

А.С. Жирник, А.В. Родина, Ю.П. Семочкина,  
О.В. Высоцкая, О.Д. Смирнова, М.Г. Ратушняк, Е.Ю. Москалева

## КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ И СОСТОЯНИЕ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК МОЗГА В ОТДАЛЕННЫЙ ПЕРИОД ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ ГОЛОВЫ МЫШЕЙ

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

Контактное лицо: Александр Сергеевич Жирник, e-mail: Zhirnik\_AS@nrcki.ru

### РЕФЕРАТ

**Цель:** Исследовать влияние фракционированного  $\gamma$ -облучения головы в суммарной дозе 20 Гр на когнитивные функции, состояние глиальных клеток мозга и экспрессию генов ряда цитокинов у мышей через 2 мес после облучения.

**Материал и методы:** Самцов мышей линии C57BL/6 подвергали фракционированному  $\gamma$ -облучению головы в суммарной дозе 20 Гр (5 сеансов по 4 Гр). Через 2 мес после облучения оценивали поведение и когнитивные функции животных, в препаратах клеток, выделенных из головного мозга, определяли содержание клеток покоящейся и активированной микроглии, клеток микроглии с M1- и M2-фенотипом, количество астроцитов и пролиферирующих клеток, а также анализировали относительный уровень мРНК генов про- и противовоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 и TGF $\beta$ ) в гиппокампе.

**Результаты:** Показано, что фракционированное  $\gamma$ -облучение головы через 2 мес не влияет на двигательную активность и обстановочную ассоциативную память мышей, однако приводит к нарушению эпизодической памяти, оцениваемой в тесте «распознавание нового объекта» по индексу распознавания ( $0,44 \pm 0,08$  и  $0,02 \pm 0,09$  в контрольной и облученной группах соответственно), и снижению пространственной памяти, оцениваемой в тесте «водный лабиринт Морриса» по времени в «целевом» квадранте ( $46,8 \pm 2,4$  % и  $37,4 \pm 2,8$  % в контрольной и облученной группах соответственно). Воздействие  $\gamma$ -излучения приводило к значительному снижению содержания клеток микроглии (Iba1<sup>+</sup>-клеток) и астроцитов (GFAP<sup>+</sup>-клеток) в головном мозге мышей с одновременным увеличением доли клеток активированной микроглии (CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup>-клеток) в 2,5 раза ( $2,0 \pm 0,2$  % в контроле до  $4,9 \pm 0,5$  %), изменению соотношения M1- / M2-микроглии, а также к значимому уменьшению общего количества пролиферирующих клеток (BrdU<sup>+</sup>) и пролиферирующих клеток микроглии. Через 2 мес после облучения обнаружено возрастание экспрессии мРНК гена провоспалительного цитокина TNF $\alpha$ , снижение уровня экспрессии гена противовоспалительного цитокина TGF $\beta$  и достоверное повышение уровня экспрессии гена IL-4.

**Заключение:** Показано, что фракционированное  $\gamma$ -облучение головы в суммарной дозе 20 Гр приводит к снижению эпизодической и пространственной памяти у мышей через 2 мес после воздействия. Обнаруженные когнитивные нарушения обусловлены развитием нейровоспаления, характеризующегося увеличением доли клеток активированной микроглии в головном мозге и изменением профиля экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе.

**Ключевые слова:** головной мозг, гиппокамп, микроглия, активированная микроглия, астроциты, нейровоспаление, цитокины, экспрессия генов, фракционированное облучение, когнитивные функции, мыши

**Для цитирования:** Жирник А.С., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В., Смирнова О.Д., Ратушняк М.Г., Москалева Е.Ю. Когнитивные нарушения и состояние глиальных клеток мозга в отдаленный период после гамма-облучения головы мышей // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2022. Т. 67. № 5. С. 10–17. DOI:10.33266/1024-6177-2022-67-5-10-17

DOI: 10.33266/1024-6177-2022-67-5-10-17

A.S. Zhirnik, A.V. Rodina, Yu.P. Semochkina,  
O.V. Vysotskaya, O.D. Smirnova, M.G. Ratushnyak, E.Yu. Moskaleva

## Cognitive Disturbances and the State of Brain Glial Cells in Mice Exposed to Fractionated Whole-Brain Irradiation

National Research Center Kurchatov Institute, Moscow, Russia

Contact person: A.S. Zhirnik, e-mail: Zhirnik\_AS@nrcki.ru

### ABSTRACT

**Purpose:** To investigate the effect of fractionated whole-brain  $\gamma$ -irradiation at a cumulative dose of 20 Gy on cognitive functions, the state of brain glial cells and expression of multiple cytokines in mice 2 months after exposure.

**Material and methods:** Male C57Bl/6 mice were exposed to fractionated head  $\gamma$ -irradiation with 5 doses of 4 Gy. Two months after irradiation the behavior and cognitive functions of animals were assessed. After isolation of cells from mice brains the content of resting and activated microglia, microglial cells with M1- and M2-phenotype, astrocytes, proliferating cells were evaluated, and the hippocampal mRNA levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, TGF $\beta$ ) were determined.

**Results:** It was shown that fractionated head  $\gamma$ -irradiation didn't alter the locomotor activity and associative (context fear) memory, but reduced the episodic memory in novel object recognition test (discrimination index was  $0.44 \pm 0.08$  and  $0.02 \pm 0.09$  in control and irradiated groups, respectively) and spatial memory in Morris water maze (time in target quadrant was  $46,8 \pm 2,4$  % and  $37,4 \pm 2,8$  % in control and irradiated groups, respectively). Exposure of  $\gamma$ -radiation significantly reduced the brain contents of microglial cells (Iba1<sup>+</sup>) and astrocytes (GFAP<sup>+</sup>) with concurrent 2.5 times increase in proportion of activated microglia (from  $2.0 \pm 0.2$  % in control to  $4.9 \pm 0.5$  % in irradiated mice), changed the M1- / M2-microglia ratio and significantly decreased the number of proliferating cells (BrdU<sup>+</sup>) and proliferating microglial cells (BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>). An increase in mRNA level of pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$ , a decrease in mRNA level of anti-inflammatory cytokine TGF $\beta$  and concurrent increase in mRNA level of IL-4 were detected in hippocampus 2 months after irradiation.

**Conclusion:** We show that fractionated head  $\gamma$ -irradiation at a cumulative dose of 20 Gy reduces the episodic and spatial memory in mice 2 months after exposure. Cognitive dysfunctions detected are associated with neuroinflammation characterized by increasing proportion of activated brain microglia and altered hippocampal pro- and anti-inflammatory cytokine profile.

**Keywords:** brain, hippocampus, microglia, activated microglia, astrocytes, neuroinflammation, cytokines, gene expression, fractionated irradiation, cognitive function, mice

**For citation:** Zhirnik AS, Rodina AV, Semochkina YuP, Vysotskaya OV, Smirnova OD, Ratushnyak MG, Moskaleva EYu. Cognitive Disturbances and the State of Brain Glial Cells in Mice Exposed to Fractionated Whole-Brain Irradiation. Medical Radiology and Radiation Safety. 2022;67(5):10–17. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2022-67-5-10-17

## Введение

Метастатические опухоли головного мозга регистрируются у 10–15 % больных раком. Наиболее часто они обнаруживаются при раке легкого, особенно при мелко-клеточном раке легких, раке молочной железы, желудочно-кишечного тракта, почки и кожи [1, 2]. Для резорбции единичных образований используется стереотаксическая лучевая терапия, а при множественных метастазах – лучевая терапия с облучением всего мозга (ОВМ). Стандартным способом фракционирования при ОВМ является режим, при котором суммарная доза 30 Гр набирается за 10 фракций по 3 Гр или 37,5 Гр за 15 фракций по 2,5 Гр. Профилактическое ОВМ у пациентов с мелко-клеточным раком легкого проводится в суммарной дозе 25 Гр за 10 ежедневных фракций или при коротком курсе – в суммарной дозе 20 Гр за 5 фракций. При этом важной клинической проблемой являются отдаленные нарушения когнитивных функций у пациентов с хорошим прогнозом общей выживаемости после ОВМ [3].

В основе развития таких осложнений может лежать повреждение сосудистого русла и гематоэнцефалического барьера, повреждение нейральных стволовых клеток и нарушение нейрогенеза в гиппокампе, гибель части нейронов и глиальных клеток и нарушение функциональной активности нейронов [4–6]. Появление гибнущих клеток и продуктов их распада приводит к нарушению гомеостаза глиальных клеток – активации клеток микроглии и затем астроцитов – и последующему развитию хронического нейровоспаления. Это сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов и активных метаболитов кислорода и азота, которые в свою очередь повреждают нейроны, что в совокупности, по-видимому, и приводит к формированию изменений в функциях ЦНС спустя несколько месяцев после облучения [7]. Исследование механизмов таких нарушений необходимо для последующего создания средств их профилактики и лечения.

Целью работы явилось исследование влияния фракционированного  $\gamma$ -облучения головы мышей в суммарной дозе 20 Гр на функции ЦНС и маркеры нейровоспаления в мозге через 2 мес после воздействия.

## Материал и методы

### Лабораторные животные

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 7–8 нед, полученных из питомника «Столбовая», массой тела 18–21 г. Животные прошли адаптацию/акклиматизацию в карантине в течение 14 дней до начала эксперимента. Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище (ad libitum). Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ «Курчатовский институт».

### Облучение

Сеансы фракционированного  $\gamma$ -облучения головы мышей проводили на установке ГУТ-200М в следующем режиме: 5 фракций по 4 Гр (суммарная доза 20 Гр): 2 фракции с интервалом в 1 сут, перерыв 2 сут, затем еще 3 фракции с интервалом в 1 сут (ис-

точник  $\gamma$ -квантов – кобальт-60; мощность дозы – 2,35 Гр/мин). На время облучения животных помещали в специальные прозрачные пластмассовые фиксаторы (ООО «НПК Открытая Наука», Россия). Для предотвращения воздействия  $\gamma$ -излучения на другие ткани использовали свинцовую защиту. При обращении с контрольными (ложно облученными) и облученными животными был выполнен одинаковый набор экспериментальных процедур.

### Анализ поведения и когнитивных функций мышей

Для анализа поведения, пространственной памяти и обстановочной ассоциативной памяти контрольных и облученных животных использовали тесты «открытое поле», «водный лабиринт Морриса» и «условно-рефлекторное замирание» соответственно. Тесты выполняли, как описано ранее [8].

Поведение животных при проведении теста «открытое поле» регистрировали с помощью системы видеорегистрации EthoVision XT 8.5 (Noldus Information Technology, Нидерланды) и анализировали в программе EthoVision XT 8.5. Проводили автоматический анализ общего пройденного пути (в см), средней скорости (в см/с), времени, проведенного в пристеночной, промежуточной и центральной зонах (в секундах). Видеозаписи также использовали для полуавтоматического подсчета общего количества стоек (без опоры и с опорой) с использованием программы BORIS 7.9.

При проведении теста «водный лабиринт Морриса» обучение животных проводили в течение 5 дней, давая по 5 попыток длительностью 60 с в день; тестирование пространственной памяти проводили на шестой день, предварительно убрав платформу из бассейна. Во время обучения и тестирования проводили автоматическую видеорегистрацию и полученные видеозаписи анализировали с использованием программы EthoVision XT 8.5, рассчитывая среднюю скорость (в см/с), время достижения платформы (в секундах), количество пересечений зоны платформы (в ед.), процент времени, проведенного «целевом» квадранте (в %).

При проведении теста «условно-рефлекторное замирание» обучение условно-рефлекторному замиранию проводили с использованием установки NIR Video Fear Conditioning Package for Mouse (Med Associates Inc., США). Мышь помещали в шумоизоляционную камеру с электропроводящим полом на 3 мин для свободного обследования обстановки, наносили электрокожное раздражение 3 раза с интервалом в 1 мин и сразу же возвращали в домашнюю клетку. Тестирование обстановочной ассоциативной памяти проводили через 24 ч после обучения при повторном предъявлении обстановки в течение 3 мин без электрокожного раздражения. Во время обучения и тестирования проводили автоматическую видеорегистрацию и полученные видеозаписи анализировали с использованием программы Video Freeze 2.6.5.81, определяя продолжительность актов замирания (отсутствие любых движений животного, кроме дыхательных) и рассчитывая процент времени замирания от общей продолжительности процедуры. Для

регистрации уровня спонтанных замираний животных в каждой экспериментальной группе использовали «активный контроль» (мыши, не подвергавшиеся действию электрокожного раздражения при обучении).

Для анализа эпизодической памяти контрольных и облученных животных использовали тест «распознавание нового объекта». Для проведения теста использовали прямоугольную арену размером 48×37,5 см, ограниченную непрозрачными стенками высотой 21 см. Перед помещением в арену каждого следующего животного стенки и пол протирали 70 % раствором этанола. Проведение теста включало фазу адаптации в арене без объектов в течение двух дней, фазу обучения с двумя одинаковыми объектами и фазу тестирования с известным и новым объектом. Объекты располагали на расстоянии 5 см от боковых стенок арены. При замене одного из известных объектов новым в день тестирования его расположение оставалось неизменным. Каждое животное помещали в центр арены, не содержащей (фаза адаптации) или содержащей (фазы обучения и тестирования) объекты, и давали 10 мин для свободного ее обследования. Видеорегистрацию поведения животного проводили при помощи цветной аналоговой видеокамеры WV-CP500G (Panasonic Corporation, Япония), установленной над центром арены на высоте 2 м, и системы видеорегистрации поведения EthoVision XT 8.5 при частоте сбора данных 25 кадров в секунду и разрешении видео 768×576 пикселей. Полученные видеозаписи поведения анализировали в полуавтоматическом режиме в программах EthoVision XT 8.5 и BORIS 7.9, определяя время исследования животным каждого объекта (тактильный контакт и обновление – расположение носа животного на расстоянии не более 2 см от объекта). Критерием исключения принимали суммарное время исследования животным обоих объектов меньше 20 с. Индекс распознавания, характеризующий степень предпочтения нового объекта, рассчитывали по формуле: индекс распознавания = (время исследования нового объекта – время исследования известного объекта) / (время исследования нового объекта + время исследования известного объекта).

#### **Выделение клеток из головного мозга мыши**

Выделение клеток из головного мозга контрольных и облученных мышей проводили в соответствии с методом [9], как описано ранее [8]. Мозг извлекали после проведения транскардиальной перфузии, удаляли мозжечок и обонятельные доли, промывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с сахарозой (20 г/л) и глюкозой (0,9 г/л), тщательно измельчали в 3 мл акутазы, переносили в пробирку и инкубировали 15 мин при 37 °С. Затем добавляли 10 % фетальной бычьей сыворотки и гомогенат ткани протирали через нейлоновое сито с диаметром пор 100 мкм (SPL Lifesciences, Республика Корея), затем через сито с диаметром пор 70 мкм, переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 4 °С 7 мин при 500×g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в 8 мл 20 %-ного изотонического раствора перколла (GE Healthcare, США), на перколл наслаивали 5 мл раствора Хэнкса (Панэко, Россия) и центрифугировали 10 мин при 550×g без торможения. Слой миелина, сконцентрированный в интерфазе, и супернатант удаляли, осадок клеток дважды промывали ФСБ, клетки ресуспендировали в ФСБ и подсчитывали в камере Горяева.

#### **Фенотипирование клеток мозга мыши**

Для окрашивания клеток антителами к внутриклеточным антигенам клетки фиксировали в растворе 2 % параформальдегида в ФСБ в течение 20 мин при комнатной температуре, отмывали ФСБ и пермеабелизировали в ФСБ, содержащем 0,1 % Triton X-100 и 1 % бычьего

сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США), в течение 30 минут. Разведение антител использовали в соответствии с указаниями фирмы-изготовителя.

Для идентификации клеток микроглии клетки головного мозга (200 тыс. клеток на образец) окрашивали первичными антителами к Iba1 (Abscam, Великобритания) и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 568 (Abscam, Великобритания). Кроме того, для идентификации клеток микроглии клетки головного мозга окрашивали антителами к CD11b, конъюгированными с фикоэритрином (BioLegend, США), и к CD45, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (BioLegend, США). Клетки микроглии идентифицировали как субпопуляцию CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> после двойного окрашивания антителами к CD11b и к CD45. Популяция клеток с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>high</sup> соответствует клеткам активированной микроглии и макрофагам. Для идентификации субпопуляций клеток M1-подобной и M2-подобной микроглии клетки головного мозга окрашивали антителами (BioLegend, США) к CD11b, конъюгированными с фикоэритрином, к CD86 и к CD206, конъюгированными с флуоресцеин-5-изотиоцианатом.

Для идентификации астроцитов использовали антитела к глияльному фибриллярному кислому белку (GFAP), конъюгированные с Cy3 (BioLegend, США).

Для детекции пролиферирующих клеток в головном мозге животным вводили 150 мг/кг BrdU в ФСБ внутривентриально в течение 4 дней до проведения транскардиальной перфузии. Количество пролиферирующих клеток определяли, окрашивая клетки антителами к BrdU. Разведение антител использовали в соответствии с указаниями фирмы-изготовителя. Для окрашивания антителами к BrdU проводили денатурацию ДНК 1 моль/л раствором HCl в течение 30 мин при температуре 37 °С, после чего нейтрализовали 0,1 моль/л боратным буфером (pH = 8,0) в течение 1 мин. После промывали осадок ФСБ дважды и инкубировали клетки в растворе соответствующих вторичных антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488.

Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Biosciences, США; Ресурсный центр молекулярной и клеточной биологии) с использованием программного обеспечения CellQuest™ (BD Biosciences, США). В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток.

#### **Анализ экспрессии мРНК генов цитокинов в гиппокампе**

Суммарную РНК из гиппокампа выделяли фенол-хлороформным методом, используя реактив ExtractRNA (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией изготовителя. Анализ относительной экспрессии мРНК исследуемых генов проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию (синтез кДНК) проводили в реакционной смеси с конечным объемом 20 мкл, приготовленной на обработанной диэтилпирикарбонатом деионизованной стерильной воде, содержащей 67 ммоль/л Трис-HCl (pH 8,8), 16,6 ммоль/л (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01 % (в/о) Твин 20, 4 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л каждого дНТФ, 3,2 мкг смеси гексамерных праймеров со случайной последовательностью, 10 ммоль/л дитиотреитола, 10 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз, 30 ед. рекомбинантной обратной транскриптазы M-MLV, 1 мкг суммарной РНК. Смесь инкубировали при 42 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали путем тепловой инактивации обратной транскриптазы, выдерживая смесь при 94 °С в течение 10 мин.

Экспрессию мРНК генов цитокинов определяли методом ПЦР в режиме реального времени с исполь-



зованием красителя SYBR Green I на амплификаторе CFX96 Touch™ (Bio-Rad, США). ПЦР проводили в реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) с конечным объемом 25 мкл, в реакцию вносили 2 мкл реакционной смеси после ревертирования, содержащую кДНК и 7,5 пкмоль каждого из пары праймеров:

*mTNF $\alpha$*  f 5'-aaatggcctccctctcatc-3', r 5'-tttgagatccatgcgcttg-3';

*mIL-1 $\beta$*  f 5'-acctgttctttgaagtgacg-3', r 5'-gaaaagaagtgctcatgtcc-3';

*mIL-6* f 5'-gaggcttaattacacatgttc-3', r 5'-aggcaattctctggttatccagt-3';

*mIL-4* f 5'-attttgaacgaggtcacaggagaag-3', r 5'-accttgaagccctacagacgag-3';

*mTGFB $\beta$*  f 5'-taatggtggaccgcaacaacg-3', r 5'-tcccgaatgtctgacgtattgaag-3';

*mGAPDH* f 5'-cagcctctcccgttagaca-3', r 5'-ttcccggttagcaaacgcttc-3'.

Проверку геноспецифичности праймеров осуществляли при помощи программ Oligo 7 и Primer-BLAST. Нуклеотидные последовательности генов были взяты из базы данных GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)). Временной и температурный режим ПЦР для *mIL-1 $\beta$* , *mIL-4*, *mTGFB $\beta$*  и *mGAPDH*: 95 °С – 15 с (первый шаг – 5 мин), 62 °С – 20 с, 72 °С – 40 с, 45 циклов ПЦР; для *mTNF $\alpha$* : 95 °С – 15 с (первый шаг – 5 минут), 54 °С – 15 с, 72 °С – 45 с, 45 циклов ПЦР. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 72 °С. Анализ результатов проводили с использованием программы Bio-Rad CFX Manager 2.0. Уровень экспрессии мРНК генов *mTNF $\alpha$* , *mIL-1 $\beta$* , *mIL-6*, *mIL-4*, *mTGFB $\beta$*  в гиппокампе измеряли относительно экспрессии конститутивного гена *mGAPDH*, уровень экспрессии которого в образцах контрольной и облученной группы мышей был одинаков, и выражали как  $2^{-\Delta Ct}$ , где  $\Delta Ct = Ct_{\text{штоткина}} - Ct_{\text{GAPDH}}$ .  $Ct$  – пороговый уровень флуоресценции, соответствующий номеру цикла ПЦР исследуемого образца, в котором флуоресценция отличается от фонового шума. Относительный уровень экспрессии генов облученных животных рассчитывали по отношению к среднему значению для контрольной группы, который принимали за единицу.

#### Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента с использованием компьютерной программы OriginPro. Все данные, кроме данных ПЦР, представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего; данные ПЦР представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . При исследовании поведения и когнитивных функций в каждой экспериментальной группе было по 12–15 животных, при остальных исследованиях – по 6–8 животных.

### Результаты и обсуждение

#### Исследование поведения и когнитивных функций у мышей в отдаленный период после облучения

Перед анализом радиационно-индуцированных изменений когнитивных функций было исследовано влияние облучения на поведение животных в тесте «открытое поле». Согласно полученным данным (табл. 1), контрольные и облученные животные имели схожую горизонтальную и вертикальную двигательную активность – различия в общем пройденном пути, средней скорости и количестве стоек отсутствовали. В то же время, у мышей, подвергнутых фракционированному

облучению головы, было отмечено возрастание тревожности, выраженное в увеличении времени пребывания в пристеночной зоне арены (табл. 1).

Таблица 1

Анализ параметров поведения мышей в тесте «открытое поле» через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы

Analysis of parameters of mice behavior in the open field test 2 months after fractionated head  $\gamma$ -irradiation

Группа	Контроль	20 Гр
Общий пройденный путь, см	2901 ± 120	3162 ± 103
Средняя скорость, см/с	9,7 ± 0,4	10,5 ± 0,3
Длительность пребывания, с	в пристеночной зоне	173 ± 10
	в промежуточной зоне	94 ± 7
	в центральной зоне	33 ± 5
Количество стоек, ед.	24 ± 2	27 ± 1

Примечание: приведены средние значения ± погрешность среднего; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Когнитивные функции контрольных и облученных мышей в отдаленный период после воздействия анализировали с помощью нескольких тестов. Результаты исследования эпизодической памяти в тесте «распознавание нового объекта» приведены на рис. 1. Анализ параметров теста показывает, что фракционированное  $\gamma$ -облучение головы мышей не повлияло на общее время обследования животными обоих объектов, которое составило  $31,6 \pm 4,2$  с в контрольной группе и  $32,8 \pm 6,0$  с в облученной группе. Тем не менее, обнаружено снижение способности облученных животных к распознаванию нового объекта при тестировании через 24 ч после обучения (рис. 1а). Индекс распознавания у контрольных животных составил  $0,44 \pm 0,08$ , в то время как у облученных животных –  $0,02 \pm 0,09$  (рис. 1б), что свидетельствует о пострадиационном нарушении эпизодической памяти.

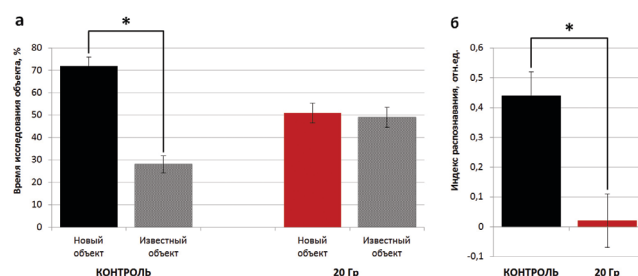


Рис. 1. Анализ состояния эпизодической памяти контрольных и облученных мышей в тесте «распознавание нового объекта» через 2 мес после окончания  $\gamma$ -облучения головы

а – время исследования объектов (время исследования каждого объекта выражено в процентах от общего времени исследования обоих объектов, принятого за 100%); б – индекс распознавания объектов; \* – отличия от контроля достоверны,  $p < 0,05$

Fig. 1. Analysis of recognition memory of control and irradiated mice using «novel object recognition» 2 months after head  $\gamma$ -irradiation  
 а – Exploration time of novel and familiar objects (the total exploration time of both objects was taken as 100%); б – discrimination index; \* – differences are significant compared to control,  $p < 0,05$

Для характеристики пространственной памяти животных использовали тест «водный лабиринт Морриса». При анализе среднего времени достижения платформы (латенция) выявлена схожая динамика обучения контрольных и облученных мышей (рис. 2а). При тестировании через 24 ч после окончания обучения различий между группами по данному параметру, а также по количеству пересечений зоны платформы обнаружено не было (латенция составила  $11,9 \pm 4,4$  с и  $18,7 \pm 5,0$  с,

количество пересечений –  $3,3 \pm 0,6$  и  $2,8 \pm 0,4$  ед. у контрольных и облученных мышей соответственно). В то же время, мыши, подвергнутые облучению головы, проводили в сравнении с контролем статистически значимо меньше времени в «целевом» квадранте (рис. 2б). Принимая во внимание схожую среднюю скорость ( $18,7 \pm 1,3$  см/с и  $18,4 \pm 0,5$  см/с у контрольных и облученных мышей соответственно), свидетельствующую об отсутствии нарушений двигательной активности, можно сделать вывод о снижении пространственной памяти у мышей через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы.

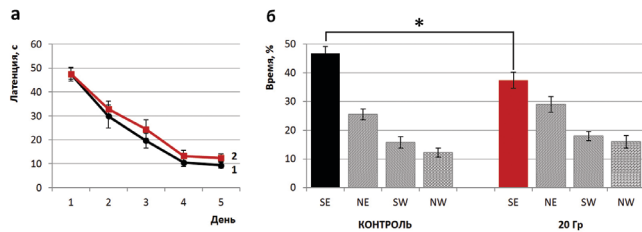


Рис. 2. Анализ состояния пространственной памяти контрольных и облученных мышей в тесте «водный лабиринт Морриса» через 2 мес после окончания  $\gamma$ -облучения головы

а – время достижения платформы контрольными (1) и облученными (2) мышами при обучении; б – процент времени, проведенного в квадрантах SE (целевой), NE (стартовый), SW (квадрант, противоположный стартовому) и NW (квадрант, противоположный целевому) при тестировании; \* – отличия от контроля достоверны,  $p < 0,05$

Fig. 2. Analysis of spatial memory of control and irradiated mice using «Morris water maze» 2 months after head  $\gamma$ -irradiation

а – latency of control (1) and irradiated (2) mice during learning phase; б – time spent in SE (target), NE (start), SW (opposite to start) and NW (opposite to target) quadrants during test phase; \* – differences are significant compared to control,  $p < 0,05$

Обстановочную ассоциативную память контрольных и облученных животных оценивали в тесте «условно-рефлекторное замирание». Значения продолжительности актов замирания приведены в табл. 2. Согласно полученным данным у контрольных мышей и мышей, подвергнутых фракционированному  $\gamma$ -облучению головы, через 2 мес после воздействия уровень замираний составлял менее 2 % до обучения (спонтанные замирания, группы «активного контроля») и значительно увеличивался непосредственно после обучения, не снижаясь при повторном попадании в известную обстановку во время тестирования через 24 ч после обучения. Статистически значимых различий по этому показателю между контрольными и облученными мышами не выявлено, что свидетельствует об отсутствии нарушений обстановочной ассоциативной памяти в исследованный период после облучения.

Таким образом, при использовании набора специальных тестов нами были получены данные, указывающие на повышение тревожности и нарушение когнитивных функций, таких как эпизодическая и пространственная память, у мышей через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы в суммарной дозе 20 Гр. Близкие данные получены Rao et al [10] при облучении головы молодых мышей в возрасте 1 мес в дозе 20 Гр за 5 фракций при ежедневном облучении. Эти авторы не наблюдали снижения когнитивных функций в тесте распознавания нового объекта через 1 мес после воздействия, но нарушения в этом тесте регистрировались у животных спустя 5 мес, а при использовании теста распознавания нового положения объекта нарушения были обнаружены и через 1, и через 5 мес, что очень близко к полученным нами ре-

Таблица 2

Анализ параметров обстановочной ассоциативной памяти мышей в тесте «условно-рефлекторное замирание» через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы  
Analysis of parameters of mice context fear memory in the fear conditioning task 2 months after fractionated head  $\gamma$ -irradiation

Группа	Контроль		20 Гр	
	Продолжительность актов замирания*, %	До обучения	$1,3 \pm 0,4$	До обучения
	После обучения	$77,9 \pm 4,2$	После обучения	$71,4 \pm 5,5$
	При тестировании	$69,1 \pm 4,2$	При тестировании	$71,6 \pm 5,3$

Примечание: \* – приведены значения для времени тестирования равного 3 мин, принятого за 100 %; данные указаны в виде среднего значения  $\pm$  погрешность среднего

зультатам. Ранее нами показано возникновение нарушений пространственной памяти, а кроме того, снижение способности мышей к обучению, основанному на использовании пространственной памяти, в тесте «водный лабиринт Морриса» через 2 мес после однократного  $\gamma$ -облучения головы в дозе 8 Гр [8]. Нарушения способности мышей к обучению в этот период после фракционированного облучения в суммарной дозе 20 Гр не наблюдали (рис. 2а). Учитывая данные Karlsson et al [11] об эквивалентности однократного облучения в дозе 8 Гр фракционированному облучению в суммарной дозе 18 Гр (9 фракций по 2 Гр), близкой к использованной в настоящей работе, можно заключить, что фракционированное облучение головы в суммарной дозе 20 Гр приводит к менее выраженному нарушению функций головного мозга, чем однократное облучение в дозе 8 Гр.

#### Исследование состава клеток, выделенных из мозга мышей через 2 мес после облучения головы

При исследовании состава клеток, выделенных из головного мозга контрольных и облученных мышей через 2 мес после воздействия, обнаружено снижение содержания клеток микроглии (Iba1<sup>+</sup>-клеток) (табл. 3). Содержание микроглиоцитов было снижено, в основном, за счет покоящейся микроглии (клетки с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>), а доля клеток активированной микроглии увеличилась в 2,5 раза в сравнении с контролем (табл. 3). При анализе поляризации микроглии в провоспалительный M1-фенотип и противовоспалительный M2-фенотип, проведенном после окрашивания CD11b<sup>+</sup>-клеток антителами к CD86 и CD206 (идентификация клеток M1- и M2-микроглии соответственно), обнаружено значимое уменьшение размера субпопуляции провоспалительной M1-микроглии с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup> в общей популяции CD11b<sup>+</sup>-клеток и сохранение размера субпопуляции противовоспалительной M2-микроглии с фенотипом CD11b<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> на уровне контроля. Содержание астроцитов (GFAP<sup>+</sup>-клеток) также было снижено (табл. 3).

Наблюдаемые изменения клеточного состава могут быть связаны как с гибелью клеток, так и с длительным снижением способности к пролиферации клеток микроглии и астроцитов после облучения. Поэтому далее было исследовано содержание доли пролиферирующих клеток, в том числе среди клеток микроглии и астроцитов. Полученные результаты приведены в табл. 4. Показано значимое уменьшение общего количества пролиферирующих клеток (BrdU<sup>+</sup>-клеток) и пролиферирующих клеток микроглии (BrdU<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>) через 2 мес после облучения. Аналогичные данные о длительном – до 6 мес – снижении пролиферации микроглии после однократного облучения головы мышей в дозе 20 Гр на фоне травмы были получены в работе [12].

Таблица 3

Содержание глиальных клеток в составе выделенных препаратов клеток головного мозга мышей через 2 мес после  $\gamma$ -облучения головы

The content of glial cells in brain samples obtained from mice 2 months after head  $\gamma$ -irradiation

Тип клеток	Контроль, %	20 Гр, %
Микроглия (Iba1 <sup>+</sup> )	10,10 ± 1,07	6,00 ± 0,89*
Покоящаяся микроглия (CD11b <sup>+</sup> /CD45 <sup>low</sup> )	11,5 ± 1,8	4,4 ± 0,5*
Активированная микроглия (CD11b <sup>+</sup> /CD45 <sup>high</sup> )	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,02
Доля клеток активированной микроглии	2,0 ± 0,2	4,9 ± 0,5*
M1-микроглия (CD11b <sup>+</sup> /CD86 <sup>+</sup> )	1,36 ± 0,09	0,36 ± 0,17*
M2-микроглия (CD11b <sup>+</sup> /CD206 <sup>+</sup> )	1,22 ± 0,24	1,22 ± 0,23
Астроциты (GFAP <sup>+</sup> )	2,88 ± 0,47	1,40 ± 0,24*

**Примечание:** Значения приведены в % от общего количества клеток в препаратах, выделенных из головного мозга контрольных и облученных животных, доля активированной микроглии – в % от общего количества клеток микроглии; приведены средние значения ± погрешность среднего; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Таблица 4

Содержание пролиферирующих глиальных клеток в составе выделенных препаратов клеток головного мозга мышей через 2 мес после  $\gamma$ -облучения головы

The content of proliferating glial cells in brain samples obtained from mice 2 months after head  $\gamma$ -irradiation

Группа	Количество, %		
	BrdU <sup>+</sup>	BrdU <sup>+</sup> /Iba1 <sup>+</sup>	BrdU <sup>+</sup> /GFAP <sup>+</sup>
Контроль	1,21 ± 0,24	0,20 ± 0,04	0,63 ± 0,20
20 Гр	0,56 ± 0,09*	0,08 ± 0,03*	0,42 ± 0,08

**Примечание:** приведены средние значения ± погрешность среднего; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Обнаруженное снижение пролиферации клеток мозга в отдаленный период после облучения головы в суммарной дозе 20 Гр свидетельствует о том, что в снижении популяции клеток микроглии (Iba1<sup>+</sup>, или CD11b<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup> клеток) существенный вклад вносит подавление их пролиферации, в то время как снижение количества астроцитов, по-видимому, преимущественно связано с их распадом. Rao et al [10], используя, как упоминалось выше, схожую дозу и режим облучения, обнаружили при иммуногистохимическом исследовании уменьшение общего количества пролиферирующих (Ki-67<sup>+</sup>) клеток и DCX<sup>+</sup>-клеток в субгранулярной зоне зубчатой извилины гиппокампа мышей через 72 ч, которое сохранялось и через 1 мес после воздействия, что коррелирует с полученными нами результатами при исследовании количества пролиферирующих клеток в выделенной суспензии клеток мозга через 2 мес после облучения. Полученные результаты о повышении доли активированной микроглии в исследованных препаратах клеток головного мозга можно рассматривать как свидетельство развития нейровоспаления. Для подтверждения присутствия признаков воспаления в мозге через 2 мес после облучения головы мышей анализировали уровень экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе – наиболее радиочувствительной области мозга.

**Исследование уровня экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в гиппокампе мышей в отдаленный период после облучения головы**

При исследовании относительного уровня экспрессии генов цитокинов в гиппокампе мышей через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы обнаружено достоверное повышение уровня экспрессии гена

провоспалительного цитокина TNF $\alpha$  и статистически незначимое повышение уровней экспрессии генов провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6 (рис. 3), что, наряду с повышением доли клеток активированной микроглии свидетельствует о развитии нейровоспаления.

В то же время, повышенный уровень экспрессии противовоспалительного цитокина IL-4 (рис. 3) в совокупности с данными о преобладании M2-микроглии через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы в суммарной дозе 20 Гр свидетельствуют о присутствии в этих условиях компенсаторного восстановительного процесса. Изменение соотношения провоспалительной M1- и противовоспалительной M2-микроглии может происходить под воздействием IL-4 [13], секретируемого, по-видимому, нейронами в ответ на сублетальные повреждения, что показано, в частности, при ишемии [14].

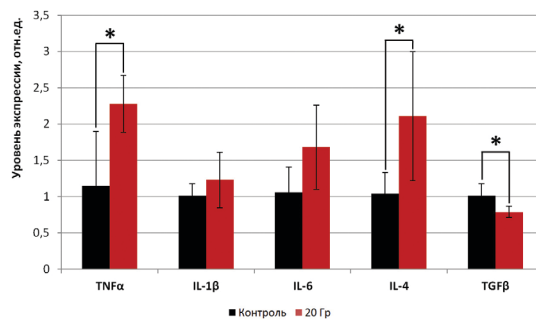


Рис. 3. Относительный уровень экспрессии генов цитокинов в гиппокампе мышей через 2 мес после  $\gamma$ -облучения головы. Приведены средние значения ± стандартное отклонение; \* – отличия статистически значимы в сравнении с контролем,  $p < 0,05$

Fig. 3. Relative levels of cytokine gene expression in the hippocampus of mice 2 months after head  $\gamma$ -irradiation. Data are presented as mean ± standard deviation; \* – differences are significant compared to control,  $p < 0.05$

Следует отметить, что ранее нами через 2 мес после облучения головы мышей в дозе 20 Гр было обнаружено повышение количества нейронов, содержащих белки, модифицированные продуктом перекисного окисления липидов 4-гидрокси-2-ноненалем [15]. Полученные в настоящем исследовании данные о развитии нейровоспаления в этот период позволяют полагать, что эти изменения отражают окислительное повреждение нейронов под действием метаболитов нейровоспаления.

**Заключение**

В отдаленный период – через 2 мес – после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы в суммарной дозе 20 Гр у мышей обнаружено повышение тревожности и развитие нарушений эпизодической и пространственной памяти при сохранении обстановочной ассоциативной памяти у животных на уровне контроля. В указанный период после облучения у мышей обнаружено снижение количества клеток микроглии, увеличение доли активированной микроглии, изменение соотношения M1-/M2-микроглии, снижение содержания астроцитов, а также снижение общего количества пролиферирующих клеток, в том числе пролиферирующих клеток микроглии. Пострадиационное снижение количества клеток микроглии в отдаленный период может приводить не только к снижению иммунной защиты мозга, но к нарушению системы обеспечения функционирования нейронов с участием микроглии, т.к. клетки микроглии участвуют в ремоделировании синапсов нейронов [16].



В гиппокампе мышей через 2 мес после фракционированного  $\gamma$ -облучения головы обнаружено повышение уровня экспрессии генов про- и одного из противовоспалительных цитокинов, свидетельствующее, в совокупности с данными о повышении доли клеток активированной микроглии, о развитии нейровоспаления в этот период. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что в основе обнаруженных отдаленных когнитивных нарушений после облучения головы мышей в дозе 20 Гр лежит нарушение гомеостаза глияльных клеток мозга: снижение количества клеток ми-

кроглии и астроцитов, увеличение доли активированной микроглии и сохраняющийся сниженный уровень пролиферации клеток мозга, включая пролиферацию клеток микроглии. Совокупность обнаруженных нарушений в сочетании с длительным действием повреждающих факторов нейровоспаления приводит к нарушению функций нейронов и ЦНС в целом. Обнаруженные нарушения могут быть использованы в качестве перспективных маркеров при экспериментальном исследовании потенциальных лекарственных средств для профилактики и лечения пострadiационного нейровоспаления.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Katano A., Yamashita H. Brain Metastasis: Recent Treatment Modalities and Future-Perspectives // *Oncol. Lett.* 2022. V.23, No. 6. P. 191. DOI: 10.3892/ol.2022.13311.
- Зайцев А.М., Куржупов М.И., Потапова Е.А., Кирсанова О.Н. Лечение метастатического поражения головного мозга // *Research'n Practical Medicine Journal.* 2015. Т.2, № 2. С. 8–14. DOI: 10.17709/2409-2231-2015-2-2-8-14.
- Вторичное злокачественное новообразование головного мозга и мозговых оболочек: Клинические рекомендации. 2020. URL: <https://rccrst.ru/klinicheskie-rekomendaczii.html>. (Дата обращения 01.07.2022).
- Pazzaglia S., Briganti G., Mancuso M., Saran A. Neurocognitive Decline Following Radiotherapy: Mechanisms and Therapeutic Implications // *Cancers (Basel).* 2020. V.12, No. 1. P. 146. DOI: 10.3390/cancers12010146. PMID: 31936195.
- Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., et al. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury // *Mol. Neurobiol.* 2017. V.54, No. 2. P. 1022–1032. DOI: 10.1007/s12035-015-9628-x. PMID: 26797684.
- Turnquist C., Harris B.T., Harris C.C. Radiation-Induced Brain Injury: Current Concepts and Therapeutic Strategies Targeting Neuroinflammation // *Neuro-Oncology Advances.* 2020. V.2, No. 1. P. vdaa057. DOI: 10.1093/oaajnl/vdaa057. PMID: 32642709.
- Lumniczky K., Szatmari T., Safrany G. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain // *Front. Immunol.* 2017. No. 8. P. 517. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00517. PMID: 28529513.
- Жирник А.С., Смирнова О.Д., Семочкина Ю.П., Шибалева К.Д., Родина А.В., Ратушняк М.Г. и др. Нарушение когнитивных функций и развитие нейровоспаления в отдаленный период после однократного  $\gamma$ -облучения головы мышей. *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2021. Т.61, № 1. С. 32–43. DOI: 10.31857/S0869803121010112.
- Legroux L., Pittet C.L., Beauseigle D., Deblois G., Prat A., Arbour N. An Optimized Method to Process mouse CNS to Simultaneously Analyze Neural Cells and Leukocytes by Flow Cytometry // *J. Neurosci Methods.* 2015. No. 247. P. 23–31. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.021. PMID: 25819540.
- Rao A.A., Ye H., Decker P.A., Howe C.L., Wetmore C. Therapeutic Doses of Cranial Irradiation Induce Hippocampus-Dependent Cognitive Deficits in Young Mice // *Journal of Neuro-Oncology.* 2011. V.105, No. 2. P. 191–198. DOI: 10.1007/s11060-011-0582-9. PMID: 21499912.
- Karlsson N., Kalm M., Nilsson M.K., Mallard C., Bjork-Eriksson T., Blomgren K. Learning and Activity after Irradiation of the Young Mouse Brain Analyzed in Adulthood Using Unbiased Monitoring in a Home Cage Environment. *Radiat // Res.* 2011. V.175, No. 3. P. 336–346. DOI: 10.1667/RR2231.1.
- Belcher E.K., Sweet T.B., Karaahmet B., Dionisio-Santos D.A., Owlett L.D., Leffler K.A., et al. Cranial Irradiation Acutely and Persistently Impairs Injury-Induced Microglial Proliferation // *Brain, Behavior, & Immunity - Health.* 2020. No. 4. P. 100057. DOI: 10.1016/j.bbih.2020.100057.
- He Y., Gao Y., Zhang Q., Zhou G., Cao F., Yao S. IL-4 Switches Microglia/Macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH // *Neuroscience.* 2020. No. 437. P. 161–171. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.008.
- Zhao X., Wang H., Sun G., Zhang J., Edwards N.J., Aronowski J. Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage // *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience.* 2015. V.35, No. 32. P. 11281–11291. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015.
- Москалева Е.Ю., Родина А.В., Семочкина Ю.П., Высоцкая О.В. Анализ маркеров окислительного повреждения нейронов и нейровоспаления в отдаленный период после  $\gamma$ -облучения головы мышей в разных дозах // *Радиационная биология. Радиоэкология.* 2022. Т.62, № 2. С. 187–195. DOI: 10.31857/S0869803122020059.
- Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2013. V.8, No. 3. P. 494–509. DOI: 10.1007/s11481-013-9434-z.

## REFERENCES

- Katano A., Yamashita H. Brain Metastasis: Recent Treatment Modalities and Future-Perspectives. *Oncol Lett.* 2022;23;6:191. DOI: 10.3892/ol.2022.13311.
- Zaytsev A.M., Kurzhupov M.I., Potapova Ye.A., Kirsanova O.N. Treatment of Metastatic Brain Lesion. *Research and Practical Medicine Journal.* 2015;2;2:8–14. DOI: 10.17709/2409-2231-2015-2-2-8-14 (In Russ.).
- Vtorichnoye Zlokachestvennoye Novoobrazovaniye Golovnogo Mozga i Mozgovykh Obolochek = Secondary Malignant Neoplasm of the Brain and Meninges. Clinical Guidelines.* 2020. URL: <https://rccrst.ru/klinicheskie-rekomendaczii.html>. (Accessed 01.07.2022) (In Russ.).
- Pazzaglia S., Briganti G., Mancuso M., Saran A. Neurocognitive Decline Following Radiotherapy: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Cancers (Basel).* 2020;12;1:146. DOI: 10.3390/cancers12010146. PMID: 31936195.
- Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., et al. Pathophysiological Responses in Rat and Mouse Models of Radiation-Induced Brain Injury. *Mol Neurobiol.* 2017;54;2:1022–1032. DOI: 10.1007/s12035-015-9628-x. PMID: 26797684.
- Turnquist C., Harris B.T., Harris C.C. Radiation-Induced Brain Injury: Current Concepts and Therapeutic Strategies Targeting Neuroinflammation. *Neuro-Oncology Advances.* 2020;2;1:vdaa057. DOI: 10.1093/oaajnl/vdaa057. PMID: 32642709.
- Lumniczky K., Szatmari T., Safrany G. Ionizing Radiation-Induced Immune and Inflammatory Reactions in the Brain. *Front. Immunol.* 2017;8:517. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00517. PMID: 28529513.
- Zhirnik A.S., Smirnova O.D., Semochkina Yu.P., Shibayeva K.D., Rodina A.V., Ratushnyak M.G., et al. Cognitive Impairment and Induction of Neuroinflammation in the Late Period after Single Whole Brain  $\gamma$ -Irradiation of Mice. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology.* 2021;61;1:32–43. DOI: 10.31857/S0869803121010112 (In Russ.).
- Legroux L., Pittet C.L., Beauseigle D., Deblois G., Prat A., Arbour N. An Optimized Method to Process mouse CNS to Simultaneously Analyze Neural Cells and Leukocytes by Flow Cytometry. *J. Neurosci Methods.* 2015;247:23–31. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.021. PMID: 25819540.

10. Rao A.A., Ye H., Decker P.A., Howe C.L., Wetmore C. Therapeutic Doses of Cranial Irradiation Induce Hippocampus-Dependent Cognitive Deficits in Young Mice. *Journal of Neuro-Oncology*. 2011;105;2:191–198. DOI: 10.1007/s11060-011-0582-9. PMID: 21499912.
11. Karlsson N., Kalm M., Nilsson M.K., Mallard C., Bjork-Eriksson T., Blomgren K. Learning and Activity after Irradiation of the Young Mouse Brain Analyzed in Adulthood Using Unbiased Monitoring in a Home Cage Environment. *Radiat. Res*. 2011;175;3:336–346. DOI: 10.1667/RR2231.1.
12. Belcher E.K., Sweet T.B., Karaahmet B., Dionisio-Santos D.A., Owlett L.D., Leffler K.A., et al. Cranial Irradiation Acutely and Persistently Impairs Injury-Induced Microglial Proliferation. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*. 2020;4:100057. DOI: 10.1016/j.bbih.2020.100057.
13. He Y., Gao Y., Zhang Q., Zhou G., Cao F., Yao S. IL-4 Switches Microglia/Macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. *Neuroscience*. 2020;437:161–171. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.008.
14. Zhao X., Wang H., Sun G., Zhang J., Edwards N.J., Aronowski J. Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2015;35;32:11281–11291. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1685-15.2015.
15. Moskaleva Ye.Yu., Rodina A.V., Semochkina Yu.P., Vysotskaya O.V. Analysis of Markers of Oxidative Damage of Neurons and Neuroinflammation Late after  $\gamma$ -Irradiation of the Mice Head at Different Doses. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya = Radiation Biology. Radioecology*. 2022;62;2:187–195. DOI: 10.31857/S0869803122020059 (In Russ.).
16. Eyo U.B., Dailey M.E. Microglia: Key Elements in Neural Development, Plasticity, and Pathology. *J. Neuroimmune Pharmacol*. 2013;8;3:494–509. DOI: 10.1007/s11481-013-9434-z.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** НИЦ «Курчатовский институт».

**Участие авторов.** Статья подготовлена с равным участием авторов.

**Поступила:** 20.06.2022. Принята к публикации: 25.08.2022.

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

**Financing.** Research Center Kurchatov Institute.

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

**Article received:** 20.06.2022. Accepted for publication: 25.08.2022.