

ОТЗЫВ

официального оппонента на докторскую работу Блохиной Таисии
Михайловны «Повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови и спленоцитов
млекопитающих при моделировании воздействия космического ионизирующего
излучения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.1. Радиобиология

Актуальность избранной темы

Докторская работа Блохиной Т.М. посвящена решению целого комплекса радиobiологических проблем, связанных с дальнейшим развитием космонавтики. Если иметь в виду межпланетные пилотируемые полеты, то чрезвычайно актуальным является выяснение биологических закономерностей действия галактических космических лучей (ГКЛ) и вторичного излучения на организм млекопитающих, прежде всего, человека, а также исследование возможностей защиты различными способами, включая физические, фармакологические и даже в последнее время генно-инженерные. Ситуация осложняется еще и тем, что радиационное воздействие происходит в комбинации с другим негативным фактором – невесомостью. По существу, неопределенности в оценке биомедицинских эффектов на сегодняшний день таковы, что серьезно затрудняют планирование межпланетных пилотируемых полетов. В значительной мере отсутствие необходимых радиобиологических знаний связано с ограниченными техническими возможностями моделирования на Земле радиационного воздействия в ходе таких полетов, в частности, с малочисленностью установок, на которых можно изучать биологические эффекты потоков высоконергетических заряженных частиц, включая тяжелые ионы. Несколько известно, ГКЛ на 92% состоят из протонов, около 7% составляют ядра гелия, и оставшийся 1% – тяжелые ионы с зарядовым числом Z более 3, прежде всего, ионы углерода и железа с энергиями в широком диапазоне от 300–500 до 1000 МэВ/нуклон. Частицы с такими энергиями обладают высокой способностью проходить через вещество физической защиты, т.е. практически невозможно защититься от воздействия такого типа ионизирующего излучения, используя при строительстве пилотируемых космических аппаратов разумные способы физической защиты. При этом, несмотря на небольшой вклад тяжелых ионов в интегральный поток частиц галактического излучения, их вклад в эквивалентную дозу ионизирующего излучения ГКЛ для экипажа космических кораблей может составлять по имеющимся оценкам 20% и более из-за высокой линейной передачи энергии и формирования вторичного излучения при прохождении через материалы конструкции корабля.

с оговором о распечатке Техники ТМ
09.09.2022 *Родионов*

ВХОД №	3994
ДАТА	05 СЕН 2022
КОЛ-ВО ЛИСТОВ:	8
ФГБУ ГНИ ФМБЦ	
им. А.И. Бурдзини ФМБЦ России	

и биологические объекты. Эти обстоятельства не оставляют сомнений в том, что необходимо изучать биологическое действие тяжелых ионов на всех уровнях организации живой материи – организменном, клеточном и молекулярном. Особую актуальность имеют исследования повреждений ДНК, учитывая, что в основе большинства медицинских эффектов, которые возникают в ответ на воздействия ионизирующих излучений, лежат изменения генетического материала соматических и половых клеток. Известно, что формирование и репарация повреждений ДНК могут изменяться в условиях невесомости, поэтому оценка генотоксических эффектов ионизирующего излучения в условиях моделируемых эффектов невесомости, выполненная в диссертационной работе, представляет несомненный интерес.

Если защититься от тяжелых ионов в составе ГКЛ практически невозможно (при текущем уровне знаний и технологий), то от протонов можно найти защиту, но необходима не только дозиметрическая, но и радиобиологическая оценка защитных свойств материалов оболочки космического корабля, которая и была выполнена в диссертационной работе.

Вместе эти обстоятельства определяют высокую актуальность данной работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации и их достоверность

Поставленные в работе задачи обоснованы в литературном обзоре, который представляет подробный анализ имеющихся данных о компонентах космического и вторичного излучений, включая солнечный ветер, радиационный пояс Земли и ГКЛ, а также о влиянии этих компонентов на ДНК. Научные положения и выводы диссертационной работы Блохитой Т.М. базируются на достаточном экспериментальном материале, который получен автором с помощью адекватных методов исследования, поэтому являются обоснованными и достоверными. В этой связи следует отметить, что работа выполнена на современном методическом уровне, соответствующем мировым стандартам, с использованием высокотехнологичных облучательских установок, позволяющих получить разные типы электромагнитных и корpusкулярных ионизирующих излучений (в том числе γ -излучение, пучки протонов с различной энергией, ионы ^{12}C и ядра ^{40}Kr). Для оценки биологических эффектов использован такой объективный, надежный и ставший уже традиционным метод пропточной цитометрии в разных вариантах, которые позволили определить долю клеток с повышенным уровнем повреждений ДНК и долю клеток в поздней стадии апоптоза. По количеству использованных объектов исследования, выполненных независимых экспериментов и повторов, количеству проанализированных клеток, использованию необходимых контролей, адекватных методов статистической обработки исследование соответствует общепринятым

нормам и правилам, поэтому надежность полученного экспериментального материала не вызывает сомнений.

Научная новизна результатов исследования и их практическая значимость

Оцнивая новизну полученных результатов, можно выделить три аспекта.

Во-первых, впервые получены данные об относительном количестве (доля) γН2АХ-позитивных лимфоцитов в периферической крови обезьян в различные сроки после локального облучения (области гиппокампа) узким пучком тяжелых ядер ^{89}Kr ($Z=36$) со сверхвысокой энергией 2,3 ГэВ/нуклон. Этот показатель поврежденности ДНК соматических клеток оставался повышенным по сравнению с контролем в течение 42 суток после радиационного воздействия. Факт длительного сохранения повышенного уровня повреждений ДНК в соматических клетках после облучения тяжелыми ядрами представляет интерес с научно-практической точки зрения даже несмотря на то, что однократное облучение ядрами ^{89}Kr не вполне воспроизводит условия космического полета, например, на Марс, по продолжительности воздействия, дозе и мощности дозы, плотности потока и средней энергии тяжелых ядер галактического излучения.

Во-вторых, новизна полученных результатов заключается также в оценке генотоксических эффектов ионизирующих излучений (γ-квантов и ионов ^{12}C) при их комбинированном действии с антиортостатической гипокинезией, моделирующей некоторые эффекты невесомости на организм обезьян во время облучения и/или перед ним. Результаты длительного исследования уровня повреждений ДНК в течение примерно 15 месяцев после облучения имеют как фундаментальное значение для радиационной биологии и медицины, так и практическое значение для дальнейшего развития космонавтики.

В-третьих, в работе получены новые данные о снижении генотоксических эффектов протонного излучения при использовании элементов оболочки проектируемого космического корабля в комбинации с традиционными защитными материалами, и проведена оценка повреждающего действия вторичного излучения, возникающего при прохождении пучка высокоэнергетических протонов через бетонную преграду различной толщины. И в этом случае практическое значение полученных результатов достаточно очевидно.

В целом, результаты диссертационной работы характеризуются значительной научной новизной, представляют не только теоретический, но и практический интерес для дальнейшего развития радиационной биологии, медицины и космонавтики. Результаты работы отражены в научных публикациях в рецензируемых журналах, в том числе на английском языке, были неоднократно представлены и обсуждены на российских и международных конференциях.

Оценка содержания и оформления работы

Диссертационная работа написана по традиционному плану и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты экспериментов, их обсуждение, заключения по каждому из трёх экспериментальных разделов, выноды и библиографический список, включающий 173 источника. Диссертация изложена на 103 страницах машинописного текста, включает 27 рисунков и 1 таблицу.

Во введении авторами обоснована необходимость изучения закономерностей влияния космического излучения на ДНК клеток млекопитающих в модельных экспериментах на Земле, в том числе в условиях, имитирующих невесомость, обоснован выбор методов исследования, сформулированы цели, задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, объективно определена научная новизна и практическая значимость работы.

В обзоре литературы (глава 1) изложены сведения о химическом составе, физических характеристиках, плотности потоков и дозах космического излучения, которому подвергается экипаж на низкой околоземной орбите и в межпланетных перелётах. Отдельно рассмотрены компоненты вторичного излучения, возникающего в результате взаимодействия первичного излучения с обшивкой и содержимым космического корабля, включая тело человека. Особое внимание в обзоре литературы уделено описанию радиационных повреждений ДНК и их ремарации на молекулярном уровне, в том числе после воздействия нейтронов и высокоэнергетических заряженных частиц, которые регистрируются в составе космического излучения. Сделано заключение о высокой чувствительности метода анализа фосфогистоновых фокусов γН2АХ как маркёра двунитевых повреждений ДНК. К сожалению, в оглавлении работы отсутствует упоминание главы «Обзор литературы», хотя в тексте эта рубрика имеется и разделы этой главы представлены в содержании.

Материалы и методы исследования достаточно подробно изложены в главе 2, которая даёт информацию о спектре использованных методик и объеме проведенной работы. Детально описаны дозиметрические характеристики и процесс облучения обезьян Macaca mulatta ядрами ⁸⁴Kr. Для имитации некоторых эффектов невесомости была использована антиортостатическая гипокинезия (АНОГ) в адаптированном для приматов варианте. Причём моделировали 2 ситуации: длительное синхронное комбинированное воздействие γ-излучения в дозе 1Гр и АНОГ, а также последовательное воздействие АНОГ и локальное облучение головы ионами ¹²C в дозе 1 Гр.

Радиационно-индуцированные двунитевые разрывы ДНК определяли с помощью проточной цитометрии по связыванию с клетками крови обезьян антител к

fosфорилированному гистону H2AX (γ H2AX). Указан каталожный номер использованного реагента, который, как указывает производитель, предназначен для иммуноцитохимического исследования клеток человека. Из-за неполного воспроизведения инструкции производителя (т.е. несовпадения видовой специфичности и метода детекции иммунореактивности) автору следовало бы представить исходные проточноСитометрические графики распределения флуоресценции клеток по обоим анализируемым каналам в окрашенном образце и контроле неспецифического связывания, а также наглядно продемонстрировать алгоритм обработки этих графиков, включая построение аналитических регионов для выявления γ H2AX-позитивных лимфоцитов. Это тем более важно, что автор в выводе №3 диссертационной работы рекомендует использовать этот метод для оценки генотоксического действия негативных факторов космических полетов.

В остальных экспериментах (по исследованию радиозащитных свойств оболочки проектируемого корабля и эффектов вторичного излучения) были использованы мыши. Анализ радиобиологических эффектов выполняли по таким критериям как органный индекс селезенки, доля γ H2AX-позитивных спленоцитов и доля TUNEL-позитивных спленоцитов, находящихся в поздней стадии апоптоза. Замечание по неполному описанию проточноСитометрического анализа γ H2AX-позитивных клеток относится в полной мере и к этому разделу главы «Материалы и методы».

В главе 3 приведены *результаты исследования и обсуждение*, которые можно разделить на 3 блока:

1. Оценка уровня поврежденности ДНК лимфоцитов периферической крови обезьян после радиационных воздействий по критерию относительного количества γ H2AX-позитивных клеток. Совершенно обосновано автор начинает изложение результатов с анализа зависимости выхода этих клеток от дозы облучения *in vitro* (в частности, было использовано γ -излучение). Установленная линейная зависимость подтверждает возможность использования методики в последующих экспериментах (несмотря на описание выше несоответствие с инструкцией производителя реагентов) и указывает на достаточную чувствительность и воспроизводимость метода. После локального воздействия на гиппокамп ядер ^{14}Kr зарегистрировано статистически значимое повышение доли γ H2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови по сравнению с контролем, различия сохранялись до 42 суток после облучения. В течение этого же времени сохранялся и эффект комбинированного радиационного воздействия и АНОГ, а далее (вплоть до 446 суток) показана тенденция к повышению доли γ H2AX-позитивных лимфоцитов. В диссертации представлены результаты одного из вариантов комбинированных воздействий,

описанных в главе «Материалы и методы». Судя по продолжительности АНОГ, речь идет о комбинации с γ -излучением. Результаты исследования второго варианта комбинированного воздействия (АНОГ+локальное облучение головы ионами ^{12}C) не приводятся. Кроме того, представленные результаты не позволяют сравнить эффекты одиночного и комбинированного действия ионизирующего излучения, а также оценить характер взаимодействия факторов, что представляет существенный интерес.

2. Оценка радиозащитных свойств трехслойной конструкции каркаса проектируемого космического корабля, дополненного слоем алюминия, пlexiglasa или воды, при облучении протонами с энергией 163 МэВ в дозе 0,5 Гр по нескольким критериям, связанным с состоянием селезенки мышей и повреждением спленоцитов. Эффективная защита не была достигнута ни в одном варианте: в лучшем случае наблюдалось умеренное (~30%) ослабление повреждающего эффекта. Автор обоснованно приходит к заключению о необходимости поиска более эффективных вариантов защиты пилотов от действия космического излучения. Нельзя также не согласиться с автором о перспективности поиска фармакологических средств защиты.

3. Оценка эффектов вторичного излучения, образующегося при прохождении пучка протонов с энергией 650 МэВ через бетонную преграду, по некоторым критериям, связанным с состоянием селезенки мышей и повреждением спленоцитов. В этом разделе показано снижение негативных биологических эффектов, облучаемых в центре пучка, с увеличением толщины бетона. Однако с увеличением расстояния от центра пучка и толщины преграды происходит увеличение доли поврежденных и апоптотических спленоцитов из-за изменения спектра вторичного излучения в сторону повышения доли нейтронной компоненты.

Полученные результаты сопоставлены с данными литературы. Представленный в этой главе анализ показывает понимание автором теоретических вопросов по теме докторской работы. По каждому блоку экспериментальных данных сделаны краткие заключения, из которых логично вытекают выводы.

В целом, материалы докторской работы хорошо структурированы, полученные данные обработаны с помощью адекватных методов статистического анализа, результаты изложены четко, выводы полностью обоснованы.

Основные результаты докторской работы отражены в 3 статьях в рецензируемых журналах и 2 тезисах докладов, опубликованных в материалах международных конференций. Содержание авторефера отражает основные положения докторской работы.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет, но несколько вопросов требуют уточнения:

1. В работе отсутствуют проточногетометрические графики, по которым определяли долю γ H2AX-позитивных лимфоцитов периферической крови обезьян и спленоцитов мышей (с указанием всех аналитических регионов);
2. Непонятна причина (-ы), по которым средняя доля γ H2AX-позитивных клеток различалась у контрольных животных примерно в 1.5 раза в опытах по изучению повреждающего действия ядер $^{14}\text{Кт}$ и комбинированного действия АНОГ +ионизирующее излучение. Возможные причины могут заключаться в различном половом или возрастном составе животных, участвующих в этих экспериментах, но эти данные не приводятся.
3. Раздел 3.1.3 описывает результаты одного из экспериментов по комбинированному воздействию АНОГ и ионизирующего излучения (рис. 21), описанных в главе «Материалы и методы». Какое именно ионизирующее излучение было использовано в этом эксперименте (γ -излучение или ионы ^{13}C)? Каковы результаты исследования с другим типом излучения? Как отличаются результаты одиночного и комбинированного действия ионизирующих излучений на уровень повреждений ДНК, оцениваемый по доле γ H2AX-позитивных клеток?
4. На рис. 25-27 диссертационной работы имеются обозначения (в виде звёздочек), но не указано, что какие именно различия они обозначают, как можно предположить, по справочнику с контрольной группой.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа Блохиной Таисии Михайловны «Повреждение ДНК лимфоцитов периферической крови и спленоцитов млекопитающих при моделировании воздействия космического ионизирующего излучения», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук, является законченной самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой даётся новое решение актуальной задачи - выяснение закономерностей действия ионизирующих излучений на генетический материал соматических клеток млекопитающих, имеющей существенное значение для радиационной и космической биологии. По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней» постановления Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. (в редакции с изменениями,

утвержденными Постановлением Правительства РФ от 28.08.2017 г. №1024, редакцией от 01.10.2018 г. №1168, ред. от 20.03.2021 №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Блюхина Таисия Михайловна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.1 – радиобиология.

Официальный оппонент:

заведующая отделом радиационной биохимии,

заведующая лабораторией пострадиационного восстановления

Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба –

филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

доктор биологических наук, профессор Замулаева Ирина Александровна

249036 Калужская область, г. Обнинск, ул. Королёва, д. 1

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –

филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр

радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

тел.: 999-251-67-10, (484)3997188

эл. почта: zamulaeva@mail.ru

«25» августа 2022 г.

Подпись доктора биологических наук, профессора Замуласовой И.Л. заверяю.

Ученый секретарь Медицинского радиологического

научного центра им. А.Ф. Цыба –

филиала ФГБУ «Национальный медицинский

исследовательский центр радиологии»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Доктор медицинских наук, профессор

Петров Владимир Александрович

«25» августа 2022 г.