ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ –
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ИМЕНИ А.И. БУРНАЗЯНА»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ
ИМ. Н.Н. СЕМЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Блохина Таисия Михайловна

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И СПЛЕНОЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОСМИЧЕСКОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Специальность 1.5.1. Радиобиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор РАН
Осипов Андреян Николаевич

Москва-2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5

1.1. Компоненты космического излучения 14

1.1.1 Солнечный ветер и радиационный пояс 15

1.1.2 Галактические космические лучи 19

1.1.3 Вторичное излучение 22

1.2 Влияние компонентов космического ионизирующего излучения на ДНК 25

1.2.1 Повреждения и репарация ДНК 25

1.2.2 Фосфорилирование гистона H2AX в облученных клетках 31

1.2.3 Цитогенетические нарушения 38

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 41

2.1 Радиобиологические эксперименты на приматах 41

2.1.1 Эксперименты по изучению кривой "доза-эффект" при облучении периферической крови in vitro 41

2.1.1.1 Животные и взятие крови 41

2.1.1.2 Облучение 41

2.1.2 Эксперименты по изучению влияния ускоренных ядер криптона-84 42

2.1.2.1 Животные 42

2.1.2.2 Облучение 42

2.1.2.3 Взятие крови 45

2.1.3 Эксперименты по изучению влияния комбинированного воздействия ионизирующего излучения и моделируемой невесомости, имитирующих условия космического полета 45

2.1.3.1 Животные 45

2.1.3.2 Антиортостатическая гипокинезия и облучение 46

2.1.3.3 Взятие крови 47

2.1.4 Выделение лимфоцитов и проточно-цитометрический анализ доли γH2AX-позитивных клеток 47

2.2 Радиобиологические эксперименты на мышах 48

2.2.1 Эксперименты по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля 48

2.2.1.1 Животные 48

2.2.1.2 Дизайн эксперимента и облучение 48

2.2.2 Исследование эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка высокоэнергетических протонов через бетонную преграду . 51

2.2.2.1 Животные 51

2.2.2.2 Дизайн эксперимента и облучение 51

2.3 Анализ радиобиологических эффектов 59

2.3.1 Оценка органного индекса селезёнки 59

2.3.2 Получение суспензии клеток селезёнки 60

2.3.3 Проточно-цитометрический анализ доли γH2AX-позитивных клеток 60

2.3.4 Проточно-цитометрический анализ доли TUNEL-позитивных клеток 61

2.4 Статистический анализ результатов экспериментов 61

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 62

3.1 Результаты радиобиологических экспериментов на приматах 62

3.1.1 Результаты экспериментов по изучению кривой "доза-эффект" при облучении периферической крови in vitro 62

3.1.2 Результаты экспериментов по изучению влияния ускоренных ядер криптона-84 63

3.1.3 Результаты экспериментов по изучению влияния комбинированного воздействия ионизирующего излучения и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета 65

3.1.4 Заключение по разделу 67

3.2 Результаты экспериментов по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля 68

3.2.1 Изменение органного индекса селезёнки 69

3.2.2. Анализ доли γH2AX-позитивных клеток 70

3.2.3 Анализ апоптотической гибели клеток с помощью метода TUNEL 72

3.2.4 Заключение по разделу 72

3.3 Результаты исследования эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка протонов высокой энергии через бетонную преграду 74

3.3.1 Изменение органного селезёночного индекса 75

3.3.2 Анализ доли γH2AX-позитивных клеток селезенки облученных мышей 76

3.3.3 Анализ апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток 78

3.3.4 Заключение по разделу 79

ВЫВОДЫ 80

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ 82

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 83

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

В космическом пространстве космонавты подвергаются воздействию различных негативных факторов, к которым, помимо состояния невесомости (микрогравитации), относится космическое излучение. Наибольшую опасность для организма представляют галактические космические лучи (ГКЛ), состоящие из высокоэнергетических тяжёлых ионов, а также солнечное космическое излучение, особенно, во время солнечных протонных событий (СПС, период роста активности) [Maalouf, et al. 2011]. Среди перечисленных компонентов космической радиации существуют различия по мощности дозы излучения, комбинации частиц и их энергетическому спектру, что следует учитывать при оценке уровня опасности для экипажа во время околопланетных и межпланетных миссий.

СПС состоит на 90% из протонов и на 10% из ионов с различной энергией [Kennedy 2014, Li, et al. 2018]. Экипаж во время космических полетов на околоземных орбитах частично защищен от заряженных частиц магнитным полем Земли [Cucinotta and Durante 2006]. По мере удаления от Солнца влияние СПС ослабевает, и основной вклад в радиационную нагрузку начинают вносить ГКЛ [Cucinotta, et al. 2013, Martinez, et al. 2013]. ГКЛ содержат смесь ионов известных как высокоэнергетические заряженные частицы (ВЭЗЧ), включая тяжелые ионы HZE (high atomic number (Z) and energy - большая атомная масса и энергия) [Bourdarie and Xapsos 2008]. Тяжелые ионы, обладающие высоким зарядом и энергией, являются основным фактором радиационного риска в глубоком космосе. По оценкам, примерно 21% эквивалентной дозы ионизирующего излучения ГКЛ для экипажа космических кораблей исходит от высокоэнергетических заряженных частиц, из которых 2% приходится на ионы железа [Norbury, et al. 2016].

Необходимо понимать, что космонавты большую часть времени находятся на борту космического корабля и подвергаются воздействию как первичного космического излучения, так и вторичного излучения (вторичные протоны, нейтроны, мезоны, гамма-кванты и т.д.), образующего при взаимодействии космического излучения с обшивкой и материалом конструкции космического корабля. Последние десятилетия активно развиваются международные космические программы, нацеленные на исследования планет, в частности Лунные и Марсианские программы [Boice 2017]. Последнее требует изучения защитных свойств доступных материалов для возведения укрытий и организации планетарных баз [Hellweg and Baumstark-Khan 2007].

Космическое излучение, а в особенности его плотноионизирующая компонента, вызывает повреждения различных биологических макромолекул, в том числе и таких жизненно важных для успешного функционирования клетки информационных структур, как ДНК. Считается, что именно ядерная ДНК является одной из основных "мишеней" при воздействии ионизирующего излучения (ИИ) на живые клетки. Среди различных типов повреждений ДНК, вызываемых ИИ, наиболее значимыми являются двунитевые разрывы (ДР). Количественный выход ДР ДНК на единицу дозы относительно небольшой (~20-40 ДР/клетка/Гр), однако именно ДР ДНК является одним из основных факторов, провоцирующих начало процессов клеточного ответа на облучение. Репарация ДР ДНК происходит преимущественно (около 80 %) некорректно путем негомологичного соединения концов (НГСК) с образованием микроделеций и цитогенетических нарушений, что, в конечном счете, может привести к онкотрансформации или инициировать гибель клетки по различным механизмам (апоптоз, аутофагия, сенесценция и т.д.) [Babayan, et al. 2020, Krenning, et al. 2019, Pustovalova, et al. 2016].

Из-за неполного понимания того, как биологические системы реагируют на космическое излучение (включая протоны, ядра гелия, частицы с высокой Z-энергией и вторичные нейтроны), в настоящее время трудно точно оценить риск канцерогенеза, возникновения когнитивных дисфункций и других последствий

для здоровья из-за воздействия излучения на организм человека в космосе. По этой причине космическое излучение остается риском номер один для здоровья космонавтов, а существующие неопределенности ограничивают планирование пилотируемых межпланетных миссий [Juerss, et al. 2017].

Помимо ИИ, другим фактором космических полетов, является пониженная гравитация. Невесомость вызывает резкие изменения уровня кальция в костях, деструктивные процессы в опорно-двигательной системе, снижение мышечного тонуса и нарушения вестибулярного аппарата [Aguirre, et al. 2006, Nakashima, et al. 2011, Plotkin, et al. 2015]. Пониженная гравитация влияет на рост и морфологию клеток, а также на метаболические процессы, связанные с дифференцировкой стволовых клеток, адгезией, миграцией, пролиферацией и способна приводить к гибели клеток [Grimm, et al. 2020, Strauch, et al. 2019]. Остается открытым вопрос о том, изменяется ли эффективность репарации ДНК при комбинированном воздействии ИИ и невесомости.

В целом анализ литературы свидетельствует о том, что вопрос об особенностях влияния космического излучения на ДНК клеток млекопитающих остается актуальным. Проблема дополняется сложностью и дороговизной космических экспериментов. Наземные исследования с использованием живых организмов, стремящиеся смоделировать биологические эффекты космической радиации, должны учитывать не только воздействия протонов и источников тяжелых ионов, но и эффекты вторичного излучения вкупе с нерадиационными факторами, такими как пониженная гравитация. Этот подход более точно прояснит влияние космического излучения на ДНК клеток человека и окажет помощь в развитии персонализированных радиологических контрмер для космонавтов.

Степень разработанности темы

Негативные последствия, связанные с воздействием космического излучения, а в особенности ГКЛ, на организм человека недостаточно изучены. Полагают, что длительное воздействие космического излучения увеличивает риск развития злокачественных новообразований, приводит к развитию когнитивных

дисфункций из-за поражения клеток центральной нервной системы (ЦНС), вызывает дегенеративные эффекты в тканях и хроническую лучевую болезнь [Cucinotta, et al. 2001]. Предполагается, что во время трехлетнего полета на Марс космонавты получат поглощенную дозу ионизирующего излучения свыше 1,5 Гр [Cucinotta and Durante 2006], то есть суммарная доза будет значительно превышать дозы, установленные действующей системой радиологической защиты NASA [Russo, et al. 2007], что может привести к возникновению радиационно-индуцированных злокачественных новообразований [Cucinotta, et al. 2013].

В ряде работ показано, что пониженная гравитация может также усугублять негативные эффекты ИИ, в частности усиливать клеточную гибель по механизму апоптоза [Dang, et al. 2014, Lewis, et al. 1998, Ohnishi, et al. 1999]. В последнее время также появились данные о том, что невесомость может замедлять процессы репарации ДР ДНК и увеличивать выход цитогенетических нарушений [Moreno-Villanueva, et al. 2017].

Цель и задачи исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение повреждения ДНК лимфоцитов периферической крови и спленоцитов млекопитающих в наземных экспериментах по моделированию воздействия космического излучения.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Исследовать влияние локального облучения области гиппокампа головного мозга *Macaca mulatta* пучком ускоренных ядер криптона-84 на изменение доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждения ДНК в отдаленный период после облучения (до 96 суток);
2) Оценить влияние комбинированного воздействия ионизирующего излучения и моделируемой невесомости на изменение доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждения ДНК у *Macaca mulatta* в различное время после воздействия (до 446 суток);
3) Провести радиобиологическую оценку защитных свойств материалов, имитирующих оболочку космического корабля, по показателям

поврежденности ДНК спленоцитов мышей линии ICR CD-1, облученных пучком ускоренных протонов;

4) Оценить влияние вторичного излучения, формирующегося при прохождении высокоэнергетических протонов через бетонную преграду, на поврежденность ДНК спленоцитов мышей линии ICR CD-1.

Положения, выносимые на защиту:

1) Исследованные компоненты космического излучения (высокоэнергетические заряженные частицы, гамма-излучение) в дозах 1-3 Гр вызывают статистически значимое увеличение доли лимфоцитов периферической крови с повышенным количеством ДР ДНК у локально и тотально облученных приматов, регистрируемое в течение как минимум 42 суток после окончания воздействия.

2) Пассивная защита космического корабля от радиации (материалы обшивки корабля) позволяет снизить генотоксический эффект протонного излучения с энергией 163 МэВ на 30 %.

3) Бетонная защита с толщиной 20, 40, 80 см снижает дозу от протонного излучения с энергией 650 МэВ в 1,8, 3 и 9,4 раза, соответственно, но при этом индуцирует поток вторичного излучения, который вызывает значимый генотоксический эффект.

Методология и методы исследования

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации - Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра химической физики им. Н.Н. Семенова Российской Академии Наук.

Теоретической и методологической основой диссертационной работы являются разработки отечественных и зарубежных ученых в области радиобиологии, молекулярной и клеточной биологии и биофизики. Информационную базу составляют статьи в периодических рецензируемых

изданиях, материалы научных конференций, объекты интеллектуальной собственности, публикации в научных сборниках по исследуемой проблеме.

Эксперименты проводились на самцах макаках-резус (*Macaca mulatta*) и самцах мышей линии ICR CD-1.

При проведении исследований были использованы:

– протонный ускоритель типа синхрофазотрон ОИЯИ, ускоритель заряженных частиц «Нуклотрон», ускорительный комплекс У-70, гамма-установки Рокус-М и ГОБО-60;

– проточно-цитометрический иммунофлуоресцентный метод анализа лимфоцитов периферической крови и клеток селезенки облученных животных, позитивных по белку-маркеру ДР ДНК (γH2AX);

– проточно-цитометрический иммунофлуоресцентный метод анализа клеток в поздней стадии апоптоза (метод TUNEL);

– статистические методы обработки полученных данных.

Научная новизна

В работе впервые изучено влияние локального облучения гиппокампа головного мозга макак-резус (*Macaca mulatta*) высокоэнергетичными ядрами криптона-84 на поврежденность ДНК лимфоцитов периферической крови. Было показано, что локальное облучение гиппокампа головного мозга обезьян ядрами криптона-84 в дозе 3 Гр приводит к статистически значимому ($p<0,05$) увеличению доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждений ДНК. Эффект сохраняется вплоть до 42 суток после облучения. Впервые в экспериментах на макак-резус исследовано комбинированное действие ИИ и моделируемой невесомости на поврежденность ДНК лимфоцитов периферической крови в отдаленный период после облучения (до 446 суток). Продемонстрировано, что комбинированное воздействие ИИ и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета, приводит к статистически значимому увеличению доли лимфоцитов с повышенным уровнем повреждений ДНК, регистрируемого в течение длительного времени после окончания воздействия (1,5 месяца). Впервые на мышах линии ICR CD-1

проведено исследование защитных антирадиационных свойств оболочки проектируемого космического корабля в комбинации с традиционными защитными материалами. Обнаружено, что оболочка проектируемого транспортного корабля не позволяет существенно снизить ДНК-повреждающий эффект 163 МэВ протонного излучения. В комбинации 4 мм алюминий + трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля + плексиглас толщиной 50 мм или водный фантом с толщиной 160 мм наблюдается умеренное (до ~30%) ослабление ДНК-повреждающего эффекта. Впервые проведены эксперименты по оценке генотоксических эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка высокоэнергетических протонов через бетонную преграду толщиной 20-80 см. Показано, что бетонная защита позволяет существенно снизить поток первичного протонного излучения с энергией 650 МэВ, снижая с увеличением толщины этой преграды выраженность негативных биологоческих эффектов у мышей, облучаемых в центре пучка. Однако с увеличением толщины преграды с 20 до 80 см и расстояние от центра пучка с 0 до 20 см существенно меняется спектр вторичного излучения и увеличивается доля нейтронной компоненты, что также вызывает негативные биологические эффекты, выражающиеся в увеличении доли поврежденных и апоптотических клеток селезенки.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение закономерностей образования и репарации ДР ДНК в клетках системы крови млекопитающих при нахождении в условиях глубокого космоса представляет собой актуальную, имеющую общебиологическое значение задачу, а ее решение позволит получить новые научные знания, имеющие фундаментальное значение для космической радиационной биологии и медицины. Результаты наших исследований также чрезвычайно важны для адекватной оценки опасности облучения в сочетании с условиями моделируемой невесомости и гипокинезии.

Полученные данные вносят важный вклад в понимание биологических процессов, происходящих в организме космонавтов во время космических

миссий, и могут быть использованы для оптимизации защитных условий от компонентов вторичного излучения.

Результаты можно использовать для оценки генотоксических эффектов негативных факторов космических полётов, проектирования эффективной физической защиты космических кораблей и баз. Результаты работы будут востребованы при чтении курса лекций по космической радиобиологии и медицины для студентов профильных специальностей.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы представлялись и докладывались на следующих научно-практических конференциях:

- Международной конференции «Современные проблемы общей и космической радиобиологии» (Дубна, 12-13 октября 2017 г.);
- 3-й Российской конференции с международным участием «Радиобиологические основы лучевой терапии» (Дубна, 17-18 октября 2019 г.);
- Seventh international conference on radiation in various fields of research (RAD 2019) (Herceg Novi, 10–14.06.2019, Montenegro);
- Школе-конференции молодых ученых и специалистов "Ильинские чтения 2020" (Москва, 22–24 декабря 2020 г.);
- Юбилейной международной научно-практической конференции «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей» (Москва, 16–17 ноября 2021 г.).

Апробация диссертации проведена на заседании секции №1 Ученого совета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.

Достоверность результатов работы обеспечивается проведением большого количества экспериментов с достаточной воспроизводимостью; статистической обработкой полученных данных с заданной вероятностью и необходимым количеством повторных исследований; сопоставлением результатов, полученных разными методами, а также сравнением с аналогичными

результатами, полученными другими авторами. Для исследования использовалось высокоточное сертифицированное оборудование, проходящее регулярные внешние и внутренние контроли качества и необходимую калибровку перед началом каждого эксперимента.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Личный вклад. Личный вклад заключался в проведении радиобиологических экспериментов, обработке, анализе и интерпретации полученных данных, написании диссертационной работы, а также подготовке статей к опубликованию. Все проточно-цитометрические исследования по оценке доли γH2AX и TUNEL клеток проводились диссертантом лично (личный вклад 100 %). Материалы диссертации доложены автором в виде устных докладов на конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3-х глав, выводов, благодарностей и библиографического списка. Содержит 105 страниц машинописного текста, в том числе 27 рисунков и 1 таблицу. Библиография включает 173 наименования.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Компоненты космического излучения

На околоземной орбите и за её пределами космонавты подвергаются постоянному воздействию заряженных частиц с низкими и высокими значениями линейной передачи энергии (ЛПЭ). Условно космическое излучение можно представить как комплекс частиц, составляющих так называемый солнечный ветер, который усиливается во время солнечных протонных событий (СПС), галактические космические лучи (ГКЛ) и захваченные частицы пояса Ван Аллена магнитосферы Земли [Benton and Benton 2001]. Экипаж космических аппаратов подвергается воздействию проникающего через обшивку излучения, а также вторичного излучения, образующегося в результате взаимодействия заряженных частиц с обшивкой и компонентами аппаратов. Члены экипажа во время длительных космических полётов, например во время будущих 3-летних пилотируемых миссий на Марс, могут получать дозы около 1,5-2,3 Гр [Moore 1992]. Последствия влияния космического излучения для здоровья космонавтов оценить достаточно трудно. Длительное воздействие космического ИИ характеризуется вариабельностью мощности доз, качественного состава излучения, энергии и интенсивности потока частиц [Badhwar 1997]. Медико-биологические последствия воздействия такого излучения зависят не только от физических характеристик частиц, их потока, мощности и суммарной накопленной дозы, но и от радиочувствительности тканей и организма [Sridharan, et al. 2016]. Все эти факторы приводят к затруднению оценки рисков для космонавтов, принимающих участие в длительных космических миссиях. Каждый из факторов предполагает дискретный анализ на моделях, обладающих высокой предиктивностью для прогностической оценки возникновения злокачественных новообразований и отдалённых эффектов воздействия на организм [Sridharan, et al. 2016].

1.1.1 Солнечный ветер и радиационный пояс

Солнечный ветер представляет собой непрерывный поток плазмы солнечного происхождения, состоящий в основном из электронов и протонов с интенсивностью от 10^{10} до 10^{12} частиц/см^2*с*стер со скоростью от 300 до 800 км/с [Di Matteo, et al. 2019]. Он распространяется приблизительно радиально от Солнца и заполняет собой Солнечную систему до гелиоцентрических расстояний ~100 а.е. Солнечный ветер увлекает корональное магнитное поле наружу, создавая гелиосферное магнитное поле (ГМП) (рис. 1), которое связывает Солнце и планеты и модулирует поток ГКЛ во внутренней гелиосфере. В нем присутствуют сложные разноскоростные течения, целый спектр волн, сильная турбулентность, исходящие от Солнца крупномасштабные плазменные образования, такие как корональные выбросы масс (КВМ), коротирующие потоки и т.д.

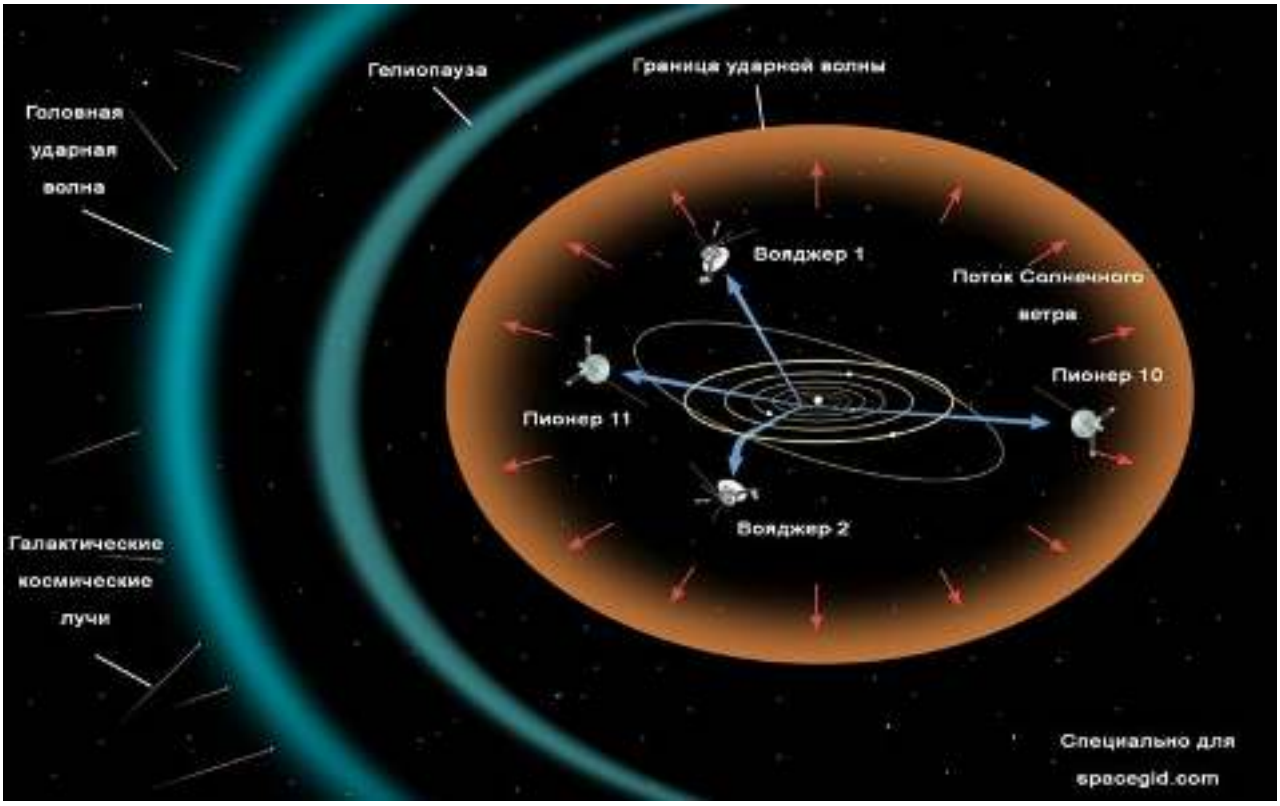


Рисунок 1. Гелиосферное магнитное поле [https://spacegid.com/granica-solnechnoy-sistemyi.html].

Частота проявления солнечной активности является периодичной. Длительность такого периода составляет около 11,2 лет, из которых в течение 4,2 лет происходит рост солнечной активности (солнечный максимум), затем, в течение 7 лет ее спад (солнечный минимум). Во время периода роста активности Солнце является сильным источником излучения. Одним из самых распространённых показателей солнечной активности является число солнечных пятен (рис. 2).

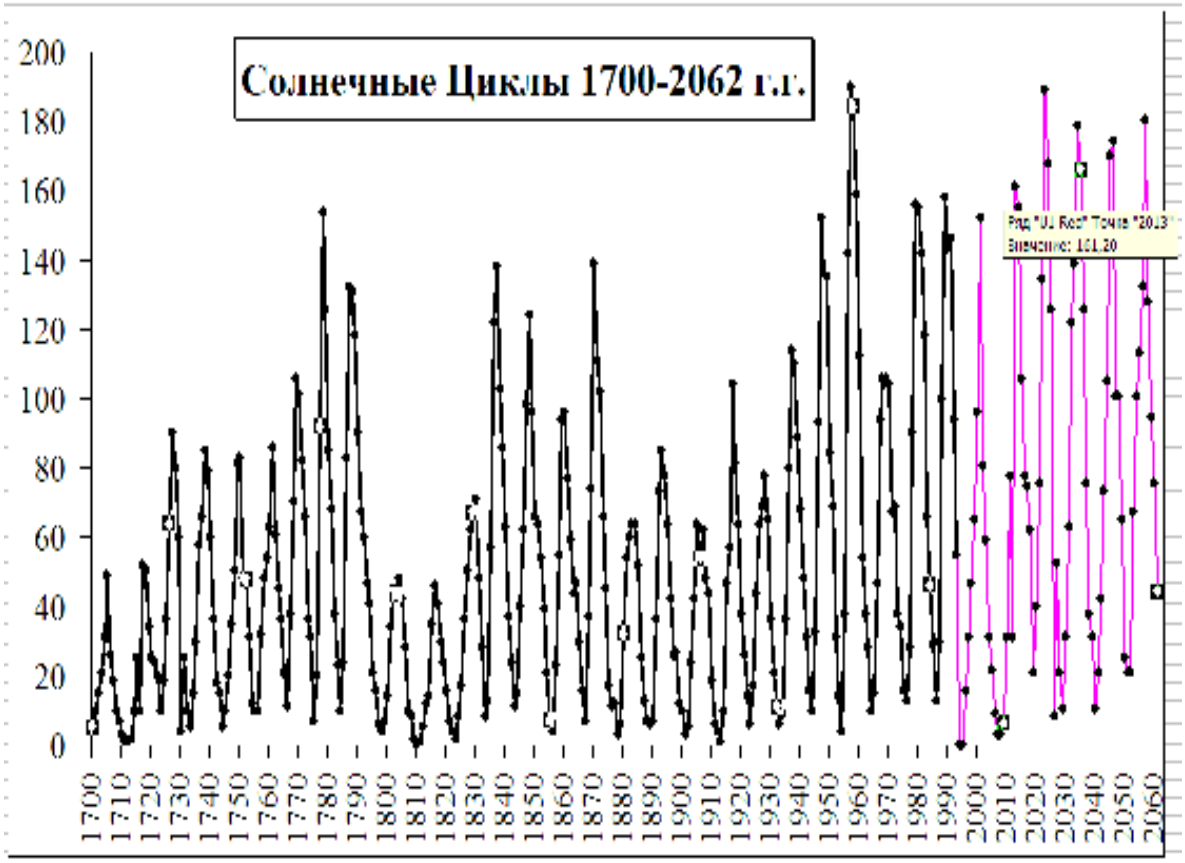


Рисунок 2. Периоды солнечной активности. По оси ординат – число солнечных пятен. По оси абсцисс – годы [Ишков 2013].

Солнечные пятна находятся в фотосфере Солнца, где температура составляет 6000°С, а поверхность покрыта бесчисленными небольшими конвекционными ячейками, называемыми «гранулами». У солнечных пятен есть темная центральная область, называемая тенью, окруженная более светлой областью, называемой полутенью. При исследовании солнечных пятен, используя

телескопы с высоким разрешением, становится видно, что область полутени распадается на многочисленные волокна или «фибриллы», которые расходятся наружу из темной зоны тени (рис. 3). Температура в зоне тени обычно составляет около 2200° С, в то время как в зоне полутени температура может достигать 3500° С. Причина того, что пятна кажутся темными, заключается в том, что они на 3000° С холоднее, чем остальная часть солнечной поверхности. Поскольку яркость зависит от температуры, тень солнечного пятна излучает в шесть раз меньше света, чем солнечная поверхность такого же размера [Lockwood, et al. 2017].

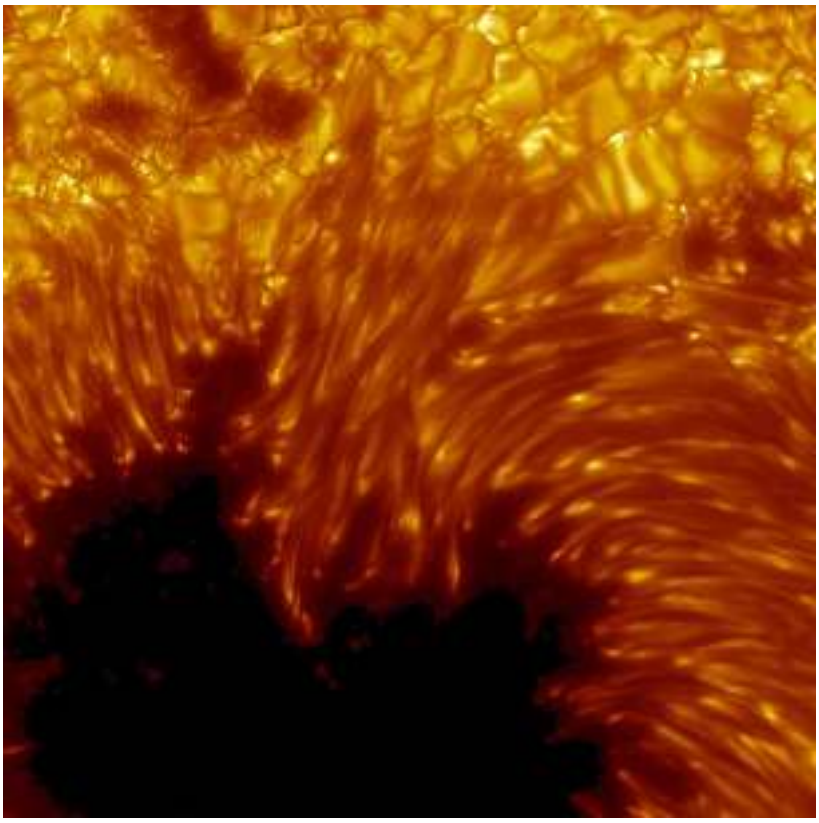


Рисунок 3. Крупный план солнечного пятна, полученный с помощью Шведского солнечного телескопа в Ла-Пальме, Канарские острова [spacehack.org].

В периоды активности Солнце выбрасывает в межпланетное пространство электроны, протоны, альфа-частицы и более тяжелые ионы. Однако наибольшую опасность представляют солнечные протонные события (СПС). Солнечные протонные события достаточно редкие явления и происходят в период солнечного

максимума 11-летнего солнечного цикла. [Mostl, et al. 2018]. Эти частицы могут быть ускорены до почти релятивистских скоростей из-за межпланетных ударных волн, предшествующих быстрым выбросам корональной массы. Во время таких выбросов флюенс протонов с энергией > 30 МэВ или даже > 100 МэВ через несколько часов или дней может превышать 10^{10} см$^{-2}$, что может представлять опасность облучения большими дозами радиации для экипажа и оборудования, которые недостаточно защищены [Shea and Smart 1990].

Хотя такие большие события редки в истории, в настоящее время нет надежных способов предсказать их возникновение. Эти обстоятельства накладывают значительные эксплуатационные ограничения для пилотируемых космических полетов. Использование штормовых укрытий с достаточным экранированием необходимо для снижения дозы облучения космонавтов до приемлемого уровня, а чувствительное оборудование должно быть отключено, чтобы избежать сбоев в работе, неисправности или радиационных повреждений. Прогресс в освоении космоса, возникший в течение последних десятилетий, позволил ученым изучить влияние интенсивности и спектра солнечных частиц и их пространственного распределения, что значительно улучшило понимание ключевых условий, исходных причин, механизмов ускорения частиц в этих исключительных событиях [Shea and Smart 1990].

Высокоэнергетические заряженные частицы солнечного ветра, в том числе СПС и корональные выбросы масс (КВМ), представляют угрозу для электрических и коммуникационных систем, а также для здоровья астронавтов, как на низкой околоземной орбите (например, на Международной космической станции (МКС)), так и в межпланетных полетах, где нет защитного магнитного поля Земли.

Радиационный пояс или пояс Ван Аллена представляет собой область магнитосферы, в которой накапливаются и удерживаются проникшие высокоэнергичные заряженные частицы. Радиационный пояс Земли составляют в основном протоны с энергией в десятки МэВ, образующие внутренний радиационный пояс Земли (4000 км), и электроны с энергией в десятки МэВ

внешнего радиационного пояса Земли (17000 км) [Badhwar, et al. 1994, Benton and Benton 2001].

1.1.2 Галактические космические лучи

За пределами нашей солнечной системы основной угрозой для здоровья космонавтов являются галактические космические лучи (ГКЛ). Первичные ГКЛ составляют протоны и ионы с широким энергетическим диапазоном, который может достигать 1 ГэВ/нуклон [Benton and Benton 2001]. Релятивистские частицы с высокими ЛПЭ, входящие в состав ГКЛ, обладают достаточной энергией, чтобы проникнуть через любые существующие на данный момент технологии экранирования [Cucinotta, et al. 2006]. Спектр ГКЛ примерно на 87% состоит из ионов водорода (протонов) и на 12% из ионов гелия (альфа частиц), при этом менее 1 % частиц представляют собой ядра высокоэнергетических частиц с зарядами в диапазоне от Z = 3 (литий) до приблизительно Z = 30 (цинк) (рис. 4) [Badhwar and O'Neill 1994]. Электроны и позитроны также входят в состав ГКЛ, но они представляют незначительную биологическую опасность, так как они легко останавливаются даже небольшим слоем экранирования космического корабля. Несмотря на в целом низкую долю присутствия в составе ГКЛ, набольшую опасность представляют частицы с высоким зарядом и энергией, например ^{56}Fe, поскольку они имеют высокие значения линейной передачи энергии (ЛПЭ) и обшивка космического корабля не может от них защитить [Cucinotta and Durante 2006]. При прохождении таких частиц через вещество, за счёт электромагнитных и ядерных взаимодействий физические характеристики полей излучения меняются. Помимо фрагментов первичного ядра при столкновении образуются компоненты вторичного излучения: вторичные протоны, нейтроны, тормозные фотоны, π-мезоны, дельта-электроны (δ лучи) и т.д. [Cucinotta and Durante 2006].

Флюенс ионизированных ядер, составляющих ГКЛ, обратно пропорционален солнечному циклу и снижается в два раза во время солнечного максимума. Значения скорости потока и спектр ГКЛ за пределами низкой

околоземной орбиты (НОО) были получены в результате измерений, проводимых беспилотными космическими аппаратами, такими как космический аппарат Mars Science Laboratory (MSL), который в период с декабря 2011 года по июль 2012 года доставлял марсоход Curiosity [Zeitlin, et al. 2013]. Полученные данные продемонстрировали, что поглощенная и эквивалентная дозы от ГКЛ могут быть хорошо оценены в преддверии будущих космических миссий.

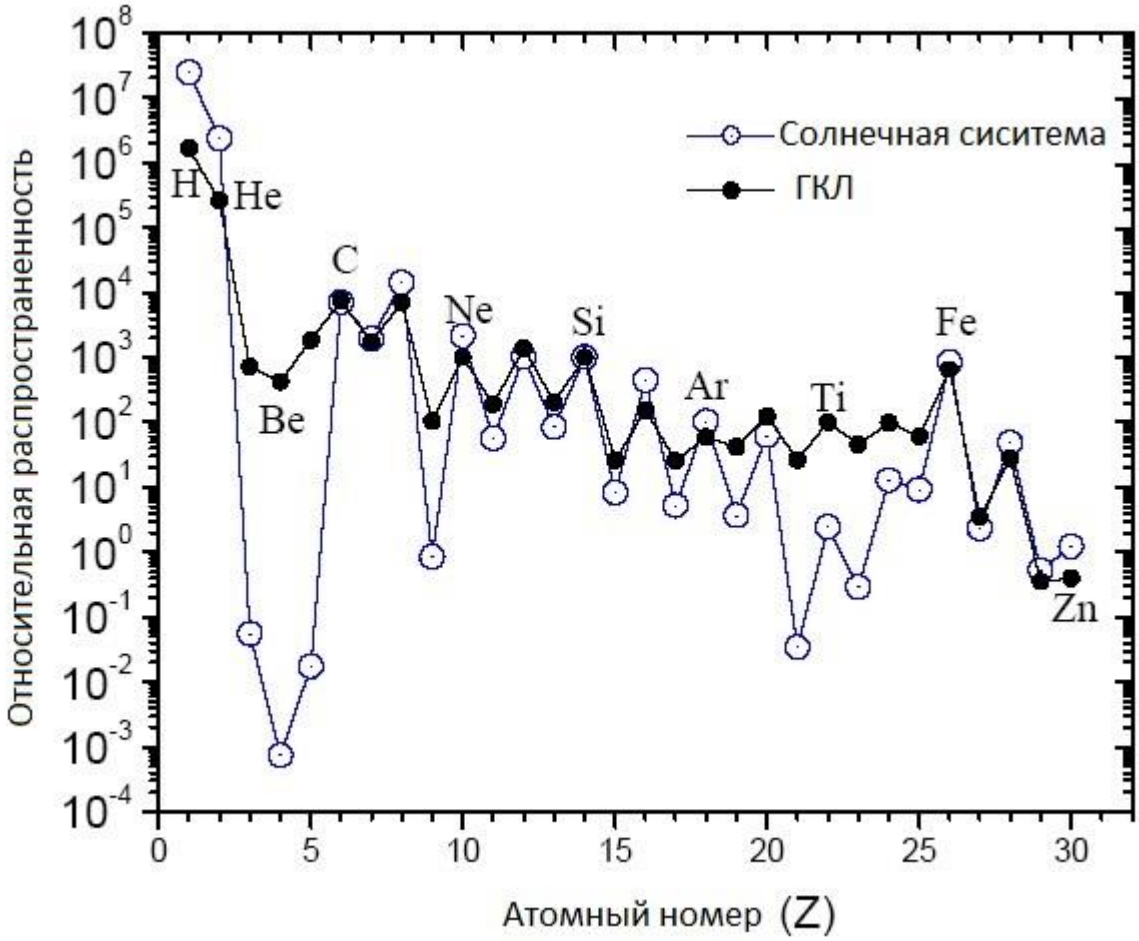


Рисунок 4. Элементарный состав космических лучей [https://izw1.caltech.edu/ACE/ACENews/ACENews83.html].

Высокая энергия ионов ГКЛ делает их серьезной угрозой для здоровья астронавтов и представляет собой один из наиболее существенных барьеров, препятствующих межпланетным миссиям. Энергия частиц ГКЛ достаточна для того, чтобы проникнуть на глубину в несколько сантиметров биологической

ткани или других органических и неорганических материалов. Экранирование лишь частично снижает дозы, испытываемые внутри космического аппарата, учитывая проникающую способность ионов высокоэнергетических заряженных частиц [Cucinotta, et al. 2006]. Более массивное экранирование может в теории обеспечить большую защиту, однако развертывание достаточной массы экранирования в пространстве ограничено практическими возможностями современных систем запуска космических аппаратов.

Во время полета за пределами НОО каждые несколько дней каждое ядро клетки астронавта в среднем будет пересекать ион водорода и каждые несколько месяцев более тяжелые ионы HZE (например, ^{16}O, ^{28}Si, ^{56}Fe) [Cucinotta, et al. 1998]. Поэтому, несмотря на их низкий флюенс, ионы HZE представляют собой серьезную биологическую угрозу и вносят значительный вклад в кумулятивную дозу ГКЛ, которую космонавты получат за пределами НОО.

Риски влияния ГКЛ включают дегенеративные эффекты в сердечно-сосудистой и центральной нервной системах, а также риск развития злокачественных новообразований в таких органах, как легкие, толстая кишка, молочные железы и желудок [Durante and Cucinotta 2008]. Учитывая отсутствие прямых эпидемиологических данных, оценки риска воздействия ГКЛ в настоящее время основаны на результатах моделирований, полученных от наземных экспериментов на клетках и животных. Взаимодействие частиц ГКЛ при прохождении через биологические объекты создает кластеризованную и сложную смесь повреждений ДНК ((ДР), однонитевые разрывы (ОР), повреждение оснований и т. д.), репарация ДНК от которых затруднена или невозможна [Cucinotta and Durante 2006, Plante, et al. 2013]. Воздействие частиц ГКЛ может также приводить к появлению «немишенных эффектов», наблюдаемых в соседних клетках, не подверженных напрямую воздействию ИИ. Полагают, что в дозах и мощностях доз, превалирующих в космической среде, немишенные эффекты играют существенное значение и способны значительно увеличивать риск возникновения негативных последствий облучения [Cucinotta and Cacao 2017].

1.1.3 Вторичное излучение

Проходя через обшивку и оснащение космического корабля, космическое излучение может быть задействовано в различных видах ядерных взаимодействий (рис. 5) [Benton and Benton 2001]. При этом образуется комплекс заряженных и не заряженных вторичных частиц с широким энергетическим спектром [Benton and Benton 2001]. Поток вторичного излучения может резко возрасти после корональных выбросов и вспышек на Солнце, что, впрочем, бывает достаточно редко [Benton and Benton 2001, Furukawa, et al. 2020].

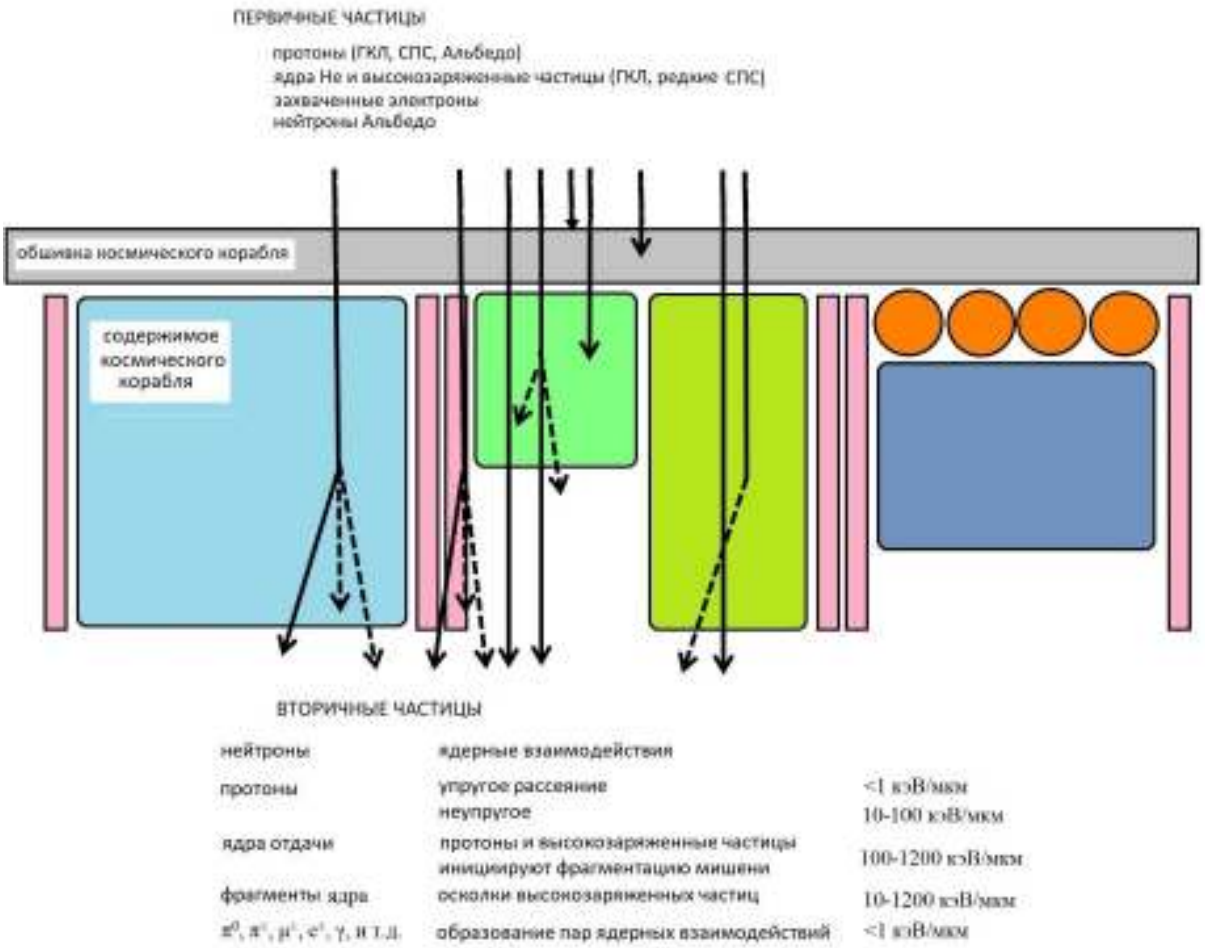


Рисунок 5. Образование вторичных частиц во внутреннем пространстве космического корабля после взаимодействия первичного излучения с обшивкой и содержимым космического модуля [Benton and Benton 2001].

В частности, для хронического воздействия нейтронов, которые образуются в качестве вторичного излучения во время космических полетов в результате ядерных взаимодействий со стенами космического корабля и телом человека, в настоящее время имеются ограниченные данные о связанных рисках [Juerss, et al. 2017].

Вторичные излучение включает в себя в основном вторичные протоны и нейтроны, тормозные фотоны и пи-мезоны [Nagamatsu, et al. 2015, Spurný 2001], которые вносят значительный вклад в общую дозу облучения космонавтов. Важно заметить, что при увеличении толщины защиты поток первичных частиц снижается, а поток вторичных частиц, напротив, возрастает, что существенно изменяет спектр излучения влияющего на космонавтов [Kolísková, et al. 2012, Nagamatsu, et al. 2015].

Эксперименты по имитации радиационного облучения частицами СПС показывают, что с увеличением толщины экранирования доза облучения в целом снижается, а доза, передаваемая на внутренние органы ниже, чем на кожу, но при этом поток и доза облучения от вторичных частиц значительно возрастает [Trovati, et al. 2006]. Увеличение толщины экранирования не снижало дозу облучения от ГКЛ-подобных частиц, как на кожу, так и внутренние органы. Это играет важную роль при оценке воздействия космической радиации на космонавтов.

Из-за направленного характера солнечного ветра облучение тела человека космическим излучением носит неоднородный характер. Результаты исследований воздействия на фантом торса человека различных типов космического излучения снаружи и внутри МКС продемонстрировали, что между «передней» и «задней» частями фантома отмечается снижение дозы примерно на 30% (рис. 6) [Badhwar, et al. 2002, Reitz, et al. 2009]. Кроме того, прогнозируемые мощности дозы, приходящиеся на модель торса человека, оказались на 20% ниже фактических. Результаты дозиметрических измерений космонавтов, фантомов «мозга» и «щитовидной железы» подтвердили, что значительный вклад в полученную дозу вносят тепловые нейтроны. Эквивалентная доза для кожи при

облучении нейтронами с низкими энергиями, по-видимому, составляет около 8–10% от общего вклада заряженных частиц [Badhwar, et al. 2002].

Измерения вне МКС показали, что доза облучения кожи составляет около 1 мГр/день, а внутренних органов от 0,22 до 0,33 мГр/день, что говорит о трех-четырехкратном снижении дозы вследствие «самоэкранирования» тела от облучения. Состав и качество излучения при этом также меняются [Reitz, et al. 2009].

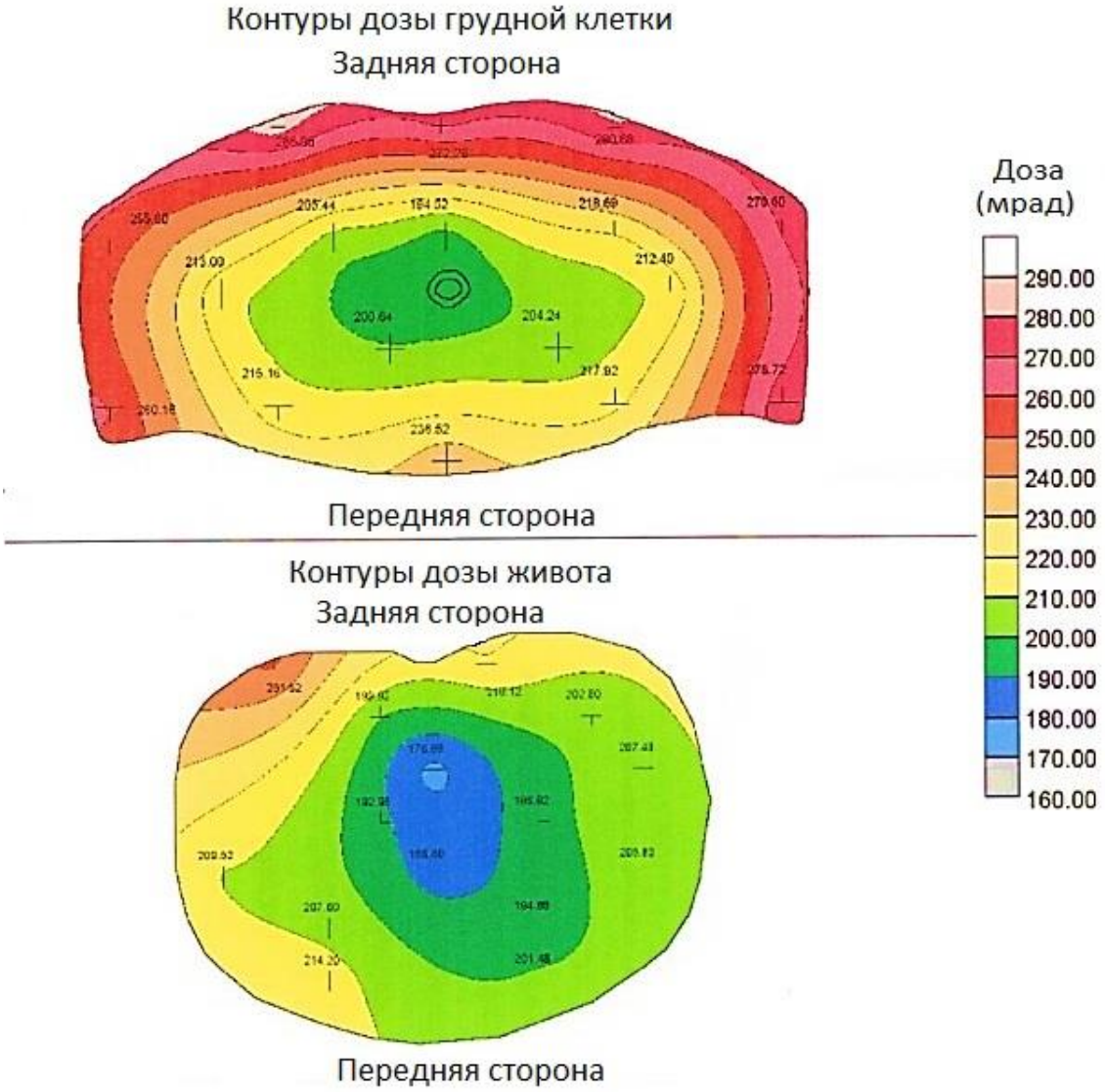


Рисунок 6. График изолиний суммарной дозы для выбранных участков фантома торса человека, 100 мрад = 1 мГр [Badhwar, et al. 2002].

Эквивалентные дозы для кроветворных органов были одинаковы в экранирующих сферах радиусом 50 и 100 см, хотя дозовый состав различался. Показано, что косвенно рассеянные вторичные частицы составляют до 60% от дозы облучения. До 90% эквивалента дозы вторичных нейтронов связано с рассеянными частицами [Dobynde and Shprits 2020].

В экспериментах по оценке влияния вторичного излучения на ДНК кератиноцитов кожи человека была показана разная степень повреждений ДНК вторичными частицами, в зависимости от типа первичного облучения. Протоны высоких энергий образуют больше вторичных частиц, соответственно, и вызывают больше повреждений ДНК, чем протоны с низкой энергией. При сравнении с ионами, обладающими большой массой и энергией, протоны генерируют меньше вторичных частиц и, соответственно, вызывают меньше повреждений ДНК. Через 24 часа после воздействия наблюдали снижение количества фокусов 53BP1, это говорит о том, что большинство клеток восстанавливали первоначальные повреждения [Lebel, et al. 2011].

1.2 Влияние компонентов космического ионизирующего излучения на ДНК

1.2.1 Повреждения и репарация ДНК

Важнейшей задачей во время космических полетов в процессе освоения глубокого космоса является обеспечение условий для сохранности необходимого уровня функциональной стабильности космонавтов. Для этого необходимо разработать способы защиты от различных видов ИИ, одновременно с обеспечением необходимой физической подготовки и сохранности когнитивных функций, а также устойчивого психофизического и эмоционального состояния. Потенциал межпланетных космических полетов для человека в настоящее время ограничен проблемами, связанными с рисками для здоровья после воздействия ГКЛ [Held 2009, Hu, et al. 2013, Mukherjee, et al. 2008]. В глубоком космосе, в отличие от НОО, космонавты подвергаются воздействию значительно бóльших

мощностей дозы ГКЛ. Однако, учитывая продолжительность экспедиций в глубокий космос, следует учитывать не только интенсивность, но и продолжительность воздействия этих излучений [Zeitlin, et al. 2013]. Воздействие этих высокоэнергетических излучений на космонавтов зависит от продолжительности их пребывания на планете или на МКС [Cucinotta and Durante 2006, Durante and Cucinotta 2008].

Одной из основных биологических мишеней ионизирующего излучения является информационная макромолекула - ДНК. Существуют различные типы радиационно-индуцированных повреждений ДНК, включая повреждение оснований, однонитевые разрывы (ОР), двунитевые разрывы (ДР), а также сшивки ДНК-ДНК и ДНК-белок [Olive, et al. 1990, Santivasi and Xia 2014]. Острое воздействие излучения с низкой ЛПЭ, такого как γ-излучения, в дозе 1 Гр вызывает ~ 100000 ионизаций различных молекул в каждом клеточном ядре и приводит к образованию ~ 1000-3000 поврежденных или потерянных азотистых оснований, ~ 1000 ОР, ~ 300-400 сшивок ДНК-ДНК и ДНК-белок, и всего ~ 20-40 ДР [Goodhead 2009]. Однако, несмотря на минорный количественный выход, именно ДР ДНК являются наиболее серьезными и опасными повреждениями ДНК. Это обусловлено тем, что в клетках в состоянии покоя (G0), а также в течение наиболее продолжительной пресинтетической фазы митотического цикла (G1), нет сестринской хроматиды, которая могла бы послужить матрицей для корректной репарации ДНК. Поэтому репарация ДНК от этих повреждений происходит преимущественно (до 80 %) некорректно, путем негомологичного соединения концов (НГСК) с возможным образованием микроделеций и цитогенетических нарушений, что, в конечном счете, может привести к онкотранформации или инициировать гибель клетки по различным механизмам (апоптоз, аутофагия, сенесценция и т.д.) [Babayan, et al. 2020, Krenning, et al. 2019, Pustovalova, et al. 2016].

Облучение с высокой ЛПЭ приводит к плотной ионизации вдоль радиационных треков и вызывает сложные повреждения ДНК, состоящие из повреждений ДНК разного типа и тандемных повреждений, а также кластерные

повреждения ДНК, представляющие собой множественные повреждения, локализованных в пределах нескольких спиральных витков ДНК (рис. 7) [Eccles, et al. 2011, Hada and Georgakilas 2008, Rydberg 2001, Sage and Shikazono 2017]. Репарация ДНК от сложных повреждений происходит более медленно в сравнении с простыми, в то время как репарация от кластерных повреждений, в особенности кластерных ДР, нередко просто невозможна [Eccles, et al. 2011]. Следовательно, даже если доза излучения с низкой и высокой ЛПЭ совпадает, то качественные и количественные характеристики образовавшихся повреждений ДНК будут различаться. В связи с этим необходима точная оценка качества и количества повреждений ДНК, вызванных космическим излучением, для более точного прогнозирования биологических эффектов в космосе.

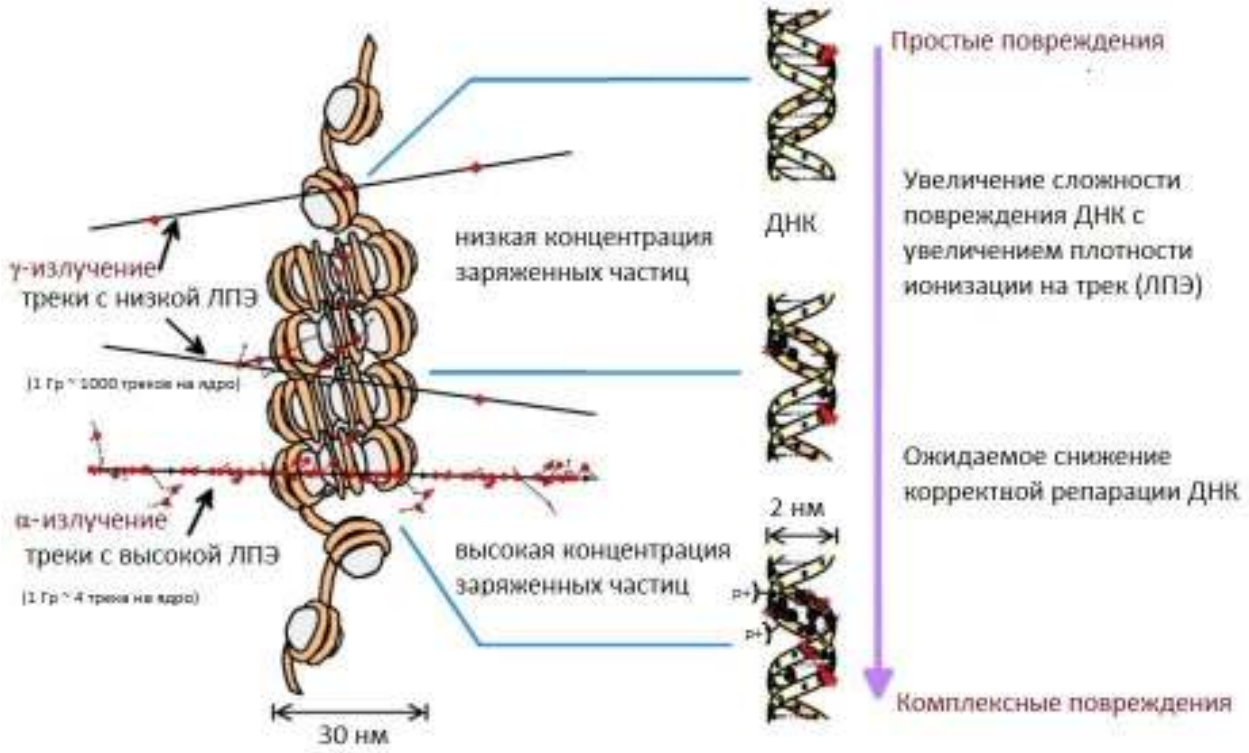


Рисунок 7. Повреждение ДНК в зависимости от типа ИИ [Mohamad, et al. 2017].

Эволюционно у организмов сформировались различные механизмы репарации повреждений ДНК, обеспечивающие стабильность генома [Jeggo and Lobrich 2006, Olive, et al. 1990, Santivasi and Xia 2014, Scully, et al. 2019]. В случае

некорректности или невозможности репарации ДНК запускаются механизмы клеточной элиминации или потери способности клетки к делению, которые позволяют избежать риска онкотрансформации [Jeggo and Lobrich 2006, Jeggo, et al. 2015, Lombard, et al. 2005, Sankaranarayanan, et al. 2013].

Поврежденные азотистые основания восстанавливаются посредством эксцизионной репарации оснований (англ. base excision repair (BER)), основными этапами которого являются: распознавание повреждения; удаление основания; разрезание нити ДНК; синтез ДНК и лигирование (сшивание) концов нити. ОР, поперечные сшивки между соседними основаниями, например, димеры тимина, а также ДНК-белок репарируются путем эксцизионной репарации нуклеотидов (англ. Nucleotide Excision Repair (NER)), основными этапами которого являются: распознавание повреждения; расплетание ДНК; связывание мультипротеиного комплекса с поврежденным участком; двойной разрез вокруг поврежденного участка; удаление поврежденного участка нити ДНК; восстановление поврежденного участка - синтез ДНК с использованием в качестве матрицы антипараллельной нити ДНК; лигирование (сшивание) концов нити. Эксцизионная репарация оснований и нуклеотидов являются быстрыми (репарация 2/3 от изначального количества повреждений происходит примерно за 5 мин) и, самое главное, как правило, безошибочными процессами благодаря наличию антипараллельной нити ДНК в качестве матрицы [Slupphaug 2003].

В клетках млекопитающих репарация ДР ДНК осуществляется в основном путем двух канонических механизмов: НГСК и гомологической рекомбинации (ГР) [Scully, et al. 2019]. Помимо этих механизмов существуют неканонические пути репарации ДР ДНК. Например, альтернативный НГСК, в ходе которого в качестве ключевого белка, распознающего ДР, выступает PARP1, а лигирование концов ДНК осуществляет комплекс лигазы III [Iliakis 2009].

В ходе реализации канонического НГСК сразу после образования ДР к участкам поврежденной ДНК привлекается комплекс KU70 / KU80. Комплекс KU70 / KU80 активирует путь НГСК, в котором киназа ДНК-PKcs и комплекс XRCC4 / Lig4 участвуют в воссоединении поврежденных концов ДНК. Во время

репарации с помощью НГСК эндонуклеаза Artemis осуществляет резекцию концов ДР (рис. 8). Такая резекция может привести к потере нуклеотидов и последующей нестабильности генома. Другим недостатком этого процесса является повышенная вероятность возникновения хромосомных перестроек из-за отсутствия контроля гомологии нитей ДНК. НГСК представляет собой сложный процесс с быстрой кинетикой, в случаях простых ДР ДНК за 30-40 минут восстанавливается около 50 % ДР, для сложных ДР ДНК это может занять 3-4 часа [Ozerov and Osipov 2015]. В целом НГСК является относительно быстрым путем репарации ДНК, но в то же время, приводящим к частым ошибкам, таким как мироделеции и цитогенетические нарушения.

Рекрутирование комплекса MRN (MRE11 / RAD50 / NBS1) к концам ДР ДНК активирует путь ГР, и этот комплекс инициирует резекцию концов ДР с помощью CtIP с последующей более длительной резекцией с помощью Exo1 или Dna2. В результате на обоих концах ДР формируется участок одноцепочечной ДНК (оцДНК). Комплекс репликативного белка А (RPA) связывается с оцДНК и впоследствии заменяется на RAD51. Такие концы оцДНК / RAD51 вторгаются в интактную гомологичную ДНК сестринской хроматиды, которая затем служит матрицей для безошибочной репарации ДНК с участием D-петли и образованием структуры Холлидея. ГР завершается разрушением структуры Холлидея, в процессе которого может произойти (а может и не произойти) обмен гомологичными участками сестринских хроматид [Iliakis 2009]. Таким образом, поскольку механизм ГР нуждается в интактной матрице ДНК, которая появляется только после репликации, он активируется во время поздней фазы S и G2, тогда как механизм НГСК активируется в любой момент клеточного цикла [Shibata 2017]. ГР является процессом с медленной кинетикой и характерными временами репарации 50 % ДР ДНК около 8-12 ч.

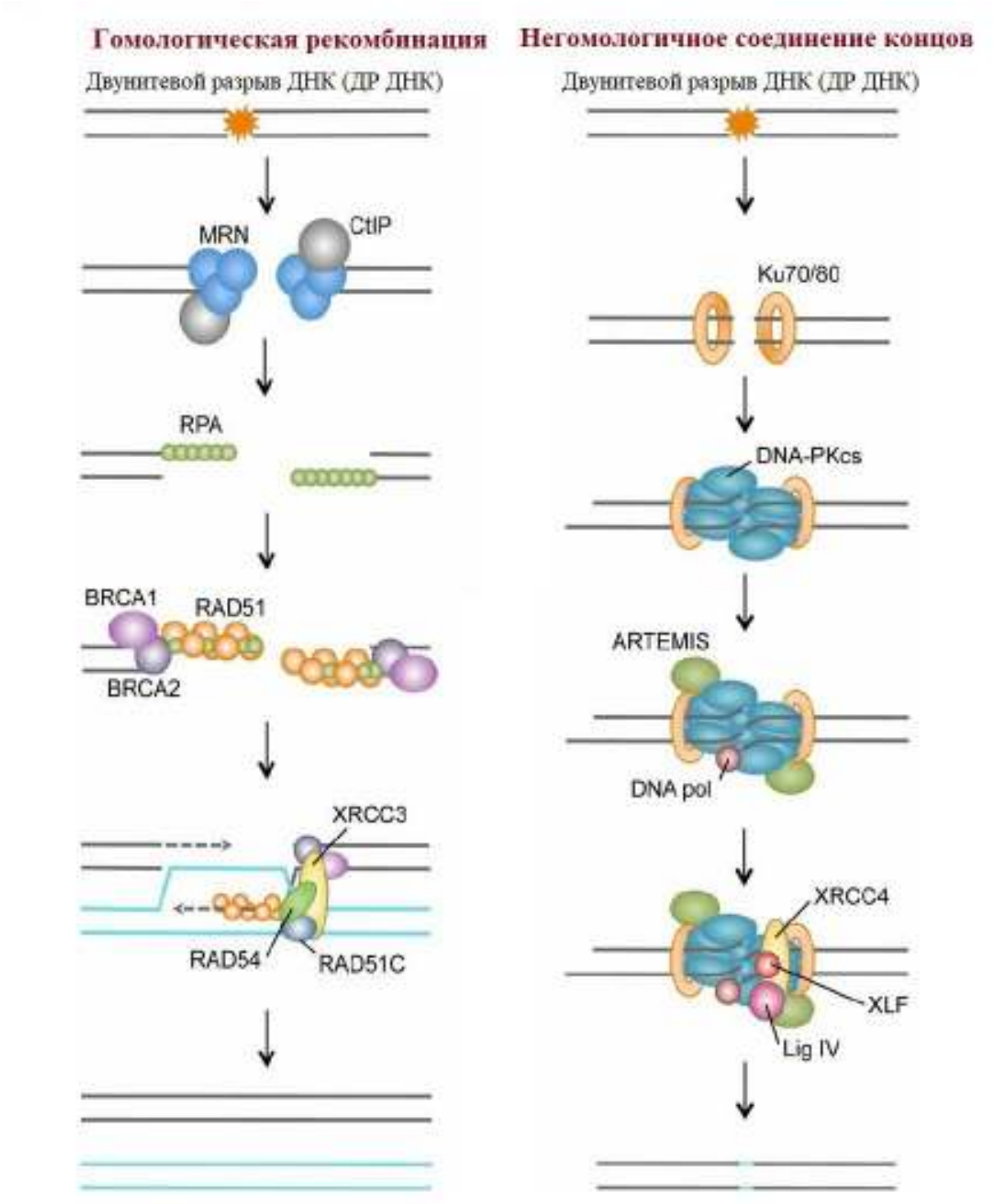


Рисунок 8. Упрощенная схема канонических путей репарации ДР ДНК. [Brochier and Langley 2013].

НГСК преимущественно (70-80 %) используется в случае репарации ДР ДНК, индуцированных ионизирующим излучением с низкой ЛПЭ. Однако

излучение с высокой ЛПЭ, которое присутствует в космическом излучении (например, тяжелые частицы), генерирует в основном сложные и кластерные повреждения ДНК. Поскольку НГСК не может восстанавливать такие повреждения ДНК, то для их восстановления часто активируется ГР [Yajima, et al. 2013]. При этом несмотря на появление сигналов активации ГР в G1 фазе, репарация 85 % повреждений происходит в S и G2 фазе [Yajima, et al. 2013]. При таком растянутом по времени процессе репарации резко увеличивается вероятность различных ошибок, которые в свою очередь запускают процессы реализации клеточного отклика: задержка клеточного цикла, инициация клеточной гибели и т.д., RIF1 и 53BP1 могут подавлять активацию ГР в G1 и влиять на выбор пути репарации между НГСК и ГР [Shibata 2017].

1.2.2 Фосфорилирование гистона H2AX в облученных клетках

Фосфорилирование корового гистона H2AX с образованием γH2AX является ранним и наиболее чувствительным индикатором образования ДР ДНК в облученных клетках [Bushmanov, et al. 2022, Osipov, et al. 2015, Ulyanenko, et al. 2019].

После индукции ДР ДНК в ядрах клеток перед фосфорилированием H2AX активируется гетерохроматиновый белок HP1-β. Он представляет собой хроматиновый фактор, связанный с гистоном H3, метилированным по лизину 9 (H3K9me). В ответ на повреждение ДНК казеинкиназа 2 (CK2) фосфорилирует HP1-β по треонину 51, что приводит к выходу HP1-β из хроматина за счёт разрушения водородных связей. Временная мобилизация HP1-β является важным фактором для фосфорилирования H2AX [Ayoub, et al. 2008].

Основной киназой фосфорилирующей гистон H2AX является сенсорная протеинкиназа ATM [Bakkenist and Kastan 2003, Kastan and Lim 2000]. После воздействия ионизирующего излучения неактивные димеры ATM распадаются на два активных мономера с высокой киназной активностью [Bakkenist and Kastan 2003, Helt, et al. 2005, Kastan and Lim 2000, Rogakou, et al. 1998]. Далее протеинкиназы MRE11, RAD50 и NBS1 образуют MRN комплекс, который

распознаёт повреждение ДНК, привлекает ATM к месту разрыва. ATM фосфорилирует субстраты - H2AX, BRCA1, 53BP1 MDC1 и контрольные точки клеточного цикла - Chk1, Chk2 [Dupre, et al. 2006, Srivastava, et al. 2009, Sun, et al. 2005]. Помимо ATM, H2AX могут фосфорилировать киназы ATR и DNA-PK. ATR фосфорилирует H2AX при коллапсе репликативной вилки (репликационный стресс) ведущем к образованию ДР ДНК с липкими концами из однонитевой ДНК, а также при образовании больших участков однонитевой ДНК [Ward and Chen 2001, Ward, et al. 2004]. DNA-PK фосфорилирует H2AX в процессе апоптотической фрагментации ДНК и при гипертоническом клеточном стрессе [Mukherjee, et al. 2006, Reitsema, et al. 2005]. В целом, после воздействия ионизирующего излучения фофорилирование H2AX в той или иной мере осуществляется всеми тремя киназами: ATM, ATR, DNA-PK [Wang, et al. 2005].

Образование ДР ДНК запускает активацию множества белков ответа (MRE11/NBS1/RAD50, MDC1, 53BP1, BRCA1) в клеточном ядре, где они совместно локализуются и взаимодействуют с H2AX [Ayoub, et al. 2008, Burma, et al. 2001, Celeste, et al. 2002, Kobayashi, et al. 2004, Lou, et al. 2006, Minter-Dykhouse, et al. 2008, Stucki and Jackson 2006, Ward, et al. 2003]. Считается, что именно присутствие фосфорилированной формы γH2AX привлекают факторы репарации ДНК [Kouzarides 2007, Taverna, et al. 2007]. Известны два домена, распознающие фосфорилированные аминокислотные остатки, среди них FHA (forkhead-associated), который узнаёт треонин в специфических аминокислотных последовательностях [Taverna, et al. 2007], и С-концевые домены BRCA1 BRCT, способные связывать фосфопептиды [Clapperton, et al. 2004, Manke, et al. 2003, Williams, et al. 2004, Yu, et al. 2003]. На первых стадиях репарации домены создают условия для узнавания MDC1 повреждения ДНК [Lukas, et al. 2004, Rodriguez, et al. 2003, Stewart, et al. 2003, Stucki, et al. 2005]. Было показано что MDC1 взаимодействует с NBS1 [Goldberg, et al. 2003, Stucki, et al. 2005], который совместно с MRN комплексом активирует ATM [Falck, et al. 2005, You, et al. 2005]. Благодаря фосфорилированию MDC1, CK2 обеспечивается связывание с NBS1 через домен FHA и BRCA, создавая условия MRE для фосфорилирования

H2AX на участках ДНК длиной в миллионы пар оснований [Chapman and Jackson 2008]. γH2AX способствует ремоделированию хроматина, выполняя функцию стыковочной площадки для белковых комплексов, связывающихся с разорванными концами ДНК [Bassing and Alt 2004, Bloor, et al. 1989, Reina-San-Martin, et al. 2003].

В целом, после образования ДР ДНК благодаря фосфорилированию и последующему высвобождению белка HP1-β, который связан с гистоном H3 [Ayoub, et al. 2008], изменяется структура хроматина, на который в пуле гистона H2A в зависимости от типа клеток приходится от 2 до 25% H2AX [Rogakou, et al. 1998]. В этих условиях запускаются процессы активации (фосфорилирования) протеинкиназ ATM, ATR, DNA-PK [Bakkenist and Kastan 2003, Furuta, et al. 2003, Kastan and Lim 2000]. На первых этапах после появления ДР происходит фофорилирование гистона H2AX по серину 139 с образованием γH2AX, который, в свою очередь, играет ключевую роль в деконденсации хроматина [Mailand, et al. 2007], распознавании ДР ДНК факторами репарации и сборке и активации репарационного комплекса [Rogakou, et al. 1998]. Затем MDC1 (медиатор контрольного белка повреждения ДНК) образует комплекс MDC1-γH2AX к которому в последствии присоединяются BRCA1 и 53BP1 [Scully and Xie 2013]. Помимо перечисленного комплекса на модифицированных концах ДНК собирается MRN комплекс, включающий MRE11, RAD50, NBS1, к которому присоединяются киназы RAD51 и ATM. На более поздних этапах репарации ДНК на модифицированных γH2AX концах включаются RAD52 и RAD54 [Essers, et al. 2002]. Функции γH2AX и его роль в реакции на повреждение ДНК схематично представлены на рисунке 9.

Таким образом, уже через несколько минут после образования ДР ДНК, вызванных воздействием ИИ (в том числе и плотноионизирующего), H2AX подвергается фосфорилированию по серину 139 с образованием фокусов (очагов) γH2AX в местах репарации ДР ДНК. В то же время в ядрах отмечается увеличение количества фокусов γH2AX, также напрямую коррелирующее с количеством образованных ДР ДНК [Kuo and Yang 2008]. Количественный анализ

фокусов γH2AX является достаточно чувствительным методом для определения единичных ДР ДНК [Banath, et al. 2004], в том числе при дозах облучения всего в несколько мГр [Rothkamm and Lobrich 2003]. В биомедицинской практике для быстрой оценки уровня фосфорилирования H2AX в облученных клетках с помощью проточной цитометрии часто используют более грубый показатель общей интенсивности флуоресценции или процент клеток, позитивных по γH2AX иммуноцитохимически окрашенных клеток [MacPhail, et al. 2003]. Остаточное количество не восстановленных ДР ДНК можно использовать для определения радиочувствительности клеток, их способности к восстановлению или эффективности репарации [Klokov, et al. 2006].

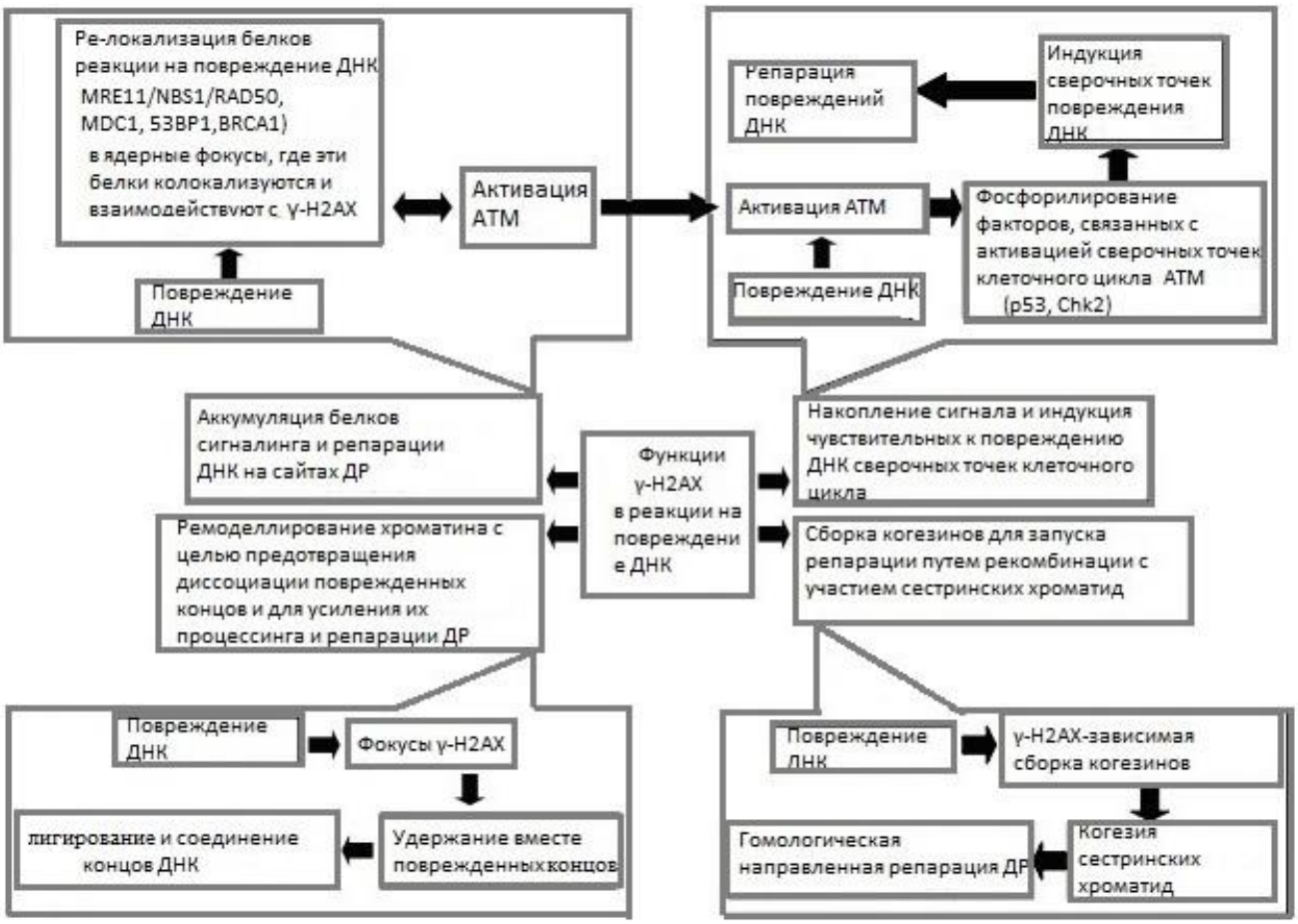


Рисунок 9. Фосфорилирование H2AX и его роль в реакции на повреждение ДНК [Podhorecka, et al. 2010].

За последние 20 лет анализу фокусов γH2AX уделяется все больше внимания, и в настоящее время он хорошо зарекомендовал себя в качестве биомаркера для обнаружения радиационно-индуцированных ДР ДНК [Ivashkevich, et al. 2012, Rogakou, et al. 1999]. Плюс ко всему, это чувствительный анализ, поскольку образование фокусов γH2AX было обнаружено в фибробластах и лимфоцитах после облучения в дозах от 1 мГр, а количество фокусов линейно зависит от дозы облучения [Rothkamm and Lobrich 2003].

Последние десятилетия анализ γH2AX применяется для изучения зависимости между количеством ДР ДНК и эффективностью репарации ДНК в различных типах клеток и тканей [Redon, et al. 2009, Valdiglesias, et al. 2013]. На клеточном уровне кинетика изменения количества фокусов γH2AX отражает скорость и эффективность репарации ДР ДНК [Sedelnikova, et al. 2003]. В работе Bhogal и коллег было показано, что неотрепарированные ДР ДНК через сутки и более после облучения, получившие название остаточные ДР ДНК, можно использовать для прогностической оценки индивидуальной восприимчивости к сложным повреждениям ДНК, которые могут быть фатальными для клеток [Bhogal, et al. 2010]. Например, было показано что после γ-облучения ^{137}Cs периферической крови добровольцев в дозе 4 Гр, при мощности дозы 0,73 Гр/мин, уровень γH2AX быстро увеличивался в течение 30 мин и достигал максимума ~ через 1 час, к 6 часам происходило быстрое снижение количества ДР ДНК, затем, к 24 часам после воздействия уровень γH2AX «выходил на плато» [Lee, et al. 2019]. Опубликовано большое количество научных статей, в которых продемонстрирована линейная зависимость выхода γH2AX в ответ на облучение в зависимости от дозы. В частности, показана зависимость изменений интенсивности флюоресценции γH2AX и количества фокусов γH2AX в ядре от дозы облучения (0, 2, 4 Гр) через разные периоды времени (30 минут, 1, 3, 6 и 24 часа) после облучения [Lee, et al. 2019]. Кроме этого, данные позволяют получить информацию о характере репарации ДР ДНК по изменению общей интенсивности флуоресценции иммуноцитохимически-меченного γH2AX или по абсолютному

количеству фокусов γH2AX [Lee, et al. 2019, Redon, et al. 2009, Wilkins, et al. 2017].

Были проведены исследования по изучению индукции и репарации ДР ДНК в цельной крови, полученной от взрослых добровольцев, после воздействия пучка быстрых нейтронов *in vitro* при двух разных мощностях дозы: низкой мощности дозы (0,015 Гр/мин) и высокой мощности дозы (0,400 Гр/мин) [Nair, et al. 2019]. Выход ДР ДНК анализировали через 30 мин после воздействия нейтронов в диапазоне доз от 0,125 до 2 Гр. Кинетику репарации изучали в разные периоды времени после воздействия нейтронного облучения в дозе 1 Гр. Было показано, что образование фокусов γH2AX было на 40% выше при воздействии излучения с высокой мощностью дозы по сравнению с облучением при низкой мощности дозы. Максимальные уровни фокусов γH2AX на клетку наблюдались через 2 ч после облучения. Число фокусов постепенно снижалось до значений 1,65 ± 0,64 фокусов на клетку при низкой мощности дозы и 1,29 ± 0,45 при высокой мощности дозы через 24 ч после воздействия, но при этом эти показатели значительно превышали контрольные значения. В таких клетках с высоким уровнем повреждения ДНК запускается процесс апоптоза ($p<0,005$). Это говорит о том, что количество остаточных ДР ДНК не возвращалось к фоновому уровню через 24 ч после облучения для обеих мощностей дозы. Более того, было показано, что через 12 ч после облучения частота фокусов для образцов, облученных при низкой мощности дозы, превышала частоту фокусов для образцов, облученных при высокой мощности дозы [Nair, et al. 2019]. Воздействие высоких доз нейтронного излучения приводит к образованию сложных и кластерных ДР ДНК. При анализе образующиеся в местах ДР скопления γH2AX могут сливаться в один больший фокус, который часто оценивается как один ДР ДНК, что занижает оценку генотоксического эффекта [Nair, et al. 2019].

Доказано, что количество индуцированных ДР ДНК пропорционально дозе облучения, тогда как на сложность ДР ДНК, на способность к репарации и на механизм отклика в ответ на повреждение ДНК конкретной клетки существенно влияет качество излучения [Urushibara, et al. 2008].

Радиационный риск от воздействия космического излучения, связанного с долгосрочными космическими полетами, например, таких как пилотируемый полет на Марс, помимо прочего, связан с воздействием тяжелых высоко энергетических частиц (HZE), от которых на сегодняшний день невозможно полностью защитить космонавтов [Durante and Cucinotta 2008, Durante and Kronenberg 2005]. Одной из особенностей дозы частиц HZE является более неоднородное распределение повреждений ДНК по объему клеточного ядра, по сравнению с фотонным ионизирующим излучением [Held 2009]. Известно, что HZE вызывает кластерные повреждения ДНК, образующиеся вдоль трека ионизации [Brenner and Ward 1992, Sutherland, et al. 2000]. Было показано, что при облучении ядрами He с линейной передачей энергии (ЛПЭ) 40кэВ/мкм образуется большое количество остаточных, длительно существующих фокусов γH2AX, что свидетельствует о медленной кинетике репарации ДР ДНК и значительной доли ДР, которые не подлежат элиминации [Rydberg, et al. 2005, Stenerlow, et al. 2000]. Можно предположить, что это связанно с нарушением в системе репарации сложных ДР ДНК, образовавшихся после воздействия излучения с высокой ЛПЭ, для которых, во-первых, характерно множественное повреждение линейного участка ДНК, охватывающее 10-20 нуклеотидов [Goodhead 1994], и во-вторых, очень близкое расположение повреждений в 3D структуре хроматина [Lobrich, et al. 1996, Rydberg 1996]. Эти факторы повышают вероятность некорректной репарации и ставит под вопрос сами процессы восстановления ДНК [Rydberg, et al. 2005]. Известно, что излучение с высокой ЛПЭ существенно нарушает процессы репарации ДР ДНК [Rydberg, et al. 2005]. Было показано, что через сутки после воздействия в дозе 1 Гр ионов азота с высокой ЛПЭ в непролиферирующих фибробластах человека было обнаружено повышенное количество остаточных фокусов γH2AX [Karlsson and Stenerlow 2004, Stenerlow, et al. 2000]. В других работах с помощью проточной цитометрии было обнаружено существенно более медленное снижение сигнала флуоресценции γH2AX в фибробластах человека после воздействия ионов железа с энергией 500МэВ по

сравнению с воздействием рентгеновского излучения [Asaithamby, et al. 2008, Desai, et al. 2005, Takahashi, et al. 2008].

Обобщая вышеизложенное, можно сделать заключение о том, что оценка уровня γH2AX важна как чувствительный маркер клеточного отклика на повреждения ДНК, включая процессы репарации. Очевидным преимуществом анализа γH2AX по сравнению с другими маркерами повреждения ДНК является высокая чувствительность, которая позволяет детектировать даже небольшое количество повреждений ДНК в клетках. При этом надо понимать, что нижний порог регистрации фосфорилированного H2AX в клеток различного типа может варьировать в зависимости от фонового уровня ядерных участков, связанных с репликацией ДНК и клеточным циклом [Ichijima, et al. 2005, McManus and Hendzel 2005].

1.2.3 Цитогенетические нарушения

Хромосомные аберрации являются классическим примером цитогенетического биомаркера воздействия ИИ и других агентов, вызывающих повреждения ДНК. Анализ хромосомных аберраций часто используются в эпидемиологических исследованиях на людях, лабораторных животных, в клеточных и тканевых системах in vitro, так как данный тест подходит для многих типов клеток [Pernot, et al. 2012]. Такой показатель как частота хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови человека может ассоциироваться с риском развития злокачественных новообразований [Bonassi, et al. 2008].

Среди хромосомных аберраций выделяют аберрации стабильного и нестабильного типов [Stevens-Kroef, et al. 2017]. Нестабильные хромосомные аберрации представляют собой фрагменты хромосом и перестроенные ацентрические, мультицентрические или кольцевые хромосомы. Нестабильные хромосомные аберрации возникают при делении клеток, и часто связаны с нарушением репликации ДНК в участках поврежденных концов без теломер или с сегрегацией хромосом. Наиболее часто используемым для радиационной биодозиметрии типом нестабильных хромосомных аберраций являются

дицентрические хромосомы. Они легко идентифицируются даже при классическом окрашивании по Романовскому-Гимзе благодаря характерной структуре с двумя центромерами и предпочтительны для оценки относительно недавнего воздействия ИИ или эффектов в долгоживущих непролиферирующих клетках. Перестроенные моноцентрические хромосомы являются стабильными хромосомными аберрациями, поскольку передаются дочерним клеткам при делении, благодаря чему используются в качестве биомаркера отсроченных эффектов воздействия ИИ. В отличии от нестабильных хромосомных аберраций, окраска по Романовскому-Гимзе не даёт исчерпывающей информации для выявления стабильных хромосомных аберраций. Поэтому для их оценки используется современный метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с ДНК-зондами, специфическими для определенных локусов хромосом [Beinke and Meineke 2012]. Ещё одна особенность анализа хромосомных аберраций заключается в том, что хромосомы хорошо видны только в метафазных клетках, в естественном положении. Для анализа хромосомных аберраций в интерфазных клетках используется метод преждевременной конденсации хромосом (PCC), когда конденсация хромосом в клетках в интерфазе вызывается за счёт слияния с митотическими клетками или химической обработкой [Durante, et al. 1999].

Микроядерный тест представляет собой упрощенный метод для анализа цитогенетических нарушений, его преимуществами является прежде всего простота, скорость анализа клеток и высокая чувствительность [Pernot, et al. 2012]. Микроядра представляют ацентрические фрагменты хромосом или целые хромосомы, отставшие во время клеточного деления. Микроядра возникают в результате неотрепарированных ДР ДНК (фрагменты хромосом) или повреждения митотического веретена деления [Fenech, et al. 2011].

С 1960-х годов для анализа генотоксических эффектов космической радиации и ретроспективной биодозиметрии у экипажа космических кораблей используют анализ хромосомных аберраций в лимфоцитах периферической крови [Maalouf, et al. 2011]. Было показано, что частота хромосомных аберраций у космонавтов как правило была выше после приземления, чем до полёта, особенно

при продолжительности космической миссии более 180 дней [George, et al. 2013, Maalouf, et al. 2011]. Затрудняют исследования оценки риска космического радиационного воздействия индивидуальная радиочуствительность и многофакторность радиационного анамнеза космонавтов. Однако, наши знания о вкладе частиц HZE, входящих в состав космического излучения, в индукцию хромосомных аберраций, все еще ограничены по сравнению с нашим пониманием эффектов ИИ с низкой ЛПЭ. В эксперименте с использованием FISH-гибридизации было показано, что частицы HZE вызывают более сложные хромосомные перестройки по сравнению с эффектами, вызванными ИИ с низкой ЛПЭ [George, et al. 2013]. При воздействии частиц HZE возникающие хромосомные аберрации существенно влияют на клеточный цикл, вызывая его задержку [Ritter and Durante 2010]. На модели мышей C57BL/6J Jms была изучена частота хромосомных аберраций через 1 и 2 месяца после воздействия рентгеновского излучения с низкой ЛПЭ и ионов Fe (HZE). При этом, FISH – методика, используемая для анализа хромосомных аберраций стабильного типа в спленоцитах показала, что воздействие HZE вызывает меньше транслокаций, чем рентгеновские лучи в пересчете на дозу излучения. ДР ДНК, образовавшиеся после воздействия HZE, вероятнее всего не репарируются и провоцируют остановку клеточного цикла или гибель клетки, при этом не вызывая хромосомных аберраций стабильного типа [Shimura and Kojima 2018].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Радиобиологические эксперименты на приматах

2.1.1 Эксперименты по изучению кривой "доза-эффект" при облучении периферической крови in vitro

2.1.1.1 Животные и взятие крови

В работе было использовано 6 самцов макак-резус (*Macaca mulatta*), массой 5-7 кг. Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и директивы № 2010/63/EU, принятой Европейским парламентом 22 сентября 2010 г. Разрешения на проведение работ было получено от Комиссии по биомедицинской этике Учреждения Российской академии наук «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем РАН», которая создана и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации. Исследования на периферической крови обезьян *in vitro* проводились за 1 месяц до проведения биомедицинских экспериментов *in vivo*. Кровь обезьян отбирали из паховой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА-K_2 в качестве антикоагулянта (“Vacuette”, Greiner Bio-One GmbH, Германия).

2.1.1.2 Облучение

Облучение периферической крови осуществляли гамма-квантами ^{60}Co на аппарате Рокус-М (Россия) в дозах 1, 3 и 5 Гр при мощности дозы 0.58 Гр/мин. После облучения образцы крови инкубировали при 37°C в течение 30 мин.

2.1.2 Эксперименты по изучению влияния ускоренных ядер криптона-84

2.1.2.1 Животные

В работе было использовано 6 самцов макак-резус (*Macaca mulatta*), массой 5-7 кг. Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и директивы № 2010/63/EU, принятой Европейским парламентом 22 сентября 2010 г. Разрешения на проведение работ было получено от Комитета по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», которая создана и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации.

2.1.2.2 Облучение

Транквилизированные животные помещались в приматологическое кресло (рис. 10). Однократное облучение приматов пучком ядер криптона-84 проводили на ускорителе заряженных частиц «Нуклотрон» в Объединенном институте ядерных исследований (ОИЯИ), г. Дубна.

Пучок ядер криптона направлялся в область головы с затылочной части черепа. Расчет средней линейной передачи энергии (ЛПЭ) ядер криптона проводился с учетом затылочной кости мозга (cortical bone) толщиной 0,5 см и плотностью 1,85 г/см^3. Средняя плотность мозга принималась равной 1,054 г/см^3. С учетом этого энергия ядер криптона на входе в мозг составляла 2,273 ГэВ и значение ЛПЭ на входе 251,9 кэВ/мкм. Толщина мозга бралась равной 5 см, и ЛПЭ на выходе из мозга составляла 267,8 кэВ/мкм. Поток ядер криптона, необходимый для создания в мозге поглощенной дозы 1 Гр, был равен $2{,}402 \cdot 10^6$ ядер/см^2.

Режим работы ускорителя: частота импульсов 0,1 Гц, растяжка медленного вывода ~ 2,5 сек. Пучок ядер криптона практически чистый, т.е. примесь других ядер с меньшими зарядами менее 10%. Пучок в месте облучения обезьян был узким и имел в сечении форму, близкую к эллипсу (большая ось по вертикали) с

шириной по X на полувысоте около 0,34 см, а по Y – 0,86 см. На рисунке 11 приведено пространственное распределение плотности потока ядер пучка, измеренное радиохромной пленкой Gafchromic EBT-3 (Ashland Advanced Materials, США).

Рисунок 10. Облучаемое животное в приматологическом кресле.

Измерение потока частиц, прошедших через мозг обезьян, осуществлялось с помощью пролетной ионизационной камеры, предварительно градуированной в этом пучке ядер криптона по показаниям сцинтилляционного счетчика. Чувствительность камеры к ядрам криптона с энергией 2,3 ГэВ/н составила 14,0 ядер на 1 импульс камеры. Фоновый счет камеры составлял менее 1 %.

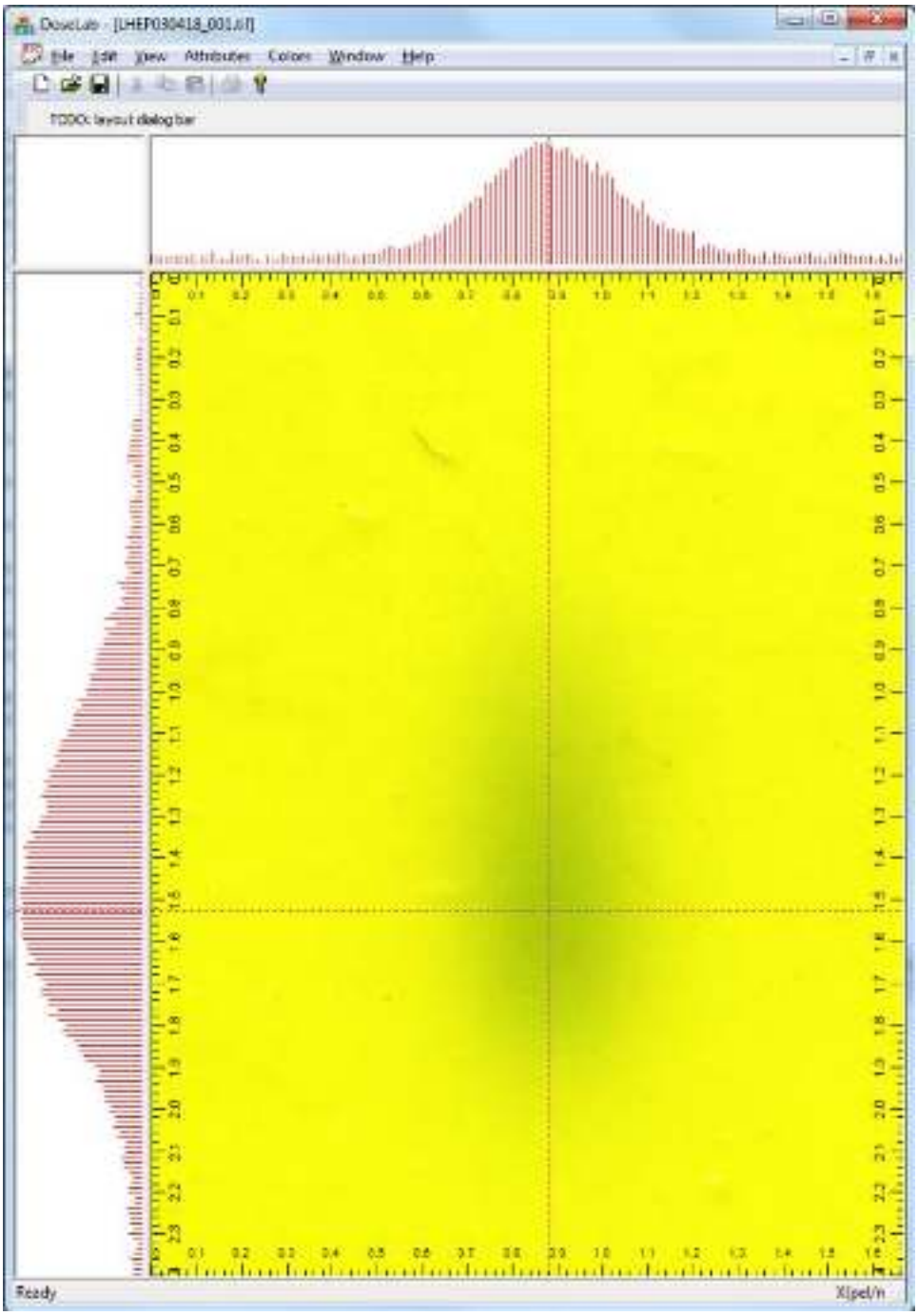


Рисунок 11. Пространственное распределение плотности потока ядер пучка, измеренное радиохромной пленкой Gafchromic EBT-3.

Длительность облучения обезьян составила 5-8 мин. Так как облучение производилось узким пучком, то были облучены только локальные участки мозга (область гиппокампа), а не весь мозг. Поглощенная доза, усредненная по всему мозгу обезьян, оценивалась в 0,15 Гр. В малом объеме мозга, куда попадал пучок, локальная доза достигала 3 Гр. Основная часть потока облучения приходилась на гиппокамп.

Сравнивая поток ядер в нашем эксперименте с потоком ядер галактического космического излучения (ГКИ) в марсианской миссии, можно отметить, что за средний срок миссии (1,8 - 2,5 года) ожидаемый поток тяжелых ядер ГКИ составит примерно $2 \cdot 10^7$ ядер/см^2. Таким образом, поток ядер в нашем эксперименте был меньше того, что ожидается в глубоком космосе, но зато заряд ядра криптона существенно превышал средний заряд тяжелых ядер ГКИ.

2.1.2.3 Взятие крови

Кровь обезьян отбирали из паховой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА-К2 в качестве антикоагулянта (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Германия) через 17 и 34 ч, а также через 42 и 96 суток после облучения.

2.1.3 Эксперименты по изучению влияния комбинированного воздействия ионизирующего излучения и моделируемой невесомости, имитирующих условия космического полета

2.1.3.1 Животные

В работе было использовано 6 самцов макак-резус (*Macaca mulatta*), массой 5-7 кг. Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и директивы № 2010/63/EU, принятой Европейским парламентом 22 сентября 2010 г. Разрешения на проведение работ было получено от Комитета по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» и Комиссии по биомедицинской этике

Учреждения Российской академии наук «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем РАН», которая создана и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации.

2.1.3.2 Антиортостатическая гипокинезия и облучение

В эксперименте по исследованию эффектов комбинированного действия двух типов ионизирующих излучений (гамма-излучение и ионы ^{12}C) и антиортостатической гипокинезии (АНОГ) на приматах животных подвергали 7-суточному воздействию АНОГ. Для этого обезьяны в специальных костюмах фиксировались на специальных столах с наклоном в сторону головы под углом 6°. Данная модель является общепринятой для воспроизведения таких эффектов невесомости как перераспределение жидкости в организме и ограничение подвижности в наземных экспериментах на людях (испытателях-добровольцах) и была адаптирована нами к экспериментам на приматах [Belyaeva, et al. 2021]. Облучение проводилось в состоянии АНОГ гамма-лучами на 6-й день моделируемой невесомости в суммарной дозе 1 Гр. Животные из экспериментальной группы помещались на сутки в специально оборудованную комнату с гамма-установкой ГОБО-60 с источником ^{137}Cs (72 г-экв. Ra). Мощность дозы составила 2,34 сГр/ч. На рис. 10 показано расположение животного в приматологическом кресле для АНОГ. Таким образом, было промоделировано синхронное комбинированное воздействие длительного гамма-облучения и эффектов моделируемой невесомости. Животные из контрольной группы находились в отдельной комнате в условиях, имитирующих режим экспериментальной группы. Световой режим и режим питания в двух группах был одинаковый. Облучение головы животных ионами ^{12}C (450 МэВ/нуклон) проводилось на 5-й день после прекращения моделирования невесомости в дозе 1 Гр на ускорительном комплексе У-70 Института физики высоких энергий (Протвино).

2.1.3.3 Взятие крови

Кровь обезьян отбирали из паховой вены в вакуумные пробирки с ЭДТА-K_2 в качестве антикоагулянта (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Германия) через 1, 19, 92, 145, 195 и 446 суток после облучения.

2.1.4 Выделение лимфоцитов и проточно-цитометрический анализ доли γH2AX- позитивных клеток

Циркулирующие лимфоциты представляют собой синхронную нециклическую популяцию с низким процентом нуклеосомного варианта H2AX, что обуславливает низкий фоновый уровень γ-H2AX [Juerss, et al. 2017].

Выделение лимфоцитов крови проводили путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин (Ficoll-Paque PLUS, General Electric Healthcare, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. После выделения лимфоциты отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 1 x 10^6 клеток/мл.

Оценку доли лимфоцитов с высоким количеством радиационно-индуцированных ДР ДНК проводили при помощи анализа фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX). Для иммунофлуоресцентной окраски γH2AX использовали мышиные моноклональные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor® 488 (Anti-phospho Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, Alexa Fluor® 488 Conjugate Antibody, 05-636-AF488, Millipore Corp., США). Анализ проводили на проточном цитометре BD FACSCalibur (США) со скоростью 200 клеток/сек. Для оценки доли γH2AX позитивных клеток использовали FL1 канал флуоресценции (фильтр 530/30 нм), дополнительно проводили окрашивание ядер клеток PI (1 мг/мл), регистрируемое по FL2 каналу флуоресценции (фильтр 585/42 нм) в линейной шкале. Для отсечения неспецифического сигнала флуоресценции (ложноотрицательных и ложноположительных клеток) использовали изотипический контроль флуоресценции IgG конъюгированные с Alexa Fluor® 488 (BD Pharmingen) для каждого образца. В каждом образце анализировали не менее 50 тыс. клеток.

2.2 Радиобиологические эксперименты на мышах

2.2.1 Эксперименты по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля

2.2.1.1 Животные

Эксперименты выполнены на 106 аутбредных мышах, самках, стока ICR CD-1 с исходной массой 22-30 г. Животные получали стандартный корм для грызунов фирмы Чара, и деионизированную воду *ad libitum* и содержались в клетках по 9 животных. Мечение животных осуществляли водно-спиртовым раствором пикриновой кислоты накануне облучения.

Эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» Совета Международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1995 г.

Разрешение на проведение работ было получено от Комиссии по биомедицинской этике Учреждения Российской академии наук «Государственный научный центр Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем РАН», которая создана и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации.

2.2.1.2 Дизайн эксперимента и облучение

Для исследования была предоставлена трехслойная конструкция элемента оболочки проектируемого транспортного корабля (ПТК) (паспорт №800-6-086/18 от 19.10.2018 г.), состоящая из слоя тепловой защиты на углепластиковой подложке. Внутренняя структура оболочки показана на рентгенограмме (рис. 12).

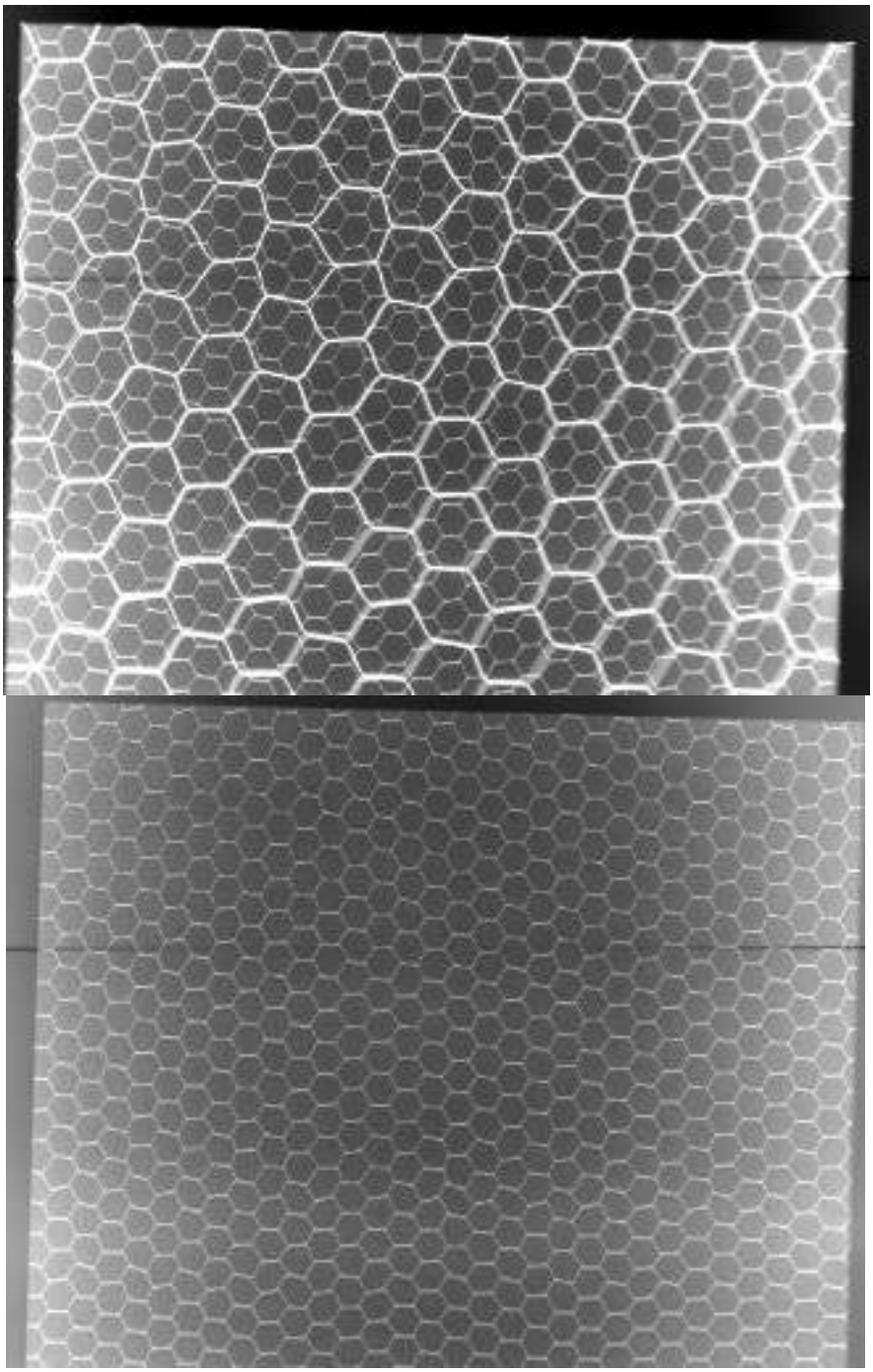
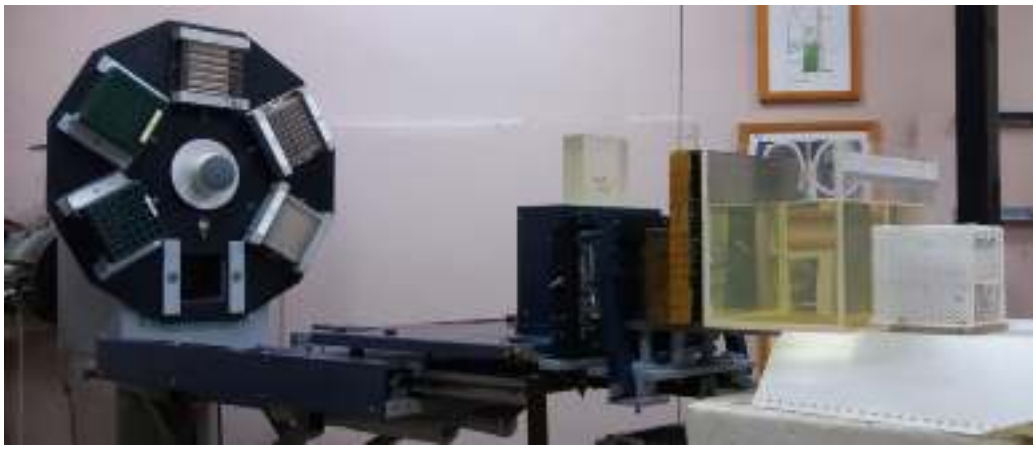


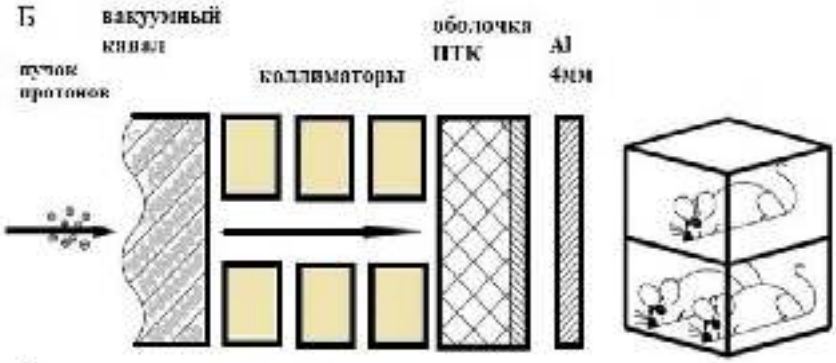
Рисунок 12 Рентгеновские снимки элемента оболочки проектируемого транспортного корабля.

Дополнительно использовали алюминиевую пластину толщиной 4 мм, плексиглас толщиной 50 мм и водные фантомы с толщиной 160 мм и 250 мм. Расположение радиационной защиты и клеток с животными в ходе эксперимента показано на рисунке 13.

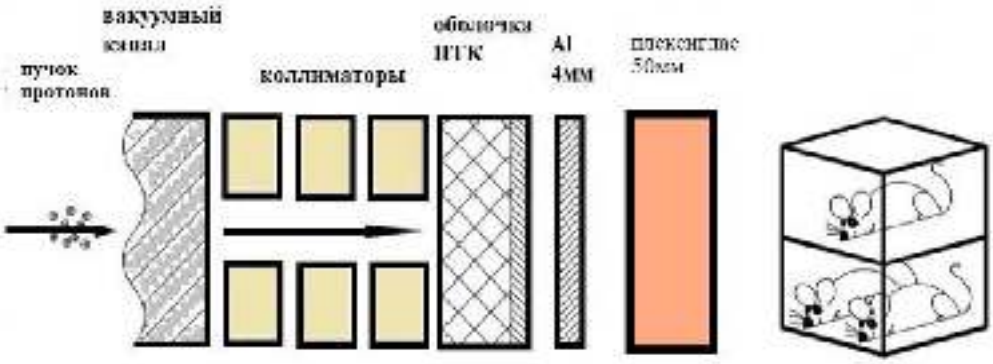
А



Б



В



Г

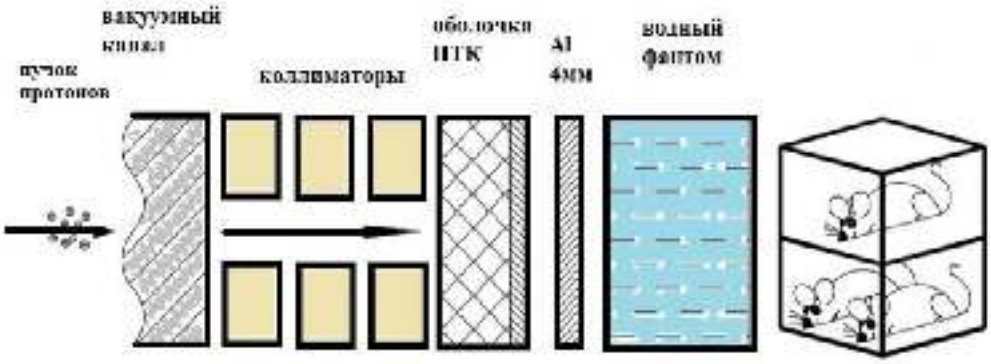


Рисунок 13. Расположение радиационной защиты и клеток с животными в ходе эксперимента: фото (А) и схема (Б, В, Г).

Облучение проводили протонным пучком в медицинской кабине фазотрона ОИЯИ (г. Дубна). Использовали пучок с энергией 163 МэВ в дозе 0,5 Гр при средней мощности дозы 0,5 Гр/мин. Сечение пучка составило 9×9 см, что позволило облучать одновременно до 4 животных (мышей), размещенных продольно по оси пучка в специальных пластиковых контейнерах.

Эвтаназию животных путем декапитации осуществляли через 18-19 часов после облучения.

2.2.2 Исследование эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка высокоэнергетических протонов через бетонную преграду

2.2.2.1 Животные

Эксперименты проведены на 214 аутбредных мышах ICR CD-1, самках с массой от 24 до 35 г (при введении в эксперимент), SPF-категории, содержавшихся в конвенциональных условиях. До введения в эксперимент мышей содержали в пластиковых клетках по 25 голов, со свободным доступом к брикетированному корму (фирмы Чара) и деионизованной воде.

Эксперименты проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных» Совета Международных медицинских научных организаций (CIOMS), Женева, 1995 г.

Разрешение на проведение работ было получено от Этического комитета ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, который создан и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации.

2.2.2.2 Дизайн эксперимента и облучение

Облучение проводилось на фазотроне ОИЯИ г. Дубна. Поле смешанного (гамма-кванты и адроны) вторичного излучения формировалось в результате прохождения пучка протонов с энергией 650 МэВ через бетонную преграду

переменной толщины (рис. 14 а). Бетонная преграда представляла собой сборку с поперечными размерами 50×60 см, изготовленную из бетонных блоков размером 20 ×20 ×50 см с удельным весом около 2,15 г/см^3, толщина которой в эксперименте менялась от 20 до 80 см. Для регистрации ионизирующего излучения использовался алмазный дозиметр ДКДА-01 (Институт физико-технических проблем, г. Дубна) с чувствительным объемом детектора 5 мм^3 и диапазоном измерения поглощенной дозы фотонного, электронного и протонного излучений до 100 Гр. Блок регистрации отображает информацию о величине заряда, Кл; дозы, Гр; тока, А; мощности дозы, Гр/с. Для позиционирования пучка на поверхности бетонной стенки и для измерения пространственного распределения вторичного излучения за различными толщинами бетонной стены использовалась радиохромная пленка Gafchromic EBT2 (International Specialty Products, США).

Животных располагали в специально сконструированной клетке из перфорированного пластика с девятью (1-9) ячейками для мышей, каждая размером 5×5×5 см (рис. 14 б). В каждую ячейку помещали по 2 животных. Клетку располагали горизонтально, перпендикулярно оси пучка таким образом, чтобы ось пучка проходила через ячейку 5. В каждом эксперименте была группа транспортного контроля: животные, перенесшие все перемещения в соответствующем транспорте, перепады температур и др. как и опытные животные, за исключением облучения.

Особенности формирования поля вторичного излучения зависит от многих факторов. Нейтронный компонент, т.е. соотношение тепловых 10^{-8} – 10^{-7} МэВ, испарительных 1-10 МэВ и каскадных 100 МэВ нейтронов зависит от толщины бетонной защиты и количества связанной воды в блоках. За тонкой преградой (20 см) нейтроны не успевают термализоваться, поэтому они не учитываются. Протонный компонент формируется благодаря упругому и квазиупругому рассеянию ядер первичных протонов. При прохождении центра мишени часть энергии протонов пучка рассеивается, и они составляют основной вклад в спектр

частиц. При этом если энергия достигает значения в 300 МэВ, то происходит ядерная реакция между протонами и ядрами веществ, в результате которой образуются пи-мезоны, с энергией не превышающей 200-300 МэВ. При распаде пи-мезонов по направлению первичного протонного пучка происходит обогащение спектра гамма-квантами в области энергий 100 МэВ.

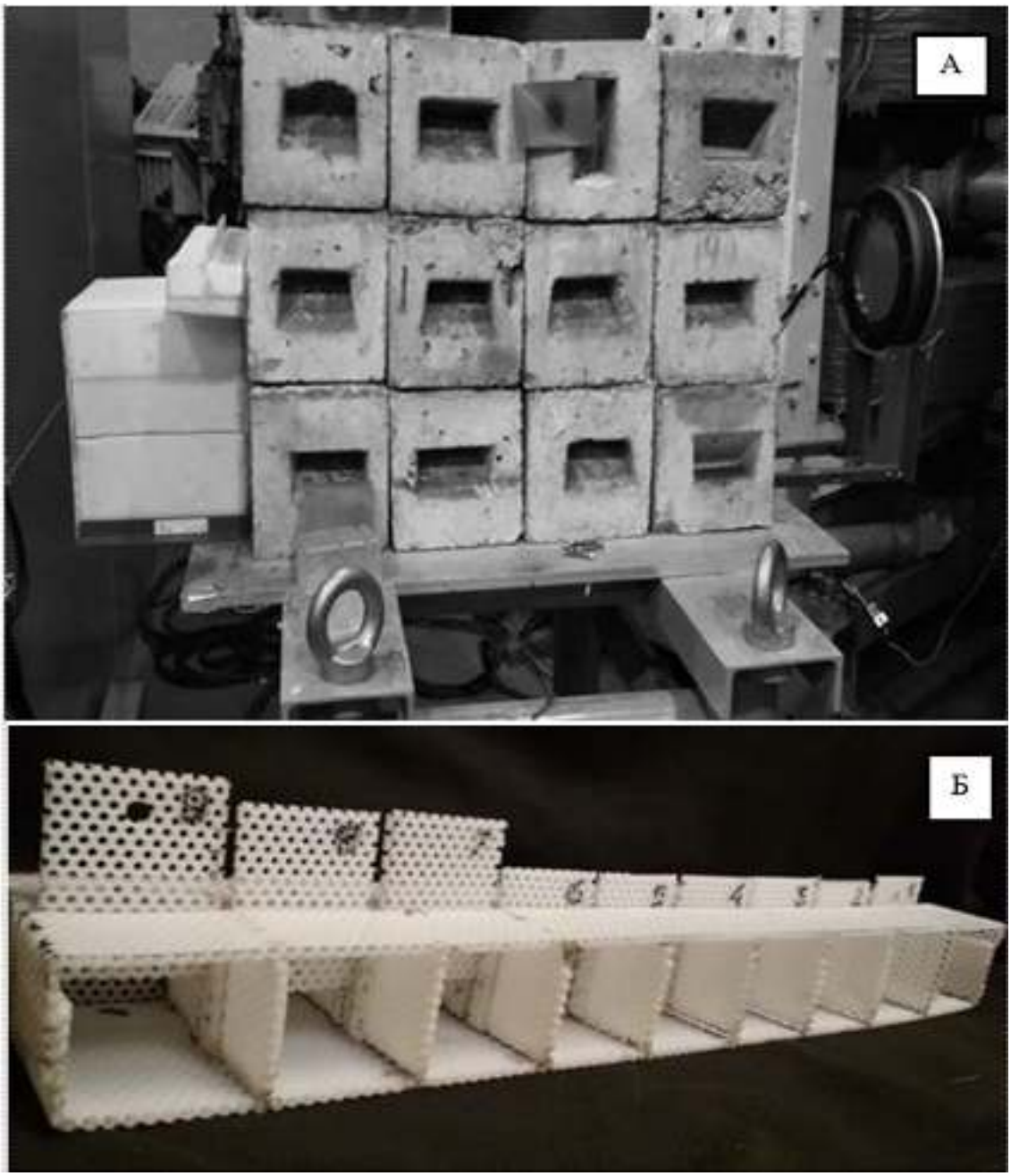


Рисунок 14. Бетонная конструкция сбоку (А) и клетка из перфорированного пластика с девятью (1-9) ячейками для мышей (Б).

В программе SRIM-2003 [Ziegler 2004], позволяющей оценить торможение и диапазон ионов в веществе, было рассчитано что при плотности бетона 2,15 г/см³ и энергии протонов в пучке 650 МэВ пробег квантов составит 95,2 см. На рисунке 15 показано пространственное поле распределения спектра квантов вторичного излучения: нейтронов, протонов, пи-мезонов, гамма-квантов, образующихся за бетонной преградой толщиной 20 см. Область пролета пучка первичных протонов через преграду принята за ноль. В этом участке наблюдается максимум флюенса, основной вклад вносят как вторичные протоны, так и часть протонов первичного пучка, для которых при энергии 650 МэВ 20 см преграды недостаточно для полного торможения. Из середины преграды вылетает часть первичных протонов пучка и протоны с малыми углами рассеяния, после упругих и квазиупругих взаимодействий с ядрами вещества преграды. Распределение фермионов нейтронов представлено, в основном, по краям и составляют подавляющую часть флюенса адронов, но при этом не имеют резкого максимума. В процессе неупругого рассеяния нейтронов или их захвата образуются гамма-кванты, что отражается на рисунке в виде практически полного совмещения с рисунком распределения флюенса нейтронов. В гораздо меньшем количестве за бетонной преградой представлены пи-мезоны. В зависимости от рассматриваемой точки, компонентный состав вторичного поля излучения варьирует в широких пределах, что позволяет изучить влияние нескольких комбинаций компонентов вторичного излучения на исследуемые показатели. По краям это будет воздействие преимущественно нейтронов, а в центре преграды – высокоэнергетические протоны [Samoylov, et al. 2021].

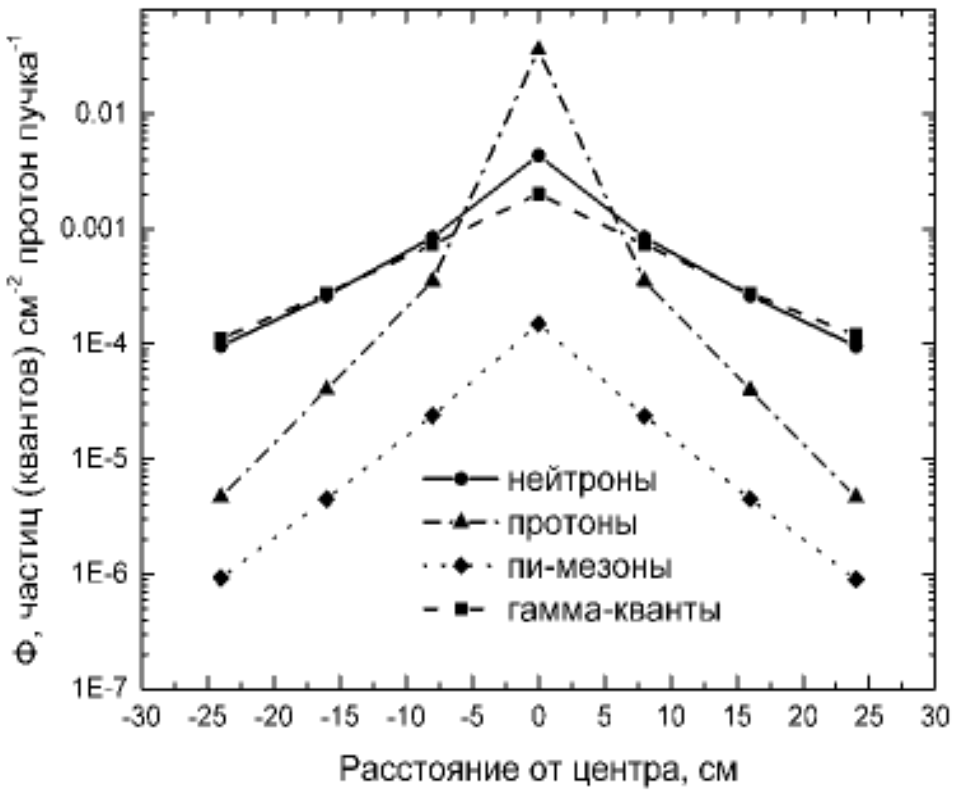


Рисунок 15. Пространственные распределения флюенсов (φ) нейтронов, протонов, пи-мезонов, гамма-квантов за стенкой толщиной 20 см.

На рисунке 16 представлены пространственные распределения флюенсов нейтронов, протонов, пи-мезонов и гамма-квантов за бетонной защитой толщиной 40 см. Пространственное распределение флюенсов адронов за защитой 40 см более плоское, чем за 20-см защитой, поскольку с ростом толщины защиты начинает все большую роль играть межъядерный каскад и протоны на краях защиты формируются во взаимодействиях нейтронов с ядрами в последнем слое защиты. Флюенсы протонов в центральной части защиты, в целом, снижены, по сравнению с 20-см защитой, но одиночные акты рассеяния первичных протонов пучка, как и часть не испытавших взаимодействия протонов пучка, все еще создают острый максимум поля за защитой по оси пучка. Снижается и количество пи-мезонов за защитой вследствие снижения средней энергии нуклонов в защите.

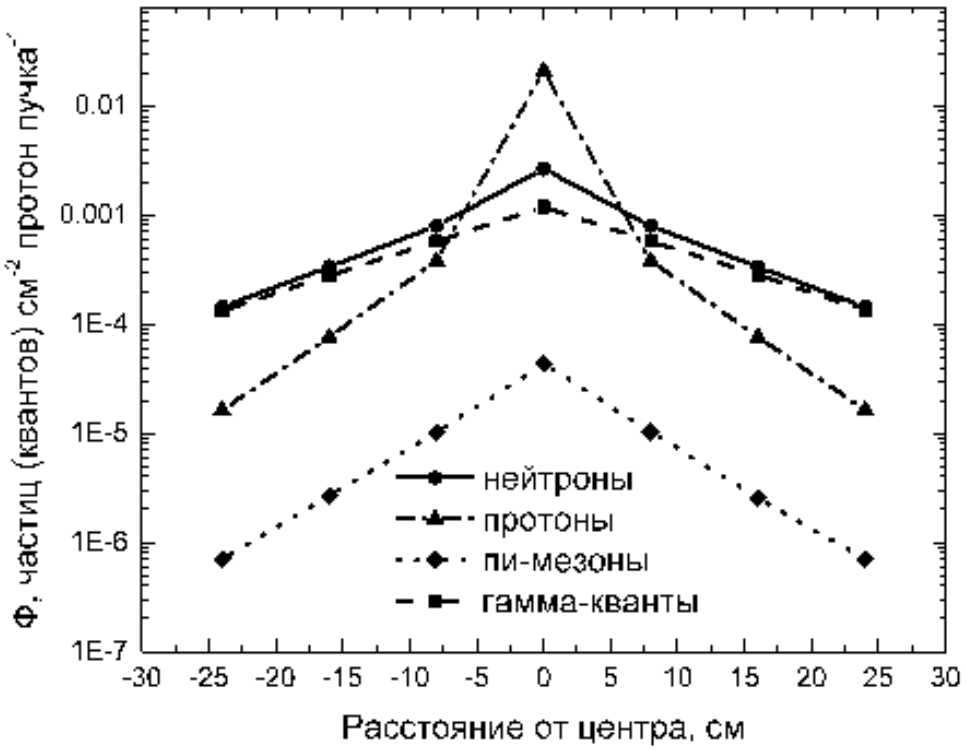


Рисунок 16. Пространственные распределения флюенсов нейтронов, протонов, пи-мезонов, гамма-квантов за стенкой толщиной 40 см.

На рисунке 17 представлены пространственные распределения флюенсов нейтронов, протонов, пи-мезонов и гамма-квантов за бетонной защитой толщиной 80 см. Видно, что за толстой защитой пространственные распределения вторичных адронов фактически полностью формируются в результате межъядерного каскада, поскольку свободный пробег до неупругого взаимодействия в бетоне нейтронов даже высокой энергии (близкой к энергии первичных протонов пучка) составляет около 40 см. Выходы адронов из защиты снижаются, т.к. при такой толщине бетона начинает превалировать ослабление излучения в защите. Из-за диссипации энергии нуклонов в защите выход пи-мезонов из неё становится пренебрежимо малым.

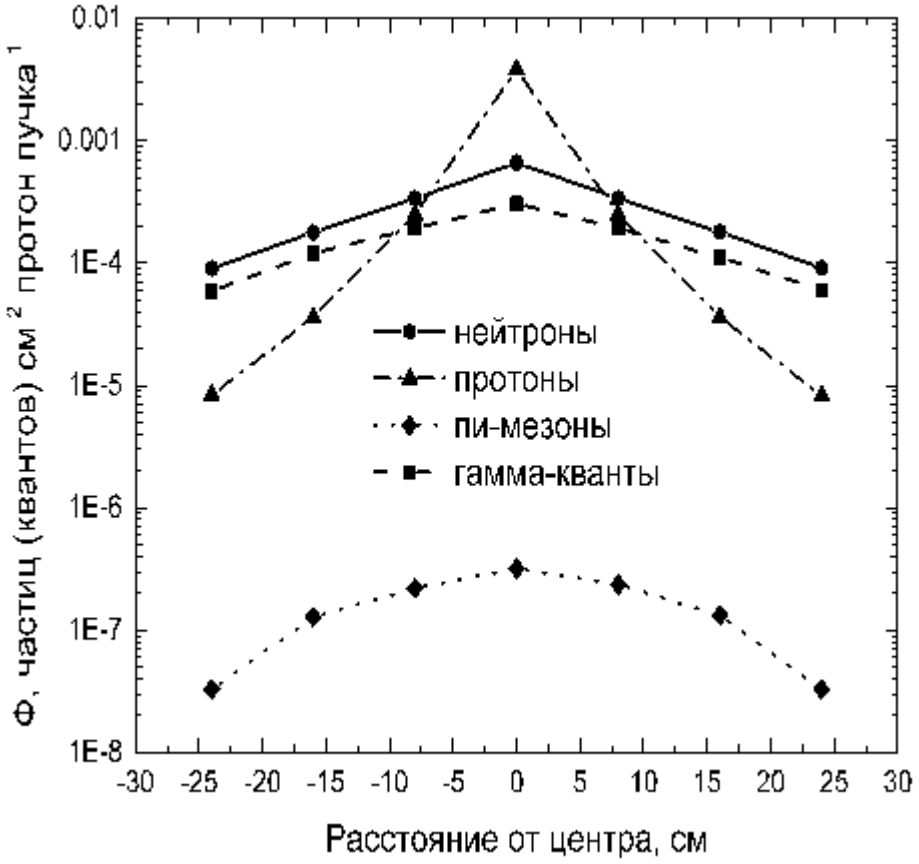


Рисунок 17. Пространственные распределения флюенсов нейтронов, протонов, пи-мезонов, гамма-квантов за стенкой толщиной 80 см.

Расположение облучаемых мышей за бетонной сборкой показано на рисунке 18. Расстояние от поверхности бетона до центров "мышей" (ячеек) – 1.9 см, расстояние между центрами "мышей" – 5 см (рис. 18).

Для оценки поглощенных доз рассчитывались для каждой толщины бетона энергетические распределения частиц (протонов, нейтронов и заряженных π-мезонов) и гамма-квантов в объеме сфер, имитирующих мышей, и парциальные поглощенные дозы по каждому компоненту смешанного поля излучения за защитой. Спектры частиц – это усредненные по объему ячеек энергетические распределения флюенса частиц в энергетических бинах – распределении энергии по группам (чтобы получить дифференциальный спектр по энергии надо значение

флюенса в каждом бине разделить на ширину бина, т.е. получить спектр в единицах частиц·МэВ$^{-1}$·см$^{-2}$).

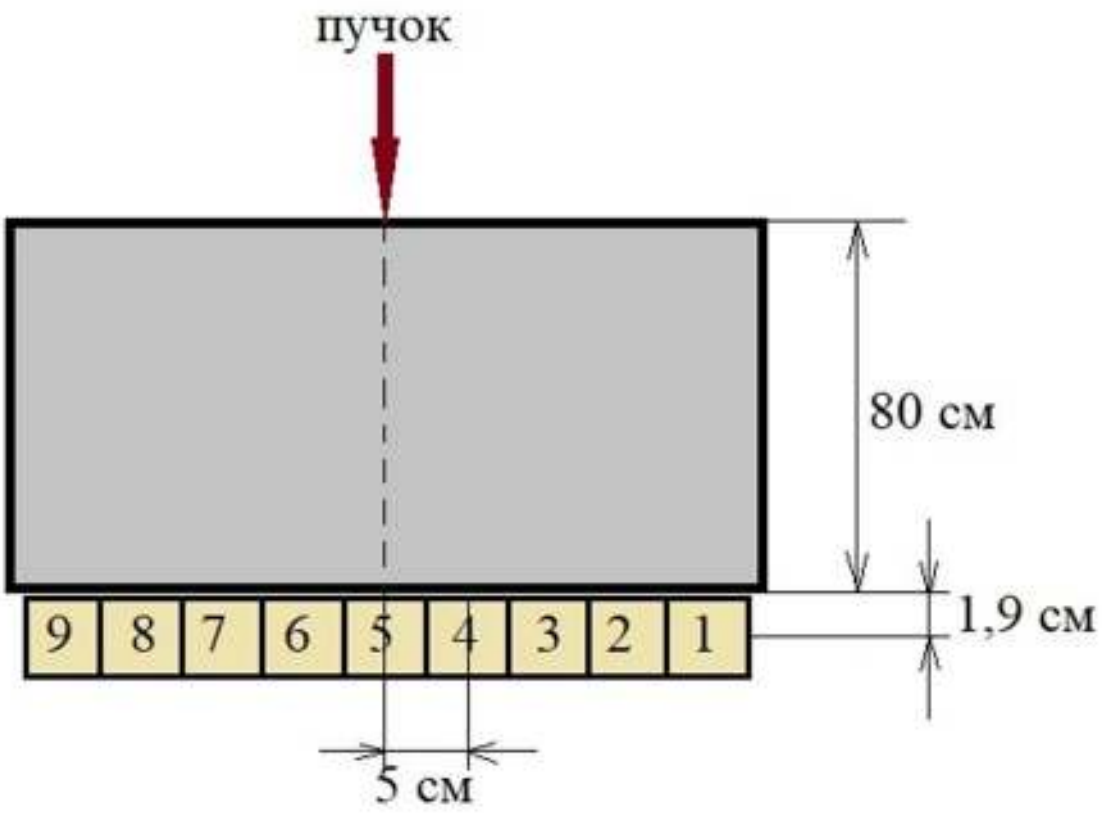


Рисунок 18. Расположение облучаемых мышей за бетонной стенкой

Из середины преграды вылетает часть первичных протонов пучка и протоны с малыми углами рассеяния, после упругих и квазиупругих взаимодействий с ядрами вещества преграды. Распределение нейтронов представлено, в основном, по краям и составляют подавляющую часть флюенса адронов, но при этом не имеют резкого максимума. В процессе неупругого рассеяния нейтронов или их захвата образуются гамма-кванты. В гораздо меньшем количестве за бетонной преградой представлены пи-мезоны. В зависимости от рассматриваемой точки, компонентный состав вторичного поля излучения варьирует в широких пределах, что позволяет изучить влияние нескольких комбинаций компонентов вторичного излучения на исследуемые

показатели. На расстоянии 30 см от центра преграды это будет воздействие преимущественно нейтронов, а в центре - протонов [Samoylov, et al. 2021].

Усредненные значения поглощенных доз, получаемых мышами за бетонной преградой толщиной 20, 40 и 80 см в зависимости от расположения ячеек представлены в таблице 1. Во всех экспериментах доза протонов на входе в бетонную защиту составила 25 Гр, при средней мощности дозы 0,6 Гр/сек.

Таблица 1. Поглощенные дозы, получаемые мышами за бетонной преградой, толщиной 20, 40 и 80 см в зависимости от расположения ячеек, Гр.

Толщина бетона, см	Расстояние от центра входного пучка протонов, см				
	0	5	10	15	20
20	13.90±2.09	5.66±1.14	0.64±0.09	0.30±0.03	0.17±0.06
40	8.45±1.27	3.81±0.31	0.59±0.14	0.24±0.01	0.13±0.01
80	2.65±0.40	1.35±0.25	0.36±0.15	0.19±0.02	0.11±0.01

2.3 Анализ радиобиологических эффектов

2.3.1 Оценка органного индекса селезёнки

Массу мышей и селезёнки определяли на аналитических весах Ohaus (Германия) с ценой деления 1 мг. Селезенку взвешивали после извлечения из брюшной полости и очистки от соединительной ткани с помощью пинцета и ножниц. Органный индекс селезёнки вычисляли по формуле: (масса органа/масса тела)*1000.

2.3.2 Получение суспензии клеток селезёнки

Спленоциты выделяли путём механической гомогенизации селезёнки в охлаждённом до 4°С фосфатно-солевом буфере (137 mM NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na_2HPO_4, 2 мМ K_2HPO_4, pH 7,4) из расчета 1 мл буфера на 10 мг ткани лимфоидного органа. Полученную суспензию клеток дважды фильтровали через нейлоновый фильтр Falcon™ Cell Strainers (Thermo Fisher Scientific, США) с размер ячейки 40 мкм. Клетки концентрировали путём центрифугирования 250g 15 минут, после чего пипеткой отбирали надосадочную жидкость. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ледяного этилового спирта (70°) и помещали на 4 часа в морозильную камеру -20°. Перед анализом образцы дважды центрифугировали в фосфатно-солевом буфере, содержащим 0,3% BSA и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 1 х 10^6 клеток/мл. Определение концентрации клеток проводили с использованием камеры Горяева в соответствии с прилагаемой инструкцией производителя на световом микроскопе Olympus CKX-41 (Olympus, Япония).

2.3.3 Проточно-цитометрический анализ доли γH2AX-позитивных клеток

Для оценки γH2AX-позитивных клеток были выбраны конъюгированные с флуоресцентным красителем специфические антитела к γH2AX. В качестве иммунофлуоресцентной метки γH2AX использовали мышиные моноклональные антитела Anti-phospho Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, Alexa Fluor® 488 Conjugate Antibody (05-636-AF488, Millipore Corp., США). Анализ проводили на проточном цитометре BD FACSCalibur (США) со скоростью 200 клеток/сек. Для оценки доли γH2AX - позитивных клеток использовали FL1 канал флуоресценции (фильтр 530/30 нм), дополнительно проводили окрашивание ядер клеток PI (1 мг/мл), регистрируемое по FL2 каналу флуоресценции (фильтр 585/42 нм) в линейной шкале. Для отсечения неспецифического сигнала флуоресценции (ложноотрицательных и ложноположительных клеток) использовали изотипический контроль флуоресценции IgG конъюгированные с Alexa Fluor®

488 (BD Pharmingen) для каждого образца. В каждом образце анализировали не менее 50 000 клеток. Результаты анализировали в программе BD Cell Quest Pro.

2.3.4 Проточно-цитометрический анализ доли TUNEL-позитивных клеток

Фрагментацию ДНК определяли с помощью Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Thermo Fisher Scientific, США), дополнительно для мечения участков связывания TDT с 3' концом фрагментированной молекулы ДНК в реакционную смесь вносили FLu-12-dUTP (ООО Биосан, Россия). После добавления реакционной смеси исследуемые образцы инкубировали при 37 °С в течение 60 минут в темноте. Перед анализом в пробирки добавляли PI (1 мг/мл) для выделения единичных ядер клеток и отсечения дуплетов. Флуоресценция FLu-12-dUTP регистрировалась на канале флуоресценции FL1 (фильтр 530/30 нм) в логарифмическом режиме, в то время как сигнал PI регистрировался в линейном режиме на втором канале флуоресценции FL2 (фильтр 585/42 нм).

Анализ проводили на проточном цитометре BD FACSCalibur (США) со скоростью 200 клеток/сек. Для отсечение неспецифического сигнала флуоресценции (ложноотрицательных и ложноположительных клеток) использовали изотипический контроль флуоресценции IgG конъюгированный с FITC (fluorescein isothyocyanate, Invitrogen) для каждого образца. В каждом образце анализировали не менее 50 000 клеток. Результаты анализировали в программе BD Cell Quest Pro.

2.4 Статистический анализ результатов экспериментов

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (Statsoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего. Статистическая значимость оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты радиобиологических экспериментов на приматах

3.1.1 Результаты экспериментов по изучению кривой "доза-эффект" при облучении периферической крови in vitro

На предварительном этапе работы был проведен анализ изменения доли лимфоцитов с повышенным уровнем ДР ДНК (позитивных по белку-маркеру ДР ДНК - γH2AX) через 30 мин после гамма-облучения клеток *in vitro* в дозах 1, 3 и 5 Гр (рис. 19).

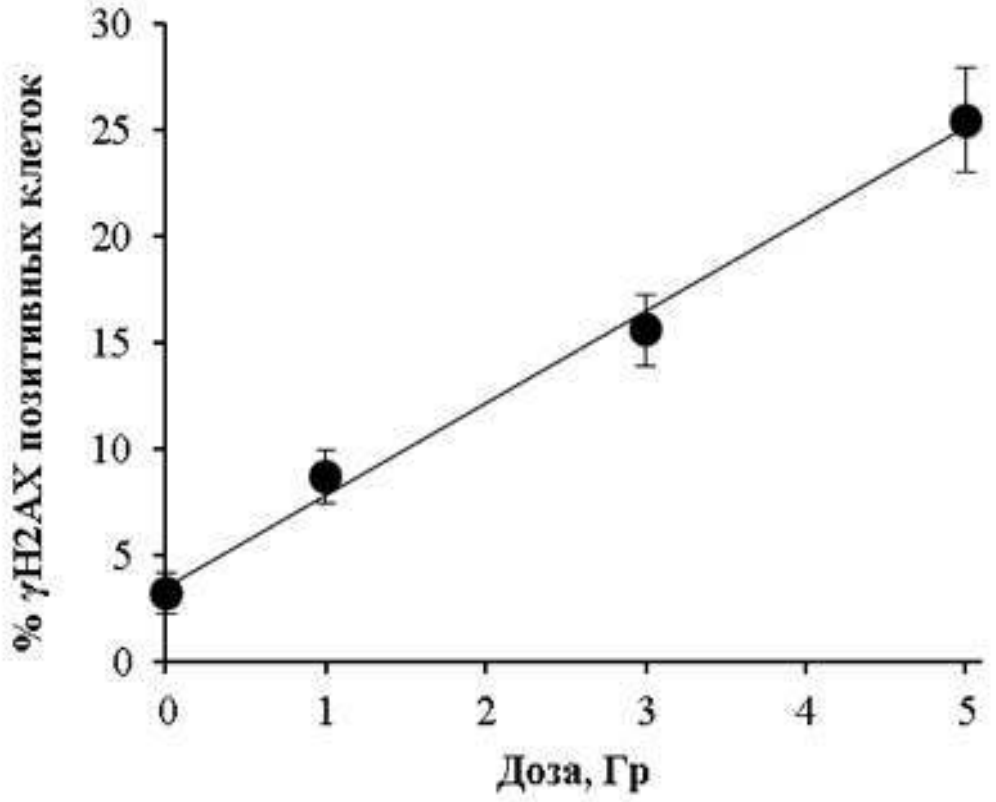


Рисунок 19. Зависимости изменений доли γH2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови обезьян от дозы гамма-облучения через 30 мин после воздействия *in vitro*. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка.

Выбор временной точки был обусловлен тем, что именно через 30-60 мин после облучения наблюдается максимальное образование γH2AX [Aleksandrov, et al. 2020]. Из данных, представленных на рис. 19, видно, что доля γH2AX-позитивных клеток меняется линейно с увеличением дозы гамма-излучения. Облучение в наименьшей из выбранных доз (1 Гр) увеличивало долю γH2AX-позитивных клеток ~ в 2,7 раза по сравнению с контрольным значением ($p<0,05$). В целом, дозовую зависимость можно описать линейной функцией $y=4,3x+3,6$ ($R2=0,99$), где y – доля γH2AX-позитивных клеток в %, x – доза в Гр. Таким образом, проточно-цитометрический анализ γH2AX-позитивных клеток показал себя как достаточно чувствительный и хорошо воспроизводимый тест.

3.1.2 Результаты экспериментов по изучению влияния ускоренных ядер криптона-84

Тяжелые ионы, входящие в состав галактического космического излучения, представляют основную опасность для здоровья космонавтов при межпланетных полетах за пределами магнитосферы Земли. С целью оценки генотоксических эффектов облучения ядрами тяжелых элементов самцы макак-резус были подвергнуты локальному облучению головы ядрами криптона-84. Поглощенная доза, усредненная по всему мозгу обезьян, составляла 0,15 Гр, однако, в малом объеме мозга, куда попадал пучок, локальная доза доходила до 3 Гр. Основная часть потока облучения приходилась на гиппокамп.

Результаты исследований, представленные на рисунке 20, показали, что через 17 ч после облучения отмечалось почти 2-кратное увеличение доли γH2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови (рис. 20). К 34 ч происходило снижение доли γH2AX-позитивных клеток, однако их количество продолжало оставаться статистически значимым по отношению к контрольным значениям (~1,5 раза, $p=0,006$). Обращает на себя внимание тот факт, что даже через 42 суток после облучения доля γ-H2AX-позитивных клеток оставалась повышенной (рис. 20). И лишь к 96-м суткам этот показатель возвращался к контрольным значениям. Нужно понимать, что при локальном облучении головного мозга

воздействию подвергается небольшая доля лимфоцитов периферической крови. Поэтому с определенной долей вероятности можно считать, что наблюдаемые нами эффекты являются косвенными, возникшими за счет «эффекта свидетеля» [Furukawa, et al. 2020]. Наибольший интерес представляет феномен повышенного количества клеток с поврежденной ДНК через 42 суток после облучения. То есть поврежденные лимфоциты периферической крови не элиминируются и продолжают циркулировать в кровеносном русле в течение длительного времени после облучения. Ранее было показано, что повышенный выход лимфоцитов с повреждениями ДНК обнаруживается у астронавтов спустя несколько месяцев после полета [Beaton-Green, et al. 2015, George, et al. 2004].

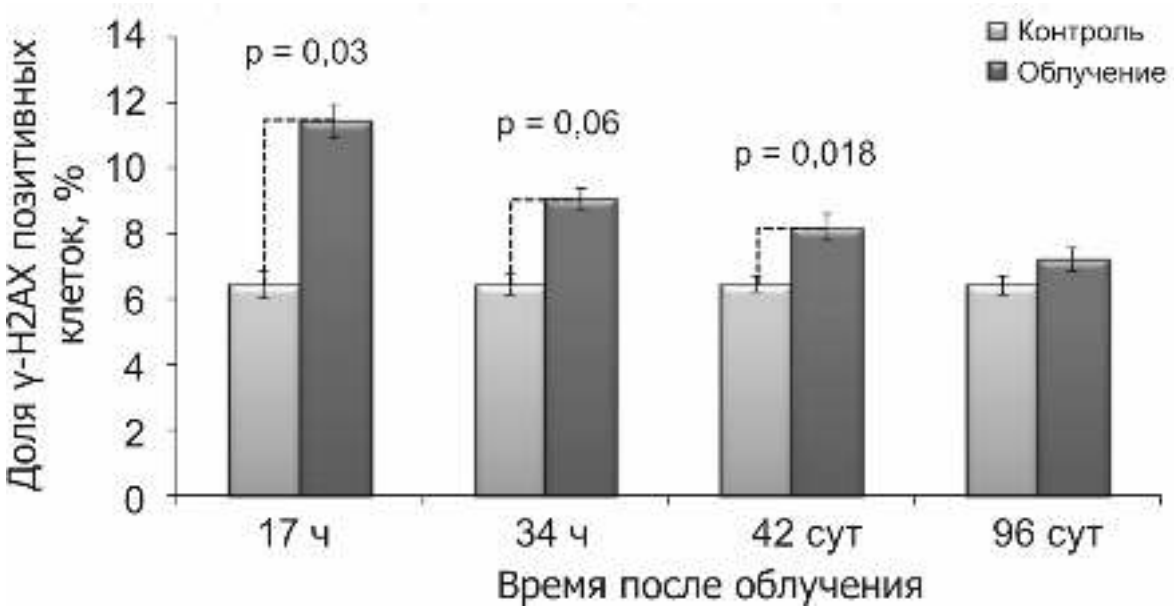


Рисунок 20. Изменения доли лимфоцитов периферической крови с высоким количеством двунитевых разрывов ДНК (γH2AX-позитивные клетки) у обезьян в различные сроки после облучения ядрами криптона-84.

3.1.3 Результаты экспериментов по изучению влияния комбинированного воздействия ионизирующего излучения и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета

Во время межпланетных космических полетов, связанных с выходом корабля за пределы магнитосферы Земли, человек подвергается воздействию комбинированному различных негативных факторов, важнейшими из которых являются ионизирующее излучение (ИИ) и невесомость. Космическое излучение, а в особенности его плотноионизирующая компонента, вызывает повреждения различных биологических макромолекул, в том числе и таких жизненно важных для успешного функционирования клетки информационных структур, как ДНК. В настоящее время появились данные о том, что невесомость может замедлять процессы репарации критических повреждений ДНК и увеличивать выход цитогенетических нарушений [Moreno-Villanueva, et al. 2017, Repina and Repin 2009]. Остается открытым вопрос о том, насколько долго могут существовать ДР ДНК в клетках человека и животных после комбинированного воздействия ИИ и невесомости.

В ходе настоящей работы проведено изучение влияния комбинированного воздействия ИИ и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета, на поврежденность ДНК лимфоцитов периферической крови макак-резус в различное время после прекращения воздействия (от 1 до 446 суток). Долю клеток с высоким количеством ДР ДНК, позитивных по суррогатному белку-маркеру ДР ДНК – фосфорилированному гистону H2AX (γH2AX), оценивали с помощью проточной цитометрии.

Для моделирования невесомости была использована антиортостатическая гипокинезия (АНОГ). Данная модель является общепринятой для воспроизведения таких эффектов невесомости как перераспределение жидкости в организме и ограничение подвижности в наземных экспериментах на людях

(испытателях-добровольцах) и была адаптирована нами к экспериментам на приматах.

Было показано, что воздействие моделируемой невесомости в течение 7 суток приводило к статически значимому ($p<0,05$) увеличению доли γH2AX-позитивных клеток в 2,1 раза по сравнению с контролем, регистрируемым на 1-е сутки после прекращения воздействия, результаты представлены на рисунке 21. Обращает на себя внимание том факт, что до окончания всего срока наблюдений (446 суток) у животных, подвергавшихся моделируемой невесомости, отмечалась устойчивая тенденция к сохранению более высокой доли γH2AX-позитивных клеток по сравнению с контрольными животными. Необходимо понимать, что при воздействии АНОГ животные подвергаются воздействию иммобилизационного стресса. Известно, что иммобилизационный стресс индуцирует повреждения ДНК и гибель лимфоцитов животных [Hatanaka, et al. 2001, Ivannik, et al. 2000].

Комбинированное воздействие ИИ и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета, приводило к статистически значимому ($p<0,05$) увеличению доли γH2AX-позитивных клеток по сравнению с контролем через 1, 19 и 42 сутки после прекращения воздействия (рис. 21). Столь длительное сохранение эффекта может быть обусловлено большой продолжительностью жизни отдельных субпопуляций лимфоцитов периферической крови, от нескольких месяцев до нескольких лет [Costa Del Amo, et al. 2018]. Длительное сохранение повышенного количества лимфоцитов с поврежденной ДНК наблюдалось также в экспериментах на макаках-резус, облученных ускоренными ионами криптона (раздел 3.2). Лимфоциты являются высокодифференцированными клетками и, по всей видимости, часть повреждённых лимфоцитов с сохранившимися функциональными свойствами не элиминируется, а продолжает циркулировать в периферической крови длительное время. Подобный феномен длительного поддержания повышенного количества лимфоцитов периферической крови с повреждениями ДНК, наблюдается у космонавтов и астронавтов. Показано, что такие повреждённые лимфоциты крови

регистрируются спустя месяцы после полета [Beaton-Green, et al. 2015, Fedorenko 1999, George, et al. 2004, Snigiryova, et al. 2012]. Стоит отметить, что этот феномен может быть также частично объяснен не только длительным периодом жизни лимфоцитов с некритичными для их функционирования повреждениями, но и замедлением процессов репарации ДНК в условиях невесомости [Mognato, et al. 2009].

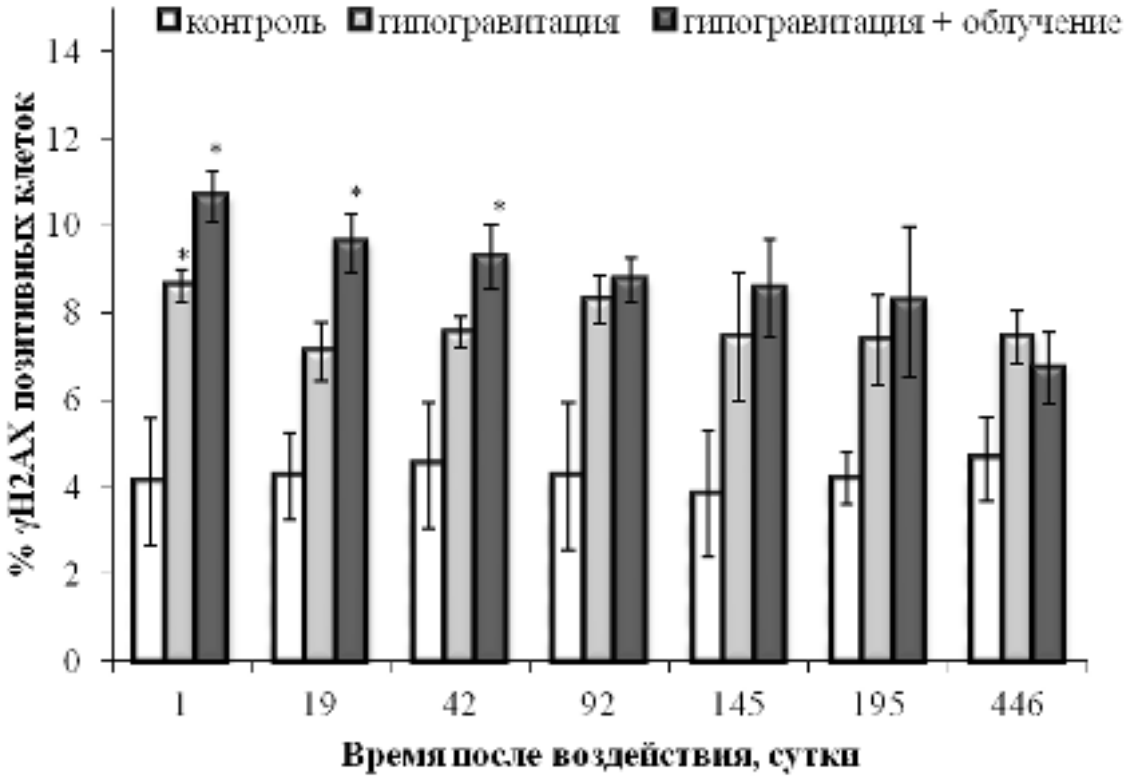


Рисунок 21. Изменения доли γH2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови обезьян в различное время после воздействия факторов, моделирующих условия космического полета *in vivo* (ионизирующее излучение и невесомость). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка. * - $p<0,05$ – значимость различий от контроля.

3.1.4 Заключение по разделу

Результаты исследований показали, что локальное облучение гиппокампа головного мозга обезьян ядрами криптона-84 в дозе 3 Гр приводит к

статистически значимому ($p<0,05$) увеличению доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждений ДНК. Эффект сохраняется вплоть до 42 суток после облучения. При локальном облучении гиппокампа головного мозга воздействию подвергалась относительно небольшая доля лимфоцитов периферической крови. Поэтому с определенной долей вероятности можно считать, что наблюдаемые нами эффекты являются косвенными, возникшими за счет «эффекта свидетеля».

Комбинированное воздействие ИИ и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета, также приводит к статистически значимому увеличению доли лимфоцитов с повышенным уровнем повреждений ДНК, регистрируемому в течение длительного времени после окончания воздействия (1,5 месяца).

В целом, проточно-цитометрический анализ доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждений ДНК (γH2AX позитивный клетки) можно рекомендовать для оценки генотоксического воздействия негативных факторов космических полетов.

3.2 Результаты экспериментов по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля

Во время космических миссий команда большую часть времени находится внутри космической станции/корабля. Оболочка (обшивка) корабля, с одной стороны, обеспечивает частичную защиту от космического излучения. С другой стороны, при взаимодействии космического излучения с материалом обшивки образуется вторичное излучение, которое вносит дополнительный вклад в облучение космонавтов/астронавтов.

Целью нашей работы было изучение защитных свойств обшивки проектируемого транспортного корабля от ДНК повреждающего действия 163 МэВ протонного излучения.

Исследования были проведены на мышах через 18-19 часов после облучения в дозе 0,5 Гр. В качестве показателей исследовали: органный индекс

селезёнки, процент клеток с высоким содержанием ДР ДНК и долю апоптотических клеток селезёнки.

3.2.1 Изменение органного индекса селезёнки

Одним из значимых последствий воздействия ИИ является опустошение лимфоидных органов, в частности тимуса и селезёнки, что ведёт к снижению массы органов. В наших исследованиях оценивали органный индекс селезёнки как отношение массы селезёнки к массе тела животного.

На рисунке 22 представлены результаты оценки органного индекса селезёнки мышей, подвергшихся воздействию протонного излучения напролёт и через материалы, моделирующие корпус космического корабля. Были взяты: 4 мм алюминий (Al); имитация каркаса космического корабля, состоящая из слоя тепловой защиты на углепластиковой подложке (SS); плексиглас толщиной 50 мм (P); водный фантом с толщиной 160 мм (W). Было показано, что протонное излучение в дозе 0,5 Гр приводит к статистически значимому снижению органного индекса селезёнки. При использовании защитных материалов в исследуемых комбинациях наблюдалась тенденция восстановления органного индекса, сниженного при облучении без защиты, что может говорить о некотором защитном действии используемых материалов. Наиболее эффективная статистически значимая защита наблюдалась при использовании комбинации Al+SS+W и Al+SS+P (рис. 22).

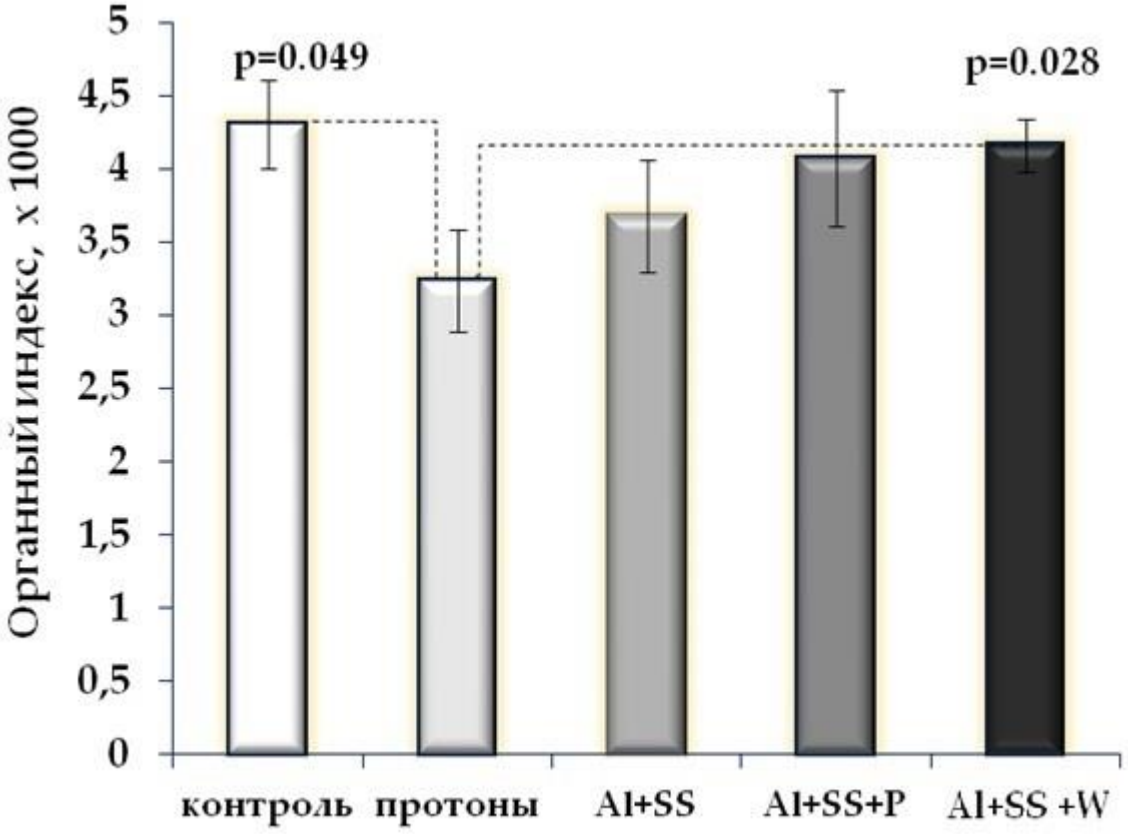


Рисунок 22. Изменения органного индекса селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты и с различными комбинациями защиты (Al+SS - 4 мм алюминий и трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля; Al+SS+P - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля и плексиглас толщиной 50 мм; Al+SS+W - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля, плексиглас толщиной 50 мм и водный фантом с толщиной 160 мм). Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего.

3.2.2. Анализ доли γH2AX-позитивных клеток

Результаты исследований, представленные на рисунке 23, показали, что воздействие протонного излучения приводит к статистически достоверному увеличению доли γH2AX-позитивных клеток селезёнки в 2,6 раза по сравнению с контролем (рис. 23). Использование Al+SS не приводило к снижению доли γH2AX-позитивных клеток по сравнению с вариантом без защиты (рис. 23).

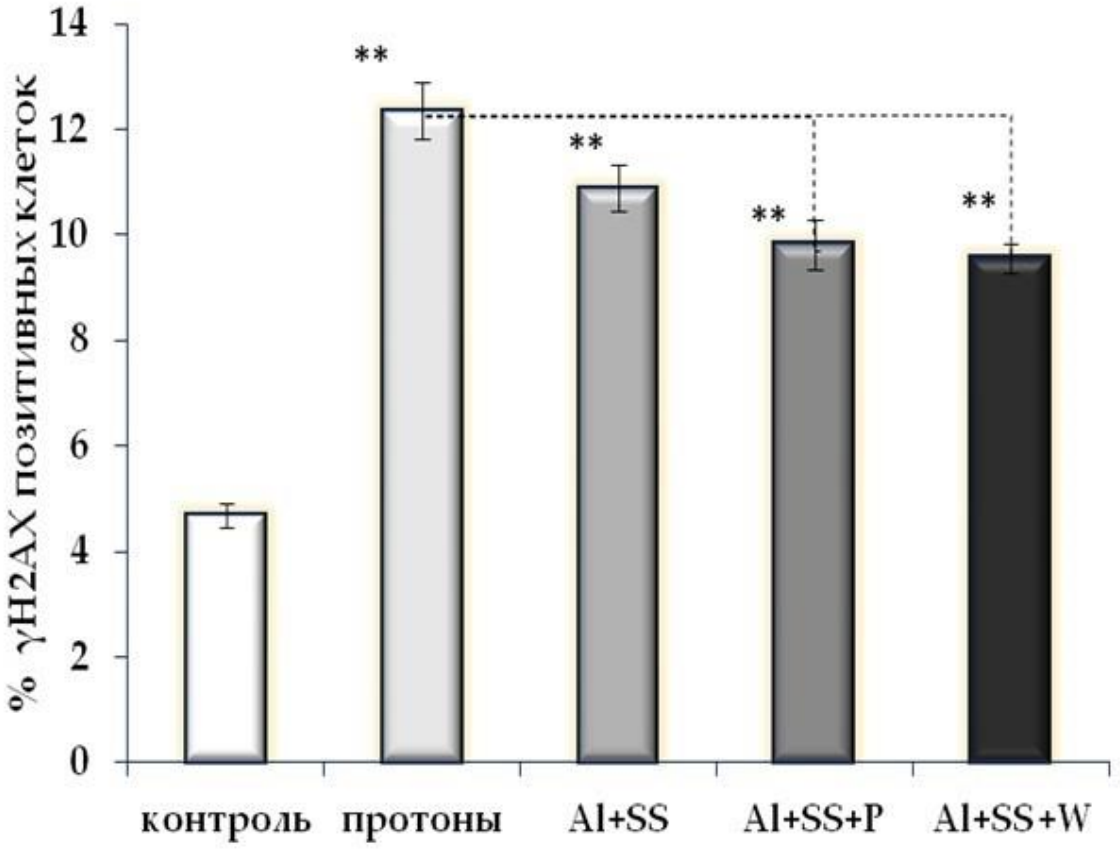


Рисунок 23. Изменения доли γH2AX-позитивных клеток селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты и с различными комбинациями защиты (Al+SS - 4 мм алюминий и трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля; Al+SS+P - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля и плексиглас толщиной 50 мм; Al+SS+W - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля, плексиглас толщиной 50 мм и водный фантом с толщиной 160 мм). Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего. ** - $p < 0{,}01$ - значимость различий по сравнению с контролем.

Дополнительное использование комбинации Al+SS+P или Al+SS+W снижало долю γH2AX-позитивных клеток в 1,3 раза по сравнению с вариантом без защиты. Однако, доля γH2AX-позитивных клеток оставалась на довольно высоком уровне (~в 2,1 раза выше контрольных значений), что говорит о недостаточных защитных свойствах исследованных материалов.

3.2.3 Анализ апоптотической гибели клеток с помощью метода TUNEL

Представлялось интересным провести исследование доли клеток селезёнки, гибнущих по механизму апоптоза. Одним из признаков апоптотической гибели клеток является межнуклеосомная деградация хроматина. Для оценки апоптотической межнуклеосомной деградации хроматина нами был использован метод Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL), который зарекомендовал себя как один из наиболее специфических методов оценки апоптоза. На рисунке 24 показано, что воздействие протонного излучения в дозе 0,5 Гр приводит к статистически достоверному увеличению доли апоптотических клеток в 2,2 раза по сравнению с контролем (рис. 24). Комбинация защитных материалов Al+SS и Al+SS+P снижала долю апоптотических клеток в 1,2 и 1,3 раза по сравнению с вариантом без защиты. Обращает на себя внимание отсутствие защитного эффекта комбинации материалов Al+SS+W. Ни одна из исследованных комбинаций защитных материалов не позволила снизить долю апоптотических клеток до контрольных значений.

3.2.4 Заключение по разделу

В результате нашей работы по изучению защитных свойств элементов корпуса космического корабля, дополненных слоем плексигласа или воды, было показано, что облучение мышей 163 МэВ протонным излучением в дозе 0,5 Гр приводит к статистически значимому увеличению количества ДР ДНК в клетках селезёнки, регистрируемых с помощью анализа γH2AX через 18-19 ч после воздействия. Необходимо понимать, что репарация 90-95% радиационно - индуцированных ДР ДНК к этому времени уже заканчивается [Ozerov and Osipov 2015]. Поэтому наблюдаемые нами ДР ДНК, по всей видимости, представляют собой энзиматические ДР, возникшие в ходе апоптотической межнуклеосомной деградации ДНК. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные с помощью метода TUNEL, который часто используется для анализа

апоптотических клеток. Клеточную гибель и опустошение органа отражают и результаты оценки селезёночного индекса.

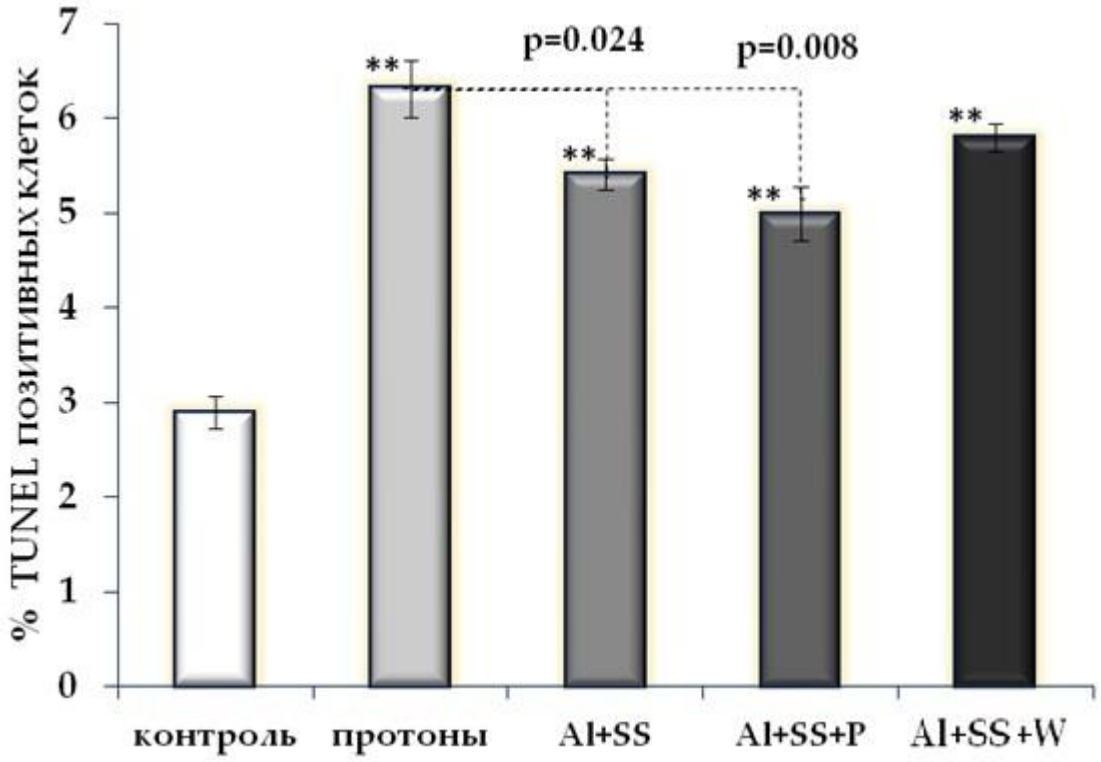


Рисунок 24. Изменения доли TUNEL-позитивных клеток селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты и с различными комбинациями защиты (Al+SS - 4 мм алюминий и трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля; Al+SS+P - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля и плексиглас толщиной 50 мм; Al+SS+W - 4 мм алюминий, трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля, плексиглас толщиной 50 мм и водный фантом с толщиной 160 мм). Данные представлены как средние значения ± ошибка среднего. ** - $p < 0{,}01$ - значимость различий по сравнению с контролем.

Использование в качестве защиты 4 мм алюминия и элементов каркаса космического корабля не приводит к статистически значимому снижению доли γH2AX-позитивных клеток (рис. 23), но несколько уменьшает долю TUNEL-позитивных клеток (рис. 24). Более выраженным защитным действием обладает конструкция, состоящая из комбинации 4 мм алюминия, каркаса космического

корабля и 50 мм плексигласа. В этом случае наблюдалось снижение как доли γH2AX-позитивных клеток, так и доли TUNEL-позитивных клеток. При таком усиленном варианте защиты количество повреждённых /гибнущих клеток селезёнки было статистически значимо выше контрольных значений, но статистически значимо ниже, чем при облучении только через элементы корпуса космического корабля.

Представлялось интересным исследовать защитные свойства комбинации 4 мм алюминия, каркаса космического корабля, плексигласа и 160 мм толщины водного фантома. Однако и этот вариант защиты приводил к снижению доли γH2AX-позитивных клеток лишь в 1,3 раза. Снижение доли TUNEL-позитивных клеток при этом не наблюдалось.

В целом было показано, что исследованные в ходе работе варианты защиты не позволяют полностью снизить ДНК-повреждающий эффект 163 МэВ протонного излучения. В лучшем случае наблюдается умеренное (~30%) ослабление повреждающего эффекта. Необходим поиск более эффективных вариантов защиты астронавтов/космонавтов от действия космического излучения, в том числе фармакологических.

3.3 Результаты исследования эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка протонов высокой энергии через бетонную преграду

Высокоэнергетические протоны космического излучения взаимодействуют с элементами обшивки космических кораблей, скафандров, атомами воздуха, с генерацией вторичных протонов, нейтронов, мезонов и γ-излучения. В последнее время активно дискутируется вопрос колонизации Луны и планет Солнечной системы. При этом, в качестве защиты от космического излучения предлагаются конструкции из различных материалов, в том числе и бетона. Бетонные конструкции так же используются для защиты от протонного излучения на ускорителях частиц. Если биологические эффекты самого протонного излучения довольно хорошо изучены, то исследования, посвящённые эффектам вторичного

излучения не многочисленны и фрагментарны. В частности, это касается вторичного излучения, генерируемого протонами при прохождении через бетонную преграду.

Целью настоящей работы было исследование влияния вторичного излучения, образующегося при прохождении 650 МэВ протонов через бетонную преграду толщиной 20-80 см на степень поврежденности ДНК клеток селезёнки мышей. При этом проводили исследование биологических эффектов у животных, находящихся не только за бетонной преградой различной толщины, но и на разном расстоянии от центра прохождения протонного пучка.

3.3.1 Изменение органного селезёночного индекса

На рисунке 25 представлены результаты оценки органного индекса селезёнки у мышей, находящихся на разном расстоянии от центра протонного пучка, проходящего через бетон толщиной 20, 40 и 80 см. Было показано, что максимальное снижение индекса селезёнки отмечалось у мышей, находящихся в центре протонного пучка (рис. 25). При увеличении толщины бетонной преграды у мышей, находящихся в центре пучка, снижается выраженность биологического эффекта (рис. 25). Эти данные хорошо коррелируют с данными дозиметрии (доза снижается в 5,3 раза при увеличении толщины преграды с 20 до 80 см) и свидетельствуют о защитных противорадиационных свойствах бетона. Однако эта защита является довольно слабой и даже при толщине защиты 80 см животные получают достаточно большую дозу облучения - 2,65 Гр, что отражается на органном индексе селезёнки (рис. 25). С увеличением расстояния от центра пучка снижалась доза облучения и уменьшался негативный биологический эффект. Животные, находящиеся за бетонной защитой на расстоянии 15-20 см от центра протонного пучка, получали низкую дозу радиации (~ 0.1-0.3 Гр) и у них не отмечалось статистически значимого снижения органного индекса селезёнки.

При этом настораживает тенденция к снижению значения органного индекса селезёнки у мышей, находящихся за бетонной преградой 80 см и при этом расположенных на наибольшем расстоянии (20 см) от центра пучка. Более того,

между группами мышей, находившихся в момент облучения на расстоянии 20 см за бетонной преградой 40 и 80 см отмечалась статистически достоверная разница в изменении органного индекса селезенки (рис. 25). Это может быть обусловлено тем, что на таком расстоянии от центра протонного пучка увеличивается вклад в суммарную дозу облучения нейтронной компоненты, которая может оказывать существенный биологический эффект.

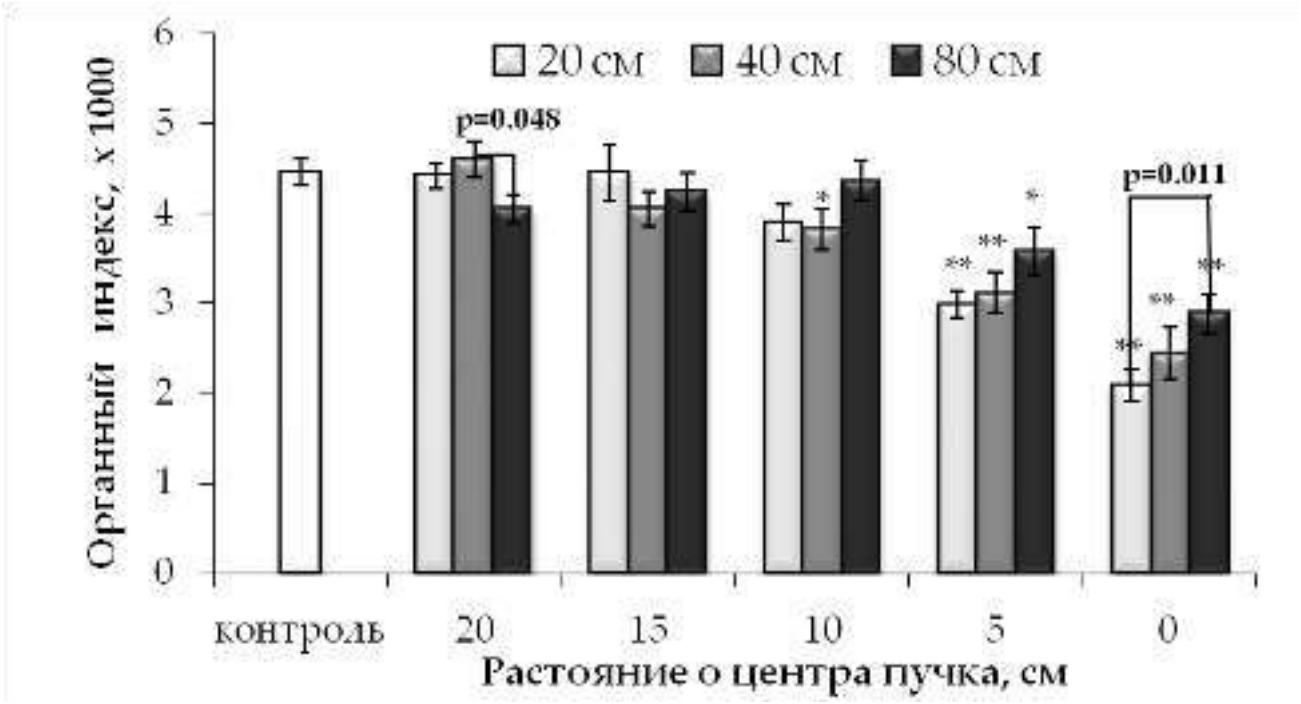


Рисунок 25. Органный индекс селезёнки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

3.3.2 Анализ доли γH2AX-позитивных клеток селезенки облученных мышей

Результаты оценки доли γH2AX-позитивных клеток, в соответствии с рисунком 26, свидетельствуют о том, что наибольшая доля повреждённых клеток селезёнки отмечается у мышей, находившихся по центру пучка и получивших максимальную дозу ИИ (рис. 26).

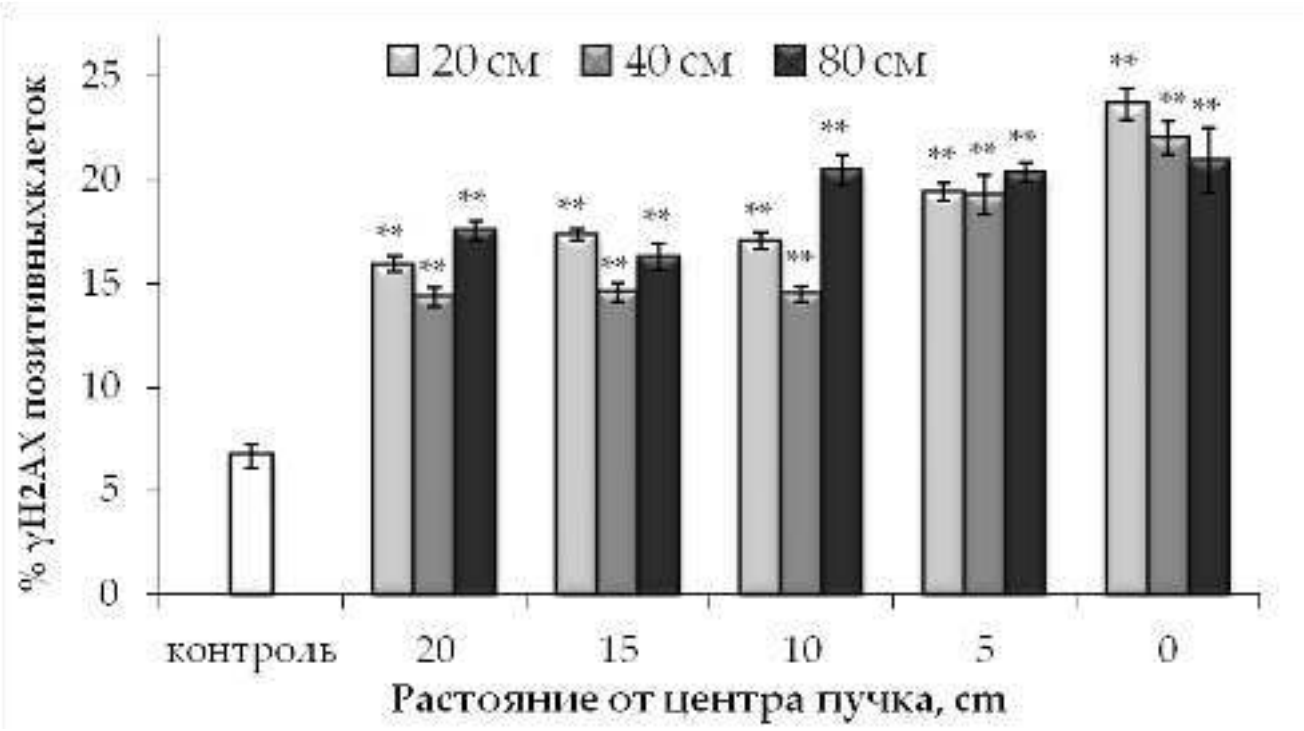


Рисунок 26. Изменение доли γH2AX-позитивных клеток селезёнки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

Не было отмечено существенного изменения доли γH2AX-позитивных клеток при увеличении толщины бетонной защиты. По всей видимости, это обусловлено элиминацией или выбросом в кровяное русло высоко повреждённых клеток. Интересно, что даже у мышей, находящихся на наибольшем расстоянии (20 см) от центра пучка и получивших низкую дозу (0,1-0,2 Гр) облучения, отмечается статистически достоверное увеличение доли γH2AX-позитивных клеток. Увеличение толщины бетонной защиты с 20 до 80 см у мышей, находившихся по краям протонного пучка, ведёт не к снижению, а к увеличению доли γH2AX-позитивных клеток. Это феномен может быть обусловлен высокой биологической эффективностью вторичного нейтронного излучения, генерируемого при прохождении протонов через бетонную преграду. При этом, при увеличении толщины бетонной преграды увеличивается интенсивность потока вторичных нейтронов (см. раздел 2.2.2).

3.3.3 Анализ апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток

Результаты оценки доли апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток представлены на рисунке 27.

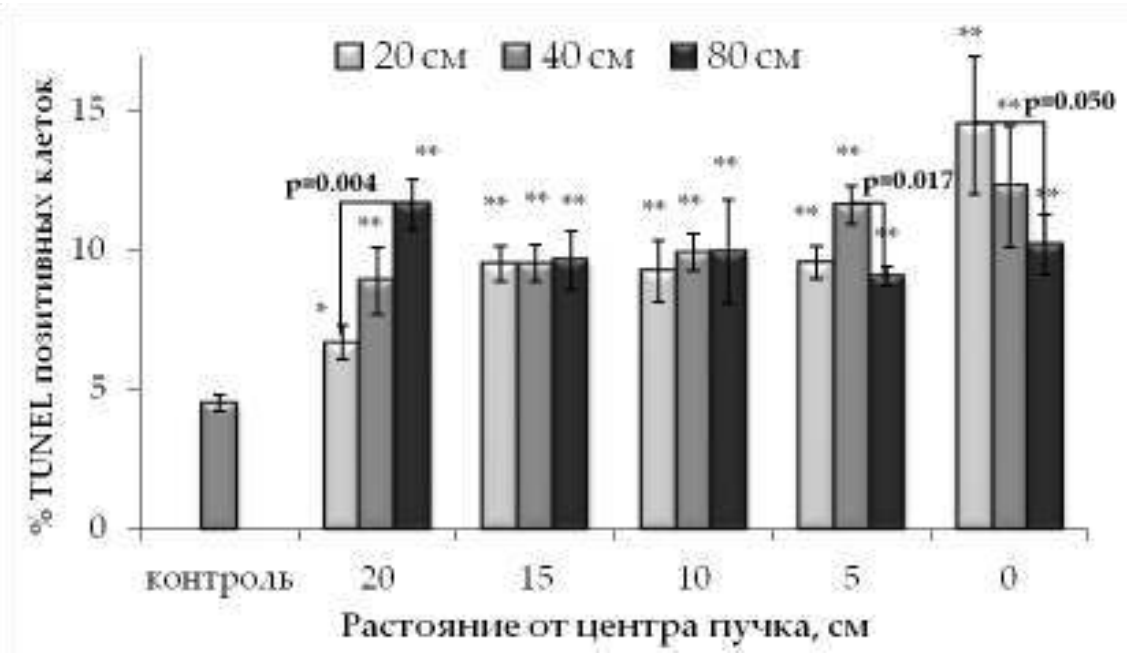


Рисунок 27. Изменение доли апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток селезёнки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

Показано, что наибольшая доля апоптотических клеток отмечается у мышей, находившихся в центре пучка за 20 см бетонной преградой. Увеличение толщины бетонной преграды приводит к снижению доли гибнущих клеток, что свидетельствует о защите от облучения. Парадоксальная обратная закономерность была обнаружена у мышей, находящихся на расстоянии 20 см от центра луча. При увеличении толщины бетонной защиты отмечается увеличение доли апоптотических клеток. В этом случае доза облучения примерно одинаковая (0,1-0,2 Гр) и полученные результаты могут быть объяснены только компонентами вторичного излучения с большей относительной биологической эффективностью (ОБЭ).

3.3.4 Заключение по разделу

Проведенные исследования выявили два противоположных эффекта. С одной стороны, бетонная преграда позволяет существенно снизить поток первичного протонного излучения, снижая с увеличением толщины этой преграды выраженность негативных биологических эффектов у мышей, облучаемых в центре пучка. С другой стороны, с увеличением толщины преграды существенно меняется спектр вторичного излучения и увеличивается доля нейтронной компоненты, что также вызывает негативные биологические эффекты, выражающиеся в увеличении доли поврежденных и апоптотических клеток селезенки. Особенно отчетливо видно изменение спектра вторичного излучения на расстоянии 20 см от центра пучка. У мышей, облучаемых за бетонной преградой толщиной 80 см, на расстоянии 20 см от центра пучка, доля апоптотических клеток селезенки была выше, чем у мышей находящихся на таком же расстоянии от центра пучка, но облучаемых за бетонной преградой толщиной 20 см (рис. 27).

В целом, наши исследования показали, что бетонная защита толщиной 80 см не позволяет полностью снизить негативные радиобиологические эффекты протонного излучения из-за выраженной генерации вторичного излучения, в особенности его нейтронной компоненты.

ВЫВОДЫ

1) Локальное облучение гиппокампа головного мозга обезьян ядрами криптона-84 в дозе 3 Гр приводит к статистически значимому ($p<0,05$) увеличению доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждений ДНК. Эффект сохраняется вплоть до 42 суток после облучения.

2) Комбинированное воздействие ионизирующего излучения и моделируемой невесомости, имитирующих условия космического полета, приводит к статистически значимому увеличению доли лимфоцитов с повышенным уровнем повреждений ДНК, регистрируемых в течение длительного времени после окончания воздействия (1,5 месяца).

3) Оболочка проектируемого транспортного корабля не позволяет существенно снизить ДНК-повреждающий эффект 163 МэВ протонного излучения. В комбинации 4 мм алюминий + трехслойная конструкция каркаса проектируемого космического корабля + плексиглас толщиной 50 мм или + водный фантом с толщиной 160 мм наблюдается умеренное (~30%) ослабление ДНК-повреждающего эффекта.

4) Бетонная защита позволяет существенно снизить поток первичного протонного излучения с энергией 650 МэВ, снижая с увеличением толщины этой преграды выраженность негативных биологических эффектов у мышей, облучаемых в центре пучка. Однако с увеличением толщины преграды с 20 до 80 см и расстоянии от центра пучка с 0 до 20 см существенно меняется спектр вторичного излучения и увеличивается доля нейтронной компоненты, что также вызывает негативные биологические эффекты, выражающиеся в увеличении доли поврежденных и апоптотических клеток селезенки.

5) Проточно-цитометрический анализ доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждений ДНК (γH2AX-позитивные клетки) можно рекомендовать для оценки генотоксического действия негативных факторов космических полетов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

φ – флюенс

АНОГ – антиортостатическая гипокинезия

ВЭЗЧ – высокоэнергетические заряженные частицы

ГК – гипокинезия

ГКЛ – галактические космические лучи

ГР – гомологическая рекомбинация

ДР – двунитевые разрывы

ИИ – ионизирующее излучение

ЛПЭ – линейная передача энергии

МКС – Международная космическая станция

НГСК – негомологичное соединение концов

НОО – низкая околоземная орбита

ОБЭ – относительная биологическая эффективность

ОР – однонитевые разрывы

ПТК – пилотируемый транспортный корабль

СПС – солнечные протонные события

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ишков, В.Н. Периоды пониженной и повышенной солнечной активности: наблюдательные особенности и ключевые факты / В.Н. Ишков // ВСЕРОССИЙСКАЯ ЕЖЕГОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО ФИЗИКЕ СОЛНЦА "СОЛНЕЧНАЯ И СОЛНЕЧНО-ЗЕМНАЯ ФИЗИКА – 2013". – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 111-114.
2. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM / Y. Sun, X. Jiang, S. Chen [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – V. 102. – № 37. – P. 13182-13187. – DOI 10.1073/pnas.0504211102.
3. Accumulation of a tumor suppressor p53 protein in rat muscle during a space flight / T. Ohnishi, A. Takahashi, X. Wang [et al.] // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 1999. – V. 430. – № 2. – P. 271-274. – DOI 10.1016/s0027-5107(99)00138-4.
4. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX / I.M. Ward, K. Minn, K.G. Jorda, J. Chen // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – № 22. – P. 19579-19582. – DOI 10.1074/jbc.C300117200.
5. Accumulation of spontaneous gammaH2AX foci in long-term cultured mesenchymal stromal cells / M. Pustovalova, A. Grekhova, T. Astrelina [et al.] // Aging (Albany NY). – 2016. – V. 8. – № 12. – P. 3498-3506. – DOI 10.18632/aging.101142.
6. Advanced Composition Explorer (ACE): официальный сайт. – URL: https://izw1.caltech.edu/ACE/ACENews/ACENews83.html. (дата обращения: 11.07.2022). – Текст: электронный.
7. Analyses of the secondary particle radiation and the DNA damage it causes to human keratinocytes / E.A. Lebel, A. Rusek, M.B. Sivertz [et al.] // J Radiat Res. – 2011. – V. 52. – № 6. – P. 685-693. – DOI 10.1269/jrr.11015.

8. Association between G2-phase block and repair of radiation-induced chromosome fragments in human lymphocytes / M. Durante, Y. Furusawa, H. Majima [et al.] // Radiat Res. – 1999. – V. 151. – № 6. – P. 670-676.
9. Astronaut's Organ Doses Inferred from Measurements in a Human Phantom Outside the International Space Station / G. Reitz, T. Berger, P. Bilski [et al.] // Radiation Research. – 2009. – V. 171. – № 2. – P. 225-235. – DOI 10.1667/rr1559.1.
10. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1 / Z. You, C. Chahwan, J. Bailis [et al.] // Mol Cell Biol. – 2005. – V. 25. – № 13. – P. 5363-5379. – DOI 10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005.
11. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks / S. Burma, B.P. Chen, M. Murphy [et al.] // J Biol Chem. – 2001. – V. 276. – № 45. – P. 42462-42467. – DOI 10.1074/jbc.C100466200.
12. Badhwar, G.D. Long-term modulation of Galactic Cosmic Radiation and its model for space exploration / G.D. Badhwar, P.M. O'Neill // Adv Space Res. – 1994. – V. 14. – № 10. – P. 749-757. – DOI 10.1016/0273-1177(94)90537-1.
13. Badhwar, G.D. The radiation environment in low-Earth orbit / G.D. Badhwar // Radiat Res. – 1997. – V. 148. – № 5 Suppl. – P. S3-10.
14. Bakkenist, C.J. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation / C.J. Bakkenist, M.B. Kastan // Nature. – 2003. – V. 421. – № 6922. – P. 499-506. – DOI 10.1038/nature01368.
15. Banath, J.P. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines / J.P. Banath, S.H. Macphail, P.L. Olive // Cancer Res. – 2004. – V. 64. – № 19. – P. 7144-7149. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-04-1433.
16. Bassing, C.H. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity / C.H. Bassing, F.W. Alt // Cell Cycle. – 2004. – V. 3. – № 2. – P. 149-153. – DOI 10.4161/cc.3.2.689.
17. Beinke, C. High Potential for Methodical Improvements of Fish-Based Translocation Analysis for Retrospective Radiation Biodosimetry / C. Beinke,

V. Mee // Health Physics. – 2012. – V. 103. – № 2. – P. 127-132. – DOI 10.1097/HP.0b013e31824645fb.

18. Benton, E.R. Space radiation dosimetry in low-Earth orbit and beyond / E.R. Benton, E.V. Benton // Nucl Instrum Methods Phys Res B. – 2001. – V. 184. – № 1-2. – P. 255-294. – DOI 10.1016/s0168-583x(01)00748-0.
19. Biological effectiveness of accelerated particles for the induction of chromosome damage: track structure effects / K.A. George, M. Hada, L. Chappell, F.A. Cucinotta // Radiat Res. – 2013. – V. 180. – № 1. – P. 25-33. – DOI 10.1667/RR3291.1.
20. Bloor, M.J. Occupational status variations in disagreements on the diagnosis of cause of death / M.J. Bloor, C. Robertson, M.L. Samphier // Hum Pathol. – 1989. – V. 20. – № 2. – P. 144-148. – DOI 10.1016/0046-8177(89)90178-0.
21. Boice, J.D. Jr. Space: The Final Frontier-Research Relevant to Mars / J.D. Jr. Boice // Health Phys. – 2017. – V. 112. – № 4. – P. 392-397. – DOI 10.109 7/HP.0000000000000656.
22. Bourdarie, S. The Near-Earth Space Radiation Environment / S. Bourdarie, M. Xapsos // IEEE Transactions on Nuclear Science. – 2008. – V. 55. – № 4. – P. 1810-1832. – DOI 10.1109/tns.2008.2001409.
23. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting / I.A. Manke, D.M. Lowery, A. Nguyen, M.B. Yaffe // Science. – 2003. – V. 302. – № 5645. – P. 636-639. – DOI 10.1126/science.1088877.
24. Brenner, D.J. Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks [Text] / D.J. Brenner, J.F. Ward // Int J Radiat Biol. – 1992. – V. 61. – № 6. – P. 737-748. – DOI 10.1080/09553009214551591.
25. Brochier, C. Chromatin modifications associated with DNA double-strand breaks repair as potential targets for neurological diseases / C. Brochier, B. Langley // Neurotherapeutics. – 2013. – V. 10. – № 4. – P. 817-830. – DOI 10.1007/s13311-013-0210-9.

26. Carbon Ion Radiotherapy: A Review of Clinical Experiences and Preclinical Research, with an Emphasis on DNA Damage/Repair / O. Mohamad, B. Sishc, J. Saha [et al] // Cancers. – 2017. – V. 9. – № 12. – P. 66. – DOI 10.3390/cancers9060066.
27. Chapman, J.R. Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage / J.R. Chapman, S.P. Jackson // EMBO Rep. – 2008. – V. 9. – № 8. – P. 795-801. – DOI 10.1038/embor.2008.103.
28. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries / S. Bonassi, H. Norppa, M. Ceppi [et al.] // Carcinogenesis. – 2008. – V. 29. – № 6. – P. 1178-1183. – DOI 10.1093/carcin/bgn075.
29. Chromosome aberrations of clonal origin are present in astronauts' blood lymphocytes / K. George, M. Durante, V. Willingham, F.A. Cucinotta // Cytogenet Genome Res. – 2004. – V. 104. – № 1-4. – P. 245-251. – DOI 10.1159/000077498.
30. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation / B.M. Sutherland, P.V. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – V. 97. – № 1. – P. 103-108. – DOI 10.1073/pnas.97.1.103.
31. Comparative efficiency of injurious action of radiation and stress on thymus and lipid peroxidation / B.P. Ivannik, N.I. Riabchenko, L.A. Dzikovskaia [et al.] // Radiats Biol Radioecol. – 2000. – V. 40. – № 6. – P. 656-658.
32. Comparative study of the effects of different radiation qualities on normal human breast cells / D. Juerss, M. Zwar, U. Giesen [et al.] // Radiat Oncol. – 2017. – V. 12. – № 1. – P. 159. – DOI 10.1186/s13014-017-0895-8.
33. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors / H. Wang, M. Wang, H. Wang [et al.] // J Cell Physiol. – 2005. – V. 202. – № 2. – P. 492-502. – DOI 10.1002/jcp.20141.

34. Coronal and heliospheric magnetic flux circulation and its relation to open solar flux evolution / M. Lockwood, M.J. Owens, S.M. Imber [et al.] // J Geophys Res Space Phys. – 2017. – V. 122. – № 6. – P. 5870-5894. – DOI 10.1002/2016JA023644.

35. Cucinotta, F.A. Cancer risk from exposure to galactic cosmic rays: implications for space exploration by human beings / F.A. Cucinotta, M. Durante // The Lancet Oncology. – 2006. – V. 7. – № 5. – P. 431-435. – DOI 10.1016/s1470-2045(06)70695-7.

36. Cucinotta, F.A. Evaluating shielding effectiveness for reducing space radiation cancer risks / F.A. Cucinotta, M.-H. Y. Kim, L. Ren // Radiation Measurements. – 2006. – V. 41. – № 9-10. – P. 1173-1185. – DOI 10.1016/j.radmeas.2006.03.011.

37. Cucinotta, F.A. Non-Targeted Effects Models Predict Significantly Higher Mars Mission Cancer Risk than Targeted Effects Models / F.A. Cucinotta, E. Cacao // Scientific Reports. – 2017. – V. 7. – № 1. – e1832. – DOI 10.1038/s41598-017-02087-3.

38. Cucinotta, F.A. The effects of delta rays on the number of particle-track traversals per cell in laboratory and space exposures / F.A. Cucinotta, H. Nikjoo, D.T. Goodhead // Radiat Res. – 1998. – V. 150. – № 1. – P. 115-119.

39. Current knowledge about the impact of microgravity on the proteome / S.M. Strauch, D. Grimm, T.J. Corydon [et al.] // Expert Rev Proteomics. – 2019. – V. 16. – № 1. – P. 5-16. – DOI 10.1080/14789450.2019.1550362.

40. Cytogenetic damage in the blood lymphocytes of astronauts: effects of repeat long-duration space missions / K. George, J. Rhone, A. Beitman, F.A. Cucinotta // Mutat Res. – 2013. – V. 756. – № 1-2. – P. 165-169. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2013.04.007.

41. Cytogenetic Nomenclature and Reporting / M. Stevens-Kroef, A. Simons, K. Rack, R.J. Hastings // Methods Mol Biol. – 2017. – V. 1541. – P. 303-309. – DOI 10.1007/978-1-4939-6703-2_24.

42. Development of a high-throughput gamma-H2AX assay based on imaging flow cytometry / Y. Lee, Q. Wang, I. Shuryak [et al.] // Radiat Oncol. – 2019. – V. 14. – № 1. – P. 150. – DOI 10.1186/s13014-019-1344-7.

43. Distinct versus overlapping functions of MDC1 and 53BP1 in DNA damage response and tumorigenesis / K. Minter-Dykhouse, I. Ward, M.S. Huen [et al.] // J Cell Biol. – 2008. – V. 181. – № 5. – P. 727-735. – DOI 10.1083/jcb.200801083.

44. DNA damage recognition proteins localize along heavy ion induced tracks in the cell nucleus / A. Takahashi, N. Yamakawa, T. Kirita [et al.] // J Radiat Res. – 2008. – V. 49. – № 6. – P. 645-652. – DOI 10.1269/jrr.08007.

45. DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells / R. Scully, A. Panday, R. Elango, N.A Willis. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2019. – V. 20. – № 11. – P. 698-714. – DOI 10.1038/s41580-019-0152-0.

46. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 / E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr [et al.] // J Biol Chem. – 1998. – V. 273. – № 10. – P. 5858-5868. – DOI 10.1074/jbc.273.10.5858.

47. DNA repair in modeled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with gamma-rays / M. Mognato, C. Girardi, S. Fabris, L. Celotti // Mutat Res. – 2009. – V. 663. – № 1-2. – P. 32-39. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2009.01.002.

48. DNA Repair, Genome Stability, and Aging / D.B. Lombard, K.F. Chua, R. Mostoslavsky [et al.] // Cell. – 2005. – V. 120. – № 4. – P. 497-512. – DOI 10.1016/j.cell.2005.01.028.

49. DNA-PK is responsible for enhanced phosphorylation of histone H2AX under hypertonic conditions / T. Reitsema, D. Klokov, J.P. Banath, P.L. Olive // DNA Repair (Amst). – 2005. – V. 4. – № 10. – P. 1172-1181. – DOI 10.1016/j.dnarep.2005.06.005.

50. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells / B. Mukherjee, C. Kessinger, J. Kobayashi [et al.] // DNA

Repair (Amst). – 2006. – V. 5. – № 5. – P. 575-590. – DOI 10.1016/j.dnarep.2006.01.011.

51. Dobynde, M.I. Radiation environment created with GCRs inside a spacecraft / M.I. Dobynde, Y.Y. Shprits // Life Sci Space Res (Amst). – 2020. – V. 24. – P. 116-121. – DOI 10.1016/j.lssr.2019.09.001.
52. Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: experimental and theoretical study for high- and low-LET radiation / B. Rydberg, B. Cooper, P.K. Cooper [et al.] // Radiat Res. – 2005. – V. 163. – № 5. – P. 526-534. – DOI 10.1667/rr3346.
53. Dupre, A. Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex / A. Dupre, L. Boyer-Chatenet, J. Gautier // Nat Struct Mol Biol. – 2006. – V. 13. – № 5. – P. 451-457. – DOI 10.1038/nsmb1090.
54. Durante, M. Ground-based research with heavy ions for space radiation protection / M. Durante, A. Kronenberg // Adv Space Res. – 2005. – V. 35. – № 2. – P. 180-184. – DOI 10.1016/j.asr.2004.12.034.
55. Durante, M. Heavy ion carcinogenesis and human space exploration / M. Durante, F.A. Cucinotta // Nature Reviews Cancer. – 2008. – V. 8. – № 6. – P. 465-472. – DOI 10.1038/nrc2391.
56. Eccles, L.J. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? / L.J. Eccles, P. O'Neill, M.E. Lomax // Mutat Res. – 2011. – V. 711. – № 1-2. – P. 134-141. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2010.11.003.
57. Effects of combined exposure to modeled radiation and gravitation factors of the interplanetary flight: Monkeys' cognitive functions and the content of monoamines and their metabolites; cytogenetic changes in peripheral blood lymphocytes / A.G. Belyaeva, V.S. Kudrin, I.V. Koshlan [et al.] // Life Sciences in Space Research. – 2021. – V. 30. – P. 45-54. – DOI 10.1016/j.lssr.2021.05.004.
58. Effects of shielding on the induction of 53BP1 foci and micronuclei after Fe ion exposures / W. Hu, H. Pei, H. Li [et al.] // Journal of Radiation Research. – 2013. – V. 55. – № 1. – P. 10-16. – DOI 10.1093/jrr/rrt078.

59. Evaluating biomarkers to model cancer risk post cosmic ray exposure / D.M. Sridharan, A. Asaithamby, S.R. Blattnig [et al.] // Life Sciences in Space Research. – 2016. – V. 9. – P. 19-47. – DOI 10.1016/j.lssr.2016.05.004.

60. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression / T. Nakashima, M. Hayashi, T. Fukunaga [et al.] // Nat Med. – 2011. – V. 17. – № 10. – P. 1231-1234. – DOI 10.1038/nm.2452.

61. Evolution of the Health Canada astronaut biodosimetry program with a view toward international harmonization / L.A. Beaton-Green, S. Lachapelle, U. Straube, R.C. Wilkins // Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen. – 2015. – V. 793. – P. 101-106. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2015.07.013.

62. Exposure to galactic cosmic radiation compromises DNA repair and increases the potential for oncogenic chromosomal rearrangement in bronchial epithelial cells / Z. Li, K.K. Jella, L. Jaafar [et al.] // Sci Rep. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 11038. – DOI 10.1038/s41598-018-29350-5.

63. Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays / S.H. MacPhail, J.P. Banath, T.Y. Yu [et al.] // Int J Radiat Biol. – 2003. – V. 79. – № 5. – P. 351-358. – DOI 10.1080/0955300032000093128.

64. Falck, J. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage / J. Falck, J. Coates, S.P. Jackson // Nature. – 2005. – V. 434. – № 7033. – P. 605-611. – DOI 10.1038/nature03442.

65. Fedorenko, B.S. Cytogenetic damage in cells of experimental animals and man induced by accelerated charged particles and cosmic rays / B.S. Fedorenko // Physics of Particles and Nuclei. – 1999. – V. 30. – № 2. – DOI 10.1134/1.953104.

66. Formation of gammaH2AX and pATM Foci in Human Mesenchymal Stem Cells Exposed to Low Dose-Rate Gamma-Radiation / S. Ulyanenko, M. Pustovalova, S. Koryakin [et al.] // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20. – № 11. – DOI 10.3390/ijms20112645.

67. Forward Modeling of Coronal Mass Ejection Flux Ropes in the Inner Heliosphere with 3DCORE / C. Mostl, T. Amerstorfer, E. Palmerio [et al.] // Space Weather. – 2018. – V. 16. – № 3. – P. 216-229. – DOI 10.1002/2017SW001735.

68. Galactic cosmic ray simulation at the NASA Space Radiation Laboratory / J.W. Norbury, W. Schimmerling, T.C. Slaba [et al.] // Life Sci Space Res (Amst). – 2016. – V. 8. – P. 38-51. – DOI 10.1016/j.lssr.2016.02.001.

69. Genomic instability in mice lacking histone H2AX / A. Celeste, S. Petersen, P.J. Romanienko [et al.] // Science. – 2002. – V. 296. – № 5569. – P. 922-927. – DOI 10.1126/science.1069398.

70. Goodhead, D.T. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA / D.T. Goodhead // Int J Radiat Biol. – 1994. – V. 65. – № 1. – P. 7-17. – DOI 10.1080/09553009414550021.

71. H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation / B. Reina-San-Martin, S. Difilippantonio, L. Hanitsch [et al.] // J Exp Med. – 2003. – V. 197. – № 12. – P. 1767-1778. – DOI 10.1084/jem.20030569.

72. Hada, M. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review / M. Hada, A.G. Georgakilas // J Radiat Res. – 2008. – V. 49. – № 3. – P. 203-210. – DOI 10.1269/jrr.07123.

73. Held, K.D. Effects of low fluences of radiations found in space on cellular systems / K.D. Held // International Journal of Radiation Biology. – 2009. – V. 85 – № 5. – P. 379-390. – DOI 10.1080/09553000902838558.

74. Helios Observations of Quasiperiodic Density Structures in the Slow Solar Wind at 0.3, 0.4, and 0.6 AU / S. Di Matteo, N.M. Viall, L. Kepko [et al.] // J Geophys Res Space Phys. – 2019. – V. 124. – № 2. – P. 837-860. – DOI 10.1029/2018ja026182.

75. Hellweg, C.E. Getting ready for the manned mission to Mars: the astronauts' risk from space radiation / C.E. Hellweg, C. Baumstark-Khan // Naturwissenschaften. – 2007. – V. 94. – № 7. – P. 517-526. – DOI 10.1007/s00114-006-0204-0.

76. Helt, C.E. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage / C.E. Helt, W.A. Cliby, P.C. Keng [et al.] // J Biol Chem. – 2005. – V. 280. – № 2. – P. 1186-1192. – DOI 10.1074/jbc.M410873200.

77. Histone H2AX in DNA damage and repair / O.A. Sedelnikova, D.R. Pilch, C. Redon, W.M. Bonner // Cancer Biol Ther. – 2003. – V. 2. – № 3. – P. 233-235. – DOI 10.4161/cbt.2.3.373.

78. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers / S.D. Taverna, H. Li, A.J. Ruthenburg [et al.] // Nat Struct Mol Biol. – 2007. – V. 14. – № 11. – P. 1025-1040. – DOI 10.1038/nsmb1338.

79. How safe is safe enough? Radiation risk for a human mission to Mars / F.A. Cucinotta, M.H. Kim, L.J. Chappell, J.L. Huff // PLoS One. – 2013. – V. 8. – № 10. – e74988. – DOI 10.1371/journal.pone.0074988.

80. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response / N. Ayoub, A.D. Jeyasekharan, J.A. Bernal, A.R. Venkitaraman // Nature. – 2008. – V. 453. – № 7195. – P. 682-686. – DOI 10.1038/nature06875.

81. Human exposure to space radiation: role of primary and secondary particles / S. Trovati, F. Ballarini, G. Battistoni [et al.] // Radiat Prot Dosimetry. – 2006. – V. 122. – № 1-4. – P. 362-366. – DOI 10.1093/rpd/ncl438.

82. Human TSCM cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness / P. Costa Del Amo, J. Lahoz-Beneytez, L. Boelen [et al.] // PLoS Biol. – 2018. – V. 16. – № 6. – e2005523. – DOI 10.1371/journal.pbio.2005523.

83. Iliakis, G. Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence / G. Iliakis // Radiother Oncol. – 2009. – V. 92. – № 3. – P. 310-315. – DOI 10.1016/j.radonc.2009.06.024.

84. Immobilization stress-induced thymocyte apoptosis in rats [Text] / K. Hatanaka, H. Ikegaya, I. Takase [et al.] // Life Sci. – 2001. – V. 69. – № 2. – P. 155-165. – DOI 10.1016/s0024-3205(01)01106-7.

85. Immunofluorescence detection of clustered gamma-H2AX foci induced by HZE-particle radiation / N. Desai, E. Davis, P. O'Neill [et al.] // Radiat Res. – 2005. – V. 164. – № 4, Pt 2. – P. 518-522. – DOI 10.1667/rr3431.1.

86. Inhibition of Osteocyte Apoptosis Prevents the Increase in Osteocytic Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand (RANKL) but Does Not Stop Bone Resorption or the Loss of Bone Induced by Unloading / L.I. Plotkin, A.R. Gortazar, H.M. Davis [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – V. 290. – № 31. – P. 18934-18942. – DOI 10.1074/jbc.M115.642090.

87. Interplay of space radiation and microgravity in DNA damage and DNA damage response / M. Moreno-Villanueva, M. Wong, T. Lu [et al.] // NPJ Microgravity. – 2017. – V. 3. – P. 14. – DOI 10.1038/s41526-017-0019-7.

88. Ionizing radiation and genetic risks. XVII. Formation mechanisms underlying naturally occurring DNA deletions in the human genome and their potential relevance for bridging the gap between induced DNA double-strand breaks and deletions in irradiated germ cells / K. Sankaranarayanan, R. Taleei, S. Rahmanian, H. Nikjoo // Mutation Research/Reviews in Mutation Research. – 2013. – V. 753. – № 2. – P. 114-130. – DOI 10.1016/j.mrrev.2013.07.003.

89. Ionizing radiation biomarkers for potential use in epidemiological studies / E. Pernot, J. Hall, S. Baatout [et al.] // Mutat Res. – 2012. – V. 751. – № 2. – P. 258-286. – DOI 10.1016/j.mrrev.2012.05.003.

90. Jeggo, P. Radiation-induced DNA damage responses / P. Jeggo, M. Lobrich // Radiat Prot Dosimetry. – 2006. – V. 122. – № 1-4. – P. 124-127. – DOI 10.1093/rpd/ncl495.

91. Jeggo, P.A. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective / P.A. Jeggo, L.H. Pearl, A.M. Carr // Nature Reviews Cancer. – 2015. – V. 16. – № 1. – P. 35-42. – DOI 10.1038/nrc.2015.4.

92. Karlsson, K.H. Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions / K.H. Karlsson, B. Stenerlow // Radiat Res. – 2004. – V. 161. – № 5. – P. 517-527. – DOI 10.1667/rr3171.

93. Kastan, M.B. The many substrates and functions of ATM / M.B. Kastan, D.S. Lim // Nat Rev Mol Cell Biol. – 2000. – V. 1. – № 3. – P. 179-186. – DOI 10.1038/35043058.

94. Kennedy, A.R. Biological Effects of Space Radiation and Development of Effective Countermeasures / A.R. Kennedy // Life Sci Space Res (Amst). – 2014. – V. 1. – P. 10-43. – DOI 10.1016/j.lssr.2014.02.004.

95. Klokov, D. Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays / D. Klokov, S.M. MacPhail, J.P. Banath [et al.] // Radiother Oncol. – 2006. – V. 80. – № 2. – P. 223-239. – DOI 10.1016/j.radonc.2006.07.026.

96. Kobayashi, J. NBS1 and its functional role in the DNA damage response / J. Kobayashi, A. Antoccia, H. Tauchi [et al.] // DNA Repair (Amst). – 2004. – V. 3. – № 8-9. – P. 855-861. – DOI 10.1016/j.dnarep.2004.03.023.

97. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function / T. Kouzarides // Cell. – 2007. – V. 128. – № 4. – P. 693-705. – DOI 10.1016/j.cell.2007.02.005.

98. Krenning, L. Life or Death after a Break: What Determines the Choice? / L. Krenning, J. van den Berg, R.H. Medema // Mol Cell. – 2019. – V. 76. – № 2. – P. 346-358. – DOI 10.1016/j.molcel.2019.08.023.

99. Kuo, L.J. Gamma-H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks / L.J. Kuo, L.X. Yang // In Vivo. – 2008. – V. 22. – № 3. – P. 305-319.

100. Late residual gamma-H2AX foci in murine skin are dose responsive and predict radiosensitivity in vivo / N. Bhogal, P. Kaspler, F. Jalali [et al.] // Radiat Res. – 2010. – V. 173. – № 1. – P. 1-9. – DOI 10.1667/RR1851.1.

101. LET dependence of the yield of single-, double-strand breaks and base lesions in fully hydrated plasmid DNA films by 4He(2+) ion irradiation / A. Urushibara, N. Shikazono, P. O'Neill [et al.] // Int J Radiat Biol. – 2008. – V. 84. – № 1. – P. 23-33. – DOI 10.1080/09553000701616072.

102. Lobrich, M. Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation / M. Lobrich, P.K. Cooper, B. Rydberg // Int J Radiat Biol. – 1996. – V. 70. – № 5. – P. 493-503. – DOI 10.1080/095530096144680.

103. Low doses of X-rays induce prolonged and ATM-independent persistence of gammaH2AX foci in human gingival mesenchymal stem cells / A.N. Osipov, M. Pustovalova, A. Grekhova [et al.] // Oncotarget. – 2015. – V. 6. – № 29. – P. 27275-27287. – DOI 10.18632/oncotarget.4739.

104. Low Repair Capacity of DNA Double-Strand Breaks Induced by Laser-Driven Ultrashort Electron Beams in Cancer Cells / N. Babayan, N. Vorobyeva, B. Grigoryan [et al.] // Int J Mol Sci. – 2020. – V. 21. – № 24. – e9488. – DOI 10.3390/ijms21249488.

105. Maalouf, M. Biological effects of space radiation on human cells: history, advances and outcomes / M. Maalouf, M. Durante, N. Foray // J Radiat Res. – 2011. – V. 52. – № 2. – P. 126-146. – DOI 10.1269/jrr.10128.

106. Martinez, R. ISECG Global Exploration Roadmap: A Stepwise Approach to Deep Space Exploration / R. Martinez, K.E. Goodliff, R. Whitley // AIAA SPACE 2013 Conference and Exposition. – San Diego, CA, 2013. – DOI 10.2514/6.2013-5504.

107. McManus, K.J. ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells / K.J. McManus, M.J. Hendzel // Mol Biol Cell. – 2005. – V. 16. – № 10. – P. 5013-5025. – DOI 10.1091/mbc.e05-01-0065.

108. Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention / C. Lukas, F. Melander, M. Stucki [et al.] // EMBO J. – 2004. – V. 23. – № 13. – P. 2674-2683. – DOI 10.1038/sj.emboj.7600269.

109. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks / M. Stucki, J.A.Clapperton, D. Mohammad [et al.] // Cell. – 2005. – V. 123. – № 7. – P. 1213-1226. – DOI 10.1016/j.cell.2005.09.038.

110. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint / G.S. Stewart, B. Wang, C.R. Bignell [et al.] // Nature. – 2003. – V. 421. – № 6926. – P. 961-966. – DOI 10.1038/nature01446.

111. MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint / M. Goldberg, M. Stucki, J. Falck [et al.] // Nature. – 2003. – V. 421. – № 6926. – P. 952-956. – DOI 10.1038/nature01445.

112. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals / Z. Lou, K. Minter-Dykhouse, S. Franco [et al.] // Mol Cell. – 2006. – V. 21. – № 2. – P. 187-200. – DOI 10.1016/j.molcel.2005.11.025.

113. Measurements of energetic particle radiation in transit to Mars on the Mars Science Laboratory / C. Zeitlin, D.M. Hassler, F.A. Cucinotta [et al.] // Science. – 2013. – V. 340. – № 6136. – P. 1080-1084. – DOI 10.1126/science.1235989.

114. Measurements on the shuttle of the LET spectra of galactic cosmic radiation and comparison with the radiation transport model / G.D. Badhwar, F.A. Cucinotta, L.A. Braby, A. Konradi // Radiat Res. – 1994. – V. 139. – № 3. – P. 344-351.

115. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo / E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner // J Cell Biol. – 1999. – V. 146. – № 5. – P. 905-916. – DOI 10.1083/jcb.146.5.905.

116. Modeling of Laboratory Animals Exposure Conditions behind Local Concrete Shielding Bombarded by 650-MeV Protons / A. Samoylov, A. Bushmanov, A. Molokanov [et al.] // Medical Radiology and radiation safety. – 2021. – V. 65. – № 5. – P. 77-86. – DOI 10.12737/1024-6177-2020-65-5-77-86.

117. Modulation of the DNA-damage response to HZE particles by shielding / B. Mukherjee, C. Camacho, N. Tomimatsu [et al.] // DNA Repair. – 2008. – V. 7. – № 10. – P. 1717-1730. – DOI 10.1016/j.dnarep.2008.06.016.

118. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells / M. Fenech, M. Kirsch-Volders, A.T. Natarajan [et al.] // Mutagenesis. – 2011. – V. 26. – № 1. – P. 125-132. – DOI 10.1093/mutage/geq052.

119. Moore, F.D. Radiation burdens for humans on prolonged exomagnetospheric voyages / F.D. Moore // The FASEB Journal. – 1992. – V. 6. – № 6. – P. 2338-2343. – DOI 10.1096/fasebj.6.6.1544543.

120. NASA Space Flight Human System Standards/ D. Russo, T. Foley, K. Stroud [et al.] // Law Hum Behav. – 2007. – DOI 10.1037/e578052012-005.

121. Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage / J. Essers, A.B Houtsmuller., L. van Veelen [et al.] // EMBO J. – 2002. – V. 21. – № 8. – P. 2030-2037. – DOI 10.1093/emboj/21.8.2030.

122. Olive, P.L. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay / P.L. Olive, J.P. Banath, R.E. Durand // Radiat Res. – 1990. – V. 122. – № 1. – P. 86-94.

123. Osteocyte Apoptosis Is Induced by Weightlessness in Mice and Precedes Osteoclast Recruitment and Bone Loss / J.I. Aguirre, L.I. Plotkin, S.A. Stewart [et al.] // Journal of Bone and Mineral Research. – 2006. – V. 21. – № 4. – P. 605-615. – DOI 10.1359/jbmr.060107.

124. Ozerov, I.V. Kinetic model of DNA double-strand break repair in primary human fibroblasts exposed to low-LET irradiation with various dose rates / I.V. Ozerov, A.N. Osipov // Computer Research and Modeling. – 2015. – V. 7. – № 1. – P. 159-176. – DOI 10.20537/2076-7633-2015-7-1-159-176.

125. Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains / M. Rodriguez, X. Yu, J. Chen, Z. Songyang // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – № 52. – P. 52914-52918. – DOI 10.1074/jbc.C300407200.

126. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication / T. Furuta, M.I. Aladjem, W.M. Bonner, Y. Pommier // J Biol Chem. – 2003. – V. 278. – № 22. – P. 20303-20312. – DOI 10.1074/jbc.M300198200.

127. Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response / Y. Ichijima, R. Sakasai, N. Okita [et al.] // Biochem Biophys Res Commun. – 2005. – V. 336. – № 3. – P. 807-812. – DOI 10.1016/j.bbrc.2005.08.164.

128. Plante, I. Calculation of the energy deposition in nanovolumes by protons and HZE particles: geometric patterns of initial distributions of DNA repair foci / I.

Plante, A.L. Ponomarev, F.A. Cucinotta // Physics in Medicine and Biology. – 2013. – V. 58. – № 18. – P. 6393-6405. – DOI 10.1088/0031-9155/58/18/6393.

129. Podhorecka, M. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy / M. Podhorecka, A. Skladanowski, P. Bozko // J Nucleic Acids. – 2010. – V. 2010. – Article: 920161. – DOI 10.4061/2010/920161.
130. Rejoining of DNA fragments produced by radiations of different linear energy transfer / B. Stenerlow, E. Hoglund, J. Carlsson, E. Blomquist // Int J Radiat Biol. – 2000. – V. 76. – № 4. – P. 549-557. – DOI 10.1080/095530000138565.
131. Repair of HZE-particle-induced DNA double-strand breaks in normal human fibroblasts / A. Asaithamby, N. Uematsu, A. Chatterjee [et al.] // Radiat Res. – 2008. – V. 169. – № 4. – P. 437-446. – DOI 10.1667/RR1165.1.
132. Repina, L.A. Cytogenetic characteristics of human blood lymphocytes in vivo in a 120-day bedrest study / L.A. Repina, M.V. Repin // Aviakosm Ekolog Med. – 2009. – V. 43. – № 6. – P. 59-60.
133. Ritter, S. Heavy-ion induced chromosomal aberrations: a review / S. Ritter, M. Durante // Mutat Res. – 2010. – V. 701. – № 1. – P. 38-46. – DOI 10.1016/j.mrgentox.2010.04.007.
134. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins / N. Mailand, S. Bekker-Jensen, H. Faustrup [et al.] // Cell. – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 887-900. – DOI 10.1016/j.cell.2007.09.040.
135. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers / N. Srivastava, S. Gochhait, P. de Boer, R.N.K. Bamezai // Mutat Res. – 2009. – V. 681. – № 2-3. – P. 180-188. – DOI 10.1016/j.mrrev.2008.08.003.
136. Rothkamm, K. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses / K. Rothkamm, M. Lobrich // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – V. 100. – № 9. – P. 5057-5062. – DOI 10.1073/pnas.0830918100.
137. Rydberg, B. Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: formation of short DNA fragments. II. Experimental detection / B. Rydberg // Radiat Res. – 1996. – V. 145. – № 2. – P. 200-209.

138. Rydberg, B. Radiation-induced DNA damage and chromatin structure / B.Rydberg // Acta Oncol. – 2001. – V. 40. – № 6. – P. 682-685. – DOI 10.1080/02841860152619070.

139. Sage, E. Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis / E. Sage, N. Shikazono // Free Radic Biol Med. – 2017. – V. 107. – P. 125-135. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008.

140. Santivasi, W.L. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair / W.L. Santivasi, F. Xia // Antioxid Redox Signal. – 2014. – V. 21. – № 2. – P. 251-259. – DOI 10.1089/ars.2013.5668.

141. Scully, R. Double strand break repair functions of histone H2AX / R. Scully, A. Xie // Mutat Res. – 2013. – V. 750. – № 1-2. – P. 5-14. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2013.07.007.

142. Shea, M.A. A summary of major solar proton events / M.A. Shea, D.F. Smart // Solar Physics. – 1990. – V. 127. – № 2. – P. 297-320. – DOI 10.1007/bf00152170.

143. Shibata, A. Regulation of repair pathway choice at two-ended DNA double-strand breaks / A. Shibata // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2017. – V. 803-805. – P. 51-55. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.011.

144. Shimura, N. The Lowest Radiation Dose Having Molecular Changes in the Living Body / N. Shimura, S. Kojima // Dose Response. – 2018. – V. 16. – № 2. – Article: 1559325818777326. – DOI 10.1177/1559325818777326.

145. Simulated microgravity increases heavy ion radiation-induced apoptosis in human B lymphoblasts / B. Dang, Y. Yang, E. Zhang [et al.] // Life Sci. – 2014. – V. 97. – № 2. – P. 123-128. – DOI 10.1016/j.lfs.2013.12.008.

146. Simulations of absorbed dose on the phantom surface of MATROSHKA-R experiment at the ISS / Z. Kolísková, L. Sihver, I. Ambrožová [et al.] // Advances in Space Research. – 2012. – V. 49. – № 2. – P. 230-236. – DOI 10.1016/j.asr.2011.09.018.

147. Slupphaug, G. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage / G. Slupphaug // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2003. – V. 531. – № 1-2. – P. 231-251. – DOI 10.1016/j.mrfmmm.2003.06.002.

148. Snigiryova, G.P. Cytogenetic examination of cosmonauts for space radiation exposure estimation / G.P. Snigiryova, N.N. Novitskaya, B.S.Fedorenko // Advances in Space Research. – 2012. – V. 50. – № 4. – P. 502-507. – DOI 10.1016/j.asr.2012.05.010.

149. Space radiation absorbed dose distribution in a human phantom / G.D. Badhwar, W. Atwell, F.F. Badavi [et al.] // Radiat Res. – 2002. – V. 157. – № 1. – P. 76-91. – DOI 10.1667/0033-7587(2002)157[0076:sraddi]2.0.co;2.

150. Space Radiation Biology for "Living in Space" / S. Furukawa, A. Nagamatsu, M. Nenoi [et al.] // Biomed Res Int. – 2020. – V. 2020. – P. 4703286. – DOI 10.1155/2020/4703286.

151. Space Radiation Cancer Risks and Uncertainties for Mars Missions / F.A. Cucinotta, W. Schimmerling, J.W. Wilson [et al.] // Radiation Research. – 2001. – V. 156. – № 5. – P. 682-688. – DOI 10.1667/0033-7587(2001)156[0682:Srcrau]2.0.Co;2.

152. Space Radiation Dosimetry to Evaluate the Effect of Polyethylene Shielding in the Russian Segment of the International Space Station / A. Nagamatsu, M. Casolino, O. Larsson [et al.] // Physics Procedia. – 2015. – V. 80. – P. 25-35. – DOI 10.1016/j.phpro.2015.11.083.

153. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat) / M.L. Lewis, J.L. Reynolds, L.A. Cubano [et al.] // The FASEB Journal. – 1998. – V. 12. – № 11. – P. 1007-1018. – DOI 10.1096/fasebj.12.11.1007.

154. Spurný, F. Radiation doses at high altitudes and during space flights / F. Spurný // Radiation Physics and Chemistry. – 2001. – V. 61. – № 3-6. – P. 301-307. – DOI 10.1016/s0969-806x(01)00253-5.

155. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1 / R.S. Williams, M.S. Lee, D.D. Hau, J.N. Glover // Nat Struct Mol Biol. – 2004. – V. 11. – № 6. – P. 519-525. – DOI 10.1038/nsmb776.

156. Structure and mechanism of BRCA1 BRCT domain recognition of phosphorylated BACH1 with implications for cancer / J.A. Clapperton, I.A. Manke, D.M. Lowery [et al.] // Nat Struct Mol Biol. – 2004. – V. 11. – № 6. – P. 512-518. – DOI 10.1038/nsmb775.

157. Stucki, M. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes / M. Stucki, S.P. Jackson // DNA Repair (Amst). – 2006. – V. 5. – № 5. – P. 534-543. – DOI 10.1016/j.dnarep.2006.01.012.

158. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain / X. Yu, C.C. Chini, M. He [et al.] // Science. – 2003. – V. 302. – № 5645. – P. 639-642. – DOI 10.1126/science.1088753.

159. The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair / R. Aleksandrov, R. Hristova, S. Stoynov, A. Gospodinov // Cells. – 2020. – V. 9. – № 8. – e1853. – DOI 10.3390/cells9081853.

160. The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection / H. Yajima, H. Fujisawa, N.I. Nakajima [et al.] // DNA Repair. – 2013. – V. 12. – № 11. – P. 936-946. – DOI 10.1016/j.dnarep.2013.08.009.

161. The effects of microgravity on differentiation and cell growth in stem cells and cancer stem cells / D. Grimm, M. Wehland, T.J. Corydon [et al.] // Stem Cells Transl Med. – 2020. – V. 9. – № 8. – P. 882-894. – DOI 10.1002/sctm.20-0084.

162. The Impact of Dose Rate on DNA Double-Strand Break Formation and Repair in Human Lymphocytes Exposed to Fast Neutron Irradiation / S. Nair, M. Engelbrecht, X. Miles [et al.] // Int J Mol Sci. – 2019. – V. 20. – № 21. – DOI 10.3390/ijms20215350.

163. URL: https://sciencesprings.wordpress.com.

164. URL: https://spacegid.com/granica-solnechnoy-sistemyi.html

165. URL: spacehack.org.

166. Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research / A. Ivashkevich, C.E. Redon, A.J. Nakamura [et al.] // Cancer Lett. – 2012. – V. 327. – № 1-2. – P. 123-133. – DOI 10.1016/j.canlet.2011.12.025.

167. Utilization of DNA double-strand breaks for biodosimetry of ionizing radiation exposure / A. Bushmanov, N. Vorobyeva, D. Molodtsova, A.N. Osipov // Environmental Advances. – 2022. – V. 8. – e100207. – DOI 10.1016/j.envadv.2022.100207.

168. Ward, I.M. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress / I.M. Ward, J. Chen // J Biol Chem. – 2001. – V. 276. – № 51. – P. 47759-47762. – DOI 10.1074/jbc.C100569200.

169. Ward, I.M. UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress / I.M. Ward, K. Minn, J. Chen // J Biol Chem. – 2004. – V. 279. – № 11. – P. 9677-9680. – DOI 10.1074/jbc.C300554200.

170. Wilkins, R.C. The Application of Imaging Flow Cytometry to High-Throughput Biodosimetry / R.C. Wilkins, M.A. Rodrigues, L.A. Beaton-Green // Genome Integr. – 2017. – V. 8. – P. 7. – DOI 10.4103/2041-9414.198912.

171. Ziegler, J.F. SRIM-2003 / J.F. Ziegler // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 2004. – V. 219-220. – P. 1027-1036. – DOI 10.1016/j.nimb.2004.01.208.

172. γ-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin / C.E. Redon, J.S. Dickey, W.M. Bonner, O.A. Sedelnikova // Adv Space Res. – 2009. – V. 43. – № 8. – P. 1171-1178. – DOI 10.1016/j.asr.2008.10.011.

173. γH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies / V. Valdiglesias, S. Giunta, M. Fenech [et al.] // Mutat Res. – 2013. – V. 753. – № 1. – P. 24-40. – DOI 10.1016/j.mrrev.2013.02.001.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность руководителю диссертационной работы профессору РАН Осипову Андреяну Николаевичу за помощь, чуткое руководство и поддержку при выполнении диссертационной работы. Выражаю признательность и благодарность профессору Штембергу Андрею Сергеевичу и его сотрудникам за помощь в организации и проведении радиобиологических экспериментах на приматах и профессору Иванову Александру Александровичу и его сотрудникам за помощь в организации и проведении радиобиологических экспериментов на мышах. Я очень признательна доктору физико-математических наук Тимошенко Геннадию Николаевичу и кандидату технических наук Молоканову Александру Григорьевичу за дозиметрическое и радиометрическое сопровождение экспериментов. Также я выражаю благодарность сотрудникам лаборатории радиационной биофизики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, и в особенности, Воробьевой Наталье Юрьевне, Яшкиной Елизавете Игоревне и Пустоваловой Маргарите Витальевне за постоянную помощь и поддержку.