

УТВЕРЖДАЮ

И.О. директора Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Института теоретической и
экспериментальной биофизики
Российской академии наук



01.09.2022
к.ф.-м.н. Селезнева Ирина Ивановна

« 1 » сентября 2022 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу
БЛОХИНОЙ Таяны Михайловны

**«Повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови и спленоцитов
млекопитающих при моделировании воздействия космического ионизирующего
излучения»,**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.1. – радиобиологии

Актуальность избранной темы

Диссертация Блохиной Т.М. посвящена изучению повреждений ДНК лимфоцитов крови и спленоцитов млекопитающих в наземных экспериментах, моделирующих условия космических полетов, в которых на живые организмы оказывают воздействие ионизирующие излучения с разной линейной передачей энергии (ЛПЭ) и моделируемая микрогравитация с ограничением движений животных.

Если исключить возможность радиационных аварий и террористических актов, то основные задачи радиобиологических исследований в настоящее время связаны с решением проблем радиотерапии и освоением космоса. Побочным эффектом облучения организмов при радиотерапии и длительных полетах является возникновение злокачественных новообразований, что делает актуальным изучение последствий воздействия ионизирующих излучений (ИИ) как для выявления факторов риска и

с отзывом отряда имени Блохиной ТМ 07.09.2022
ТМ

ВХОД №	<i>4015</i>
ДАТА	<i>08 СЕН 2022</i>
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	<i>8</i>
ФГБУ ГИЦ ФМБЦ им. А.И. Буцаева ФМБА России	

обеспечения безопасности космонавтов, так и для оптимизации протоколов лечения онкологических пациентов. В отличие от пучка фотонов/ускоренных частиц, направленного на локальный участок тела пациента, воздействие ИИ при планируемых космических полетах осуществляется на весь организм. Высокоэнергетические частицы (10^6 – 10^{21} эВ) и фотоны из внеземных источников, находящихся внутри и вне нашей галактики, индуцируют повреждения ДНК клеток крови летчиков, совершающих высотные полеты, и космонавтов, несмотря на низкие дозы и небольшие мощности доз. В этой связи востребованы исследования воздействия на живые организмы и фотонов, и ускоренных частиц. В последнее время большой интерес представляют исследования с применением ускоренных протонов/тяжелых ионов, поскольку основную энергию они отдают в конце пробега в пике Брэгга, что увеличивает тяжесть радиационного поражения. Известно, что воздействие ускоренных тяжелых ионов приводит к возникновению кластерных повреждений ДНК, трудно репарируемых или не репарируемых. Исследования молекулярно-клеточных нарушений, возникающих после воздействия ИИ с разной ЛПЭ на головной мозг, представляются важными для поиска путей снижения не только индукции онкогенеза, но и когнитивных дисфункций, что особенно важно при длительных космических полетах. Другим стрессовым фактором при космических полетах является микрогравитация, влияние этого фактора в сочетании с воздействием ИИ с разной ЛПЭ до сих пор остается недостаточно выясненным.

Актуальность избранной автором темы исследований не вызывает сомнений. Эксперименты оценки защитных свойств материалов, имитирующих оболочку космического корабля, проведены с использованием традиционной для радиобиологических задач животной модели – генетически гетерогенных мышей. Эксперименты для оценки повреждений ДНК лимфоцитов крови в условиях, моделирующих космические полеты, проведены на более редком объекте – обезьянах, что делает эти исследования более ценными, поскольку широко используемый объект – мышь (лимфоидный тип кроветворения) отличается от приматов/человека (миелоидный тип кроветворения) формой кроветворения, а также эффективностью систем репарации ДНК.

Научная новизна и оценка достоверности результатов и выводов исследования

В работе Блохиной Т.М. удалось выявить периметрические эффекты воздействия высокоэнергетических ядер криптона-84 на головной мозг, проявившихся в виде

повышенного уровня повреждений ДНК лимфоцитов крови. Было обнаружено, что моделируемая в наземных экспериментах микрогравитация с ограниченным движением как сама, так и в сочетании с радиационным воздействием (гамма-излучение и ускоренные ионы углерода-12) приводит к увеличению доли поврежденных лимфоцитов в крови обезьян. В дополнение к этим экспериментам была проведена оценка защитных свойств материалов, имитирующих оболочку космического корабля, и этих материалов в сочетании с традиционными защитными материалами, а также регистрируемых в лимфоцитах мышей генотоксических эффектов вторичных излучений, образующихся при прохождении пучка ускоренных протонов через бетонную преграду. Достоверность различий оценена с использованием t-критерия Стьюдента.

Все полученные автором экспериментальные результаты являются новыми и были представлены на международной и российской конференциях с международным участием.

Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК

Диссертационная работа Блохиной Т.М. имеет структуру, соответствующую установленным правилам ВАК, и состоит из введения, обзора литературных данных, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы.

Глава «Обзор литературы» отражает современное состояние исследований по теме диссертации. В ней представлены два параграфа – «Компоненты космического излучения» и «Влияние компонентов космического позирующего излучения на ДНК». В первом параграфе подробно описаны солнечный ветер и радиационный пояс, галактические космические лучи и вторичное излучение, возникающее в результате взаимодействия космического излучения с материалом космического корабля. Во втором параграфе описаны повреждения и репарация ДНК, выявление уровня критических для жизнеспособности клетки двуниевых разрывов ДНК с помощью гамма¹²AХ-фокусов и цитогенетические нарушения.

В главе «Материалы и методы» описаны дизайн и условия облучения ускоренными ядрами/ионами и фотонами, а также протоны с возможностью возникновения вторичного излучения, процедуры работы с животными, взятие аликвот крови, получение лимфоцитов крови и спленоцитов мышей. Отдельно описаны процедуры

комбинированного воздействия ИИ и микрогравитации в наземных условиях эксперимента. Затем следуют описания методов регистрации радиобиологических эффектов и статистический анализ полученных результатов.

Третья, заключительная, глава «Результаты и обсуждение» представляет результаты экспериментальной проверки предложенного в диссертации подхода по изучению биологических эффектов ИИ с разной ЛПО. Эксперименты с животными предусматривает анализ доза-эффект гамма-облученной *in vitro* крови обезьян в диапазоне доз 1-5 Гр; определяли долю клеток крови с повышенным уровнем повреждений ДНК. По расчетам автора в последующих экспериментах в малом объеме мозга, куда попадал пучок ядер криптона-84, локальная доза достигала 3 Гр, что соответствует примерно центральной области на кривой доза-эффект. Логически работа разбита на две части:

(1) результаты экспериментов по оценке доли лимфоцитов в крови с повышенным уровнем повреждений ДНК после локального облучения головного мозга обезьян ускоренными ядрами криптона-84, а также после гамма-облучения всего тела и дополнительного облучения ускоренными ионами углерода-12 головы обезьян в сочетании с имитацией микрогравитации с ограничением движений животного и без них.

Было обнаружено, что (а) локальное облучение головного мозга обезьян в дозе 3 Гр приводит к статистически значимому увеличению доли лимфоцитов крови с повышенным уровнем повреждений ДНК, эффект сохраняется вплоть до 42 суток после облучения; (б) моделируемая в наземных экспериментах микрогравитация с ограничением движений как сама, так и в сочетании с указанным радиационным воздействием приводит к статистически значимому увеличению доли поврежденных лимфоцитов в крови обезьян.

(2) результаты экспериментов по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля по критерию доли лимфоцитов в крови мышей с повышенным уровнем повреждений ДНК, а также результаты экспериментов по оценке гепатоксических эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка ускоренных протонов через бетонную преграду, по критериям органного индекса селезенки мышей, доли лимфоцитов с повышенным уровнем повреждений ДНК, доли апоптотических лимфоцитов.

Было обнаружено, что (а) оболочка проектируемого транспортного корабля не позволяет существенно снизить ДНК-повреждающий эффект ускоренных протонов; (б)

бетонная защита позволяет существенно снизить генотоксические эффекты (по указанным критериям) первичного протонового излучения, но с увеличением толщины бетона вторичное излучение вызывает повреждения спленоцитов.

Глава завершается Заключением, в котором автор кратко резюмирует основные выводы диссертации и предлагает возможные применения полученных результатов.

Список литературы включает 173 наименования.

Значимость результатов для соответствующей области науки и рекомендации по использованию результатов и выводов

Диссертационная работа Блохиной Т.М. содержит результаты, представляющие как фундаментальную, так и прикладную значимость. Полученные данные позволят понимать процессы, происходящие в организмах космонавтов во время длительного пребывания на космических кораблях и станциях, и могут быть использованы для оптимизации мер по защите здоровья космонавтов. Результаты по оценке радиозащитных свойств различных материалов и генотоксических эффектов, производимых вторичным излучением, могут учитываться для защиты космических кораблей и баз. Результаты работы будут востребованы при чтении лекций по радиобиологии/космобиологии и медицине.

При анализе работы возникли следующие вопросы и замечания:

1. В оглавлении сразу после «Введения» отсутствует название главы – «Обзор литературы».
2. В главе «Материалы и методы» недостаточно описано облучение обезьян ионами углерода: нет характеристики источников излучений, не указано, выполнялось облучение в пике Брэгга или вне его.
3. В главе «Результаты и обсуждение» представлены, в основном, результаты, обсуждение недостаточно полное.
4. В литературном обзоре приведен подраздел, посвященный цитогенетическим нарушениям, но в результатах нет регистрации ни хромосомных aberrаций, ни микроядер. С какой целью приведена эта информация?
5. Жаль, что работа оформлена слишком аскетично, без фотографий гаммаH2AX-фокусов и без приедения первичных данных, полученных на проточном цитофлуориметре, что не позволяет оценить качество материала и обработку результатов цитометрии конкапелем.

6. Для статистического анализа привлечен лишь t-тест по Стьюденту, необходимо было использовать и другие статистические анализы: как правило, при сопоставлении трех и более выборок используют методы дисперсионного анализа.

Замечания по автореферату:

1. В автореферате не включены в перечень базовых организаций учреждения, где выполнялось облучение на ускорителях, в то время как значительная часть работы по облучению и физическому моделированию зашитных конструкций выполнялась, по всей видимости, там.
2. Ошибочно указан год предполагаемой защиты.
3. Стр. 3: слишком категоричное утверждение о фатальности негомологичного соединения концов, здесь необходимо разъяснение о «грязных» концах разрывов, образующихся при воздействии ионизирующей радиации.
4. Слишком категоричное утверждение о том, что облучался именно гишпакамид, для этого необходимо привести результаты томографии и стереотаксиса.
5. В тексте присутствуют отдельные термины на английском языке, имеющие устоявшиеся русскоязычные эквиваленты.
6. Стр. 19, рис. 4 – не приведены значения вероятностей, хотя рамки сопоставления присутствуют.
7. Несмотря на корректное отображение количества публикаций (3) в журналах из рекомендованного ВАК перечня в тексте автореферата, в итоговом списке публикаций (стр. 26, «Список статей... в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК») были все печатные работы соискателя (5), две из которых опубликованы в сборниках материалов конференций, в перечне рекомендованных ВАК изданий по состоянию на 01.02.2022, не обнаруживаемых (ссылка на перечень - <https://vak.minobrnauki.gov.ru/uploader/loader?type=19&name=91107547002&f=11305>).

Несмотря на высказанные замечания, данная работа имеет несомненную ценность, поскольку выполняется на приматах, система репарации которых близка человеку, и с привлечением облучения с разпой ЛНД, указанные недостатки не влияют на общую оценку диссертационной работы Блохиной Татяны Михайловны.

Заключение

Диссертационная работа «Повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови и макрофагов млекопитающих при моделировании воздействия космического ионизирующего излучения» по своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и научно-практической значимости удовлетворяет требованиям п. 9 «Приложения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор – Блохина Татьяна Михайловна – заслуживает присвоения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1. – радиобиология.

Диссертация и отзыв обсуждены и утверждены на семинаре Лаборатории радиационной молекулярной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) 31 августа 2022 г. (протокол № 162).

Зав. лабораторией
радиационной молекулярной биологии
ИТЭБ РАН
к.б.н.
01.09.2022

Handwritten mark

Е.А. Кузнецова



Подпись: Кузнецова Елена Александровна
Удостоверено: *Handwritten signature* **Э.А.К.**

Handwritten signature

Сведения о ведущей организации

Наименование организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН).

Полный почтовый адрес:

142290, г. Пушкино, Московская область, ул. Институтская д.3

Тел. (495) 632-78-69

Факс (4967) 33-05-53

E-mail: office@iteb.ru

Сайт ИТЭБ РАН: <https://iteb.ru/>

Список публикаций сотрудников ИТЭБ РАН по теме диссертации Блохиной Т.М.

1. Abdullaev S., Minkabirova G., Kartmanova E., Bruskov V., Gaziev A.I. Melformin prolongs survival rate in mice and causes increased excretion of cell-free DNA in the urine of X-irradiated rats. // *Mutat Res Gen Tox En*. 2018. V. 831. P. 13-18. doi: [org/10.1016/j.mrgentox](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox).
2. Sirotа N, Kuznetsova E, Mitroshina I. The level of DNA damage in mouse hematopoietic cells and in frog and human blood cells, as induced by the action of reactive oxygen species in vitro // *Radiat Environ Biophys*. 2018. V. 57. № 2. P. 115-121. doi: [10.1007/s00411-018-0732-y](https://doi.org/10.1007/s00411-018-0732-y). Epub 2018 Feb 21.
3. Anlipova V.N., Lomaeva M.G., Zyrina N.V. Mitochondrial DNA deletions in tissues of mice after ionizing radiation exposure // *Int J Radiat Biol*. 2018. V. 94. № 3. P. 282-288.
4. Abdullaev S., Gubina N., Bulanova T., Gaziev A. Assessment of Nuclear and Mitochondrial DNA, Expression of Mitochondria-Related Genes in Different Brain Regions in Rats after Whole-Body X-ray Irradiation // *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(4), 1196. DOI: [10.3390/ijms21041196](https://doi.org/10.3390/ijms21041196).
5. Abdullaev S., Bulanova T., Timoshenko G., Gaziev A. Increase of mtDNA number and its mutant copies in rat brain after exposure to 150 MeV protons // *Mol Biol Rep* 2020, 47, 4815-4820. DOI: [10.1007/s11033-020-05491-7](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05491-7), <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11033-020-05491-7.pdf>
6. Kuznetsova E.A., Sirotа N.P., Mitroshina I.Y., Pikalov V.A., Smirnova E.N., Rozanova O.M., Glukhov S.I., Sirotа T.V., Zaichkina S.I. DNA damage in blood leukocytes from mice irradiated with accelerated carbon ions with an energy of 450MeV/nucleon // *Int J Radiat Biol*, 2020, 96(10), 1245-1253. DOI: [10.1080/09553002.2020.1807640](https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1807640), <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1807640>
7. Абдуллаев С. А., Евдокимовский Э. В., Газиев А. И. Исследование количества копий и гетероплазмии митохондриальной ДНК в различных областях головного мозга крыс после краниального воздействия протонов // *Радиационная биология. Радиэкология*, 2020, 60(1), 5–11. DOI: [10.31857/S0869803120010038](https://doi.org/10.31857/S0869803120010038)
8. Abdullaev S.A., Evdokimovskii E.V., Gaziev A.I. A study of mitochondrial DNA copy number and heteroplasmy in different rat brain regions after cranial proton impact. // *Biology Bulletin*. 2020, 47(11), 19-24. DOI: [10.1134/S1062359020110023](https://doi.org/10.1134/S1062359020110023)
9. Milić M., Ceppi M., Bruzzone M., et al. The hCOMET project: international database comparison of results with the comet assay in human biomonitoring. *Baseline frequency of DNA damage and effect of main confounders* // *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2021, v. 787, 108371-108399. doi:[10.1016/j.mrrev.2021.108371](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108371) <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108371>