

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

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2022

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна» и Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Научный руководитель:

Осипов Андрей Николаевич – доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий отделом экспериментальной радиобиологии и радиационной медицины ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна» ФМБА России

Официальные оппоненты:

Замулаева Ирина Александровна – доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом радиационной биохимии и лабораторией пострадиационного восстановления Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Посыпанова Галина Ароновна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной биологии и молекулярной медицины Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий ФГБУ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Защита диссертации состоится «29» сентября 2012 г. в 11 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 462.001.04

Адрес: 123098, Москва, ул. Живописная, д. 46, стр. 8, Конференц зал.

Тел. +7 (495) 190-96-98

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, и на сайте: <https://fmbafmbc.ru/scientific-activities/dissertation-council>

Автореферат разослан « 20 » июля 2022 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Шандала Н.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (СПС), состоящее 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].

Необходимо понимать, что космонавты подвергаются воздействию как первичного космического излучения, так и вторичного излучения (вторичные протоны, нейтроны, мезоны, гамма-кванты и т.д.), образующегося при взаимодействии космического излучения с обшивкой и материалом конструкции космического корабля. Последние десятилетия международные космические программы нацелены на исследования планет, в частности Лунные и Марсианские программы [Voice 2017], что требует изучения защитных свойств доступных материалов для возведения укрытий и организации планетарных баз [Hellweg and Baumstark-Khan 2007]. При этом в качестве защиты от космического излучения предлагаются конструкции из различных материалов, в том числе и бетона. Бетонные конструкции также используются для защиты от протонного излучения на ускорителях частиц.

Космическое излучение, а в особенности его плотноионизирующая компонента, вызывает повреждения различных биологических макромолекул, в том числе ДНК. Среди различных типов повреждений ДНК, вызываемых ионизирующим излучением (ИИ), наиболее значимыми являются двунитевые разрывы (ДР). Репарация ДР ДНК происходит преимущественно (около 80 %) некорректно путем негомологичного соединения концов (НГСК) с образованием микроделений и цитогенетических нарушений, что, 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].

Помимо ИИ, другим фактором космических полетов является пониженная гравитация. В последнее время появились данные о том, что невесомость может замедлять процессы репарации ДР ДНК [Moreno-Villanueva, et al. 2017].

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 вкуче с нерадиационными факторами, такими как пониженная гравитация.

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 ^{84}Kr на изменение доли лимфоцитов периферической крови с повышенным уровнем повреждения ДНК в отдаленный период после облучения (до 96 суток).

2) Оценить влияние комбинированного воздействия ИИ 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 имени 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 самках 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 (γ Н2АХ);

– 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 $^{84}\text{Kг}$ на ДНК лимфоцитов периферической крови. Было показано, что локальное облучение гиппокампа головного мозга обезьян ядрами $^{84}\text{Kг}$ 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 макаках-резус исследовано комбинированное действие ИИ и моделируемой невесомости на 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 свойств оболочки проектируемого космического корабля в комбинации с традиционными защитными материалами. 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 биологических эффектов у мышей, облучаемых в центре пучка. Однако с увеличением толщины преграды с 20 до 80 см и расстояния 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, проектирование эффективной физической защиты космических кораблей и баз. Результаты работы будут востребованы при чтении курса лекций по космической биологии 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 γ H2AX 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 103 страниц машинописного текста, в том числе 27 рисунков и 1 таблицу. Библиография включает 173 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы. В главе рассматривается понятие космического излучения, включая солнечные протонные события, галактическое космическое излучение и их производное в виде вторичного излучения, образующегося при взаимодействии с обшивкой и оснащением космического корабля. Представлены общие положения, связанные с радиационно-индуцированными повреждениями ДНК и механизмами их репарации, фосфорилированием гистона H2AX в облученных клетках и формированием цитогенетических нарушений.

Глава 2. Материалы и методы.

2.1 Радиобиологические эксперименты на приматах

2.1.2 Эксперименты по изучению влияния ускоренных ядер ^{84}Kr

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. Разрешение на проведение работ было получено от Комитета по биоэтике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», который создан и работает в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации.

2.1.2.2 Облучение

Транквилизованные животные помещались в приматологическое кресло. Однократное облучение приматов пучком ядер ^{84}Kr проводили на ускорителе заряженных частиц «Нуклотрон» в Объединенном институте ядерных исследований, г. Дубна.

Поток ядер ^{84}Kr , необходимый для создания в мозге поглощенной дозы 1 Гр, был равен $2,402 \cdot 10^6$ ядер/см². 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/см². 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. Разрешение 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 ¹²C) 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°. 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 ¹³⁷Cs (72 г-экв. Ra). Мощность дозы составила 2,34 сГр/ч. 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-К₂ 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

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 1×10^6 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 мышинные 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 отсеечения 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 (SS). Дополнительно использовали алюминиевую пластину (Al) толщиной 4 мм, плексиглас (P) толщиной 50 мм и водные фантомы (W) с толщиной 160 мм и 250 мм. Облучение проводили протонным пучком в медицинской кабине фазотрона Объединенного Института Ядерных Исследований (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 ч 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, содержащихся 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. 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/см³, 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). Для позиционирования пучка на поверхности бетонной стенки и для измерения пространственного распределения вторичного излучения за различными толщинами бетонной стены использовалась радиохромная пленка Gafchromic EBТ2 (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. 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.

В программе SRIM-2003 [Ziegler 2004], позволяющей оценить торможение и диапазон ионов в веществе, было рассчитано, что при плотности бетона $2,15 \text{ г/см}^3$ и энергии протонов в пучке 650 МэВ пробег квантов составит 95,2 см. 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 составляет подавляющую часть флюенса адронов, но при этом не имеет резкого максимума. 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].

В целях оценки поглощенных доз для каждой толщины бетона рассчитывались энергетические распределения частиц (протонов, нейтронов и π -мезонов) и гамма-квантов в объеме сфер, имитирующих мышей, и парциальные поглощенные дозы по каждому компоненту смешанного поля излучения за защитой.

Усредненные значения поглощенных доз, получаемые 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

Спленциты выделяли путём механической гомогенизации селезёнки в охлаждённом до 4°C фосфатно-солевом буфере (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 250 g 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°C. Перед анализом образцы дважды центрифугировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,3% BSA, и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере до конечной концентрации 1×10^6 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 γ H2AX-позитивных клеток

Анализ доли γ H2AX-позитивных клеток проводили по методике, описанной в разделе 2.1.4.

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°C в течение 60 минут в темноте. Перед анализом в пробирки добавляли PI (1 мг/мл) для выделения единичных ядер клеток и отсеечения 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. 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 \pm стандартная ошибка среднего. Статистическая значимость оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Результаты радиобиологических экспериментов на приматах

3.1.2 Результаты экспериментов по изучению влияния ускоренных ядер ^{84}Kr

Результаты исследований показали, что через 17 ч после облучения гиппокампа головного мозга обезьян ядрами ^{84}Kr в дозе 3 Гр отмечалось почти 2-кратное увеличение доли γH2AX -позитивных лимфоцитов периферической крови (рис. 1). К 34 ч происходило снижение доли γH2AX -позитивных клеток, однако их количество продолжало оставаться статистически значимым по отношению к контрольным значениям ($\sim 1,5$ раза, $p=0,006$). Даже через 42 суток после облучения доля γH2AX -позитивных клеток оставалась повышенной (рис. 1). И лишь к 96-м суткам этот показатель возвращался к контрольным значениям. Это может свидетельствовать о том, что поврежденные лимфоциты 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].

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

Воздействие моделируемой невесомости в течение 7 суток приводило к статически значимому ($p<0,05$) увеличению доли γH2AX -позитивных клеток в 2,1 раза, регистрируемоу на 1-е сутки после прекращения воздействия

(рис. 2), по сравнению с контролем. Обращает на себя внимание тот факт, что до окончания всего срока наблюдений (446 суток) у животных, подвергавшихся моделируемой невесомости, отмечалась устойчивая тенденция к сохранению более высокой доли γ H2AX-позитивных клеток по сравнению с контрольными животными. Необходимо понимать, что при воздействии АНОГ моделируется не только невесомость, но подверженность животных воздействию иммобилизационного стресса. Известно, что иммобилизационный стресс индуцирует повреждения ДНК и гибель лимфоцитов животных [Hatanaka, et al. 2001, Ivannik, et al. 2000].

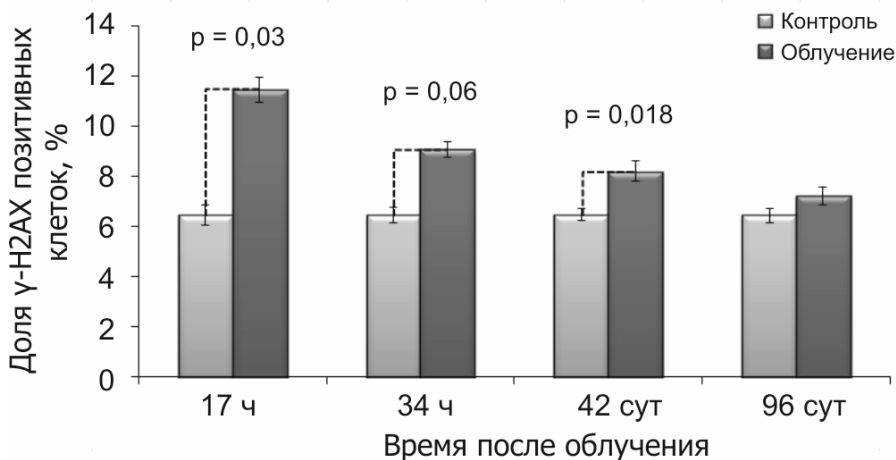


Рисунок 1. Изменения доли лимфоцитов периферической крови с высоким количеством ДР ДНК (γ H2AX-позитивные клетки) у обезьян в различные сроки после облучения ядрами ^{84}Kr .

Комбинированное воздействие ИИ и моделируемой невесомости, имитирующие условия космического полета, приводило к статистически значимому ($p < 0,05$) увеличению доли γ H2AX-позитивных клеток по сравнению с контролем, через 1, 19 и 42 суток после прекращения воздействия (рис. 2). Стоит отметить, что этот феномен может быть также частично объяснен не только длительным периодом жизни лимфоцитов с не критичными для их функционирования повреждениями, но и замедлением процессов репарации ДНК в условиях невесомости [Mognato, et al. 2009].

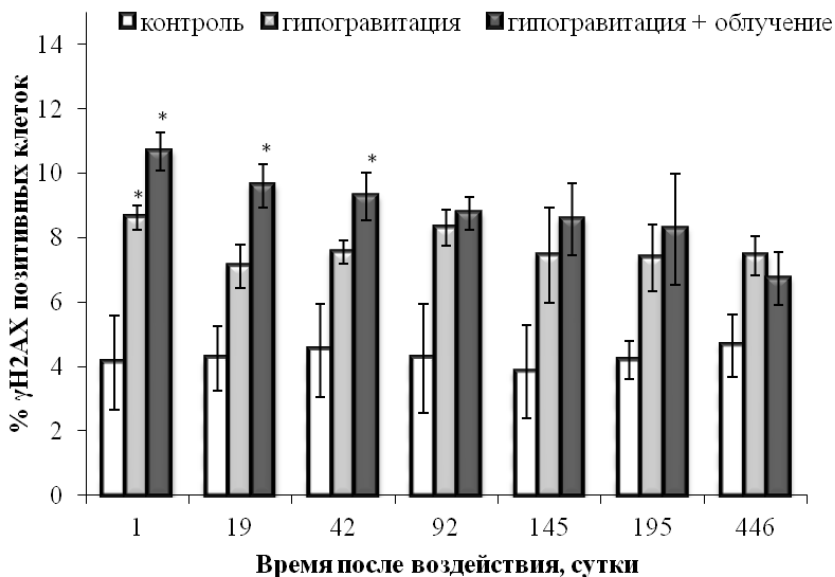


Рисунок 2. Изменения доли γ H2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови обезьян в различное время после воздействия факторов, моделирующих условия космического полета *in vivo* (ионизирующее излучение и невесомость). Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка. * - $p < 0,05$ – значимость различий от контроля.

3.2 Результаты экспериментов по оценке радиозащитных свойств оболочки проектируемого транспортного корабля

3.2.1 Изменение органного индекса селезёнки

Для изучения защитных свойств обшивки проектируемого транспортного корабля от ДНК повреждающего действия 163 МэВ протонного излучения были проведены исследования на мышах через 18-19 часов после облучения в дозе 0,5 Гр. 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). При использовании материалов в исследуемых комбинациях наблюдалась тенденция восстановления органного индекса, сниженного при облучении без защиты, что может

говорить о некотором защитном действии используемых материалов (рис. 3). Наиболее эффективная статистически значимая защита наблюдалась при использовании комбинации Al+SS+W и Al+SS+P (рис. 3).

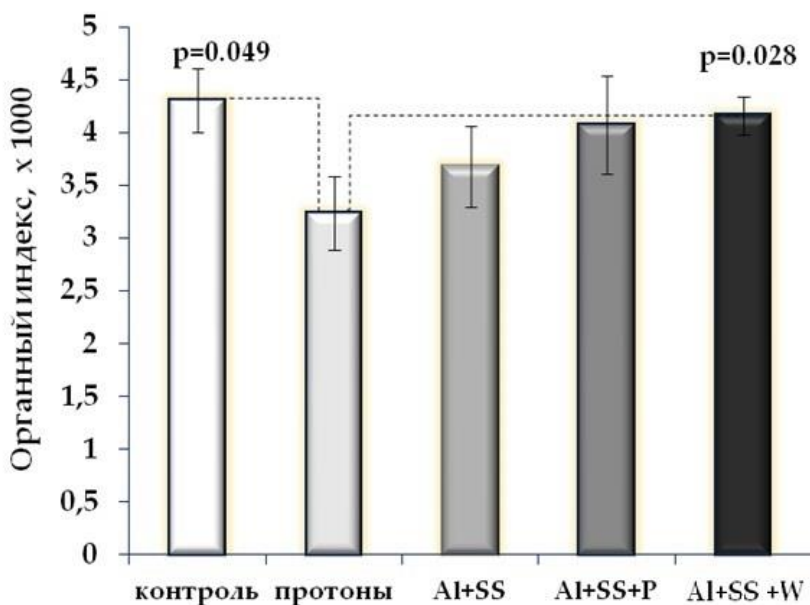


Рисунок 3. Изменения органного индекса селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты и с различными комбинациями защиты. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего.

3.2.2. Анализ доли γ H2AX-позитивных клеток

Воздействие протонного излучения приводило к статистически достоверному увеличению доли γ H2AX-позитивных клеток селезёнки в 2,6 раза по сравнению с контролем (рис. 4). Использование Al+SS не приводило к снижению доли γ H2AX-позитивных клеток по сравнению с вариантом без защиты (рис. 4). Дополнительное использование комбинации Al+SS+P или Al+SS+W снижало долю γ H2AX-позитивных клеток в 1,3 раза по сравнению с вариантом без защиты. Однако доля γ H2AX-позитивных клеток оставалась на довольно высоком уровне (~в 2,1 раза выше контрольных значений), что говорит о недостаточных защитных свойствах исследованных материалов.

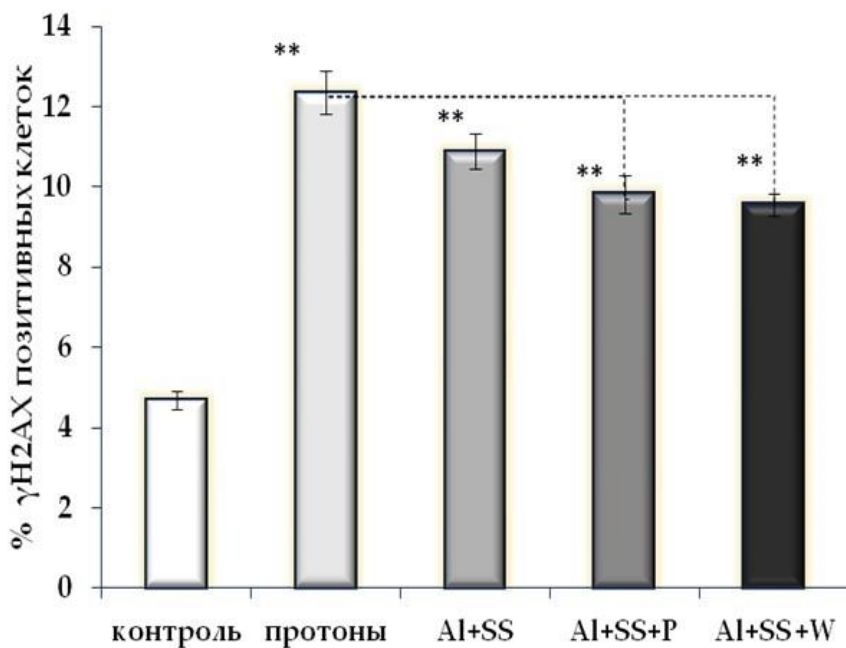


Рисунок 4. Изменения доли γ H2AX-позитивных клеток селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты (протоны) и с различными комбинациями защиты. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего. ** - $p < 0,01$ - значимость различий по сравнению с контролем.

3.2.3 Анализ апоптотической гибели клеток с помощью метода TUNEL

Воздействие протонного излучения в дозе 0,5 Гр приводило к увеличению доли апоптотических клеток в 2,2 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контролем (рис. 5). 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.

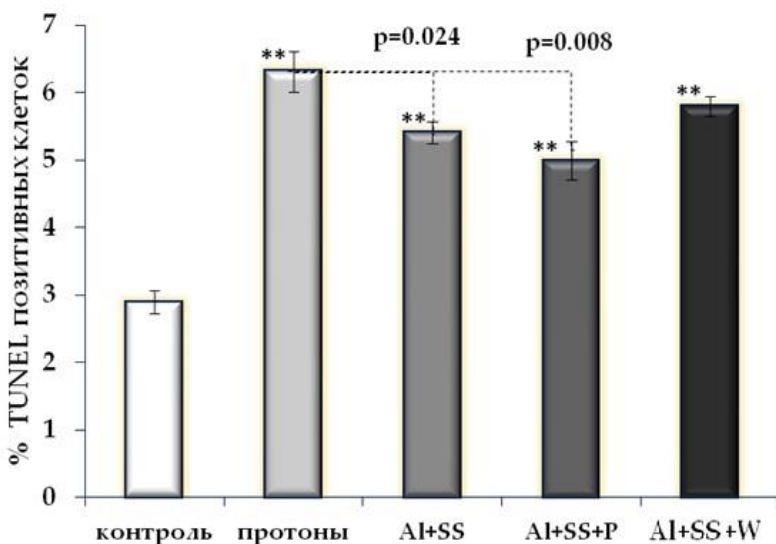


Рисунок 5. Изменения доли TUNEL-позитивных клеток селезёнки мышей после воздействия протонного излучения без защиты (протоны) и с различными комбинациями защиты. Данные представлены как средние значения \pm ошибка среднего. ** - $p < 0,01$ - значимость различий по сравнению с контролем.

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

На следующем этапе работы было проведено исследование влияния вторичного излучения, образующегося при прохождении 650 МэВ протонов через бетонную преграду толщиной 20-80 см, на ДНК клеток селезёнки мышей, 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

Максимальное снижение индекса селезёнки отмечалось у мышей, находящихся в центре протонного пучка (рис. 6). При увеличении толщины бетонной преграды у мышей, находящихся в центре пучка, снижается выраженность биологического эффекта (рис. 6). 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. 6). 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.

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 (рис. 6). 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.

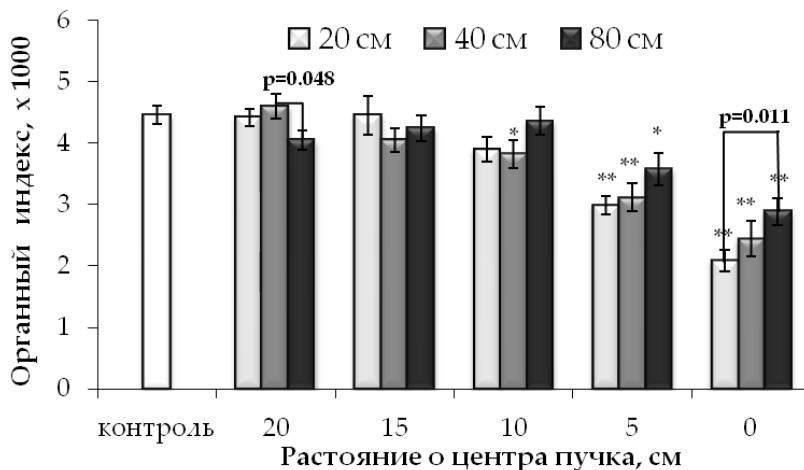


Рисунок 6. Органный индекс селезёнки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

3.3.2 Анализ доли γ H2AX-позитивных клеток селезенки облученных мышей

Наибольшая доля повреждённых клеток селезенки отмечается у мышей, находившихся по центру пучка и получивших максимальную дозу ИИ (рис. 7). Не было отмечено существенного изменения доли γ H2AX-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 γ H2AX-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 γ H2AX-позитивных клеток. Это феномен может быть обусловлен высокой биологической эффективностью вторичного нейтронного излучения, генерируемого при прохождении протонов через бетонную преграду.

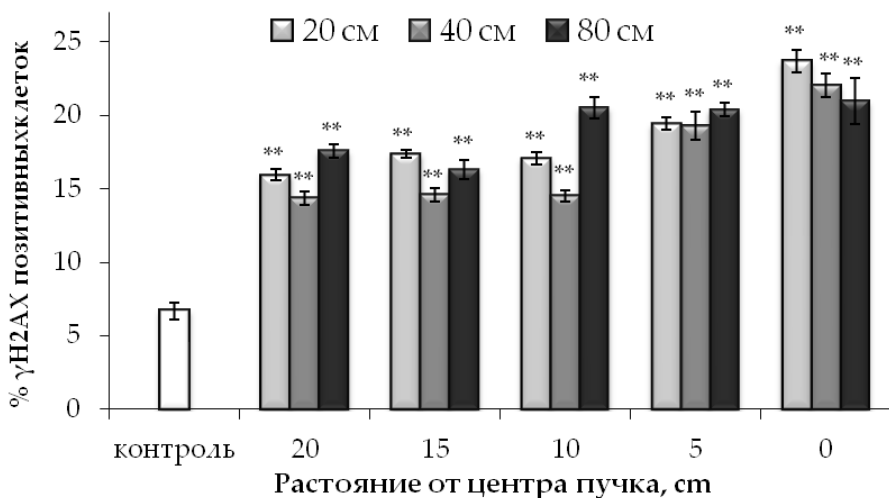


Рисунок 7. Изменение доли γ H2AX-позитивных клеток селезенки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

3.3.3 Анализ апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток

Наибольшая доля апоптотических клеток отмечается у мышей, находившихся в центре пучка за 20 см бетонной преградой (рис. 8). 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).

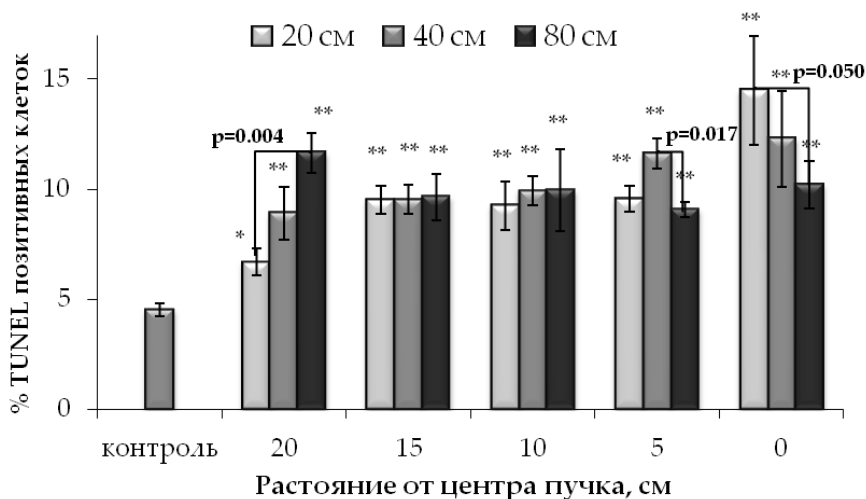


Рисунок 8. Изменение доли апоптотических (TUNEL-позитивных) клеток селезёнки мышей, подвергавшихся воздействию вторичного излучения, при нахождении за бетонными преградами толщиной 20, 40 и 80 см на различном расстоянии от центра входящего протонного пучка.

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 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 клетки селезенки.

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 ^{84}Kr 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 расстояния 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 СТАТЕЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ИЗДАНИЯХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК

1. Long-term persistence of increased number of γ H2AX+ peripheral blood lymphocytes in monkeys exposed to negative factors of space flights: ionizing radiation and simulated hypogravity / **Т.М. Blokhina**, E.I. Yashkina, A.N. Osipov [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – V. 172. – № 1. – P. 81-84. – DOI 10.1007/s10517-021-05336-8. – Web of Science. Scopus. Q3.
2. 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, A.N. Nosovsky, A.A. Perevezentsev, A.S. Shtemberg, I.V. Koshlan, N.A. Koshlan, M.D. Isakova, Y.V. Bogdanova, G.N. Timoshenko, E.A. Krasavin, **Т.М. Blokhina**, E.I. Yashkina, A.N. Osipov // Life Sciences in Space Research. – 2021. – V. 30. – P. 45-54. – DOI 10.1016/j.lssr.2021.05.004. – Web of Science. Scopus. Q2.
3. Гематологические, биохимические и молекулярные эффекты облучения головы обезьян ядрами криптона высоких энергий / А.С. Штемберг, И.Н. Клоц, А.Г. Беляева, **Т.М. Блохина** [et al.] // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2020. – Т. 54. – № 1. – С. 38-45. – DOI 10.21687/0233-528X-2020-54-1-38-45. – Scopus. Q4.
4. Пострадиационные изменения количества γ H2AX позитивных лимфоцитов крови макак-резус, облученных ионизирующим излучением, моделирующим космическое, в условиях гипогравитации / **Т.М. Блохина**, Е.И. Яшкина, А.Г. Беляева [и др.] // Юбилейная международная научно-практическая конференция «ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России: 75 лет на страже здоровья людей»: Тезисы докладов юбилейной международной научно-практической конференции, Москва, 16–17 ноября 2021 года. – Москва: ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 2021. – С. 30-31.
5. Радиобиологические эффекты вторичного излучения и наведенной радиоактивности в медицинской кабине фазотрона ОИЯИ при протонном облучении / А.А. Иванов, **Т.М. Блохина**, Т.М. Бычкова [и др.] // Радиобиологические основы лучевой терапии: Материалы 3-й Российской конференции с международным участием, Дубна, 17–18 октября 2019 года. – Дубна: ОИЯИ, 2019. – С. 63-65.