DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-86-93

УДК 612.014.482.4:595.3:576.311.317

Использование МТТ-теста для изучения отдалённых эффектов острого γ -облучения у ракообразных *Daphnia magna*

Савина Н.Б.¹, Ускалова Д.В.¹, Сарапульцева Е.И.^{1,2}

¹ ИАТЭ НИЯУ МИФИ, Обнинск;

² МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Обнинск

Для изучения токсического действия γ -излучения в качестве модели использованы беспозвоночные животные *Daphnia magna* (*D. magna*) – один из повсеместно распространённых видов низших ветвистоусых ракообразных, широко применяемых в экотоксикологических исследованиях. Исходную выборку *D. magna* (F_0) однократно облучали γ -квантами ^{60}Co в дозах 10 (мощность дозы 28 мГр/мин), 100 и 1000 мГр (мощность дозы 960 мГр/мин). На четвёртые сутки проводили МТТ-тест, который отражает жизнеспособность клеток и их метаболическую активность. В работе установлено, что облучение *D. magna* в дозах 100 и 1000 мГр вызывает снижение МТТ-показателя, т.е. оказывает токсический эффект. Из третьего помёта облучённых *D. magna* формировали потомство первого поколения (F_1), которое не облучали. Обнаружено, что токсический эффект сохраняется и у необлучённого потомства. В работе установлена корреляционная зависимость между показателем МТТ-теста и выживаемостью *D. magna* в двух поколениях. Сделано заключение, что МТТ-тест может быть использован как скрининговый метод для анализа отдалённых радиационно-индуцированных эффектов низкодозового облучения *in vivo*.

Ключевые слова: МТТ-тест, *Daphnia magna*, γ -облучение, острое облучение, радиационно-индуцированный биологический эффект, отдалённые радиобиологические эффекты, цитотоксичность, малые дозы, жизнеспособность, экотоксикология.

Введение

Токсическое действие γ -излучения изучали на *Daphnia magna*, распространённом в природе виде низших ветвистоусых ракообразных [1]. Ранее радиационный эффект у этих организмов оценивали преимущественно по выживаемости и плодовитости [2, 3]. Для оценки эффекта мы использовали модифицированный МТТ-тест [4], который применяется для *in vitro* анализа чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам [5]. Также нами было показано, что МТТ-анализ можно применять *in vivo* при изучении влияния низких доз облучения на *Daphnia magna* [4].

В 1953 г. впервые было обнаружено, что соли тетразолия (МТТ) в присутствии метаболически активных клеток восстанавливаются до формазана, нерастворимого в воде окрашенного в фиолетовый цвет соединения. Это свойство легло в основу создания спектрофотометрического МТТ-теста, с помощью которого можно оценить *in vitro* количество жизнеспособных клеток по изменению оптической плотности окрашенных образцов.

Хорошо известно, что метаболизм, как и все регуляторные процессы в организме, связан с окислительным фосфорилированием, происходящим в митохондриях. Нарушение митохондриальной активности приводит к патологиям развития эмбрионов лабораторной линии африканской шпорцевой лягушки [6], ускоренному старению и сокращению продолжительности жизни *Drosophila melanogaster* [7] и облучённых мышей [8]. Одним из объяснений наблюдаемого у *D. magna* эффекта при использовании МТТ-теста может быть нарушение функционирования

Савина Н.Б. – магистрант; Ускалова Д.В. – аспирант; Сарапульцева Е.И.* – д.б.н., проф. ИАТЭ НИЯУ МИФИ, в.н.с. МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

*Контакты: 249036, Калужская обл., Обнинск, ул. Королёва, 4. Тел. +7(910) 912-20-94; e-mail: helen-bio@yandex.ru.

митохондрий, связанное с целостностью митохондриальной ДНК (мтДНК). В обзоре [9] собраны экспериментальные доказательства того, что мтДНК в большей степени, чем ядерная ДНК (ядДНК), подвержена действию различных эндо- и экзогенных факторов, в том числе ионизирующего излучения. Если следующему поколению передаются мутантные копии мтДНК, то активная экспрессия их генов приводит к синтезу aberrантных белков, которые могут нарушить работу цепи переноса электронов, что вызовет повышенное образование активных форм кислорода (АФК), усиление оксидативного стресса и дисфункцию митохондрий. Обнаруженная нами ранее [10] активация синтеза АФК у облучённых *D. magna* и их потомства первого поколения подтверждает наше предположение, что токсическое действие облучения приводит к нарушению метаболизма у рачков и сохранению эффекта в первом, необлучённом потомстве *D. magna*. В митохондриях возникает широкий спектр изменений, включающий в себя повреждение мтДНК, липидов и белков, снижение дыхательной функции. Развитие этих процессов приводит к нарушению энергетического гомеостаза клеток и тканей. Однако из литературы известно, что восстановление МТТ может катализировать также другие, не митохондриальные, ферменты [11]. Поэтому эффект, обнаруженный нами с применением МТТ-теста, может быть объяснён цитотоксическим действием γ -излучения, вызывающего снижение общей метаболической активности облучённых *D. magna* и их потомства первого поколения.

Повышенный синтез АФК в митохондриях может служить также сигналом для запуска аутофагии с избирательной элиминацией органелл с нарушенными функциями или погибших клеток [9]. Однако, в соответствии с методикой, МТТ-тест оценивает значения оптической плотности (OD) в относительных единицах. Согласно приведённой в разделе «Материалы и методы» формуле, полученные данные OD «нормируются» на единицу массы образца, а не на суммарную массу клеток в образце. Также известно, что значения OD, полученные МТТ-тестом, коррелируют с выживаемостью клеток [12]. В связи с этим целесообразно провести исследование, результаты которого помогут определить, отразится ли нарушение соотношения живых и мёртвых клеток на выживаемости особи в целом, и может ли показатель жизнеспособности, полученный МТТ-тестом в опыте *in vivo*, быть биомаркером отдалённой радиационно-индуцированной гибели *D. magna*.

Цель работы – показать новые возможности МТТ-теста для анализа отдалённых радиационно-индуцированных эффектов у потомства *D. magna* после острого γ -облучения родительского поколения F_0 .

Материалы и методы

Культивирование *D. magna* и схема облучения

Культура *Daphnia magna* Straus была получена на кафедре гидробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова и в течение нескольких лет культивируется в нашей лаборатории в соответствии с международным протоколом [13]. В качестве среды для культуры применяется водопроводная отстоянная дважды фильтрованная вода: pH 7,5-8,2, $O_2 \sim 10,0$ мг/л; жёсткость $\sim 6,8$ мг/л, соотношение Ca:Mg 4:1, Fe < 0,3 мг/л, Mn – 0,1 мг/л, хлоридов – до 12 мг/мл, фосфатов – < 0,05 мг/мл, сульфатов около 44 – 50 мг/мл, взвешенных веществ – < 3 мг/мл.

Для синхронизации культуры пробы по 5 половозрелых самок культивировали в 100 мл воды при освещённости 700 люкс в режиме «свет/тьма» 12 ч/12 ч при 20 °C (Климатостат, мо-

дель Р2, Россия). *D. magna* кормили ежедневно суспензией зелёных водорослей (*Chlorella vulgaris*) в концентрации ~ 1,9 мг С/л (плотность – $4 \cdot 10^5$ кл./мл). Новорождённых рачков из третьего и последующих помётов поколения F_0 облучали на установке «Луч-1» (Латвия, ^{60}Co) в дозах 10, 100 и 1000 мГр. Контрольные группы формировали из необлучённых рачков того же возраста. МТТ-анализ в поколении F_0 проводили на четвёртые сутки после облучения.

Для получения первого поколения потомства (F_1) дафний из поколения F_0 пробы по 5 особей помещали в 100 мл воды и культивировали в климатостате в оптимальных условиях.

МТТ-тест

Для проведения МТТ-теста из каждой дозовой и контрольной групп каждого поколения 50 дафний переносили в микропробирки типа «Эппендорф». После удаления воды к суспензии добавляли 100 мкл водного раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали образцы 1 ч в темноте при комнатной температуре. По окончании инкубации раствор МТТ замещали на 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения осадка формазана. Через 10 мин содержимое микропробирок гомогенизировали. По такой же схеме, только без добавления МТТ, из необлучённых *D. magna* в каждой серии опытов готовили пять фоновых проб. Далее 100 мкл суспензии каждого образца переносили в лунки 96-луночного планшета. Согласно рекомендациям [14], фоновые пробы помещали в лунки ряда В, начиная с В2. Крайние ряды (А1...А12 и В1, С1, Е1...) не заполняли во избежание искажения результатов. Контрольные и опытные пробы размещали в лунках рядов С, D, Е и т.д. Измерение оптической плотности образцов проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе «StatFax» 2100 («Awareness Technology», США, VIS-модель) при длине волны 492 (рабочая) и 630 нм (шумовая).

Проведено несколько серий независимых экспериментов. Результаты проанализированы по изменению оптической плотности (OD) в 42-67 образцах из каждого поколения в контрольных и облучённых группах. Средние значения OD вычисляли по формуле:

$$OD_{o/k} - OD_{\phi},$$

где $OD_{o/k}$ – абсолютные значения OD каждой пробы в опыте (о) / или контроле (к), OD_{ϕ} – средние значения OD фоновых проб.

Анализ результатов и статистическая обработка данных

Статистическая обработка выполнена с помощью пакета программ STATISTICA 8. Проведён двухфакторный дисперсионный анализ для оценки вклада эффекта облучения. Значимость отличия групп, облучённых в разных дозах, с соответствующим контролем оценивали с использованием теста Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

Результаты и обсуждение

Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа, γ -облучение оказывает сильный токсический эффект как на исходную выборку, так и на потомство *D. magna* из необлучённого поколения F_1 ($F(3,38)=37,51$; $P=1,59 \cdot 10^{-11}$). При этом между эффектами в облучённом поколении и эффектами у потомства значимые различия не выявляются ($F(1,38)=0,38$; $P=0,54$).

В табл. 1 приведены данные по изменению оптической плотности в образцах *D. magna*.

Таблица 1

Изменение оптической плотности в образцах *D. magna* в поколениях F₀ и F₁ после острого γ -облучения исходной выборки (F₀)

Доза, мГр	0	10	100	1000
Поколение F ₀ : тест Крускала-Уоллиса (df=3)*=66,90; P=1,98×10 ⁻¹⁴				
N	52	43	53	42
M±SEM	0,23±0,01	0,21±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01
P†		1	5,09×10 ⁻¹¹	1,45×10 ⁻¹²
Поколение F ₁ : тест Крускала-Уоллиса (df=3)*=31,16; P=7,88×10 ⁻⁷				
N	42	67	43	49
M±SEM	0,19±0,01	0,19±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01
P†		0,11	4,29×10 ⁻⁷	1,55×10 ⁻⁵

Примечание: M – среднее значение оптической плотности; SEM – стандартная ошибка; N – количество проанализированных образцов; * – вероятность гомогенности всех групп, оценённая тестом Крускала-Уоллиса; † – вероятность теста Крускала-Уоллиса для сравнения с контрольной группой с поправкой Бонферрони на множественное сравнение.

Из таблицы видно, что в поколении F₀ наблюдается значимое влияние облучения, начиная с дозы 100 мГр, которая в 500 раз ниже полулетальной для *D. magna* (53 Гр [15]). В выборках, облучённых в дозе 10 мГр, негативный эффект не обнаружен. Результаты согласуются с ранее полученными данными для родительского поколения, облучённого в дозах 10-1000 мГр [4]. Согласно табл. 1 наблюдается достоверное снижение оптической плотности в образцах первого поколения потомства *D. magna* (F₁).

Для ответа на вопрос: отразится ли нарушение соотношения живых и мёртвых клеток на выживаемости особи в целом, и может ли показатель жизнеспособности, полученный МТТ-тестом в опыте *in vivo*, быть биомаркером отдалённой радиационно-индуцированной гибели *D. magna*, было проведено сопоставление оценённых МТТ-тестом показателей цитотоксичности с радиационно-индуцированным нарушением выживаемости рачков в поколениях F₀ и F₁. В наших предыдущих исследованиях [16-18] была обнаружена высокая чувствительность молоди *D. magna* к облучению в малых и средних дозах. На рис. 1 приведены значения OD облучённых и контрольных образцов дафний, полученных МТТ-тестом, и показатели выживаемости *D. magna*, полученные при остром γ -облучении родительской выборки в дозах 10-1000 мГр в работе [16].

Рис. 1. Оптическая плотность (А) в образцах (МТТ-тест) и выживаемость (Б) *D. magna* к 21-м суткам (N=40) [16] в двух поколениях с увеличением дозы облучения исходной выборки, в процентном отношении к соответствующему контролю. Приведены средние значения со стандартными ошибками (* P<0,05).

Взятые для корреляционного анализа средние значения выживаемости (в % относительно исходной выборки, $N=40$) составили: для поколения F_0 – 95,0; 90,0; 82,5 и 75,0 (для контроля и доз 10, 100 и 1000 мГр соответственно); для поколения F_1 – 77,5; 52,5 и 57,5 (для контроля и доз 100 и 1000 мГр) [16]. Проведённый анализ выявил высокую корреляцию показателей как для поколения F_0 ($r=0,83$, $P=0,17$), так и для поколения F_1 ($r=0,99$, $P=0,08$). Результаты представлены на рис. 2.

Рис. 2. Зависимость изменения выживаемости в двух поколениях *D. magna* от изменения оптической плотности в образцах дафний после острого γ -облучения исходной выборки в дозах 10-1000 мГр.

Недостаточная статистическая значимость результатов связана с малой выборкой анализируемых в исследовании доз облучения. Возможно, увеличение количества выборок позволит в дальнейшем решить эту задачу.

Заключение

Таким образом, при оценке радиационных эффектов у *D. magna* с применением МТТ-теста обнаружено, что облучение материнской выборки дозами 100 и 1000 мГр вызывает у дафний и их необлучённого потомства первого поколения радиационно-индуцированный токсический эффект. При воздействии на рачков в дозе 10 мГр величина токсического эффекта относительно невелика и статистической значимости не имеет. На основании полученных данных можно заключить, что МТТ-тест, широко применяющийся в биомедицинских исследованиях для выбора цитотоксической терапии, может быть применён как скрининговый метод для анализа отдалённых эффектов облучения *D. magna* в радиобиологических исследованиях.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-07-01403.

Литература

1. Barata C., Campos B., Rivetti C., LeBlanc G.A., Eytcheson S., Street S., Tobor-Kaplon M., de Vries Buitenweg S., Choi S.-H., Choi J., Sarapultseva E.I., Coutellec M.-A., Coke M., Pandard P., Chaumo A., Quéau H., Delorme N., Geffard O., Martínez-Jerónimo F., Watanabe H., Tatarazako N., Lopes I., Pestana J., Soares A.M.V.M., De Schamphelaere K., Pereira C.M. Validation of a two-generational reproduction test in *Daphnia magna*: an interlaboratory exercise //Sci. Total Environ. 2017. V. 579. P. 1073-1083.
2. Dallas L.J., Keith-Roach M., Lyons B.P., Jha A.N. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: a critical review //Radiat. Res. 2012. V. 177. P. 693-716.
3. Fuller N., Lerebours A., Smith J.T., Ford A.T. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: a review //Aquat. Toxicol. 2015. V. 167. P. 55-67.
4. Сарапульцева Е.И., Рябченко Н.И., Иголкина Ю.В., Иванник Б.П. Использование клеточного биохимического метода для биотестирования *in vivo* радиационного загрязнения окружающей среды //Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53. № 6. С. 634-638.
5. Hayon T., Dvilansky A., Shpilberg O., Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia //Leukemia and Lymphoma. 2003. V. 44, N 11. P. 1957-1962.
6. Мелехова О.П. Свободнорадикальные процессы в эпигеномной регуляции развития. М.: Наука, 2010. 324 с.
7. Moskalev A.A., Aliper A.M., Smit-McBride Z., Buzdin A., Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity //Cell Cycle. 2014. V. 13, N 7. P. 1063-1077.
8. Loed L.A., Wallace D.C., Martin G.M. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102, N 52. P. 18769-18770.
9. Газиев А.И. Пути сохранения целостности митохондриальной ДНК и функций митохондрий в клетках, подвергшихся воздействию ионизирующей радиации //Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53, № 2. С. 117-136.
10. Сарапульцева Е.И., Мелехова О.П., Коссова Г.В., Иголкина Ю.В., Алексеева Н.В. Свободнорадикальные реакции *in vivo* при облучении дафний в малых дозах //Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 3. С. 305-308.
11. Bernas T., Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes //Cytometry. 2002. V. 47. P. 236-242.
12. Buch K., Peters T., Nawroth Th., Sängner M., Schmidberger H., Langguth P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay – a comparative study //Radiat. Oncol. 2012. V. 7, N 1. doi: 10.1186/1748-717X-7-1.
13. Guideline for the Testing of Chemicals. No 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and development. Paris, 2012. 202 p.
14. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols /Ed.: I.A. Cree. Second ed. Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Human Press, 2011. P. 237-244.
15. Тряпицына Г.А. Реакция биоценозов водных экосистем на хроническое радиационное воздействие: автореф. дис. ... докт. биол. наук. М.: МГУ, 2011. 46 с.
16. Сарапульцева Е.И., Горский А.И., Малина Ю.Ю. Радиационные риски смертности и сокращение продолжительности жизни γ -облучённых в малых дозах дафний //Радиация и риск. 2011. Т. 20, № 1. С. 34-40.
17. Сарапульцева Е.И., Бычкова И.Б., Федорцева Р.Ф. Наследование дозозависимых эффектов относительно малых доз радиации. Модельные опыты на *Daphnia magna* //Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2009. Т. 54, № 6. С. 11-15.
18. Sarapultseva E.I., Dubrova Y.E. The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in *Daphnia magna* //Environ. Res. 2016. V. 150. P. 138-143.

Application of MTT-assay to estimate long-term effects of acute γ -radiation on *Daphnia magna*

Savina N.B.¹, Uskalova D.V.¹, Sarapultseva E.I.^{1,2}

¹ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering of the NRNU "MEPhI", Obninsk;

² A. Tsyb MRRC, Obninsk

We investigated applicability of MTT-assay for study of cytotoxic effects of low-level γ -radiation on multicellular crustacean *D. magna*. The species represent a very useful model for quick analysis of long-term cytotoxic effect of different agents including antitumor pharmaceuticals. The life span of *D. magna* is relatively short and seldom exceeds 10-11 weeks; they are also characterized by quite short duration of embryonic and postembryonic development, 3-4 days, and gestation of 5-8 days. At present, fast-growing application of radiopharmaceuticals (RFP) for diagnosis and treatment requires research into cytotoxicity and radiotoxicity of RFPs and products of their biotransformation in a body. Currently for preclinical study of radiopharmaceuticals mice and rats are used in biopharmacology. However, simple and express tests providing new insights into the mechanisms underlying the efficiency and toxicity of RFP are required. Over recent years we have studied long-term effects of low-dose radiation using *D. magna* as model for analysis of long-term effects of low-level γ -radiation and MTT-assay for assessment of the effects on metabolic activity in the species. In the article we present results of research on effects of low-level γ -radiation (10, 100 and 1000 mGy) on *D. magna* Straus and its non-irradiated offspring of the first generation. To assess cells metabolism in irradiated *D. magna* MTT-assay was used. The assay is based on the property of NAD(P)H-dependent oxidoreductase enzymes, contained in metabolically active cells, to reduce yellow tetrazolium salt (MTT) to the insoluble deep purple formazan. After dissolution of formazan crystals absorbance of the solution was measured. In our study we found that MTT-assay can be used for assessment of radiotoxic effects from exposure of *D. magna* to low-level γ -radiation; the toxic effect was passed to non-exposed offspring of the first generation; the toxic effect is low after exposure to 10 mGy. Our data also demonstrate that *D. magna* is a sensitive model that can be used for express analysis of long-term effects of low-level radiation.

Key words: MTT-assay, *Daphnia magna*, gamma-radiation, acute radiation, radiation-induced biological effect, long-term radiobiological effects, cytotoxicity, low doses, viability, ecotoxicology.

References

1. Barata C., Campos B., Rivetti C., LeBlanc G.A., Eytcheson S., Street S., Tobor-Kaplon M., de Vries Buitenweg S., Choi S.-H., Choi J., Sarapultseva E.I., Coutellec M.-A., Coke M., Pandard P., Chaumo A., Quéau H., Delorme N., Geffard O., Martínez-Jerónimo F., Watanabe H., Tatarazako N., Lopes I., Pestana J., Soares A.M.V.M., De Schampheleere K., Pereira C.M. Validation of a two-generational reproduction test in *Daphnia magna*: an interlaboratory exercise. *Sci. Total Environ.*, 2017, vol. 579, pp.1073-1083.
2. Dallas L.J., Keith-Roach M., Lyons B.P., Jha A.N. Assessing the impact of ionising radiation on aquatic invertebrates: a critical review. *Radiat. Res.*, 2012, vol. 177, pp. 693-716.
3. Fuller N., Lerebours A., Smith J.T., Ford A.T. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: a review. *Aquat. Toxicol.*, 2015, vol. 167, pp. 55-67.
4. Sarapultseva E.I., Riabchenko N.I., Igolkina Iu.V., Ivannik B.P. Methyltetrazolium bromide (MTT) was applied for bioassay of environmental radioactivity *in vivo*. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2013, vol. 53, no. 6, pp. 634-638. (In Russian).
5. Hayon T., Dvilansky A., Shpilberg O., Nathan I. Appraisal of the MTT-based assay as a useful tool for predicting drug chemosensitivity in leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 2003, vol. 44, no. 11, pp. 1957-1962.

Savina N.B. – Master's Degree Student; Uskalova D.V. – Post-Graduate Student; Sarapultseva E.I.* – D. Sc., Biol., Prof. OINPE NRNU MEPhI, Lead. Researcher. A. Tsyb MRRC.

*Contacts: 4 Korolyov str., Obninsk, Kaluga region, Russia, 249036. Tel. +7(910) 912-20-94; e-mail: helen-bio@yandex.ru.

6. **Melekhova O.P.** Svobodnoradical'nye prosessy v razvitii genomnoy epiregulyacii [Free radical processes in the development of genomic epiregulation]. Moscow, Nauka Publ., 2010. 324 p.
7. **Moskalev A.A., Aliper A.M., Smit-McBride Z., Buzdin A., Zhavoronkov A.** Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle*, 2014, vol. 13, no. 7, pp. 1063-1077.
8. **Loed L.A., Wallace D.C., Martin G.M.** The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, vol. 102, no. 52, pp. 18769-18770.
9. **Gaziev A.I.** Pathways for maintenance of mitochondrial DNA integrity and mitochondrial functions in cells exposed to ionising radiation. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2013, vol. 53, no. 2, pp. 117-136. (In Russian).
10. **Sarapultseva E.I., Melekhova O.P., Kossova G.V., Igolkina J.V., Alexeeva N.V.** Free radical reactions in *Daphnia* after low doses of γ -irradiation *in vivo*. *Radiatsionnaya biologiya. Radioekologiya – Radiation Biology. Radioecology*, 2014, vol. 54, no. 3, pp. 305-308. (In Russian).
11. **Bernas T., Dobrucki J.** Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 2002, vol. 47, pp. 236-242.
12. **Buch K., Peters T., Nawroth Th., Sanger M., Schmidberger H., Langguth P.** Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT assay – a comparative study. *Radiat. Oncol.*, 2012, vol.7, no. 1. doi: 10.1186/1748-717X-7-1.
13. Guideline for the Testing of Chemicals No 211. *Daphnia magna* Reproduction Test. Organization for Economic Cooperation and Development. Paris, 2012. 202 p.
14. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. Ed.: I.A. Cree. Second ed. Springer. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Human Press, 2011, pp. 237-244.
15. **Tryapitsina G.A.** Reaktsiya biotsenozov vodnykh ekosistem na khronicheskoe radiatsionnoe vozdeystvie [Reaction biocenoses of aquatic ecosystems to chronic radiation exposure]. Avtoref. diss. doct. biol. nauk. Moscow, MSU, 2011. 46 p.
16. **Sarapultseva E.I., Gorski A.I., Malina J.J.** Radiation risk of mortality and reduced lifespan of daphnids gamma-irradiated at low doses. *Radiatsiya i risk – Radiation and Risk*, 2011, vol. 20, no. 1, pp. 32-38. (In Russian).
17. **Sarapultseva E.I., Bychkovskay I.B., Fedortseva R.F.** Inherited dose independent effects of the low-dose irradiation. The model experiments on *Daphnia Magna*. *Meditinskaya radiologiya i radiatsionnaya bezopasnost' – Medical Radiology and Radiation Safety*, 2009, vol. 54, no. 6, pp. 11-15. (In Russian).
18. **Sarapultseva E.I., Dubrova Y.E.** The long-term effects of acute exposure to ionising radiation on survival and fertility in *Daphnia magna*. *Environ. Res.*, 2016, vol. 150, pp. 138-143.