

## Анализ радиопротекторных свойств фумарата 3-гидроксипиридина на модели беспозвоночного животного после облучения протонами в опытах *in vivo*

О.В. Кузьмичева<sup>1</sup>, Д.В. Ускалова<sup>1</sup>, Д.Т. Дегтярева<sup>1</sup>, Т.В. Уланова<sup>1</sup>, С.В. Шкавров<sup>1</sup>,  
Е.И. Сарапульцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, Обнинск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский ядерный университет Московский инженерно-физический институт, Москва, Россия

Целью статьи является анализ радиопротекторных и антиоксидантных свойств фумарата 3-гидроксипиридина при облучении протонами модельного тест-организма в опытах *in vivo*. В качестве тест-организма использована лабораторная культура беспозвоночных животных из подотряда ракообразные *Daphnia magna*. Синтезированная авторами соль фумарата 3-гидроксипиридина представляла собой растворимое в спирте и воде белое кристаллическое вещество – соль 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и фумаровой кислоты, выделенное из этанола. Острое облучение тест-организма проведено на протонном комплексе «Прометейс» в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия) сканирующим пучком протонов в дозе 30 Гр (энергия 150 МэВ) в распределенном пике Брэгга. Выживаемость *Daphnia magna* оценивали в 21-суточном эксперименте на ежедневной основе. Цитотоксичность исследуемых факторов анализировали колориметрическим методом по изменению метаболической активности клеток многоклеточного тест-организма, антиоксидантные свойства фумарата 3-гидроксипиридина оценивали по изменению активности ферментов каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы. Оценку вклада анализируемых факторов в наблюдаемые эффекты проводили тестом Краскела-Уоллиса. Статистическую обработку выживаемости осуществляли по критерию  $\chi^2$ , остальные показатели – по критерию Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение. Согласно полученным данным, выживаемость облученных новорожденных животных снижалась к 21-суточному возрасту на 29,3 % ( $p=0,03$ ). При совместном с фумаратом 3-гидроксипиридином действии гибель животных снижалась на 56,6 % ( $p=8,8 \times 10^{-4}$ ). Выявлено, что основной вклад (85 %) в совместный эффект вносило облучение. Интегральная оценка уровня оксидативного стресса показала, что облучение протонами вызывает цитотоксический эффект в клетках тест-организма. Фумарат 3-гидроксипиридин не оказывает радиопротекторного и антиоксидантного действия при культивировании *Daphnia magna* в растворе вещества с концентрацией 50 мг/мл после облучения протонами. Полученные результаты согласуются с данными об отсутствии радиопротекторных свойств фумарата 3-гидроксипиридина после облучения тяжелыми ионами. Авторы предполагают единый механизм взаимодействия фумарата 3-гидроксипиридина с плотнoионизирующим излучением разного типа (протонами, тяжелыми ионами, альфа-частицами), который не оказывает радиопротекторного действия. Необходимо продолжить поиск радиопротекторов для протонной терапии среди веществ другого класса.

**Ключевые слова:** облучение протонами, *Daphnia magna*, радиопротектор, антиоксидант, фумарат 3-гидроксипиридин.

### Введение

Протонная терапия – один из современных видов лечения злокачественных новообразований. Он обладает рядом преимуществ перед фотонной терапией, например, формированием пика Брэгга с наибольшей дозой излучения в зоне мишени. При этом доза облучения, приходящаяся на ткани, окружающие опухоль, хоть и значительно снижается, но все еще наносит ущерб здоровым клеткам. Так оптимизация подходов к лучевой терапии остается актуальной задачей. Она предполагает разные методики, в том числе, использование радиопротекторов.

Надежный радиопротектор должен обладать цитопротекторными и антиоксидантными свойствами. С целью профилактики лучевых повреждений в литературе описываются малотоксичные протекторы природного происхождения: флавоноиды, фенольные кислоты, ликопины, алкалоиды, полисахариды и фитогормоны [1]. Анализ литературы показал, что производные 3-оксидина и 3-гидроксипиридина способны препятствовать перекисному окислению липидов и белков. Например, мексидол эффективно ингибирует свободно-радикальное окисление липидов биомембран и повышает активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутазы [2, 3]. Выявлено, что механизм анти-

Кузьмичева Ольга Владимировна

Обнинский институт атомной энергетики

Адрес для переписки: 249039, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Студгородок, д. 1; E-mail: kuzmichevaov20@oiate.ru

оксидантного действия мексидола сходен с таковым у еще одного химического вещества, описываемого в литературе как антиоксидант, фумарата 3-гидроксипиридина (фумарат 3-ГП) [4, 5]. Подвижный атом водорода гидроксильной группы фумарата 3-ГП может взаимодействовать с образующимися в ходе перекисного окисления липидов пероксидными (ROO•) и алкокси-радикалами (RO•) и инактивировать их в соответствии с формулой (1):



где АН – фумарат 3-ГП с подвижным атомом водорода; X• - радикальный инициатор или промежуточный радикальный продукт свободно-радикального окисления [2].

Входящая в состав фумарата 3-ГП фумаровая кислота активирует антиоксидантные сигнальные пути в организме, выполняя защитную роль в окислительном стрессе, например, в процессе воспаления [6, 7]. В работе [5] на беспородных крысах-альбиносах обнаружено, что фумарат 3-ГП проявляет выраженные кардиопротекторные свойства. Наряду со способностью инактивировать свободные радикалы фумарат 3-ГП изменяет активность антиоксидантных ферментов: повышает активность Se-зависимой глутатионпероксидазы и снижает активность индуцибельной NO-синтазы [8]. В литературе приведены сведения о фармакологической активности соединения в дозах 25 мг/кг на модели аллоксанового диабета, катехоламинового повреждении миокарда, тканевой гипоксии, остром нарушении мозгового кровообращения; остро и хроническое гепатита лабораторных крыс. Установлено наличие антигипоксического, кардио-, нейро- и гепатопротекторного действия у изучаемого соединения [9-12].

**Цель исследования** – анализ радиозащитных свойств фумарата 3-ГП на здоровые ткани окружения в опытах *in vivo* при облучении пучками протонов на примере беспозвоночного животного *Daphnia magna*, поскольку за последнее десятилетие существенно увеличилось применение протонной терапии в лечении злокачественных новообразований.

## Материалы и методы

### Культивирование тест-организма

В качестве модельного тест-организма использовали беспозвоночных многоклеточных животных *D. magna*, культивируемых более 12 лет в оптимальных условиях лаборатории отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ в климатостате (модель Р2) в дехлорированной дважды фильтрованной водопроводной воде согласно международному протоколу [13]. Беспозвоночные животные из подотряда ракообразные *D. magna* широко применяются в радиобиологических и экотоксикологических исследованиях благодаря высокой чувствительности к изменениям окружающей среды, клональному размножению, высокой плодовитости, короткому жизненному циклу, расширенному геному, простоте культивирования в лабораторных условиях и многому другому. Эти животные имеют органы обоняния в виде усиков, фасеточный глаз, почки, мозг, который располагается рядом с пищеводом, замкнутую систему кровообращения и двуостное сердце на спинной части прозрачного тела, покрытого тонкой хитиновой оболочкой. В лабораторных условиях *D. magna* размножаются партеногенетически,

производя амеиотические яйца. Эмбриональный период длится до 5 суток. Примерно к 10-суточному возрасту у *D. magna* завершается период созревания, и самка начинает вымет молоди. В течение жизненного цикла самка каждые 3-4 суток приносит до 40 новорожденных. Новорожденные животные имеют видимые невооруженным глазом размеры 0,7 – 0,9 мм в длину. Размер взрослых животных достигает 3 – 5 мм.

### Общая характеристика фумарата 3-гидроксипиридина

Фумарат 3-ГП был синтезирован на кафедре химии ИАТЭ НИЯУ МИФИ в соответствии с методикой [8; 14]. Полученная соль фумарата 3-ГП представляла собой растворимое в спирте и воде белое кристаллическое вещество с температурой плавления 287 °С.

Для синтеза вещества 0,03 моль 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и 0,015 моль фумаровой кислоты перемешивали в 70 мл этанола, кипятили 1 ч в колбе с обратным холодильником до полного растворения компонентов. Реакционную смесь охлаждали, выпавшие кристаллы отделяли фильтрованием и сушили при комнатной температуре. Выход продукта составил 89 %.

### Облучение пучками протонов

Для анализа выживаемости проводили острое облучение односуточных *D. magna* в дозе 30 Гр на протонном комплексе «Прометеус» в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия) сканирующим пучком протонов (энергия 150 МэВ), покрывающего зону 65 × 70 мм с равномерностью 99 %. Размер одиночного пучка составлял 7,1 × 6,4 мм. Длительность вывода пучка – 150 мс, пауза между циклами – 1,8 с. Исследование проведено для варианта протонного облучения с пиком Брэгга, находящимся за пределами тест-объекта («прострельное» облучение) [15]. Такой вариант облучения и формирующаяся доза приходятся на здоровые клетки окружения злокачественной опухоли за сеанс протонной терапии. Расчет и контроль дозы облучения проводили сотрудники центра коллективного пользования «Радиологические и клеточные технологии» ФГБУ «НМИЦ радиология» в МРНЦ им. А.Ф. Цыба. Для анализа цитотоксических и антиоксидантных свойств облучение животных проводили в 10-суточном возрасте.

### Схема эксперимента

Для оценки выживаемости односуточных *D. magna* из третьего помета маточной культуры помещали в культуральную воду, распределив на следующие группы: контроль, облучение 30 Гр, фумарат 3-ГП и фумарат 3-ГП+30 Гр. *D. magna* из контрольной группы не подвергали воздействию исследуемых факторов и до 21-суточного возраста культивировали по одиночно в стеклянных лабораторных стаканах в условиях климатостата для анализа выживаемости. Для облучения протонами односуточных животных соответствующих групп переносили в пластиковые контейнеры с 20 мл культуральной воды. Эксперименты проведены в нескольких повторах. Облучение в дозе 30 Гр занимало около 30 мин. После облучения животных рассаживали поодиночно в стеклянные лабораторные стаканы с 50 мл воды и культивировали до 21-суточного возраста в условиях климатостата. В сумме в каждой контрольной и опытной группах было от 20 до 60 особей. Фумарат 3-ГП добавляли в концентрации 50 мг/мл [16]

соответствующие сосуды на одни сутки, а тем животных отмывали от фумарата и культивировали согласно протоколу. В группе сочетанного воздействия животных отмывали от фумарата, переносили в пластиковые контейнеры и облучали пучками протонов в дозе 30 Гр. Затем рассаживали по одиночно и культивировали до 21-суточного возраста в условиях климатостата. Пилотные опыты применения фумарата после облучения не выявили значимых отличий от контроля. Данные не приводятся. Для анализа биохимических показателей исследуемые группы формировали из особей 9-суточного возраста и облучали по вышеописанной схеме. Изменение МТТ-показателя (3-4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий (МТТ), уровня малонового диальдегида (МДА-показатель) и активности ферментов антиоксидантной защиты оценивали на следующие сутки после облучения

#### Анализ токсических и радиопротекторных свойств

Токсические свойства исследуемых факторов оценивали на ежедневной основе по критерию выживаемости *D. magna* в 21-суточном эксперименте. Культивировали животных в климатостате (модель Р2) при температуре  $20 \pm 1$  °С, автоматическом регулировании освещения 12/12 день/ночь и вентилировании. Культуральную среду меняли еженедельно. Погибших и новорожденных животных учитывали и удаляли из экспериментальных сосудов. Кормили через сутки суспензией *Ch. vulgaris* в концентрации 2 мгС/л. В каждой контрольной и опытной группах было от 20 до 60 особей.

#### Анализ цитотоксических и антиоксидантных свойств

Цитотоксические и антиоксидантные свойства исследуемых факторов анализировали по изменению МТТ-показателя (3-4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий (МТТ), уровню малонового диальдегида (МДА-показатель) и активности ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы).

МТТ-показатель интегрально характеризует активность митохондриальных дегидрогеназ, соотношение живых и мертвых клеток подопытного организма и работу системы антиоксидантных ферментов [17]. МТТ-анализ проводили на следующие сутки после облучения по модифицированной авторами методике, анализируя метаболическую активность клеток в гомогенизированных образцах тест-организма [18]. В каждом образце было по 20 особей *D. magna*. Анализ проводили по изменению оптической плотности (ОП) подготовленных образцов на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology, США, VIS-модель) при длине волны 492 нм (фоновая 630 нм). Согласно методике, ОП образцов пропорциональна количеству фиолетово окрашенного формазана, образованного при восстановлении бесцветного 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) дегидрогеназами живых клеток. Всего в контрольных и опытных группах было проанализировано от 19 до 47 образцов.

МДА-показатель оценивали по модифицированной для проведения анализа на *D. magna* методике [19]. В каждый образец отбирали по 20 десятисуточных животных. Образцы для анализа гомогенизировали. Измерение ОП

образцов проводили на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific Instruments Co, Ltd (Китай) при длине волны 530 нм. Всего проанализировано от 9 до 17 образцов в каждой опытной и контрольной группах.

Активность каталазы (CAT) оценивали по изменению ОП образцов, подготовленных из 10-суточных животных по вышеописанной схеме, на спектрофотометре ThermoScientific™ NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers при длине волны 237 нм по модифицированной методике [20]. В каждой группе проанализировано от 12 до 43 образцов с 20 особями в каждом. Объем измеряемой пробы составлял 2 мкл. Полученное значение ОП в усл. ед. пересчитывается в единицы активности фермента CAT по формуле (2):

$$A(\text{cat}) = (E(\text{опыт}) - E(\text{хол})) \times K \times V(\text{гом})/t \times V(\text{общ}), \quad (2)$$

где  $A(\text{cat})$  – активность CAT в  $\text{M}^{-1}/\text{мин} \times \text{г}$  (мл);  $E(\text{хол})$  – ОП холостой пробы (без добавления исследуемого образца);  $E(\text{опыт})$  – ОП опытной пробы;  $V(\text{гом})$  – объем исходного гомогената;  $V(\text{общ})$  – объем внесенной пробы;  $t$  – время инкубации, мин;  $K$  – коэффициент молярной экстинкции перекиси водорода [21].

Активность супероксиддисмутазы (SOD) оценивали по модифицированной методике [22]. Измерение ОП образцов, подготовленных из 10-суточных животных по вышеописанной схеме, проводили на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific Instruments Co, Ltd (Китай) при длине волны 570 нм. В каждом образце было по 20 особей. Всего проанализировано от 19 до 47 образцов из каждой опытной и контрольной группы.

Активность пероксидазы (PX) оценивали по модифицированной методике [20]. Измерение ОП образцов, подготовленных из 10-суточных животных по вышеописанной схеме, проводили на иммуноферментном анализаторе «Stat Fax 280» («Awareness Technology», США, VIS-модель) при длине волны 450 нм (рабочая) и 630 нм (шумовая). В каждом образце было 20 особей. Всего проанализировано от 16 до 36 образцов из каждой опытной и контрольной группы.

#### Статистический анализ

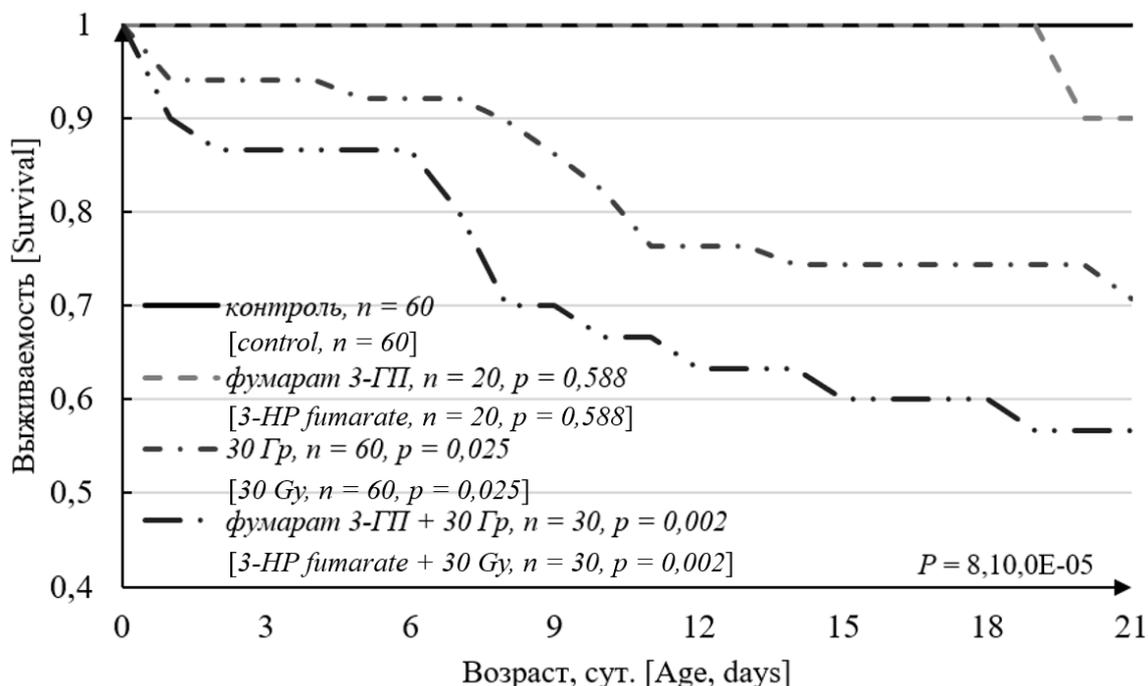
Анализ динамики выживаемости проводили лог-ранк тестом. Для анализа цитотоксичности, антиоксидантных и радиопротекторных свойств фумарата использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса для нескольких групп сравнения и Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение в программе STATISTICA 8.

## Результаты

### Анализ выживаемости *D. magna*

На рисунке представлена динамика выживаемости *D. magna* в 21-суточном эксперименте контроле и после облучения пучками протонов, а также при взаимодействии облучения с фумаратом 3-ГП.

Согласно полученным данным, выживаемость облученных в дозе 30 Гр *D. magna* к 21-суточному возрасту снижалась на 29,3 % ( $p=0,03$ ). Фумарат не изменял выживаемость животных. При совместном с облучением протонами действия фумарата выживаемость *D. magna* к 21-суточному возрасту снижалась на 44,4 % ( $p=8,8 \times 10^{-4}$ ).



**Рис.** Доля выживших *Daphnia magna* в контроле и после облучения пучками протонов в дозе 30 Гр, а также при взаимодействии облучения с фумаратом 3-ГП. На графиках показаны вероятности (*p*) по всей выборке и (*n*) – количество животных в выборке

**[Fig.** The proportion of *Daphnia magna* survivors in the control group and after irradiation with proton beams at a dose of 30 Gy, as well as during the interaction of irradiation with 3-HP fumarate. The graphs show the probabilities (*p*) for the entire sample and (*n*) - number of animals in the sample]

В таблице 1 представлены результаты оценки вклада облучения, фумарата 3-ГП и их взаимодействия в изменение выживаемости *D. magna* к 21-суточному возрасту.

**Вклад облучения, фумарата 3-ГП и их взаимодействия в наблюдаемые эффекты выживаемости *D. magna***

**The contribution of irradiation, 3-HP fumarate and their interactions to the observed effects of *D. magna* survival]**

Фактор [Factor]	<i>P</i> *
30 Гр + Фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP Fumarate]	0,002**
30 Гр [30 Gy]	0,012
Фумарат 3-ГП [3-HP Fumarate]	0,699

\* – по критерию Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение, \*\* – тест Краскела-Уоллиса с поправкой на множественное сравнение [\* – Mann-Whitney test with multiple comparison correction, \*\* - Kruskal-Wallis test with multiple comparison correction]

Из таблицы 1 видно, что сочетанное действие облучения с фумаратом вызывало усиление эффекта с учетом поправки на множественное сравнение (*p*=0,002). Согласно тесту Краскела-Уоллиса, основной вклад в эффект вносило облучение.

*Анализ цитотоксического действия факторов по МТТ- и МДА-показателям*

Анализ вклада действующих факторов в изменение МТТ- и МДА-показателей в клетках *D. magna* выявил цитотоксический эффект облучения протонами (*p*= $2,12 \times 10^{-5}$  и 0,002 соответственно) (табл. 2).

Медианные значения (*M*) приведены в единицах оптической плотности (ОП). Парное сравнение с контролем проведено по критерию Манна-Уитни с поправкой на множественное сравнение. Согласно представленным в таблице 2 данным, облучение вызывало значимое снижение МТТ- и МДА-показателей (*p*= $2,12 \times 10^{-5}$  и 0,002). Фумарат не изменял анализируемые показатели (*p*~1,000 для МТТ- и МДА-показателей) и не проявлял радиопротекторные свойства при совместном с облучением протонами взаимодействии на тест-организм (*p*=0,018 и *p*=0,006 для МТТ- и МДА-показателей соответственно).

Анализ вклада действующих факторов в изменение активности ферментов каталазы (*CAT*), пероксидазы (*Px*) и супероксиддисмутазы (*SOD*) в гомогенизированных образцах *D. magna* показан в таблице 3.

Таблица 2

**Влияние облучения протонами и фумарата 3-ГП в изменение МТТ- и МДА-показателей в клетках *Daphnia magna***

[Table 2

**The effect of proton irradiation and 3-HP fumarate on changes in MTT- and MDA-parameters in *Daphnia magna* cells]**

Фактор [Factor]	Количество образцов <sup>++</sup> [Sample Size <sup>++</sup> ]	Медиана (мр) <sup>*</sup> , усл. ед [Median (IQR) <sup>*</sup> , Conditional units (CU)]	<i>P</i> <sup>**</sup>	<i>P</i> <sup>***</sup>	<i>P</i> <sup>****</sup>
МТТ-показатель [MTT-indicator]					
Контроль, К [Control, C]	29	0,367 (0,362)	–	–	–
Облучение, 30 Гр [Radiation, 30 Gy]	47	0,227 (0,088)	5,30 x10 <sup>-6*</sup>	2,12 x10 <sup>-5*</sup>	3x10 <sup>-5*</sup>
Фумарат 3-ГП, 0,05 мг/мл [3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	25	0,401 (0,046)	0,591	1,000	0,917
30 Гр + фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	19	0,235 (0,027)	4,57 x10 <sup>-4*</sup>	0,018*	0,026*
МДА-показатель [MDA-indicator]					
Контроль, К [Control, C]	17	0,582 (0,089)	–	–	–
Облучение, 30 Гр [Radiation, 30 Gy]	14	1,251 (0,113)	4,78x10 <sup>-5*</sup>	0,002*	0,001*
Фумарат 3-ГП, 0,05 мг/мл [3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	12	0,511 (0,074)	0,658	1,000	0,981
30 Гр + фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	9	1,065 (0,127)	1,62x10 <sup>-4*</sup>	0,006*	0,006*

\* – межквартильный размах; \*\* – тест Манна-Уитни; \*\*\* – поправка на множественное сравнение; \*\*\*\* – тест Краскела-Уоллиса; ++ – в каждом образце по 20 особей; \* – значимые отличия от соответствующего контроля [\* – interquartile range; \*\* – Mann-Whitney test; \*\*\* – multiple comparison correction; \*\*\*\* – Kruskal-Wallis test; ++ – each sample contains 20 individuals; \* – statistically significant differences from the corresponding control].

Таблица 3

**Влияние облучения протонами и действие фумарата 3-ГП на активность ферментов антиоксидантной защиты в клетках *Daphnia magna***

[Table 3

**The effect of proton irradiation and 3-HP fumarate on the activity of antioxidant enzymes in *Daphnia magna* cells]**

Фактор [Factor]	Количество образцов <sup>++</sup> [Sample Size <sup>++</sup> ]	Медиана (мр) <sup>*</sup> , усл. ед. [Median (IQR) <sup>*</sup> , Conditional units (CU)]	<i>P</i> <sup>**</sup>	<i>P</i> <sup>***</sup>	<i>P</i> <sup>****</sup>
Активность каталазы (CAT) [Catalase activity (CAT)]					
Контроль, К [Control, C]	43	0,036 (0,001)	–	–	–
Облучение, 30 Гр [Radiation, 30 Gy]	25	0,047 (0,001)	4,2x10 <sup>-5*</sup>	0,001*	0,021*
Фумарат 3-ГП, 0,05 мг/мл [3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	27	0,032 (0,003)	0,774	1,000	0,976
30 Гр + фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	12	0,049 (0,002)	1,3x10 <sup>-4*</sup>	0,005*	0,024*
Активность пероксидазы (Px) [Peroxidase activity (Px)]					
Контроль, К [Control, C]	45	0,187 (0,006)	–	–	–
Облучение, 30 Гр [Radiation, 30 Gy]	43	0,113 (0,004)	10 <sup>-7*</sup>	2,27x10 <sup>-7*</sup>	0,011*
Фумарат 3-ГП, 0,05 мг/мл [3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	41	0,156 (0,007)	0,332	1,000	0,998
30 Гр + фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	23	0,104 (0,003)	10 <sup>-7*</sup>	1,25x10 <sup>-7*</sup>	0,042*

Фактор [Factor]	Количество образцов <sup>++</sup> [Sample Size <sup>++</sup> ]	Медиана (мр), усл. ед. [Median (IQR), Conditional units (CU)]	<i>P</i> **	<i>P</i> ***	<i>P</i> ****
<i>Активность супероксиддисмутазы (SOD) [Superoxide dismutase activity (SOD)]</i>					
Контроль, К [Control, C]	36	0,187 (0,007)	–	–	–
Облучение, 30 Гр [Radiation, 30 Gy]	36	0,113 (0,04)	10 <sup>-7*</sup>	4,00x10 <sup>-7*</sup>	10 <sup>-5*</sup>
Фумарат 3-ГП, 0,05 мг/мл [3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	31	0,157 (0,007)	0,282	1,000	0,674
30 Гр + фумарат 3-ГП [30 Gy + 3-HP fumarate, 0.05 mg/mL]	19	0,104 (0,005)	10 <sup>-7*</sup>	4,00x10 <sup>-7*</sup>	10 <sup>-5*</sup>

\* – межквартильный размах; \*\* – тест Манна-Уитни; \*\*\* – поправка на множественное сравнение; \*\*\*\* – тест Краскела-Уоллиса; ++ – в каждом образце по 20 особей. \* – значимые отличия от соответствующего контроля [\* – interquartile range; \*\* – Mann-Whitney test; \*\*\* – multiple comparison correction; \*\*\*\* – Kruskal-Wallis test; ++ – each sample contains 20 individuals; \* – statistically significant differences from the corresponding control].

Из таблицы 3 видно, что облучение вызывает значимый цитотоксический эффект ( $p=0,001$ ;  $2,27 \times 10^{-7}$ ,  $4,0 \times 10^{-7}$  для *CAT*, *Px* и *SOD* соответственно). Совместное действие облучения и фумарата 3-ГП, проанализированное тестом Манна-Уитни, оказывало аналогичное воздействие на животных ( $p=0,005$ ;  $1,25 \times 10^{-7}$  и  $4,00 \times 10^{-7}$  соответственно для *CAT*, *Px* и *SOD*). Из таблицы 3 видно, что облучение вносило основной вклад в цитотоксический эффект, оцененный тестом Краскела-Уоллиса с поправкой на множественное сравнение.

### Обсуждение

Данные по негативному действию облучения протонами согласуются с результатами исследований на животных и клеточных линиях. На эмбрионах рыбок *Danio rerio* обнаружено снижение выживаемости, повышение частоты искривления позвоночника как одного из видов аномалий развития и отека перикарда как примера острого воздействия протонного излучения в дозе выше 15 Гр [23]. Облучение пучками протонов в распределенном пике Брегга в дозе 10 Гр вызывало апоптоз в клеточных линиях человека (LLC, HepG2) в опытах *in vitro* [24]. Фумарат 3-ГП в дозе 25 и 50 мг/кг проявлял антиоксидантные свойства на модели острой интоксикации тетрахлорметаном, проявляющееся в снижении летальности подопытных крыс [8].

Наши данные не подтверждают протекторные свойства фумарата 3-ГП, описанные в цитируемом исследовании [25], где показано, что применение фумарата перорально в концентрации 25 мг/кг в 1,4 раза повышало выживаемость подопытных крыс. Радиопротекторный эффект фумарата 3-ГП (0,01 мг/мл) был описан в литературе после облучения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и опухолевых клеток линии HeLa гамма-квантами в дозе 10 Гр (энергия 1,25 МэВ). Однако добавление фумарата 3-ГП перед облучением клеточных линий ионами <sup>12</sup>C в дозах 10 Гр не оказывало радиозащитного действия, а приводило к снижению в 1,3 раза времени удвоения опухолевых (нейробластома SK-N-BE) клеток человека [16]. Авторы объясняли наблюдаемый эффект высокой ОБЭ ионного излучения.

Из литературы известно, что фумарат 3-ГП (в дозе 25 мг/кг) эффективно снижал выраженность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню МДА в сыворотке крови белых крыс с острым тетрахлорметановым гепатитом [26]. Из литературы также известно о повышении ка-

талазной активности клеток, ответственных за сахарный диабет у белых мышей, при пероральном введении фумарата 3-ГП [27]. Мексидол (3-окси-6-метил-2-этилпиридина-сукцинат), является аналогом фумарата 3-ГП, и как многие 3-оксипиридины, обладает ингибирующим действием на процессы ПОЛ, в частности, повышает активность *SOD*, что приводит к восстановлению тканевого дыхания на внутренней мембране митохондрий [28]. Однако, полученные нами данными не выявили изменения активности каталазы и других анализируемых ферментов антиоксидантной защиты в клетках *D. magna* при культивировании животных в растворе фумарата 3-ГП с концентрацией 0,05 мг/мл ( $p \sim 1,000$  для *CAT*, *Px* и *SOD*) после облучения протонами.

В патенте на способ синтеза фумарата 3-ГП описано эффективное применение данного вещества для лечения заболеваний, обусловленных окислительным стрессом [13]. Аналогами фумарат 3-ГП являются производные 3-оксипиридина, такие как мексидол и эмоксипин, широко применяемые в медицине благодаря антиоксидантным, анксиолитическим, противосудорожным, антистрессорным, церебропротекторным, противопаркинсоническим, антиамнестическим и противопоалкогольным свойствам [29].

Используемый нами тест-организм *D. magna* наиболее чувствителен к негативным факторам в ювенильный период [30]. Применение данного тест-организма в качестве модели позволило выявить усиление цитотоксического действия облучения протонами при суточном воздействии на новорожденных животных наночастицами золота в концентрации 10 мкг/мл [31]. Однако проведенное нами исследование не выявило антиоксидантных и радиопротекторных свойств фумарата 3-ГП после *in vivo* облучения протонами односуточных модельных животными *D. magna* в дозе 30 Гр (мощность 150 МэВ).

Согласно сведениям из литературы, фумарат 3-ГП проявил себя как радиопротектор после облучения клеточных линий человека гамма-квантами <sup>60</sup>Co, но не проявил радиозащитных свойств после облучения тяжелыми ионами <sup>12</sup>C [16, 26]. Возможно, феномен связан с особенностями взаимодействия фумарата 3-ГП с разного типа ионизирующим излучением. При исследовании радиозащитных свойств радиопротекторов (например, мелатонина [32]) обнаруживают противоречивые результаты ввиду наличия прооксидантного эффекта, приводящего к радиосенсибилизации клеток. Прямой эффект радиопротекторных свойств мелатонина объяс-

няют за счет удаления свободных радикалов, а косвенный антиоксидантный эффект – результатом изменений в транскрипции генов и активности антиоксидантных ферментов, продуцирующих АФК и оксиды азота. Авторы статьи [32] считают, что одним из факторов, при котором радиопротекторы могут как уменьшать, так и усиливать повреждения клеток, является мощность дозы ионизирующего излучения. Исследование радиопротекторных и антиоксидантных свойств фумарата 3-ГП при взаимодействии с плотно-ионизирующим излучением требует дальнейшего анализа.

### Заключение

В результате проведенного исследования было выявлено, что фумарат 3-гидроксипиридина не обладает выраженными радиопротекторными и антиоксидантными свойствами при облучении модельного тест-организма *Daphnia magna* пучками протонов в дозе 30 Гр.

Научно-практическая значимость работы заключается в уточнении спектра действия фумарата 3-ГП к излучениям с высокой линейной передачей энергии (ЛПЭ) и его потенциального применения в медицине. Учитывая, что соединение проявляет антиоксидантные и кардиопротекторные свойства при различных патологических состояниях после облучения гамма-квантами, дальнейшие исследования могут быть направлены на поиск оптимальных условий его использования в клинической практике, а также на поиск новых классов радиопротекторов для протонной терапии.

В ходе работы удалось подтвердить негативное влияние протонного излучения на модельный организм, что подтверждается снижением выживаемости и изменением ключевых показателей окислительного стресса и метаболической активности. Полученные результаты вносят вклад в понимание биологических эффектов протонного облучения и подчеркивают необходимость поиска эффективных средств защиты живых систем от его последствий.

### Сведения о личном вкладе авторов в работу над статьей

Кузьмичева О.В. – анализ научной литературы, получение экспериментальных данных, получение и статистический анализ данных, обсуждение результатов и оформление окончательного варианта статьи для подачи в редакцию.

Ускалова Д.В. – планирование и организация экспериментальной работы, определение цели и задач исследования, получение и статистический анализ данных, обсуждение результатов и написание статьи.

Дегтярева Д.Т. – получение экспериментальных данных, анализ и обсуждение полученных результатов.

Уланова Т.В. – анализ научной литературы и интерпретация результатов.

Шкавров С.В. – синтез фумарата, анализ литературы и интерпретация результатов.

Сарапульцева Е.И. – разработка концепции научной работы и осуществление общего руководства, анализ и интерпретация полученных данных, обсуждение результатов и написание статьи.

### Благодарности

Облучение осуществлено на оборудовании ЦКП «Радиологические и клеточные технологии» ФГБУ «НМИЦ радиология» Минздрава России.

### Информация о конфликте интересов

Авторы декларируют отсутствие конфликтов интересов.

### Сведения об источнике финансирования

Работа выполнена при финансовой поддержке РФН в рамках научного проекта № 23-24-10041.

### Литература

1. Козина Ю.В., Зуков Р.А., Слепов Е.В., Козина Е.В. Роль радиопротекторов и иммунотропов в профилактике лучевых реакций и осложнений // Эффективная фармакотерапия. 2021. Т. 17, № 2. С. 50–57. DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-2-50-57.
2. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейрорепродуктивные эффекты и механизм действия // Психофармакология и биологическая наркологию. 2001. № 1. С. 2–12. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/antioksidant-meksidol-osnovnye-neyropsihotropnye-effekty-i-mehanizm-deystviya> (Дата обращения: 02.11.2024).
3. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э. Сравнительный гемореактивный анализ мексидола // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117, № 1. С. 75–83. DOI: 10.17116/jnevro20171171275-84.
4. Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Васильева О.В. и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина // Вопросы медицинской химии. 2001. Т. 47, № 3. С. 288–300. URL: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-2001-47-3-288/> (Дата обращения: 02.11.2024).
5. Замотаева М.Н., Чаиркин И.Н., Инчина В.И., Дроздов И.А. Экспериментальное обоснование применения мексидола и 3-оксипиридина фумарата при хроническом повреждении миокарда // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 155, № 2. С. 212–214.
6. Ilica R.A., Kloetzer L., Galaction A.I., Cașcaval D. Fumaric acid: production and separation // Biotechnology letters. 2019. Vol. 41, No 1 P.47–57. DOI:10.1007/s10529-018-2628-y.
7. Volc-Platzer B. Fumaric acid esters for paediatric psoriasis // The British journal of dermatology. 2021. Vol. 185, No 1, P. 5–6. DOI: 10.1111/bjd.20057.
8. Данилина Е.В., Семенов А.В. Синтез и исследование фармакологической активности нового экспериментального препарата-фумарата 3-оксипиридина // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2006. Т. 49, № 2. С. 359–362. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=hukkwf> (Дата обращения: 02.11.2024).
9. Инчина В.И., Коршунова А.Б., Просвиркина И.А. и др. Сравнительная оценка некоторых эффектов производных 3-оксипиридина и пиримидина в эксперименте // Вестник новых медицинских технологий. 2010. Т. 17, № 3. С. 158–160. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitel'naya-otsenka-nekotoryh-effektov-proizvodnyh-z-oksipiridina-i-pirimidina-v-eksperimente> (Дата обращения: 02.11.2024).
10. Коршунова А.Б., Инчина В.И., Костычев Н.А. и др. Нейропротективная активность некоторых производных 3-оксипиридина и пиримидина при глобальной ишемии головного мозга в эксперименте // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. 2011. Т. 2, № 18. С. 41–47. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyroprotektivnaya-aktivnost-nekotoryh-proizvodnyh-3-oksipiridina-i-pirimidina-pri-globalnoy-ishemii-golovnogo-mozga-v-eksperimente> (Дата обращения: 02.11.2024).
11. Семенова Е.В., Инчина В.И., Семенов А.В. Изучение антигипоксической активности новых производных 3-гидроксипиридина // Журнал российской ассоциации по спортивной медицине и реабилитации больных и инвалидов. 2007. Т. 22, № 2. С. 52–55.

12. Трескунова Е.В., Свиридонова С.В. Исследование производного 3-оксипиридина на белковообразовательные, пигментные, липидные и ферментные показатели печени // Международный научно-исследовательский журнал. 2021. Т. 5(107). DOI: 10.23670/IRJ.2021.107.5.056.
13. OECD, 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of 510 Chemicals, Section 2 (OECD Publishing, Paris). URL: [https://www.oecd.org/en/publications/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test\\_9789264185203-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en.html) (Дата обращения: 02.11.2024).
14. Семенов А.В., Инчина В.И., Семенова Е.В. Патент РФ RU 2365582 С1. МПК C07D213/65 (2006.01). Соль 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина с фумаровой кислотой, обладающая метаболической и кардиопротекторной активностью, и способ ее получения. Оpubл. 27.08.2009.
15. Бушманов А.Ю., Шейно И.Н., Липенгольц А.А. и др. Перспективы применения комбинированных технологий в протонной терапии злокачественных новообразований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64, № 3. С. 11–18. DOI: 10.12737/article\_5cf237bf846b67.57514871.
16. Купцова П.С., Комарова Л.Н., Выпова Е.Р. Исследование радиопротекторных свойств фумаровой кислоты и фумарата 3-оксипиридина при действии ионизирующего излучения на клетки человека // Радиационная гигиена. 2023. Т. 16, № 1. С. 32-39. DOI:10.21514/1998-426X-2023-16-1-32-39.
17. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. / Ed. I.A. Cree. Second ed. – Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press, 2011. P. 237–244.
18. Савина Н.Б., Ускалова Д.В., Сарапульцева Е.И. Использование МТТ-теста для изучения отдаленных эффектов острого  $\gamma$ -облучения у ракообразных *Daphniamagna* // Радиация и риск. 2018. Т. 27, № 1. С. 86–93. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-86-93
19. Barata C., Varo I., Navarro J.C. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds // Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology. 2005. Vol. 140, No 2. P. 175–186. DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013/
20. Jemec A., Tišler T., Erjavec B., Pintar A. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2012. No 86. P. 213–218. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.016/
21. Aebi H. Catalase in vitro // Methods in Enzymology. 1984. No 105. P. 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
22. Сирота Т.В. Использование нитросинеготетразолия в реакции автоокисления адреналина для определения активности супероксиддисмутазы // Биомедицинская химия. 2013. Т. 59, № 4. С. 399-410. DOI: 10.18097/PBMC20135904399.
23. Szabó E.R., Brand M., Hans S. et al. Radiobiological effects and proton RBE determined by wildtype zebrafish embryos // PLoS ONE. 2018. Vol. 13, No 11. P. e0206879. DOI: 10.1371/journal.pone.0206879.
24. Lee K.B., Lee J.S., Park J.W. et al. Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Experimental & molecular medicine*. 2008. Vol. 40. P. 118-29. DOI: 10.3858/emm.2008.40.1.118.
25. Уланова Т.В., Инчина В.И., Русейкин Н.С. и др. Исследование влияния новых производных 3-гидроксипиридина и препаратов сравнения на выживаемость и некоторые биохимические показатели крови белых крыс при экспериментальном диабете // Вестник Мордовского университета. 2016. Т. 26. № 2. С. 180-191. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201602.180-191.
26. Уланова Т.В., Котляров А.А., Комарова Л.Н. и др. Изучение противоопухолевой активности фумарата 3-оксипиридина на культурах клеток // Современные проблемы науки и образования. 2022. № 6-10. DOI: 10.17513/spno.32253.
27. Усанова А.А., Семенова Е.В., Инчина В.И. и др. Влияние производных 3-гидроксипиридина на состояние процессов перекисного окисления липидов при экспериментальном остром тетрахлорметановом гепатите // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2009. Т. 19, № 1. С. 114-118.
28. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Хананашвили Я.А. и др. Препараты янтарной и фумаровой кислот как средства профилактики и терапии различных заболеваний // Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016. № 3. С. 16-30. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/preparaty-yantarnoy-i-fumarovoy-kislot-kak-sredstva-profilaktiki-i-terapii-razlichnyh-zabolevaniy> (Дата обращения: 02.11.2024).
29. Новиков В.Е., Ковалева Л.А., Лосенкова С.О., Климкина Е.И. Фармакология антиоксидантов на основе 3-оксипиридина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2004. № 3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/farmakologiya-antioksidantov-na-osnove-3-oksipiridina> (Дата обращения: 02.11.2024).
30. Harris K.D.M., Bartlett N.J., Lloyd V.K. *Daphnia* as an emerging epigenetic model organism // *Genetics research international*. 2012. No 1. P. 147892. DOI: 10.1155/2012/147892.
31. Петросова Д.Т., Ускалова Д.В., Кузьмичева О.В. и др. Усиление наночастицами золота цитотоксического действия облучения протонами в опытах *in vivo* // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69, № 4. С. 13-19. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-13-19.
32. Третьякова М.С., Белоусов М.В., Плотников Е.В. Радиопротекция и радиосенсибилизация: современный взгляд на радиомодуляторы в фармакологии // Современные проблемы науки и образования. 2022. № 6-2. DOI:10.17513/spno.32262.

Поступила: 03.12.2024

**Кузьмичева Ольга Владимировна** – магистрант Обнинского института атомной энергетики – филиала Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, программа «Биоинформатика и анализ данных в биологии и медицине». Адрес для переписки: 249039, Россия, Калужская область, г. Обнинск, ул. Студгородок, д. 1; E-mail: [kuzmichevaov20@oiate.ru](mailto:kuzmichevaov20@oiate.ru)  
ORCID: 0009-0002-3344-0099

**Ускалова Дарья Вадимовна** – кандидат биологических наук, доцент отделения биотехнологий Обнинского института атомной энергетики – филиала Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, Обнинск, Россия  
ORCID: 0000-0001-8687-0872

**Дегтярева Диана Тиграновна** – магистрант Обнинского института атомной энергетики – филиала Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, программа «Биомедицинские исследования в радиобиологии» Обнинск, Россия

ORCID: 0009-0003-4600-1527

**Уланова Татьяна Вадимовна** – кандидат медицинских наук, заведующая кафедрой фармакологии Обнинского института атомной энергетики – филиала Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, Обнинск, Россия

ORCID: 0000-0002-1371-4358

**Шкавров Сергей Владимирович** – кандидат химических наук, доцент отделения биотехнологий Обнинского института атомной энергетики – филиала Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, Обнинск, Россия

ORCID: 0009-0009-0572-9427

**Сарапульцева Елена Игоревна** – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры фундаментальной медицины Национального исследовательского ядерного университета Московского инженерно-физического института, Москва, Россия

ORCID: 0000-0003-4747-5495

Для цитирования: Кузьмичева О.В., Ускалова Д.В., Дегтярева Д.Т., Уланова Т.В., Шкавров С.В., Сарапульцева Е.И. Анализ радиопротекторных свойств фумарата 3-гидроксипиридина на модели беспозвоночного животного после облучения протонами в опытах *in vivo* // Радиационная гигиена. 2025. Т. 18, № 1. С. 27–37. DOI: 10.21514/1998-426X-2025-18-1-27-37

---

## Analysis of the radioprotective properties of 3-hydroxypyridine fumarate on an invertebrate animal model after proton irradiation *in vivo*

Olga V. Kuzmicheva<sup>1</sup>, Daria V. Uskalova<sup>1</sup>, Diana T. Degtyareva<sup>1</sup>, Tatyana V. Ulanova<sup>1</sup>, Sergey V. Shkavrov<sup>1</sup>, Elena I. Sarapultseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Obninsk, Kaluga region, Russia

<sup>2</sup> Moscow Engineering Physics Institute National Research Nuclear University, Moscow, Russia

*The purpose of the article is to analyze the radio protective and antioxidant properties of 3-hydroxypyridine fumarate in interaction with proton irradiation on a model test organism from the suborder Daphnia magna crustaceans in vivo. The salt of 3-hydroxypyridine fumarate synthesized by the authors was a white crystalline substance soluble in alcohol and water – a mixture of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine and fumaric acid in ethanol. Acute irradiation of the test organism was carried out on the Prometheus proton complex at the A. Tsyb Medical Radiological Research Center (Obninsk, Russia) with a scanning proton beam at a dose of 30 Gy (energy 150 MeV) in a distributed Bragg peak. The survival rate of D. magna was assessed in a 21-day experiment on a daily basis. The cytotoxicity of the studied factors was analyzed by changes in MTT and MDA parameters, the antioxidant properties of 3-hydroxypyridine fumarate were evaluated by changes in the activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes. The contribution of the analyzed factors to the observed effects was assessed using the Kruskal-Wallis test. Statistical processing of survival was carried out according to the  $\chi^2$  criterion, and other indicators – according to the Mann-Whitney criterion, adjusted for multiple comparisons. According to the data obtained, the survival rate of irradiated newborn animals decreased by 29.3 % by the age of 21 days ( $p = 0.03$ ). When combined with 3-hydroxypyridine fumarate action, the death of animals decreased to 44.4 % ( $p = 8.8 \times 10^{-4}$ ). It was revealed that radiation contributed to the joint effect. An integral assessment of the level of oxidative stress showed that proton irradiation causes a cytotoxic effect in the cells of the test organism. 3-hydroxypyridine fumarate does not have radioprotective and antioxidant effects when D. magna is cultured in a solution of a substance with a concentration of 0.05 micrograms/ml after proton irradiation. The results obtained are consistent with the data on the absence of radioprotective properties of 3-hydroxypyridine fumarate after irradiation with heavy ions. The authors propose a unified mechanism of interaction between 3-hydroxypyridine fumarate and densely ionizing radiation of various types (protons, heavy ions, alpha particles), which does not exhibit radioprotective effects. It is necessary to continue the search for radioprotectors for proton therapy among substances of a different class.*

**Key words:** proton irradiation, *Daphnia magna*, radioprotector, antioxidant, 3-hydroxypyridine fumarate.

---

**Olga V. Kuzmicheva**

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering

**Address for correspondence:** Studgorodok Str., 1, Obninsk, Kaluga region, 249030, Russia; E-mail: kuzmichevaov20@oiate.ru

### Authors' personal contribution

Kuzmicheva O.V. – analysis of scientific literature, acquisition of experimental data, data collection and statistical analysis, discussion of results, and preparation of the final version of the article for submission.

Uskalova D.V. – planning and organization of experimental work, defining the research objectives and tasks, data acquisition and statistical analysis, discussion of results, and article writing.

Degtyareva D.T. – acquisition of experimental data, analysis, and discussion of the obtained results.

Ulanova T.V. – analysis of scientific literature and interpretation of results.

Shkavrov S.V. – synthesis of fumarate, literature analysis, and interpretation of results.

Sarapultseva E.I. – development of the scientific concept and overall supervision, analysis and interpretation of the obtained data, discussion of results, and article writing.

### Acknowledgments

The irradiation was carried out using the equipment of the Shared Research Facility "Radiological and Cellular Technologies" at the National Medical Research Center of Radiology of the Ministry of Health of Russia.

### Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

### Sources of funding

This work was financially supported by the Russian Science Foundation under the scientific project No. 23-24-10041.

### References

- Kozina YuV, Zukov RA, Slepov EV, Kozina EV. The role of radioprotectors and immunotropes in the prevention of radiation reactions and complications. *Effektivnaya farmakoterapiya = Effective Pharmacotherapy*. 2021;17(2): 50-57. DOI: 10.33978/2307-3586-2021-17-2-50-57. (In Russian).
- Voronina TA. Antioxidant Mexidol: Main neuropsychotropic effects and mechanism of action. *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya = Psychopharmacology and Biological Narcology*. 2001;1: 2–12. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/antioksidant-meksidol-osnovnye-neyropsihotropnye-effekty-i-mehanizm-deystviya> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
- Torshin Yu, Gromova OA, Sardaryan IS, Fedotova LE. Comparative chemoreactomic analysis of Mexidol. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. SS Korsakova = Journal of Neurology and Psychiatry named after SS Korsakov*. 2017;117(1): 75–83. DOI: 10.17116/jnevro20171171275-84. (In Russian).
- Klebanov GI, Lyubitskiy OB, Vasileva OV, Klimov YuV, Penzulaeva OB, Teplyashin AS, et al. Antioxidant properties of 3-hydroxypyridine derivatives: Mexidol, *Emoxipin*, and *Proxipin*. *Voprosy meditsinskoy khimii = Problems of Medical Chemistry*. 2001;47(3): 288–300. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/ru/article-ru/PBMC-2001-47-3-288/> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
- Zamotaeva MN, Chairkin IN, Inchina VI, Drozdov IA. Experimental substantiation for the use of Mexidol and 3-hydroxypyridine fumarate in chronic myocardial injury. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2013;155(2): 212-214. DOI:10.1007/s10517-013-2115-3.
- Ilica RA, Kloetzer L, Galaction AI, Cașcaval D. Fumaric acid: production and separation. *Biotechnology letters*. 2019;41(1): 47–57. DOI:10.1007/s10529-018-2628-y.
- Volc-Platzer B. Fumaric acid esters for paediatric psoriasis. *The British journal of dermatology*. 2021;185(1): 5–6. DOI: 10.1111/bjd.20057.
- Danilina EV, Semenov AV. Synthesis and pharmacological activity study of a new experimental drug – 3-hydroxypyridine fumarate. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of the Russian State Medical University*. 2006;49(2): 359–362. Available from: <https://www.elibrary.ru/item.asp?edn=hukkwf> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
- Inchina VI, Korshunova AB, Prosvirkina IA, Semenov AV, Ulanova TV, Chairkin IN. Comparative evaluation of some effects of 3-hydroxypyridine and pyrimidine derivatives in an experiment. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Bulletin of New Medical Technologies*. 2010;17(3): 158–160. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/sravnitel'naya-otsenka-nekotoryh-effektov-proizvodnyh-z-okspiridina-i-pirimidina-v-eksperimente> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
- Korshunova AB, Inchina VI, Kostychev NA, Prosvirkina IA, Chairkin IN. Neuroprotective activity of some 3-hydroxypyridine and pyrimidine derivatives in global cerebral ischemia in an experiment. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region = Izvestia of Higher Educational Institutions. Volga Region*. 2011;2(18): 41–47. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/neyroprotektivnaya-aktivnost-nekotoryh-proizvodnyh-3-okspiridina-i-pirimidina-pri-globalnoy-ishemii-golovnogo-mozga-v-eksperimente> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
- Semenova EV, Inchina VI, Semenov AV. Study of antihypoxic activity of new 3-hydroxypyridine derivatives. *Zhurnal rossiyskoy assotsiatsii po sportivnoy meditsine i reabilitatsii bol'nykh i invalidov = Journal of the Russian Association for Sports Medicine and Rehabilitation of Patients and Disabled Persons*. 2007;22(2): 52-55. (In Russian).
- Treskunova EV, Sviridonova SV. Study of a 3-oxypyridine derivative on protein formation, pigment, lipid, and enzyme indicators of the liver. *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal = International Research Journal*. 2021;5(107). DOI: 10.23670/IRJ.2021.107.5.056. (In Russian).
- OECD, 2012. Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 (OECD Publishing, Paris). Available from: [https://www.oecd.org/en/publications/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test\\_9789264185203-en.html](https://www.oecd.org/en/publications/test-no-211-daphnia-magna-reproduction-test_9789264185203-en.html) [Accessed November 02, 2024].
- Semenov AV, Inchina VI, Semenova EV. Patent RU 2365582 C1. IPC C07D213/65 (2006.01). Salt of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine with fumaric acid possessing metabolic and cardioprotective activity and a method for its production. Published on august 27th, 2009. (In Russian).
- Bushmanov AYu, Sheyno IN, Lipengolts AA, Soloviev AN, Koryakin SN. Prospects for the application of combined technologies in proton therapy of malignant neoplasms. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2019;64(3): 11–18. DOI: 10.12737/article\_5cf237bf846b67.57514871. (In Russian).
- Kuptsova PS, Komarova LN, Vypova ER. Study of radioprotective properties of fumaric acid and fumarate 3-oxypyridine under ionizing radiation on human cells. *Radiatsionnaya Gygiena = Radiation Hygiene*. 2023;16(1): 32-39. DOI:10.21514/1998-426X-2023-16-1-32-39. (In Russian).
- Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. Ed. IA Cree. Second ed. Springer New York Dordrecht Heidelberg London: Human Press; 2011: 237–244.
- Savina NB, Uskalova DV, Sarapultseva EI. Application of the MTT test to study the long-term effects of acute  $\gamma$ -irradiation in crustaceans *Daphnia magna*. *Radiatsiya i risk = Radiation and Risk*. 2018;27(1): 86–93. DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-86-93. (In Russian).

19. Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology & Pharmacology*. 2005;140(2): 175–186. DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013.
20. Jemec A, Tišler T, Erjavec B, Pintar A. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;86: 213–218. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.09.016.
21. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984;105: 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
22. Sirota TV. Use of nitro blue tetrazolium in the autoxidation reaction of adrenaline to determine superoxide dismutase activity. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2013;59(4): 399–410. DOI: 10.18097/PBMC20135904399. (In Russian).
23. Szabó ER, Brand M, Hans S, Hideghéty K, Karsch L, Lessmann E, et al. Radiobiological effects and proton RBE determined by wildtype zebrafish embryos. *PLoS ONE*. 2018;13(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0206879.
24. Lee KB, Lee JS, Park JW, Huh TL, Lee YM. Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Experimental & molecular medicine*. 2008;40: 118–29. DOI: 10.3858/emm.2008.40.1.118.
25. Ulanova TV, Inchina VI, Ruseykin NS, Khudoykina SV, Romanova EV. Study of antitumor activity of fumarate 3-oxyppyridine in cell cultures. *Vestnik Mordovskogo universiteta = Modern Problems of Science and Education*. 2016.26(2): 180–191. DOI: 10.15507/0236-2910.026.201602.180-191. (In Russian).
26. Ulanova TV, Kotlyarov AA, Kakora SA, Shokina SV, Vypova ER, Komarova LN. Study of antitumor activity of fumarate 3-oxyppyridine in cell cultures. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2022;6-10. DOI: 10.17513/spno.32253. (In Russian).
27. Usanova AA, Semenova EV, Inchina VI. Influence of 3-hydroxypyridine derivatives on lipid peroxidation processes in experimental acute carbon tetrachloride hepatitis. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2009;19(1): 114–118. (In Russian).
28. Shakhmardanova SA, Gulevskaya ON, Khananashvili YaA, Zelenskaya AV, Nefedov DA, Galenko-Yaroshevskiy PA. Succinic and fumaric acid preparations as means of prevention and therapy of various diseases. *Zhurnal fundamental'noy meditsiny i biologii = Journal of Fundamental Medicine and Biology*. 2016;3: 16–30. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/preparaty-yantarnoy-i-fumarovoy-kislot-kak-sredstva-profilaktiki-i-terapii-razlichnyh-zabolevaniy> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
29. Novikov VE, Kovaleva LA, Losenkova SO, Klimkina EI. Pharmacology of antioxidants based on 3-oxyppyridine. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj meditsinskoy akademii = Bulletin of the Smolensk State Medical Academy*. 2004;3. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/farmakologiya-antioksidantov-na-osnove-3-oksipiridina> [Accessed November 02, 2024]. (In Russian).
30. Harris KDM, Bartlett NJ, Lloyd VK. *Daphnia* as emerging epigenetic model organism. *Genetics research international*. 2012;1: 147892. DOI: 10.1155/2012/147892.
31. Petrosova DT, Uskalova DV, Kuzmicheva OV, Saburov VO, Sarapultseva EI. Enhancement of gold nanoparticles' cytotoxic effect under proton irradiation in *in vivo* experiments. *Meditsinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost = Medical Radiology and Radiation Safety*. 2024;69(4): 13–19. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-13-19. (In Russian).
32. Tretyakova MS, Belousov MV, Plotnikov EV. Radioprotection and radiosensitization: a modern view on radiomodulators in pharmacology. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*. 2022;6-2. DOI:10.17513/spno.32262. (In Russian).

Received: December 03, 2024

**For correspondence: Olga V. Kuzmicheva** – Master's Student at Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of the National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Program «Bioinformatics and Data Analysis in Biology and Medicine» (Studgorodok Str., 1, Obninsk, Kaluga region, 249030, Russia; E-mail: kuzmichevaov20@iate.ru) ORCID: 0009-0002-3344-0099

**Darya V. Uskalova** – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Department of Biotechnology, Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of the National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Obninsk, Russia ORCID: 0000-0001-8687-0872

**Diana T. Degtyareva** – Master's Student at Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of the National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Program «Biomedical Research in Radiobiology», Obninsk, Russia ORCID: 0009-0003-4600-1527

**Tatyana V. Ulanova** – Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Pharmacology, Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of the National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Obninsk, Russia ORCID: 0000-0002-1371-4358

**Sergey V. Shkavrov** – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor at the Department of Biotechnology, Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Branch of the National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Obninsk, Russia ORCID: 0009-0009-0572-9427

**Elena I. Sarapultseva** – Doctor of Biological Sciences, Professor at the Department of Fundamental Medicine, National Research Nuclear University Moscow Engineering Physics Institute, Moscow, Russia ORCID: 0000-0003-4747-5495

**For citation: Kuzmicheva O.V., Uskalova D.V., Degtyareva D.T., Ulanova T.V., Shkavrov S.V., Sarapultseva E.I. Analysis of the radioprotective properties of 3-hydroxypyridine fumarate on an invertebrate animal model after proton irradiation in vivo. Radiatsionnaya Gygiena = Radiation Hygiene. 2025. Vol. 18, No. 1. P. 27–37. (In Russian). DOI: 10.21514/1998-426X-2025-18-1-27-37**