

БИОФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ И ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *Daphnia magna* КАК МОДЕЛЬНОГО ОРГАНИЗМА

© 2024 г. Н.Б. Савина^{*,#}, Д.В. Ускалова^{**}, Д.Т. Петросова^{**}, Е.И. Сарапульцева^{*, **}

^{*}Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Каширское шоссе, 31, Москва, 115409, Россия

^{**}Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Студгородок, 1, Обнинск Калужской области, 249039, Россия

[#]E-mail: nsavina15@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.11.2023 г.

После доработки 21.11.2023 г.

Принята к публикации 06.12.2023 г.

Представлен обзор методов визуализации изображения и другие биофизические подходы, которые демонстрируют валидность применения высших беспозвоночных животных из подтипа ракообразных *Daphnia magna* в качестве тест-модели для биомедицинских и экотоксикологических исследований. Описаны основные характеристики животных, такие как прозрачное тело, малые размеры, фильтрующий тип питания, наличие оформленных органов, а также короткий жизненный цикл, высокая плодовитость и чувствительность к токсикантам, позволяющие использовать данный тест-организм в опытах *in vivo* как альтернативную теплокровным животным модель. Проведен анализ публикаций, в которых *D. magna* были использованы в качестве модели для визуализации накопления и распределения наноматериалов в организме, а также для анализа механизмов цитотоксичности. Описаны методы флуоресцентной визуализации, интерференционной микроскопии и спектрофотометрии.

Ключевые слова: *Daphnia magna*, биомедицина, экотоксикология, визуализация, спектрофотометрия, наноматериалы, биораспределение.

DOI: 10.31857/S0006302924020194, EDN: OTKHQH

Современная тенденция использования наноматериалов в биомедицинских целях является многообещающей. Активно накапливается экспериментальный материал о биобезопасности и биосовместимости наночастиц, изучаются возможности нанорадиосенсибилизации для технологий бинарной лучевой терапии и адресной доставки биологически активных веществ в клетки векторами на основе наноматериалов. Наночастицы золота используют, например, для доставки лекарств и терапии рака из-за их высокого соотношения полезной нагрузки к носителю [1]. Квантовые точки (QDs) обладают уникальными фотоэлектрическими свойствами, благодаря чему используются в биомедицине в качестве средств визуализации и диагностики [2]. А разработка детекторов на основе нанопроволочных датчиков (NWs) стала конкурентоспособной альтернативой традиционным аналитическим системам отображения [3]. Информация о накопле-

нии, цито- и генотоксичности наноматериалов в клетках и тканях имеет решающее значение для применения в биомедицине. В то же время требуют внимания методы и модели анализа фармакокинетики, биораспределения и токсичности этих веществ для живого организма. Не следует забывать о возможности загрязнения наноматериалами окружающей среды, что может привести к нарушению функционирования пищевых сетей и снижению биоразнообразия из-за высокой активности взаимодействия наночастиц с компонентами живой природы. Поэтому задачи, которые стоят перед исследователями, включают в себя, в том числе, анализ биобезопасности наноматериалов в опытах *in vitro* и *in vivo*, изучение распределения наноматериалов в организме и количественную оценку избирательности поглощения органами и тканями.

Для визуализации накопления и распределения наноматериалов в тканях и органах используют разные биофизические методы – просвечивающую электронную микроскопию, конфокальную лазерную сканирующую микроскопию,

Сокращения: QDs – квантовые точки, NWs – нанопроволочные датчики.

масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой и другие [4]. Данные методы отличаются простым, быстрым и неинвазивным подходом к визуализации. Большинство исследований, как и процитированное выше, проводятся *in vitro* и сосредоточены на взаимодействии «наночастица—клетка» в специфической и ограниченной среде. Поэтому результаты опытов *in vitro* некорректно напрямую сопоставлять и аппроксимировать на исследования *in vivo*. В этом случае используют теплокровных животных, входящих в «золотой стандарт» доклинических испытаний.

Целью данной публикации является обзор методов визуализации изображения и других биофизических подходов с применением беспозвоночных животных из подтипа ракообразные класса жаброногие *Daphnia magna* Straus, 1820 в качестве модели для биомедицинских и экотоксикологических исследований.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИВОТНЫХ *Daphnia magna* В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ И ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Высшие беспозвоночные животные *Daphnia magna* являются доступным и широко применяемым в экотоксикологии, популяционной генетике, экофизиологии и других научных направлениях тест-организмом. *D. magna* рекомендована для проведения токсикологических исследований в «Руководствах» Организации экономического сотрудничества и развития по тестированию химических веществ (тест на острую иммобилизацию [5] и тест на размножение *D. magna* [6]). Эти беспозвоночные 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 [7]. Особым преимуществом их применения является простота культивирования, короткий жизненный цикл, многочисленное потомство, относительно небольшие, но видимые невооруженным глазом размеры тела.

По типу питания *D. magna* относится к фильтраторам [8]. Пять пар грудных конечностей со щетинками образуют фильтрационный аппарат для питания и дыхания, генерируя поток воды. Он направляет внутрь раковины животного простейших, водоросли, бактерии и органический детрит, которые затем поступают в продольный желоб и передаются к ротовому отверстию рачка, где пища подвергается механической обработке. Данный тип питания, предполагающий значительное взаимодействие организма с компонентами окружающей среды, во многом определяет высокую чувствительность и, как следствие, вы-

раженную реакцию *D. magna* на воздействие внешних факторов.

Жизненный цикл животных в оптимальных условиях лаборатории составляет около 10–11 недель [9, 10]. В лабораторных условиях *D. magna* размножаются партеногенетически, производя амеиотические яйца. Эмбриональный период длится до пяти суток. Примерно к 10-суточному возрасту у *D. magna* завершается период созревания, и самка начинает вымет молоди. В течение жизненного цикла самка каждые трое-четыре суток приносит до 40 новорожденных [9, 10]. Яйца формируются в парных яичниках, расположенных вдоль кишечника, а затем перемещаются в выводковую камеру, где происходит эмбриональное развитие. Камера прозрачна, что позволяет вести учет развивающихся яиц и эмбрионов. Новорожденная молодь имеет размеры 0.7–0.9 мм в длину. К моменту половозрелости животные достигают примерно 2.5 мм, продолжают расти с каждой линькой в течение жизни и при достаточном питании достигают более крупных размеров (до 6 мм) в старшем возрасте. К моменту наступления половой зрелости они, как правило, независимо от питания, редко превосходят 2.5–3.0 мм в длину.

D. magna бесцветны за счет прозрачного хитинового панциря, защищающего грудной и брюшной отделы. Данная особенность позволяет отчетливо наблюдать внутренние органы — сердце, кишечник, выводковую камеру с яйцами и эмбрионами, а также изучать физиологические процессы (поглощение и фильтрацию молекул и частиц, перистальтику кишечника) [11, 12].

Животные из рода *Daphnia* как обязательный тест-объект включены в схему установления предельно-допустимых концентраций (ПДК) веществ-загрязнителей и сточных вод в России [13, 14]. В биотестировании используют молодь *D. magna* (в возрасте не более 24 ч), которая обладает высокой чувствительностью к токсичным веществам. При наблюдении за размножением рачков в экспериментальных условиях учитывают выживаемость, время наступления половозрелости, регистрируемое по моменту откладки яиц в выводковую камеру, время рождения первого помета с учетом выхода молоди из выводковой камеры, число пометов за срок наблюдения, общее количество родившейся молоди, общее количество абортивных яиц, мертворожденной и имеющей аномальное морфологическое строение молоди. Несомненно, что именно эти показатели в конечном итоге определяют сохранность вида и имеют решающее значение при оценке токсичности воды. Для целей биомедицины спектр задач значительно расширяется и включает в себя необходимость визуализации распределения наночастиц в органах и тканях. Ниже мы

приводим обзор биофизических методов и подходов, в которых животных *D. magna* использовали в качестве модельного организма для биомедицинских и экотоксикологических исследований.

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Флуоресцентная визуализация является высокочувствительным неинвазивным методом, применяющимся для получения изображений биологических объектов и последующего анализа их структурно-функциональных свойств. Изображения могут быть получены с применением микроскопии, визуализирующих зондов, спектроскопии и т.п.

В последнее десятилетие появляется большое количество работ по исследованию воздействия на организм *D. magna* таких наноматериалов, как наночастицы, квантовые точки, нанопроволоки. Поскольку животные покрыты хитиновым покровом, то основным способом проникновения наноматериалов в организм *D. magna* является их фильтрация из водной среды, а в клетки — путем эндоцитоза [15].

Распределение наночастиц в организме *D. magna* изучают с помощью методов световой, электронной, конфокальной флуоресцентной микроскопии [16], а также рентгеноструктурного [17] и рентгенодисперсионного спектрометрического [16] анализов. Большинство анализируемых исследований продемонстрировали, что наночастицы накапливаются преимущественно в кишечнике ракообразных. В работе [18] был изучен эффект окислительного стресса в клетках кишечника *D. magna* после воздействия наночастицами золота. Изображение кишечника животного было получено в конфокальном режиме лазерного сканера с помощью инвертированного микроскопа при 20-кратном увеличении с возбуждением/излучением 493–556 нм для флуоресцентного красителя. Установлено, что поглощенные наночастицы золота повышали образование активных форм кислорода в кишечнике *D. magna*, на что указывала ярко-зеленая флуоресценция в цитоплазме энтероцитов после 24-часового воздействия наночастицами.

С помощью сканирующего электронного микроскопа на клетках млекопитающих было обнаружено, что цитотоксичность наночастиц Al_2O_3 зависит от их кристаллических фаз [16]. В исследовании на *D. magna* показано, что октаэдрический микро/нано- Cu_2O обладает более высокой поверхностной активностью и является более токсичным для *D. magna* за счет накопления большего количества растворенных ионов Cu, чем кубический микро- и наноструктурный Cu_2O [15]. В процитированном исследовании кишечник

животных был отделен от панциря и других органов, а затем проанализирован с помощью сканирующего электронного микроскопа с энергетическим рентгенодисперсионным спектрометром.

Анализ литературы показал, что наноматериалы в виде NWs не оказывают токсического эффекта на *D. magna* [19, 20]. В цитируемых работах с применением конфокальной флуоресцентной микроскопии было установлено, что NWs подвергаются фрагментации в процессе фильтрации. Обнаружено, что короткие фрагментированные NWs диаметром 40 нм интенсивнее проходят через кишечный эпителий *D. magna*, чем более длинные фрагменты NWs диаметром 80 нм.

QDs представляют собой разновидность металлических наночастиц и имеют перспективы применения в качестве флуоресцентных зондов для визуализации. В работе [21] было установлено, что QDs способны преодолевать эпителиальный слой и мигрировать из кишечника в соседние ткани и органы. Способность к миграции определялась их зарядом. С использованием методов конфокальной микроскопии, электронно-микроскопической флуоресценции и энергодисперсионной спектроскопии удалось обнаружить, что после экспозиции *D. magna* с растворенными в воде QDs, частицы с отрицательным зарядом (QDs COOH) поглощались животными в большей степени, чем положительно заряженные (QDs NH_2). С помощью конфокального микроскопа обнаружили, что QDs накапливались преимущественно в кишечнике и в яйцах *D. magna*. Дополнительно к этому с помощью просвечивающего электронного микроскопа обнаружено накопление QDs в ворсинках кишечника [21]. QDs из амфифильного полимера (ТОPOQD, C60, SWNT) могут вызывать блокировку дыхания *D. magna* вследствие налипания частиц наноматериалов на грудные конечности в области эпиподитов [22]. С помощью рентгеновской флуоресценции и 3D-томографии не удалось обнаружить миграцию другого типа QDs (CdS, CdSe и ZnS) за пределы кишечника животных [23]. Однако при попадании в тело *D. magna* вышеперечисленные QDs начинали флуоресцировать. Учитывая это свойство, можно расширить их практическое применение в медицине, используя для визуализации и диагностики.

В работе [24] проведено сравнение эффектов воздействия QDs на беспозвоночных (ракообразные *D. magna*) и позвоночных (шпорцевая лягушка *Xenopus laevis*) животных. Показано, что накопление наноматериалов в обоих случаях происходит преимущественно в кишечнике и органах дыхания, что еще раз подчеркивает возможность использования беспозвоночных животных *D. magna* в качестве модели для первичного скри-

нинга эффектов воздействия наноматериалов *in vivo*.

В публикации [25] разработан и синтезирован зонд (BD-CHO) на основе бенз-2-окса-1,3-диазольного скелета для обнаружения формальдегида (НСОН) с помощью реакции Aza—Core с высокой селективностью и большим сдвигом Стокса (около 118 нм). Зонд был применен для мониторинга изменения концентрации формальдегида в клетках аденокарциномы молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы человека, в почках мышей, а также у модельного организма *D. magna* в опытах *in vivo* [25]. Было обнаружено усиление флуоресценции в зеленой части спектра во всех исследуемых клетках, тканях и организмах, предварительно инкубированных в формальдегид-содержащих средах, что свидетельствовало о накоплении данного соединения.

Метод визуализации, позволивший оценить уровень свободнорадикальных процессов и активных форм кислорода, образующихся в результате окислительного стресса, описан в работе [26]. Авторы разработали митохондриально-направленный флуоресцентный зонд (NA-T), основанный на механизме нуклеофильного замещения. В присутствии супероксидного аниона исходный зонд, излучающий синий цвет, подвергался разложению с образованием продукта, излучающего зеленый цвет. Приведенные в цитируемой работе эксперименты с конфокальной флуоресцентной визуализацией на нескольких типах клеток показали, что (NA-T)-зонд ориентирован на митохондрии и может быть использован для внутрикостного мониторинга эндогенного супероксид-аниона при разных типах воздействия на организм. Для тестирования свойств зонда *in vivo* в качестве модельного организма были применены ракообразные *D. magna* [26]. Свободнорадикальные реакции индуцировали форбол 12-миристинат 13-ацетат и липополисахарид. Сигналы флуоресценции фиксировали преимущественно в области кишечника *D. magna*.

В качестве примера еще одного митохондриально-направленного зонда, успешно апробированного на *D. magna*, можно привести двухфотонный ратиометрический флуоресцентный зонд (TP-SO₂) [27]. Зонд разработан для мониторинга в режиме реального времени *in vivo* диоксида серы (SO₂) — соединения, играющего значительную роль в разных физиологических и патологических процессах, превышение которого в организме способствует возникновению респираторных заболеваний, неврологических расстройств и сердечно-сосудистых заболеваний, а в отдельных случаях — рака легких [28].

Технология масс-спектрометрической визуализации (MSI) с матрично-вспомогательной лазерной десорбционной ионизацией (MALDI)

широко используется для биовизуализации в медицинских целях [29, 30]. С использованием *D. magna* в качестве тест-модели предложен метод масс-спектрометрической визуализации (MALDI MS), позволивший составить карту распределения липидов в отдельных органах и тканях животных (выводковой камере и внутренней поверхности панциря) за одно измерение [31]. В статье [32] показано, что нарушение липидного обмена, индуцированное действием перфторированных алкильных соединений, может вызвать снижение плодовитости у *D. magna*. Описанный выше процесс визуализации позволил обнаружить пространственное распределение молекул мишеней липидов в организме *D. magna*.

Еще один метод масс-спектрометрической десорбционной электро-распылительной ионизации (DESI-MS) адаптирован для визуализации и анализа пространственного распределения липидов в теле *D. magna* и изменений, происходящих при химическом воздействии бисфенола-А — эндокринного супрессора, влияющего на репродуктивную функцию *D. magna* [33]. DESI-метод вызывает ионизацию окружающей среды разрушающего действия, используя электро-распыленные ионы растворителя для десорбции, ионизации и, в конечном счете, направления анализируемых веществ к детектору MS [34]. Описанная методика позволила охарактеризовать различия в базовом липидоме отдельных анатомических областей *D. magna*, таких как яйца, глаз и кишечник животных.

МЕТОД НИЗКОКОГЕРЕНТНОЙ ИНТЕРФЕРОМЕТРИИ

Ранее нами совместно с коллегами из Московского политехнического университета был апробирован метод низкокогерентной интерференционной микроскопии для анализа частоты сердечных сокращений у *D. magna* [35–37]. Сердце *D. magna* имеет вид округлого мешка с одной парой боковых остий. Частота сердечных сокращений достигает у взрослой *D. magna* 140–180 ударов в минуту, а у новорожденной молоди — до 250–400 ударов в минуту [7]. В наших исследованиях была подобрана область спектра, в которой регистрацию интерферограммы не осложняло диффузное рассеяние света за счет хитинового покрова рачка. Видеоряд, полученный при увеличении микроскопа 20×, составлял 100 кадров в секунду. Сегмент с сердцем занимал область около 250×250 пикселей, 12 бит. Средняя частота сердечных сокращений $F = 7.3$ Гц и составляла 400 ударов в минуту. Точность измерения — около 0.1 Гц.

МЕТОДЫ СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

Оптические методы анализа биоэффектов *in vivo* на *D. magna* широко применяются в экотоксикологических экспериментах [38, 39]. Клеточный МТТ-тест, анализирующий метаболическую активность и соотношение живых и мертвых клеток в опытах *in vitro* [40], был модифицирован нами для исследований радиационных эффектов на беспозвоночных животных в опытах *in vivo* [41]. Метод позволил оценить степень свободнорадикальных реакций в теле облученных животных с использованием иммуноферментного спектрофотометра по переходу бесцветного 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола (МТТ-реактив) в фиолетово-окрашенный формазан. Были обнаружены и проанализированы радиационные эффекты острого γ -облучения животных и трансгенерационные механизмы сохранения токсического эффекта в первом необлученном поколении *D. magna* [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе приведен обзор методов визуализации с применением альтернативной теплокровным животным лабораторной модели беспозвоночного *D. magna* для первичного скринингового исследования распределения и накопления наноматериалов в организме в опытах *in vivo*. Использование в биофизических экспериментах короткоживущих, высокочувствительных к токсикантам, лекарственным препаратам, облучению и другим факторам, партеногенетически размножающихся, легко культивируемых в лабораторных условиях мелких беспозвоночных животных *D. magna* позволит получить значительный набор данных как для анализа механизмов накопления и распределения, так и для оценки биосовместимости и биобезопасности наноматериалов для организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 23-24-10041 «Анализ цитотоксичности наночастиц золота и антиоксидантных свойств фумарата в опытах *in vivo* для нужд фармкластера Калужской области» (2023–2024).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии потенциальных и явных конфликтов интересов, связанных с настоящей рукописью.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В настоящее время для экспериментов *in vivo* с беспозвоночными не требуется одобрения Комитета по этике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kus-Liškiewicz M., Fickers P., and Ben Tahar I. Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: recent advances in methodologies and regulations. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10952 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010952
2. Yun X., Zuyong X., and Jianghong R. Semiconductor quantum dots for biosensing and *in vivo* imaging. *IEEE Trans. NanoBiosci.*, **8** (1), 4–12 (2009). DOI: 10.1109/TNB.2009.2017321
3. Naumova O. V., Generalov V. M., Zaitseva E. G., Latyshev A. V., Pyankov S. A., Kolosova I. V., Ananko G. G., Agafonov A. P., Gavrilova E. V., Maksyutov R. A., and Safatov A. S. Biosensors based on SOI nanowire transistors for biomedicine and virology. *Russ. Microelectron.*, **50** (3), 137–145 (2021). DOI: 10.1134/S1063739721030069
4. Kim C. S., Li X., Jiang Y., Yan B., Tonga G. Y., Ray M., Solfiell D. J., and Rotello V. M. Cellular imaging of endosome entrapped small gold nanoparticles. *MethodsX*, **2**, 306–315 (2015). DOI: 10.1016/j.mex.2015.06.001
5. OECD, 2011. *Test Guideline No. 202: Daphnia sp. Acute immobilization test* (Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France).
6. OECD, 2012. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*, OECD Guidelines for the Testing of 510 Chemicals, Section 2 (OECD Publishing, Paris).
7. Ebert D. *Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in Daphnia* (National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD), 2005). Chapter 2, Introduction to Daphnia Biology. Электронный ресурс: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/> (дата доступа 10.10.2023).
8. Smirnov N. *Physiology of the Cladocera* (Elsevier, Boston, 2017).
9. Fuller N., Lerebours A., Smith J., and Ford A. T. The biological effects of ionising radiation on Crustaceans: A review. *Aquatic Toxicol.*, **167**, 55–67 (2015). DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.07.013i
10. Сарапульцева Е. И. Биологические эффекты радиационного воздействия у низших ракообразных *Daphnia magna*. Аналитический обзор. *Радиационная биология. Радиоэкология*, **57** (4), 414–428 (2017). DOI: 10.7868/S0869803117040075
11. Nkoom M., Lu G., Liu J., Dong H., and Yang H. Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environ. Sci. & Pollution Res.*, **26** (6), 5704–5712 (2019). DOI: 10.1007/s11356-018-04072-3
12. Bownik A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. *Sci. Total Environ.*, **700**, 134400 (2019). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134400
13. ПНД Ф Т 14.1:2.4.12-06; Т 16.1:2.3:3.9-06. *Токсикологические методы анализа. Методика определения*

острой токсичности питьевой воды, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по смертности дафний *Daphnia magna* Straus (ФБУ «ФЦАО», М., 2006, 2011).

14. Приказ Росрыболовства от 04.08.2009 N 695. «Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения».
15. Fan W., Shi Z., Yang X., Cui M., Wang X., Zhang D., Liu H., and Guo L. Bioaccumulation and biomarker responses of cubic and octahedral Cu₂O micro/nanocrystals in *Daphnia magna*. *Water Res.*, **46** (18), 5981–5988 (2012). DOI: 10.1016/j.watres.2012.08.019
16. Nogueira D. J., Vaz V. P., Neto O. S., Silva M. L. N., Simioni C., Ouriques L. C., Vicentini D. S., and Matias W. G. Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environ. Res.*, **182**, 108987 (2020). DOI: 10.1016/j.envres.2019.108987
17. Ates M., Danabas D., Ertit Tastan B., Unal I., Cicek Cimen I. C., Aksu O., Kutlu B., and Arslan Z. Assessment of oxidative stress on *Artemia salina* and *Daphnia magna* after exposure to Zn and ZnO nanoparticles, *Bull. Environ. Contamination Toxicol.*, **104** (2), 206–214 (2020). DOI: 10.1007/s00128-019-02751-6
18. Dominguez G. A., Lohse S. E., Torelli M. D., Murphy C. J., Hamers R. J., Orr G., and Klaper R. D. Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression within the gut of *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicol.*, **162**, 1–9 (2015). DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.02.015
19. Prinz C. N. Interactions of nanowires with cells and tissue, in *Technical Digest of the Int. Electron Devices Meet.* (2018), pp. 26.3.1–26.3.4. DOI: 10.1109/IEDM.2017.8268463
20. Mattsson K., Adolfsson K., Ekvall M. T., Borgström M. T., Linse S., Hansson L.-A., Cedervall T., and Prinz C. N. Translocation of 40 nm diameter nanowires through the intestinal epithelium of *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* **10** (8), 1160–1167 (2016). DOI: 10.1080/17435390.2016.1189615
21. Feswick A., Griffith R. J., Siebein K., and Barber D. S. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. *Aquatic Toxicol.*, **130**, 210–218 (2013). DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.01.002
22. Kwon D., Kim M. J., Park C., Park J., Choi K., and Yoon T. H. *In vivo* biodegradation of colloidal quantum dots by a freshwater invertebrate, *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicol.*, **114**, 217–222 (2012). DOI: 10.1016/j.aquatox.2012.02.033
23. Jackson B. P., Pace H. E., Lanzirotti A., Smith R., and Ranville J. F. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**, 911–917 (2009). DOI: 10.1007/s00216-009-2768-y
24. Galdiero E., Falanga A., Siciliano A., Maselli V., Guida M., Carotenuto R., Tussellino M., Lombardi L., Benvenuto G., and Galdiero S. *Daphnia magna* and *Xenopus laevis* as in vivo models to probe toxicity and uptake of quantum dots functionalized with gH625. *Int. J. Nanomed.*, **12**, 2717–2731 (2017). DOI: 10.2147/IJN.S127226
25. Yang M., Fan J., Du J., Long S., Wang J., and Peng X. Imaging of formaldehyde in live cells and *Daphnia magna* via Aza-Cope reaction utilizing fluorescence probe with large Stokes shifts. *Front. Chem.*, **6** (2018). DOI: 10.3389/fchem.2018.00488
26. Zhang Z., Fan J., Zhao Y., Kang Y., Du J., and Peng X. Mitochondria-accessing ratiometric fluorescent probe for imaging endogenous superoxide anion in live cells and *Daphnia magna*, *ACS Sensors*, **3** (3), 735–741 (2018). DOI: 10.1021/acssensors.8b00082
27. Li H., Zhou X., Fan J., Long S., Du J., Wang J., and Peng X. Fluorescence imaging of SO₂ derivatives in *Daphnia magna* with a mitochondria-targeted two-photon ratiometric fluorescent probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **154**, 709–718 (2018). DOI: 10.1016/j.snb.2017.07.082
28. Khalaf E. M., Mohammadi M. J., Sulistiyani S., Ramírez-Coronel A. A., Kiani F., Jalil A. T., Almulla A. F., Asban P., Farhadi M., and Derikondi M. Effects of sulfur dioxide inhalation on human health: a review. *Rev. Environ. Health* (2022). DOI: 10.1515/reveh-2022-0237
29. Singhal R., Carrigan J. B., Wei W., Taniere P., Hejmadi R., Forde C., Ludwig C., Griffiths R. L., Johnson P. J., Tucker O., Alderson D., Günther U. L., and Ward D. G. MALDI profiles of proteins and lipids for the rapid characterisation of upper GI-tract cancers. *J. Proteomics*, **80**, 207–215 (2015). DOI: 10.1016/j.jpro.2013.01.016
30. Ščupáková K., Soons Z., Ertaylan G., Pierzchalski K. A., Eijkel G. B., Ellis S. R., Greve J. W., Driessen A., Verheij J., De Kok T. M., Olde Damink S. W. M., Rensen S. S., and Heeren R. M. A. Spatial systems lipidomics reveals nonalcoholic fatty liver disease heterogeneity. *Anal. Chem.*, **90** (8), 5130–5138 (2018). DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05215
31. Schirmer E., Ritschar S., Ochs M., Laforsch C., Schuster S., and Römpf A. MALDI mass-spectrometry imaging workflow for the aquatic model organisms *Danio rerio* and *Daphnia magna*. *Sci. Reports*, **12** (1), 72–88 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-09659-y
32. Seyoum A., Pradhan A., Jass J., and Olsson P.-E. Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. *Sci. Total Environ.*, **737**, 139682 (2020). DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139682
33. Smith M. J., Weber R. J. M., and Viant M. R. Spatially mapping the baseline and bisphenol-a exposed *Daphnia magna* lipidome using desorption electrospray ionization—mass spectrometry. *Metabolites*, **12** (1), 33 (2022). DOI: 10.3390/metabol12010033
34. Takáts Z., Wiseman J. M., Gologan B., and Cooks R. G. Mass-spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science*, **306** (5695), 471–473 (2004). DOI: 10.1126/science.1104404
35. Каленков С. Г., Каленков Г. С. и Штанько А. Е. Пространственно-спектральная цифровая голография

- микрообъектов в низкокогерентном свете. *Радиотехника и электроника*, **58** (12), 1243 (2013). DOI: 10.7868/S0033849413120097
36. Сарапульцева Е. И., Каленков Г. С., Заалишвили Н. Ю., Ускалова Д. В. и Устенко К. В. Новый подход к оценке радиоэкологических последствий облучения, в кн. *Будущее атомной энергетики — AtomFuture 2019* (Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, 2020), сс. 46–47.
 37. Сарапульцева Е. И., Морозова А. О., Колесникова Н. И., Савина Н. Б., Ускалова Д. В. и Устенко К. В. Анализ сердечного ритма у модельного тест-организма *Daphnia magna* в качестве нового подхода к оценке радиоэкологических последствий облучения. *Изв. ВУЗов: ядерная энергетика*, **2**, 146–155 (2020). DOI: 10.26583/npe.2020.2.13
 38. Paul R. J., Colmorgen M., Hüller T., Tyroller F., and Zinkler D. Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods. *J. Comp. Physiol. B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **167** (6), 399–408 (1997). DOI: 10.1007/s003600050089
 39. Barata C., Varo I., Navarro J. C., Arun S., and Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicology & Pharmacology*, **140** (2), 175–186 (2005). DOI: 10.1016/j.cca.2005.01.013
 40. Nikš M. and Otto M. Towards an optimized MTT-assay. *J. Comp. Physiol. B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **130** (1), 149–151 (1990). DOI: 10.1007/s003600050089
 41. Сарапульцева Е. И., Рябченко Н. И., Иголкина Ю. В. и Иванник Б. П. Использование метилтетразолий бромида (МТТ) для биотестирования низкодозового радиационного воздействия на организменном уровне. *Радиация, биология. Радиоэкология*, **53** (6), 634–638 (2013). DOI: 10.7868/S0869803113060131
 42. Савина Н. Б., Ускалова Д. В. и Сарапульцева Е. И. Использование МТТ-теста для изучения отдаленных эффектов острого γ -облучения у ракообразных *Daphnia magna*. *Радиация и риск*, **27** (1), 86–94 (2018). DOI: 10.21870/0131-3878-2018-27-1-86-93

Biophysical Methods for Testing Nanomaterials in Terms of Biomedical and Ecotoxicological Purposes Using *Daphnia magna* as a Model Organism

N.B. Savina*, D.V. Uskalova**, D.T. Petrosova**, and E.I. Sarapultseva*, **

*National Research Nuclear University “MEPhI”, Kashirskoe shosse 31, Moscow, 115409 Russia

**Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — a Branch of National Research Nuclear University “MEPhI”, Studgorodok, 1, Obninsk, Kaluga Region, 249039 Russia

The paper presents an overview of image visualization techniques and other biophysical approaches that demonstrate a validity of using higher invertebrate animals that include the crustacean *Daphnia magna*, a member of the subphylum Crustacea as a test model for biomedical and ecotoxicological studies. The authors describe the main characteristics of animals, such as a transparent body, small size, filter feeding mechanism, the presence of the formed organs, as well as a short life cycle, high fertility and sensitivity to toxicants, which allow the use of this test organism in experiments *in vivo* as an alternative model to warm-blooded animals. An analysis of the existing literature on the use of *D. magna* as a model for visualizing the accumulation and distribution of nanomaterials in the body, as well as for analyzing the mechanisms of cytotoxicity is carried out. Methods for fluorescence imaging, interference microscopy and spectrophotometry are described.

Keywords: *Daphnia magna*, biomedicine, ecotoxicology, visualization, spectrophotometry,, nanomaterials, biodistribution