

ЛИТЕРАТУРА

1. OECD, 2012. Guideline for the Testing of Chemicals No 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and development / Paris. – 2012. – p. 202.
2. Koichiro Nakajima, Tian Xiang Gao, Kazuhiko Kume, Hiromitsu Iwata, Shuichi Hirai, Chihiro Omachi, Jun Tomita, Hiroyuki Ogino, cMunekazu Naitoe, Yuta Shibamoto. Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*, as an In Vivo Tool to Study the Biological Effects of Proton Irradiation / Koichiro Nakajima, Tian Xiang Gao, Kazuhiko Kume, Hiromitsu Iwata, Shuichi Hirai, Chihiro Omachi, Jun Tomita, Hiroyuki Ogino, cMunekazu Naitoe, Yuta Shibamoto. // Radiation research. 2020. № 194.
3. Даренская Н. Г. Реакция кроветворной системы // Радиационная медицина. – 2004. – №. 4. – С. 295-307.
4. Михальский, А. И., Савина, Н. Б., Сарapultseva, Е. И., Бычкова, И. Б. Аналитическое исследование закономерностей структуры кривых дожития экспериментальных объектов в модельных опытах на *Daphnia magna* // Успехи геронтологии. – 2020. – Т. 33. – №. 3. – С. 459-470.
5. Сарapultseva Е. И., Ускалова Д. В., Иголкина Ю. В. Анализ отдалённых радиационно-индуцированных биохимических эффектов у ракообразных в нескольких поколениях // труды регионального конкурса проектов фундаментальных научных исследований. – 2016. – С. 282-286.

АНАЛИЗ ВЫЖИВАЕМОСТИ И ДИНАМИКИ РАЗВИТИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У *DAPHNIA MAGNA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТОННОГО ОБЛУЧЕНИЯ

ANALYSIS OF SURVIVAL AND DYNAMICS OF OXIDATIVE STRESS IN *DAPHNIA MAGNA* AFTER PROTON RADIATION

А. А. Жалнина¹, Д. В. Ускалова¹, Л. Л. Куранова¹, Н. Б. Савина², С. Н. Корякин³, Е. И. Сарapultseva^{1,2,3}
A. A. Zhalnina¹, D. V. Uskalova¹, L. L. Kuranova¹, N. B. Savina², S. N. Koryakin³, E. I. Sarapultseva^{1,2,3}

¹Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», г. Обнинск, Россия

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», г. Москва, Россия

³МРНЦ имени А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия
alex.a.zhalnina@yandex.ru

¹Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering – branch of the National Research Nuclear University “MEPhI”, Obninsk, Russia

²National Research Nuclear University “MEPhI”, Moscow, Russia

³National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russian Federation, Obninsk, Russia

Изучение эффектов и механизмов действия терапевтических доз протонного излучения на организм – важная задача биомедицины и радиобиологии. Одним из механизмов действия ионизирующего излучения является окислительный стресс. Практическое применение нашел метод МТТ-теста. В нашем исследовании методом МТТ-теста проведен анализ оксидативного стресса после протонного облучения в дозе 10 Гр, а также обнаружен критический период онтогенеза на примере *Daphnia magna*. Наблюдается значимое по сравнению с контролем снижение метаболической активности в клетках *D. magna*, облученных в ювенильный и пубертатный периоды онтогенеза, особенно в 1- и 2-суточном возрасте. Выживаемость всех опытных групп *D. magna* не снижается по сравнению с контролем независимо от сроков облучения.

The study of the effects and mechanisms of action of therapeutic doses of proton radiation on the body is an important task of biomedicine and radiobiology. One of the mechanisms of action of ionizing radiation is oxidative stress. The MTT test method has found practical application. In our study, the MTT test method was used to analyze oxidative stress after proton irradiation at a dose of 10 Gy, and also revealed a critical period of ontogenesis on the example of *Daphnia magna*. There is a significant decrease in metabolic activity compared to the control in cells of *D. magna* irradiated during the juvenile and pubertal periods of ontogenesis, especially at 1- and 2-day-old age. The survival rate of all experimental groups of *D. magna* does not decrease in comparison with the control, regardless of the duration of irradiation.

Ключевые слова: ионизирующее излучение, терапевтические дозы, окислительный стресс, критические периоды онтогенеза.

Keywords: Ionizing radiation, therapeutic doses, oxidative stress, critical periods of ontogenesis.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-1-256-259>

Изучение эффектов и механизмов действия терапевтических доз протонного излучения на организм – важная задача биомедицины и радиобиологии. Одним из механизмов действия ионизирующего излучения является окислительный стресс. Практическое применение нашли методы, основанные на восстановлении митохондриальными дегидрогеназами нитросинего тетразолия (НСТ), резазурина и метилтиазолтетразолия бромидом (МТТ). МТТ-тест представляет собой колориметрический метод, который применяют для интегральной оценки активности ферментов антиоксидантной защиты, уровня свободнорадикальных реакций и соотношения живых и мертвых клеток.

Исследования свободнорадикальных реакций и антиоксидантной защиты традиционно проводят на клеточном уровне. Особый интерес представляет переход на уровень целостного организма и создание эффективной и доступной тест-системы первичного скрининга эффектов *in vivo*.

Цель данной работы – анализ оксидативного стресса после протонного облучения в дозе 10 Гр и поиск критического периода онтогенеза на примере модельного тест-организма беспозвоночного животного *Daphnia magna*.

D. magna является представителем низших ракообразных, классическим тест-объектом экотоксикологических исследований. Важными факторами широкого использования *D. magna* в качестве модельного организма являются простота культивирования, короткий жизненный цикл (до 2 месяца), короткий период онтогенеза (репродуктивный период с 10-суточного возраста) и высокая плодовитость (до 40 новорожденных на помет и до 5 пометов к 21-суточному возрасту). Эмбриональный и постнатальный периоды у *D. magna* длятся примерно по 5 суток каждый. На первые сутки после рождения у животных начинается закладка яиц и выход их выводковую камеру. Пубертатный период, когда формируются эмбрионы, длится до 10-суточного возраста, когда животные начинают выметывать новорожденную молодь. Процессы сопряжены с синтезом АТФ и активацией всех метаболических реакций. *D. magna* в указанные периоды онтогенеза наиболее уязвимы для негативных факторов, в частности для радиации.

Маточная культура *D. magna* содержалась в сосудах с 500 мл воды, с плотностью посадки 1 особь на 50 мл воды. В эксперимент брали молодь 3 помета. По 10 особей *D. magna* облучали в пластиковых контейнерах протонами на установке «Прометеус» в дозе 10 Гр (мощность дозы – 10,8 Гр/мин, энергия – 83 мэВ). Было создано 10 опытных групп, каждую из которых облучали в указанной дозе в возрасте 1–10 суток, соответственно. *D. magna* контрольной группы не облучали. Далее проводили культивирование в климатостате марки Р2 (Спецкомплектресурс, Россия): температура 21°C, режим освещения 12/12 свет/тьма, вентилирование. Для учета выживаемости *D. magna* культивировали по 1 особи в стеклянных стаканах объемом 50 мл с отстоянной водопроводной водой. *D. magna* кормили раз в два дня суспензией *Chlorella vulgaris* в концентрации 2 мгС/л.

Учет выживаемости проводили раз в два дня по стандартным методикам до 21-суточного возраста, погибших и новорожденных *D. magna* учитывали и удаляли. Выживаемость рассчитывали для контроля и дозовых групп как процент выживших животных на последние сутки эксперимента. Статистический анализ выживаемости осуществляли по непараметрическому χ^2 -критерию.

МТТ-тест проводили по модифицированной методике [1]. *D. magna* от 1-до 10-суточного возраста (по 25 особей на образец) облучали в дозе 10 Гр. Затем культивировали в стеклянных сосудах с плотностью посадки 1 особь на 50 мл культуральной воды в течение 4 суток. Параллельно ставили сосуды с необлученными *D. magna*. В каждой контрольной группе было 12 образцов, в каждой опытной – по 8 образцов. Измерения оптической плотности окрашенных образцов проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology, США, VIS-модель) при длине волны 492 нм. Отсекающая длина волны была 630 нм. Оптическая плотность образцов пропорциональна количеству формазана, образованного при восстановлении МТТ дегидрогеназами живых клеток тест-организма.

На рис. 1 видно изменение метаболической активности в клетках животных, оценённой МТТ-тестом в единицах оптической плотности.

Видно, что в ювенильном периоде в клетках *D. magna* происходит значимое по сравнению с контролем снижение оптической плотности, что свидетельствует о снижении метаболической активности. Аналогичная картина наблюдается в пубертатный период (6-10 сут).

Особый интерес представляет поиск наиболее чувствительных к облучению критических точек в индивидуальном развитии животных.

На рис. 2 представлены результаты МТТ-теста, отражающие изменение оптической плотности в образцах контрольных и облученных в разные периоды онтогенеза (с 1 по 10 сут) *D. magna*.

Наблюдается значимое снижение оптической плотности в образцах *D. magna*, облученных в 1- и 2-суточном возрасте, что подтверждает наибольшую уязвимость ювенильного периода онтогенеза животных к воздействию радиации. В этот период половые клетки активно делятся, процесс закладки яиц только начинается. Кроме того, *D. magna* активно растет. Известно, что именно делящиеся клетки максимально уязвимы к внешнему воздействию. На рисунке видно значимое снижение оптической плотности в образцах *D. magna*, облученных в 8-суточном возрасте. В этот период происходит вымет первой молодки. Аналогичные эффекты облучения протонами обнаружены у других животных. Так, у млекопитающих после кратковременного облучения в дозе до 10 Гр наблюдалось поражение кроветворной системы [2]. Облучение клеток рака молочной железы вызывало цитотоксический эффект [3]. Воздействие как протонами, так и γ -квантами приводит к подавлению митотической активности клеток и к образованию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга [4].

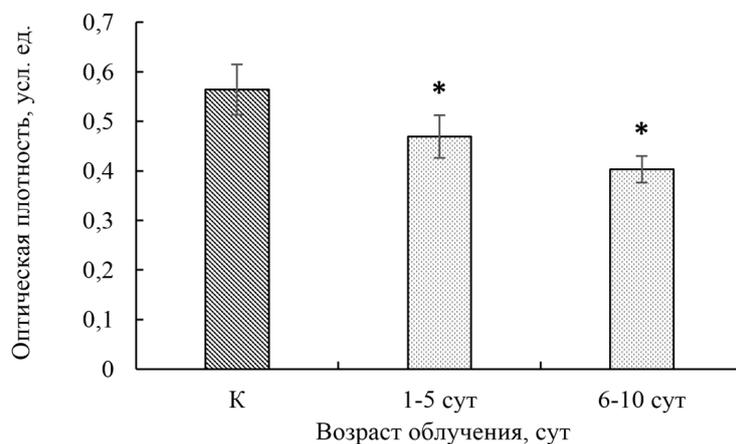


Рисунок 1 – Изменение оптической плотности (МТТ-тест) в образцах контрольных и облученных протонами в дозе 10 Гр *D. magna* в ювенильный (1–5 сут) и пубертатный (6–10 сут) периоды (* $p < 0,05$). На всех рисунках приведен усредненный по всем возрастным группам контроль (К)

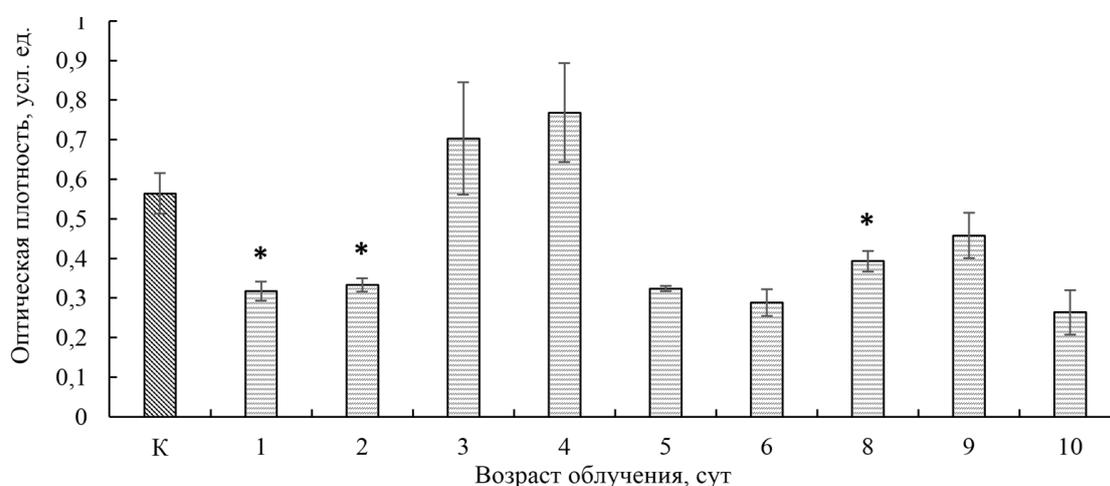


Рисунок 2 – Изменение оптической плотности (МТТ-тест) после облучения *D. magna* протонами в дозе 10 Гр (* $p < 0,05$)

Ранее нами было обнаружено цитотоксическое действие гамма-излучения в критические сутки онтогенеза – первые сутки ювенильного периода, когда клетки активно делятся, что требует больших затрат энергии [1]. Наблюдается достоверное снижение МТТ-показателя в облученных образцах. Цитотоксическое действие гамма-радиации сказывалось на выживаемости и плодовитости рачков, а также имело трансгенерационный характер [1].

Поэтому следующей задачей нашего эксперимента было определить, может ли протонное облучение на ранних этапах онтогенеза сказываться на жизнеспособности ракообразных. Для этого проведен анализ выживаемости *D. magna*.

На рис. 3 представлены результаты выживаемости контрольных и облученных *D. magna*.

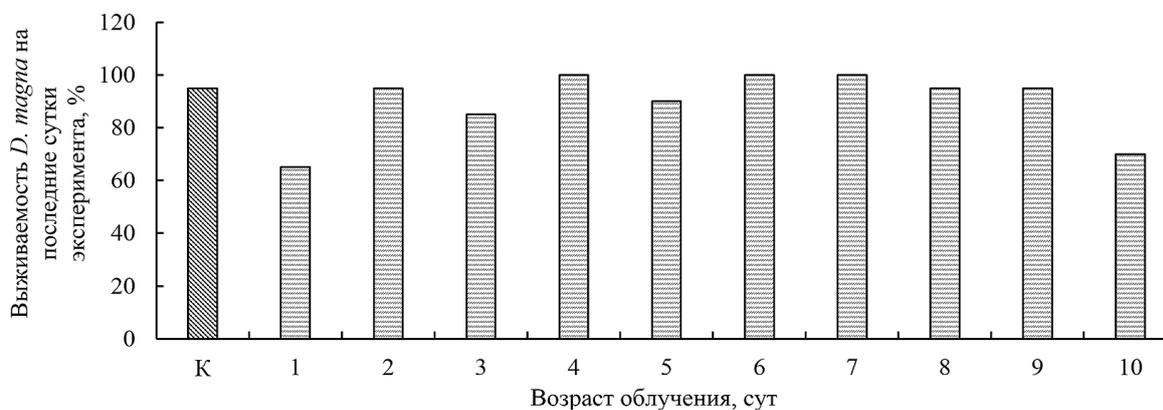


Рисунок 3 – Выживаемость контрольных и облученных протонами в дозе 10 Гр *D. magna* на 21 сутки эксперимента

Статистический анализ показал, что выживаемость всех опытных групп *D. magna* не снижается по сравнению с контролем независимо от сроков облучения. Наши результаты согласуются с данными литературы. Так, в работе [5] показано, что облучение личинок насекомых *Drosophila melanogaster* не влияло на дальнейшее развитие животных и выживаемость куколок.

Возможно, цитотоксический эффект протонного облучения *D. magna* проявится в изменении других, более чувствительных показателей, таких как плодовитость рачков или отразится на жизнеспособности последующих поколений, что требует дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савина Н. Б., Ускалова Д. В., Саранульцева Е. И. Использование МТТ-теста для изучения отдалённых эффектов острого γ -облучения у ракообразных *Daphnia magna* // Радиация и риск (Бюллетень Национального радиационно-эпидемиологического регистра). – 2018. – Т. 27. – №. 1. – С. 86-93.
2. Даренская Н. Г. Реакция кроветворной системы // Радиационная медицина. – 2004. – №. 4. – С. 295–307.
3. Гладилина И. А., Монзуль Г. Д., Нечушкин М. И., Курносоев А. А. Роль лучевой терапии в программе комплексного лечения больных раком молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2005. – № 1. – С. 31–35.
4. Говорун Р. Д., Денерас-Каминьска М., Зайцева Е. М., Красавин Е. А, Мицын Г. В., Молоканов А. Г. Исследование хромосомных нарушений в клетках человека после облучения терапевтическим пучком протонов фазотрона Объединенного института ядерных исследований // Письма в ЭЧАЯ. – 2006. – Т. 3. – №. 1. – С. 92–101.
5. Nakajima K. et al. Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*, as an In Vivo Tool to Study the Biological Effects of Proton Irradiation // Radiation research. – 2020. – Т. 194. – №. 2. – С. 143–152.

ДЕЙСТВИЕ ОБЩЕЙ КРИОТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН КЛЕТОК КРОВИ THE EFFECT OF CRYOTHERAPY ON THE STATE OF PEPTIDE COMPONENT OF PLASMA MEMBRANE OF BLOOD CELLS

**Н. В. Герасимович^{1,2}, И. В. Пухтеева^{1,2},
А. В. Ваканова^{1,2}, М. Л. Левин^{1,2}, Л. А. Малькевич³**

N. Gerasimovich^{1,2}, I. Puhteeva^{1,2}, A. Vakanova^{1,2}, M. Levin^{1,2}, L. Malkevich³

¹Белорусский государственный университет, БГУ г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
giv@iseu.by

³Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

¹Belarusian State University, BSU Minsk, Republic of Belarus

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU Minsk, Republic of Belarus

³Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

В работе установлено, что после проведения курса общей криотерапии степень тушения триптофановой флуоресценции пиреном снижается в плазматических мембранах лимфоцитов и тромбоцитов приблизительно на 35% и 50%, соответственно, по отношению к этим показателям в контрольной группе. Ранее было показано, что основной мишенью криовоздействия на клетки крови является липидный компонент биомембран. В частности, наблюдается переход липидов в более «жидкое» состояние, что, в свою очередь, в определенной степени оказывает влияние на структуру и функцию белков, а также липид-белковые взаимодействия. При кратковременном воздействии ультранизких температур на организм происходит общее системное изменение функционирования стрессреализующих и адаптационных механизмов. Механизм адаптации к сверхнизким температурам связан с изменением физико-химического состояния биологических мембран клеток организма.

The paper found that after a course of general cryotherapy, the degree of extinguishing tryptophan fluorescence with pyrene decreases in the plasma membranes of lymphocytes and platelets by approximately 35% and 50%, respectively, in relation to these indicators in the control group. Previously, it was shown that the main target of cryotherapy on blood cells is the lipid component of biomembranes. In particular, there is a transition of lipids to a more «liquid» state, which,