ+ЦФ

Таким образом, во второй серии эксперимента АнОВ оказывает более выраженное влияние на моноаминергическую систему - НА, ДА и СТ - и их метаболиты (ДОФУК, ГВК, 3-МТ и 5ОИУК), чем в первой данные в автореферате не приводятся. Наиболее чувствительной оказалась серотонинергическая система, поскольку основные изменения коснулись процессов метаболизма данного медиатора, что может быть связано с развитием депрессивного состояния мышей после воздействия АнОВ.

Итак, воздействие моделируемой невесомости вызывает увеличение тревожности. Однако фактор ЦФ оказывает слабое компенсаторное воздействие на фактор АнОВ, наблюдаемый как в поведении, так и в рамках серотонинергической системы префронтальной коры.

Изменение поведения крыс и нейрохимических механизмов работы головного мозга при комбинированном воздействии ИИ и АнОВ

В 14 суточном эксперименте обучение крыс ($n=8$) в водном лабиринте Морриса показало статистически значимые различия на 5 день тестирования, в то время как при 7 суточном эксперименте отличий не наблюдалось, несмотря на то, что присутствовала небольшая тенденция увеличения времени отыскания платформы у экспериментальных крыс.

Статистические отличия при выработки УРПИ наблюдаются при длительности воздействия 30 суток. Существенные отличия при выработки дифференцировки не наблюдаются, данные в автореферате не приводятся.

Различия в содержании моноаминов между экспериментальными группами крыс в 7-суточном эксперименте были обнаружены в префронтальной коре, гиппокампе, гипоталамусе и прилежащем ядре данные в автореферате не приводятся. Наибольшие изменения коснулись серотонинергической системы у группы АноВ.

В эксперименте при 14 суточном вывешивании для группы В и О, содержание 5-ОУИК и соотношения 5-ОУИК/СТ в гиппокампе относительно значений контроля достоверно увеличивается на 24% ($P = 0,006$) и 22% ($P = 0,04$) соответственно. Соотношение 5-ОУИК/СТ снижается на 20% ($P = 0,005$) у группы О в гиппокампе. Соотношение 5-ОУИК/СТ увеличивается в гипоталамусе у группы В на 9% ($p=0.002$). Содержание ДОФУК в префронтальной коре снижается на 40% ($P = 0,02$) у групп В. В гиппокампе, в группе О, по сравнению с группой В, происходит увеличение отношения 5-ОУИК/СТ на 59% ($p = 0.01$), и группе В+О - на 48% ($p = 0.03$) соответственно. При 30 суточном эксперименте в префронтальной коре у животных группы В+О было отмечено только увеличение концентрации ДОФУК относительно группы контроля и группы В. В гипоталамусе концентрация 5-ОИУК в этой группе была достоверно ниже у группы О по сравнению с группой В. В стриатуме у крыс группы В и группы В+О концентрация ГВК была достоверно выше относительно контрольной группы. Концентрация 5-ОИУК была достоверно выше у крыс в группе В относительно контрольной.

Таким образом, наиболее существенные отличия от контроля наблюдались при вывешивании сроком в 30 суток, наименее существенные - при вывешивании сроком в две недели. Можно предположить, что выбранные сроки АноВ пришлись на разные стадии общего адаптационного

синдрома: 7-суток воздействие – на стадию тревоги, 14-суток– на стадию резистентности и 30-суток– на стадию истощения (Ушаков, Штемберг, 2007)

Исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе наблюдаемых изменений после облучения

В рамках данной работы был проведен анализ содержания в префронтальной коре, гиппокампе и стриатуме матричной РНК, кодирующей рецепторы серотонина и дофамина. (Рис. 11).

Особый интерес представляет экстремальное повышение уровня экспрессии SERT в префронтальной коре у крыс группы В, в гиппокампе и стриатуме у группы В+О.

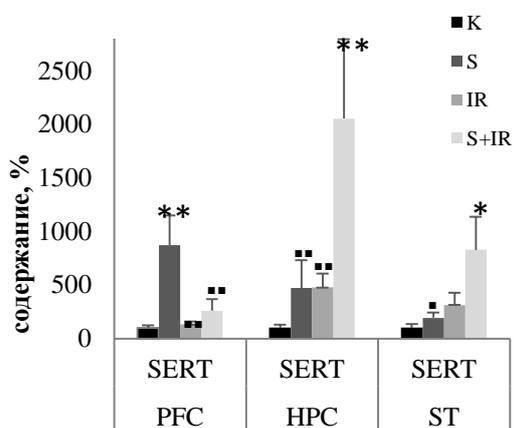


Рис. 11. ПЦР анализ уровня экспрессии мРНК ключевых белков-участников метаболизма моноаминов. *Примечание* * - $p < 0.05$, ** – $p < 0.001$, отличие от контроля, # $p < 0.05$, ## – $p < 0.001$, отличие между экспериментальными группами

Кроме того, при сравнении уровня экспрессии генов альфа-синуклеина и синтаксина-1 было выявлено их статистически значимое снижение на 60 и 40 % соответственно.

Таким образом, взаимодействие эффектов ионизирующих излучений и АНОВ при их комбинированном воздействии носит сложный характер, включающий как аддитивные, так и антагонистические проявления. Это явление было названо нами интерференционным взаимодействием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом можно сделать вывод о том, что исследуемые факторы оказывали значительно более выраженное действие на эмоционально-мотивационные процессы, нежели на когнитивные функции. Несмотря на то, что данные эффекты детектируются, они не всегда ярко выражены, что хорошо согласуется с различными, и не всегда значительными, изменениями концентрации моноаминов в структурах мозга, отвечающих за когнитивное и эмоционально-мотивационное поведение. Воздействие протонов в пике Брэгга приводит к более серьезным нарушениям по сравнению с облучением протонами на пролете даже при меньших значениях доз, что связано с резким возрастанием ЛПЭ и ОБЭ. Воздействие моделируемой невесомости вызывает увеличение тревожности у мышей в поведении, так и в небольших отклонениях в функции серотонинергической системы в префронтальной коре. При этом фактор ЦФ оказывает небольшое компенсаторное воздействие на эффект фактора АНОВ как по показателям поведения, так и по изменениям серотонинергической системы в префронтальной коре. Анализ молекулярных механизмов демонстрирует изменение экспрессии одного из СТ рецепторов, наблюдаемое в гиппокампе и стриатуме. Эти изменения, наравне с результатами анализа поведения, демонстрируют большое разнообразие взаимодействий эффектов изучаемых факторов, которые принимают различные формы. В работе данный характер взаимодействия мы назвали интерференционным, по аналогии с физическим эффектом интерференции.

ВЫВОДЫ

1. Воздействие высокоэнергетических протонов вызывает сдвиг эмоционально-мотивационных отношений в сторону пассивно-оборонительного поведения и тревожности, а также вызывает нарушения в процессах обучения, статистически значимые при облучении в пике Брэгга. Изменения сопровождаются снижением

концентрации моноаминов и их метаболитов в ключевых структурах мозга, особенно выраженное при облучении ионами углерода ^{12}C .

2. Выявлена высокая чувствительность префронтальной коры к экспериментальным воздействиям, что имеет принципиальное значение для формирования когнитивных функций.

3. В целом АНОВ является превалирующим фактором в формировании поведенческих нарушений при использованных параметрах комбинированных воздействий.

4. Нейробиологические эффекты комбинированного действия АНОВ и ионизирующих излучений зависят от длительности воздействия АНОВ: наибольший эффект наблюдается при АНОВ+гамма-облучение продолжительностью 30 суток; наименьший – 14 суток. 7-дневное воздействие занимает промежуточное положение. Возможно, это зависит от стадии общего адаптационного синдрома.

5. При разных условиях и параметрах комбинированных воздействий ионизирующих излучений различного качества и АНОВ наблюдаются различные варианты эффектов их взаимодействия – как аддитивные или синергические, так и антагонистические. По аналогии с явлением интерференции это явление можно назвать интерференционным эффектом. Данный эффект проявляется на всех уровнях функциональной организации ЦНС – от молекулярного до интегративного.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Химические соединения: 3-МТЗ-метокситирамин; 5-ОИУК(5-НИАА) 5-оксииндолуксусная кислота; ГАМК гамма-аминомасляная кислота; ГВК (HVA) гаммаванилиновая кислота; ДА (DA) дофамин; ДОФУК (DOPAC) диоксифенилуксусная кислота; НА (NA) норадреналин; СТ (5HT, 5OT) серотонин. **Группы животных:** К Контроль В (S) вывешивание О (IR) облучение О+В (IR-S) облучение + вывешивание. **Другие сокращения:** АНОВ антиортостатическое вывешивание; ГКЛ галактические космические

лучи; Гр Грей; ИИ ионизирующие излучения; ЛПЭ линейная передача энергии; МэВ, ГэВ Мегаэлектронвольт, гигаэлектронвольт; ОП открытое поле; ОБЭ относительная биологическая эффективность; ПФК, (PFC) Префронтальная кора; ПЦР Полимеразная цепная реакция; СКЛ солнечные космические лучи; ТЗЧ тяжелые заряженные частицы; УРПИ условные рефлексы пассивного избегания; ФКП факторы космического полета; ЦНС центральная нервная система; ЦФ центрифуга

РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 9 статей в журналах, рекомендованных ВАК. Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Штемберг А.С., Базян А.С., **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Матвеева М.И., Кудрин В.С., Кохан В.С. Влияние облучения протонами высокой энергии на поведение крыс и его нейрохимические механизмы. Авиакосм. и экол. медицина. 2013. Т. 47. № 6. С. 54-60

2. Штемберг А.С., **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Матвеева М.И., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Клодт П.М., Базян А.С. Влияние факторов космического полета, моделируемых в наземных условиях, на поведение, дискриминантное обучение и обмен моноаминов в различных структурах мозга крыс. Известия РАН. Серия биологическая. 2014. № 2. С. 168-175.

3. Штемберг А.С., Базян А.С., Кохан В.С., Кудрин В.С., Матвеева М.И., **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Тимошенко Г.Н., Молоканов А.Г., Красавин Е.А., Наркевич В.Б., Клодт П.М. Воздействие высокоэнергетических протонов в пике Брэгга на поведение крыс и обмен моноаминов в некоторых структурах мозга. Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 1. С. 78-85.

4. **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Матвеева М.И., Базян А.С., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Перевезенцев А.А., Штемберг А.С. Влияние антиортостатического вывешивания на активность, адаптацию к новой среде,

исследовательское поведение и обмен моноаминов в мозге мышей. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017. Т. 51. № 1. С. 39-45.

5. Ушаков И.Б., Штемберг А.С., Красавин Е.А., Базян А.С., Кудрин В.С., **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Матвеева М.И. Эффекты космической радиации, комбинированного воздействия радиации и других факторов космического полета на функции центральной нервной системы в модельных экспериментах на животных. // Успехи современной биологии. 2018. Т. 138. № 4. С. 323-335.

6. **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Шуртакова А.К, Кохан В.С., Базян А.С, Кудрин В.С., Перевезенцев А.А., Штемберг А.С. Влияние антиортостатического вывешивания и перегрузки на адаптацию к новой среде, двигательную активность, исследовательское поведение и обмен моноаминов в мозге мышей. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2018. Т. 52. № 6. С. 61-69.

7. Kokhan V.S., **Lebedeva-Georgievskaya K.B.**, Kudrin V.A., Bazyan A.S., Maltsev A. V., Shtemberg A.S. An investigation of the single and combined effects of hypogravity and ionizing radiation on brain monoamine metabolism and rats' behavior. // Life Sciences in Space Research. 2019. V. 20 № 2. P. 12-19.

8. **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Кохан В.С., Шуртакова А.К., Перевезенцев А.А., Кудрин В.С., Штемберг А.С., Базян А.С. Нейробиологические эффекты комбинированного воздействия антиортостатического вывешивания и ионизирующих излучений различного качества. // Нейрохимия. 2019. Т. 36. № 3.

9. Штемберг А.С., Перевезенцев А.А., **Лебедева-Георгиевская К.Б.**, Митрофанова О.В., Кудрин В.С., Базян А.С. Роль типологических особенностей высшей нервной деятельности в нейробиологических эффектах антиортостатического вывешивания, гамма-облучения, облучения протонами и ионами углерода ^{12}C . // Радиационная биология. Радиоэкология. 2019. Т. 59. № 3.