

Морфометрические показатели пролиферации и апоптоза кератиноцитов после введения аскорбиновой кислоты при радиационно-индуцированном повреждении кожи

Г.А. Демяшкин^{1,2}, М.А. Вадюхин², А.Х. Марукян², С.В. Саакян², Э.Б.-Г. Каракаева², С.Н. Корякин¹, Е.Ю. Шаповалова³, А.А. Канторович², А.С. Андриевских²

¹Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Москва, Россия;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия;

³Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. В литературе описаны признаки радиационно-индуцированного повреждения и фиброза кожи после воздействия разных видов ионизирующего излучения. Электроны характеризуются относительно низкой цитотоксичностью в отношении здоровых органов по сравнению с другими видами ионизирующего излучения, однако их побочные эффекты до конца не изучены. Важной задачей является разработка способов протекции эпидермиса и дермы от цитотоксического действия электронов при проведении лечения злокачественных новообразований и при перкутанном воздействии на опухоли.

Цель — провести морфометрическую оценку пролиферации и апоптоза кератиноцитов после введения аскорбиновой кислоты в экспериментальной модели радиационно-индуцированного повреждения кожи.

Методы. Проведено одноцентровое проспективное контролируемое исследование. Объект исследования — фрагменты кожи наружной поверхности бедра самцов крыс линии Вистар (возраст 9–10 недель, вес 220 ± 20 г). Животных ($n=50$) случайным образом разделили на четыре экспериментальные группы: I — контрольная ($n=20$); II — локальное облучение электронами в дозе 40 Гр ($n=10$); III — введение аскорбиновой кислоты (интраперитонеально в дозе 50 мг/кг) перед локальным облучением электронами в дозе 40 Гр ($n=10$); IV — введение аскорбиновой кислоты без облучения ($n=10$). Через 10 суток фрагменты кожи из области облучения фиксировали для последующего проведения гистологического и иммуногистохимического (с использованием антител к Ki-67 и каспазе-3) исследований.

Результаты. Спустя 10 суток после облучения электронами на линейном акселераторе «NOVAC-11» (Италия) в дозе 40 Гр в зоне воздействия наблюдаются признаки радиационно-индуцированного повреждения кожи: влажное шелушение, отёк, частичная десквамация базального слоя эпидермиса, образование микрополостей в области дермоэпидермального соединения, поражение большинства сальных желёз, а также дисбаланс в содержании малонового диальдегида и активности супероксиддисмутазы. Результаты оценки экспрессии Ki-67 и каспазы-3 свидетельствуют о снижении пролиферативной активности и об индукции апоптоза в кератиноцитах. Однако после предлучевого введения аскорбиновой кислоты количественные показатели пролиферации и апоптоза кератиноцитов, а также толщины эпидермиса близки к значениям в контрольной группе.

Заключение. Результаты исследования свидетельствуют о высокой радиопротективной эффективности аскорбиновой кислоты в отношении эпидермиса при локальном облучении электронами в дозе 40 Гр. Аскорбиновая кислота предотвращает радиационно-индуцированную апоптотическую гибель кератиноцитов путём снижения степени их оксидантного повреждения свободными радикалами, а также за счёт индукции экспрессии супероксиддисмутазы.

Ключевые слова: кератиноциты; кожа; радиационно-индуцированное повреждение; облучение электронами; апоптоз; пролиферация.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Демяшкин Г.А., Вадюхин М.А., Марукян А.Х., Саакян С.В., Каракаева Э.Б.-Г., Корякин С.Н., Шаповалова Е.Ю., Канторович А.А., Андриевских А.С. Морфометрические показатели пролиферации и апоптоза кератиноцитов после введения аскорбиновой кислоты при радиационно-

индуцированном повреждении кожи // Морфология. 2025. Т. 163, № 3. С. **XX-XX**.

DOI: 10.17816/morph.646329 EDN: YSKSPE

© Эко-Вектор, 2025

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

Рукопись получена: 17.01.2025

Рукопись одобрена: 14.03.2025

Опубликована online: 1.06.2025

Morphometrical features of proliferation and apoptosis of keratinocytes after administration of ascorbic acid in the model of radiation-induced skin damage

Grigory A. Demyashkin^{1,2}, Matvey A. Vadyukhin², Anna Kh. Marukyan², Susanna V. Saakyan², Elza B.-G. Karakaeva², Sergey N. Koryakin¹, Elena Yu. Shapovalova³, Alexey A. Kantorovich², Anastasiia S. Andrievskikh²

¹National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia;

²The First Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russia;

³V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Some authors have described the development of signs of radiation-induced damage and fibrosis in the skin after exposure to ionizing radiation. Electrons are characterized by a low cytotoxic effect on various healthy organs compared to other types of radiation, but their side effects have not been fully studied. No less important is the conduct of research in the field of developing methods for protecting the epidermis and dermis from the cytotoxic effect of electrons during the treatment of malignant neoplasms, as well as during percutaneous exposure to tumors of other localizations.

AIM: Morphometrical assessment of keratinocyte proliferation and apoptosis after administration of ascorbic acid in a model of radiation-induced skin damage.

METHODS: A single-center prospective controlled study was conducted. The object of the study was fragments of the skin of the outer surface of the thigh of male Wistar rats (age 9–10 weeks, weight 220±20 g). Animals ($n=50$) were randomly divided into four experimental groups: I — control ($n=20$); II — local irradiation with electrons at a dose of 40 Gy ($n=10$); III — administration of ascorbic acid (intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg) before irradiation with electrons at a dose of 40 Gy ($n=10$); IV — administration of ascorbic acid (intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg) ($n=10$). 10 days after electron irradiation, skin fragments were taken for histological and immunohistochemical (with antibodies to Ki-67 and caspase 3) studies.

RESULTS: Electron irradiation on the NOVAC-11 linear accelerator (Italy) at a dose of 40 Gy by the 10th day led to the appearance of signs of radiation-induced skin damage: moist peeling, edema; partial desquamation of the basal layer of the epidermis, the formation of microcavities in the area of the dermo-epidermal junction, damage to most sebaceous glands, as well as an imbalance of MDA and SOD. This was accompanied by a decrease in proliferative activity and induction of keratinocyte apoptosis based on the results of assessing the expression of Ki-67 and caspase 3. In contrast, with pre-radiation administration of ascorbic acid, it was noted that the quantitative parameters of proliferation and apoptosis markers of keratinocytes, as well as the thickness of the epidermis, were close to the values of the control group.

CONCLUSION: The results of the study indicate a high radioprotective efficiency of ascorbic acid in relation to the epidermis with local irradiation with electrons at a dose of 40 Gy. Ascorbic acid prevents radiation-induced death of keratinocytes by apoptosis, reducing the degree of their oxidative damage by free radicals, and also induces the expression of superoxide dismutase.

Keywords: keratinocytes; skin; radiation-induced damage; electron irradiation; apoptosis; proliferation.

TO CITE THIS ARTICLE:

Demyashkin GA, Vadyukhin MA, Marukyan AKh, Saakyan SV, Karakaeva EB-G, Koryakin SN, Shapovalova EYu, Kantorovich AA, Andrievskikh AS. Morphometrical features of proliferation and apoptosis of keratinocytes after administration of ascorbic acid in the model of radiation-induced skin damage. *Morphology*. 2025;163(3):XX–XX. DOI: 10.17816/morph.646329 EDN: YSKSPE

© Eco-Vector, 2025

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

Received: 17.01.2025

Accepted: 14.03.2025

Published online: 1.06.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Воздействие ионизирующего излучения при проведении терапии злокачественных новообразований в некоторых случаях приводит к радиационно-индуцированному повреждению соседних органов [1]. В соответствии с законом Бергонье–Трибондо особенно радиочувствительными являются быстро регенерирующие ткани, клетки которых активно пролиферируют. Это связано со стремительным накоплением неустрашимых постлучевых повреждений ДНК в результате прямого и косвенного воздействия ионизирующего излучения [2]. Некоторые авторы отмечают появление морфологических признаков радиационно-индуцированного повреждения и фиброза кожи у облучённых животных [3]. Аналогичные изменения наблюдали при облучении электронами в дозах 40 Гр и более [4]. На этом основании было сделано предположение о меньшей выраженности лучевых повреждений после электронотерапии при сохранении её эффективности в отношении злокачественных новообразований.

Помимо изучения лучевого повреждения эпидермиса и дермы при электронотерапии, практикой интерес представляют исследования субстратов, обладающих радиопротекторными и регенеративными свойствами. В некоторых работах продемонстрирована эффективность препаратов из группы антиоксидантов, способных связывать свободные радикалы, блокировать развитие оксидативного стресса и индуцировать синтез ферментов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и др.). Однако их применение в онкологии до сих пор остаётся предметом дискуссий [5]. Наиболее известным антиоксидантом является аскорбиновая кислота, чья протекторная эффективность при лучевом воздействии показана во многих органах [6–8]. Тем не менее, на сегодняшний день отсутствует описание антиоксидантных свойств аскорбиновой кислоты при воздействии ионизирующего излучения, а единственный одобренный радиопротекторный препарат **амифостин** имеет ряд недостатков: высокую стоимость, сложность применения, симптомы интоксикации и другие [9]. Эти факторы обуславливают актуальность и новизну исследований, посвящённых поиску и апробации новых методов защиты кератиноцитов от лучевого воздействия.

В одном из недавних исследований было показано, что введение аскорбиновой кислоты (АК) не только снижает уровень оксидативного стресса в коже, вызванного облучением ультрафиолетом, но и уменьшает гибель кератиноцитов, которую оценивали по количеству окрашенных клеток при проведении Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) и по фокусам γ -H2A.X (маркер разрывов цепей ДНК) [10]. Более того, результаты этого исследования свидетельствуют в пользу более высокой эффективности аскорбиновой кислоты при предлучевом введении по сравнению с введением после облучения. Однако подобные работы остаются единичными, а влияние АК на реакцию кератиноцитов в ответ на облучение электронами ещё предстоит изучить. Кроме того, наиболее популярные в подобных исследованиях иммуногистохимические методы предоставляют авторам лишь качественные или полуколичественные данные [11], что подчёркивает необходимость проведения морфометрической, то есть количественной, оценки структурных изменений в эпидермисе при облучении электронами и введении аскорбиновой кислоты.

Цель исследования — провести морфометрическую оценку пролиферации и апоптоза кератиноцитов после введения аскорбиновой кислоты в экспериментальной модели радиационно-индуцированного повреждения кожи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено одноцентровое проспективное контролируемое исследование.

Объект исследования — фрагменты кожи наружной поверхности бедра самцов крыс линии Вистар (возраст 9–10 недель, вес 220 ± 20 г). Проводили макроскопическую оценку качественных и количественных характеристик кожи. Затем фрагменты кожи подготавливали для гистологического исследования по стандартной методике.

Всех животных ($n=50$) поделили на следующие группы: I — контрольная ($n=20$), облучение не проводили, интраперитонеально вводили физиологический раствор; II — проводили локальное облучение электронами в разовой очаговой дозе 40 Гр, интраперитонеально вводили физиологический раствор ($n=10$); III — животным интраперитонеально вводили аскорбиновую

кислоту в дозе 50 мг/кг перед облучением электронами в разовой очаговой дозе 40 Гр ($n=10$); IV — облучение не проводили, вводили аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг/кг ($n=10$).

КРИТЕРИИ СООТВЕТСТВИЯ

В исследование включены самцы крыс линии Вистар ($n=50$), весом 220 ± 20 г в возрасте 9–10 недель.

УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ

Исследование проведено на базе Радиологического отделения экспериментального корпуса МРНЦ имени А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия).

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животных выводили из эксперимента на 10-е сутки после облучения электронами путём введения комбинации высоких доз анестетиков кетамина (50 мг/кг внутримышечно, Bioveta, Чехия) и ксилазина (5 мг/кг внутривенно, Interchemie, Нидерланды).

ОПИСАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА

Облучение животных (группы II и III) проводили в области наружной поверхности бедра с применением линейного акселератора NOVAC-11 (Италия). Устанавливали следующие параметры: частота 9 Гц, энергия 10 МэВ, мощность дозы 1 Гр/мин, размер поля Ø 50 мм. Для седации перед облучением крысам однократно вводили кетамин (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазин (5 мг/кг, внутривенно). Животных перемещали на предметный стол и укладывали так, чтобы в зоне облучения оказалась наружная поверхность бедра, а лёгкие и сердце оставались вне этой зоны. Тубус установки для облучения подводили к коже на расстояние не более 2 мм от её поверхности, перпендикулярно плоскости кожи. В качестве субстрата, обладающего радиопротекторной активностью вводили аскорбиновую кислоту (раствор для внутривенного и внутримышечного введения, 100 мг/2 мл; АО «Новосибхимфарм», Россия) в дозе 50 мг/кг интраперитонеально, за 1 час до облучения электронами — время, необходимое для всасывания и наступления эффекта. Доза была выбрана с учётом терапевтических доз препарата, рекомендованных для лечения дефицитарных состояний у человека. Для крыс рассчитывали эквивалентную дозу с использованием стандартных межвидовых коэффициентов, применяемых в доклинических исследованиях.

МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ ИСХОДОВ

Проводили макроскопическую оценку недепилированной кожи по шкале, разработанной Международной группой по радиационной терапии в онкологии RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), которая используется для оценки тяжести острого лучевого повреждения (Acute Radiation Morbidity Scoring Criteria) [12].

Содержание маркера оксидативного стресса (концентрацию малонового диальдегида) и активность антиоксидантной системы (активность супероксиддисмутазы) оценивали иммуноферментным методом в 10% гомогенате кожи, с использованием коммерческих наборов ELISA-kit, в соответствии с инструкциями производителя (Lifespan Biosciences, США).

Морфологическое исследование. Фрагменты кожи фиксировали в растворе забуференного формалина (pH 7,0). Проводку выполняли в автоматическом режиме, после чего образцы заливали в парафиновые блоки, из которых готовили серийные срезы толщиной 3 мкм на автоматическом ротационном микротоме (Leica RM 2255, Германия). Срезы депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином (BioVitrum, Россия). Толщину эпидермиса измеряли с помощью компьютерной программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Иммуногистохимическое исследование. Для иммуногистохимической оценки пролиферации и апоптоза кератиноцитов использовали первичные моноклональные антитела к Ki-67 (Thermo Fisher Scientific, США; клон MM1, Cat. № 604-240; разведение 1:100) и каспазе-3 (Thermo Fisher Scientific, США; клон 74T2, Cat. № 43-7800; разведение 1:500) соответственно. Детекцию проводили с помощью набора реагентов, включающего вторичные антитела (HiDef Detection™ HRP Polymer system, «Cell Marque», США). Ядра кератиноцитов докрашивали гематоксилином Майера (BioVitrum, Россия). Подсчёт клеток, положительных по Ki-67 и каспазе-3, осуществляли в 10 случайно выбранных полях зрения светового микроскопа при увеличении $\times 400$.

Микроскопический анализ при проведении гистологического, морфометрического (оценка толщины эпидермиса) и иммуногистохимического исследований осуществляли с помощью системы видеомикроскопии на базе микроскопа Leica DM2000 с камерой Leica ICC50 HD (Leica Microsystems, Германия).

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы SPSS 12 for Windows (IBM Analytics, США). Для проверки соответствия данных нормальному распределению применяли критерий Шапиро–Уилка. При нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента. При распределении, отличном от нормального, применяли критерий Краскела–Уоллиса с апостериорным критерием Данна, а данные выражали в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD). Парные сравнения между группами проводили с помощью U-теста Манна–Уитни с поправкой Бонферрони. Значение $p \leq 0,05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фрагменты кожи наружной поверхности бедра самцов крыс линии Вистар.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В контрольной группе и у животных, получавших АК без облучения, кожа остаётся гладкой и без видимых изменений, с физиологической белесоватой окраской и коротким волосняным покровом (0 баллов по шкале RTOG). При макроскопическом исследовании на 10-е сутки после локального облучения электронами обнаруживается гиперемия кожи в области воздействия, с признаками лучевого повреждения умеренной степени выраженности (фокальное влажное шелушение, отёк) и сниженной плотностью волосяного покрова (2 балла по шкале RTOG). У крыс, которым вводили АК перед облучением электронами отмечали сухое шелушение кожи и образование фокусов, состоящих из эпидермальных пластинок белого цвета при сохранении нормального волосяного покрова (1 балл по шкале RTOG).

Иммуноферментный анализ

Исследование оксидативного стресса в гомогенатах кожи показало, что концентрация малонового диальдегида — маркера перекисного окисления липидов — статистически значимо увеличивается (в 3,0 раза; $p=0,008$), а активность фермента антиоксидантной системы — супероксиддисмутазы, наоборот, снижается (в 1,3 раза; $p=0,006$) после локального облучения электронами по сравнению с контрольной группой. В то же время, при предлучевом введении АК эти изменения выражены в меньшей степени (табл. 1).

Гистологическое и морфометрическое исследование

Гистологическая структура кожи крыс контрольной группы (I группа) и животных после введения АК (IV группа) представлена эпидермисом, сосочковым и сетчатым слоями дермы, а также гиподермой с большим количеством волосяных фолликулов (рис. 1, а). Локальное облучение электронами (II группа) вызывает уплощение базального слоя эпидермиса и его частичную отслойку, в результате чего в структуре дермо-эпидермального соединения появляются микрополости, заполненные детритом и полиморфноядерными лейкоцитами. Сосочковый слой дермы сглажен, гемакапилляры расширены, а в их просвете обнаруживается сладж эритроцитов; сальные железы отсутствуют, а волосяные фолликулы и гиподерма остаются практически неизменёнными (рис. 1, б). В группе предлучевого введения АК (III группа) обнаружили лишь частичное утолщение базального слоя эпидермиса во внутриэпидермальной области канала волоса. Кроме того, в сосочковом слое дермы встерчаются единичные полиморфноядерные лейкоциты и заметен слабый отёк. Придатки кожи (сальные железы, волосяные фолликулы) визуальнo не изменены (рис. 1, в).

Морфометрический анализ кожи после облучения выявил снижение толщины эпидермиса (в 5,5 раза; $p=0,034$) по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 1). В то же время, в группе с предлучевым введением АК этот показатель приближается к контрольным значениям, однако статистически значимо отличается от них, при этом толщина эпидермиса (в 4,4 раза; $p=0,012$) значимо превышает значения в группе II (см. табл. 1).

Иммуногистохимическое исследование

Для оценки пролиферативной активности и апоптоза кератиноцитов подсчитывали количество клеток, экспрессирующих Ki-67 и каспазу-3. После локального облучения в эпидермисе происходит резкое снижение количества Ki-67-положительных клеток (в 2,6 раза; $p=0,030$) и увеличение числа каспаза-3-положительных клеток со слабым цитоплазматическим окрашиванием (в 6,6 раз; $p=0,024$) по сравнению с контрольной группой (рис. 2). При предлучевом введении АК

(группа III) количество Ki-67-положительных кератиноцитов выше (в 2,0 раза; $p=0,016$), а каспаза-3-положительных кератиноцитов — ниже (в 1,6 раза; $p=0,036$), чем в группе животных после локального облучения электронами, но без введения АК (табл. 2, см. рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Локальное облучение электронами в дозе 40 Гр приводит к нарушению гистоархитектоники кожи крыс, сопровождающемуся признаками радиационно-индуцированного повреждения — шелушением, отёком, гибелью кератиноцитов и полиморфноядерной лейкоцитарной инфильтрацией. Выраженность данных морфологических изменений статистически значимо снижена в группе животных, которым перед облучением вводили АК в дозе 50 мг/кг.

Цитотоксические эффекты ионизирующего излучения описаны во многих исследованиях [12]. Их развитие связано с прямыми и косвенными механизмами лучевого повреждения. Прямое действие обусловлено непосредственным нарушением структуры макромолекул и прежде всего — ДНК [13]. Косвенное повреждающее воздействие ионизирующего излучения связано с индукцией апоптоза. Облучение вызывает оксидативный стресс, сопровождающийся высвобождением свободных радикалов, продуктов радиолитической воды и перексидного окисления липидных молекул [14]. В совокупности эти факторы повреждают плазмолемму и мембраны органелл (например, митохондрий), что влечёт за собой активацию каскадов митохондриально-опосредованного некроза и апоптоза [15]. В коже это проявляется развитием радиационно-индуцированного дерматита на ранних сроках после воздействия [16].

Однако несмотря на сходство молекулярных механизмов лучевого повреждения, связанных с ионизацией, степень повреждения значительно варьирует в зависимости от вида ионизирующего излучения, а также от степени радиорезистентности конкретной ткани, сроков, скорости воздействия и дозы. Так, некоторые авторы показали, что уже в дозе 30–40 Гр X-излучение вызывает выраженное влажное шелушение кожи, а доза более 40 Гр влечёт за собой развитие множественных изъязвлений [17]. Другое исследование продемонстрировало, что воздействие γ -излучения, обладающего более высокой проникающей способностью, даже в дозах менее 5 Гр, повреждает все слои кожи, включая структуру кровеносных сосудов, что приводит к формированию многочисленных эрозий и язв, а также к выраженному воспалительному ответу [18]. Некоторые авторы проводили сравнение между двумя наиболее часто используемыми при злокачественных новообразованиях видами ионизирующего излучения и пришли к выводу, что

¹⁶⁶Но γ -излучение более опасно в остром периоде, чем X-излучение, однако в отдалённые сроки после γ -воздействия происходит частичное замещение дефекта соединительной тканью [19]. Таким образом, можно говорить о высокой цитотоксичности большинства изученных на сегодняшний день видов ионизирующего излучения.

Тем не менее, для применения в радиотерапии перспективным является облучение электронами, обладающее низкими показателями массы, проникающей способности, способности к ионизации и другими характеристиками, обуславливающими более щадящее воздействие этого вида излучения на кожу, что было продемонстрировано в нашем исследовании. Стоит подчеркнуть, что эффективность облучения электронами в отношении атипичных клеток не уступает таковой при других видах радиотерапии [20]. Таким образом, выявленная нами апоптотическая гибель кератиноцитов (иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к каспазе-3), по-видимому, связана с активацией прямого и косвенного путей лучевого повреждения, однако выражена в меньшей степени, чем при воздействии другими видами ионизирующего излучения [17].

Учитывая существенную активацию оксидативного стресса при облучении электронами, представляется важным проведение апробации соединений, обладающих антиоксидантной активностью и способных уменьшать повреждающее действие. Одним из таких веществ является аскорбиновая кислота [21]. Интраперитонеальное предлучевое введение крысам АК в целях протекции можно считать оправданным в связи с обнаруженными в настоящем исследовании менее выраженными деструктивными изменениями в эпидермисе, а также с более высокой степенью пролиферативной активности кератиноцитов и малом количестве клеток, экспрессирующих каспазу-3. Кроме того, наблюдавшееся снижение концентрации малонового диальдегида при сохранении высокой активности супероксиддисмутазы после облучения на фоне введения АК может свидетельствовать об ограничении активации косвенного пути лучевого повреждения за счёт снижения степени оксидативного стресса и синтеза прооксидантных молекул [7]. В

дополнение к этому некоторые авторы сообщают о протективных свойствах АК в отношении ДНК, реализующихся посредством связывания ионов Cu^{2+} [22].

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические изменения в коже после облучения электронами выражены в меньшей степени по сравнению с эффектами других видов ионизирующего излучения. Предлучевое введение АК потенциально можно использовать для радиопротекции эпидермиса при лечении злокачественных новообразований. Защитное действие АК обусловлено не только её прямым антиоксидантным эффектом, но также антиапоптотическими, противовоспалительными свойствами и способностью стимулировать репаративные процессы. Вместе с тем предложенные нами гипотезы требуют проведения более детальных исследований, хотя и частично согласуются с результатами других авторов [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведённого исследования свидетельствуют о радиопротективной эффективности аскорбиновой кислоты в отношении эпидермиса при однократном локальном облучении электронами в дозе 40 Гр. Защитное действие этого антиоксиданта проявляется в предотвращении радиационно-индуцированного апоптоза кератиноцитов, снижении степени их повреждения свободными радикалами и повышении экспрессии супероксиддисмутазы.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Г.А. Демяшкин — определение концепции исследования, проведение исследования, анализ данных, пересмотр и редактирование рукописи; М.А. Вадюхин — проведение исследования, написание черновика рукописи, пересмотр и редактирование рукописи; А.Х. Марукян — определение концепции исследования, проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; С.В. Саакян — определение концепции исследования, проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; Э.Б.-Г. Каракаева — определение концепции исследования, проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; С.Н. Корякин — обеспечение исследования, пересмотр и редактирование рукописи; Е.Ю. Шаповалова — обеспечение исследования, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 2006) и Хельсинской декларации (1964). Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом МРНЦ имени А.Ф. Цыба (протокол № 6 от 04.12.2021).

Источники финансирования. Отсутствуют.

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

G.A. Demyashkin — study concept and design, collection and processing of materials, analysis of obtained data, final editing; M.A. Vadyukhin — literature review, collection and analysis of literary sources, collection and processing of materials, writing and editing of the text; A.Kh. Marukyan — study concept and design, collection and processing of materials, analysis of obtained data, writing of the text; S.V. Saakyan — study concept and design, analysis of obtained data, collection and processing of materials, writing of the text; E.B.-G. Karakaeva — study concept and design, analysis of obtained data, collection and processing of materials, writing of the text; S.N. Koryakin — resources, final editing; E.Yu. Shapovalova — resources, final editing.

Ethics approval:

Funding sources: This study was not supported by any external sources of funding.

Disclosure of interests: The authors declare that they have no competing interests.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Voshart DC, Wiedemann J, van Luijk P, Barazzuol L. Regional responses in radiation-induced normal tissue damage. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):367. doi: 10.3390/cancers13030367 EDN: [NIYBVY](#)
2. Reisz JA, Bansal N, Qian J, et al. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(2):260–292. doi: 10.1089/ars.2013.5489 EDN: [UTDMBT](#)
3. Wang L, Lin B, Zhai M, et al. Deteriorative Effects of radiation injury combined with skin wounding in a mouse model. *Toxics*. 2022;10(12):785. doi: 10.3390/toxics10120785 EDN: [DBGZGI](#)
4. Demyashkin G, Shapovalova Y, Marukyan A, et al. Immunohistochemical and histochemical analysis of the rat skin after local electron irradiation. *Open Vet J*. 2023;13(12):1570–1582. doi: 10.5455/OVJ.2023.v13.i12.7 EDN: [YFSLDE](#)
5. Wieland LS, Moffet I, Shade S, et al. Risks and benefits of antioxidant dietary supplement use during cancer treatment: protocol for a scoping review. *BMJ Open*. 2021;11(4):e047200. doi: 10.1136/bmjopen-2020-047200 EDN: [DTTCEQ](#)
6. Attia AA, Hamad HA, Fawzy MA, Saleh SR. The prophylactic effect of vitamin C and vitamin B12 against ultraviolet-C-induced hepatotoxicity in male rats. *Molecules*. 2023;28(11):4302. doi: 10.3390/molecules28114302 EDN: [FYZPGK](#)
7. Sato T, Kinoshita M, Yamamoto T, et al. Treatment of irradiated mice with high-dose ascorbic acid reduced lethality. *PLoS One*. 2015;10(2):e0117020. doi: 10.1371/journal.pone.0117020
8. Demyashkin GA, Atyakshin DA, Yakimenko VA, et al. Characteristics of proliferation and apoptosis of hepatocytes after administration of ascorbic acid in a model of radiation hepatitis. *Morphology*. 2023;161(3):31–38. (In Russ.) doi: 10.17816/morph.624714 EDN: [LDQCSJ](#)
9. King M, Joseph S, Albert A, et al. Use of Amifostine for cytoprotection during radiation therapy: A review. *Oncology*. 2020;98(2):61–80. doi: 10.1159/000502979
10. Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, et al. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Rep*. 2018;8(1):16199. doi: 10.1038/s41598-018-34530-4 EDN: [ONLVLU](#)
11. Ravetti S, Clemente C, Brignone S, et al. Ascorbic acid in skin health. *Cosmetics*. 2019;6(4):58. doi: 10.3390/cosmetics6040058
12. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31(5):1341–1346. doi: 10.1016/0360-3016(95)00060-C EDN: [APLAHB](#)
13. Williams JP, Newhauser W. Normal tissue damage: its importance, history and challenges for the future. *Br J Radiol*. 2019;92(1093):20180048. doi: 10.1259/bjr.20180048 EDN: [WXTPIZ](#)
14. Zhao H, Zhuang Y, Li R, et al. Effects of different doses of X-ray irradiation on cell apoptosis, cell cycle, DNA damage repair and glycolysis in HeLa cells. *Oncol Lett*. 2019;17(1):42–54. doi: 10.3892/ol.2018.9566
15. Nuszkievicz J, Woźniak A, Szewczyk-Golec K. Ionizing radiation as a source of oxidative stress-the protective role of melatonin and vitamin D. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):5804. doi: 10.3390/ijms21165804 EDN: [KOENZI](#)
16. Jiao Y, Cao F, Liu H. Radiation-induced cell death and its mechanisms. *Health Phys*. 2022;123(5):376–386. doi: 10.1097/HP.0000000000001601 EDN: [SAYLYY](#)
17. Bontempo PSM, Ciol MA, Meneses AG, et al. Acute radiodermatitis in cancer patients: incidence and severity estimates. *Rev Esc Enferm USP*. 2021;55:e03676. doi: 10.1590/S1980-220X2019021703676 EDN: [JAVVIL](#)
18. Bromberger L, Heise B, Felbermayer K, et al. Radiation-induced alterations in multi-layered, in-vitro skin models detected by optical coherence tomography and histological methods. *PLoS One*. 2023;18(3):e0281662. doi: 10.1371/journal.pone.0281662 EDN: [ZXDUWC](#)
19. Kim JS, Park SH, Jang WS, et al. Gamma-ray-induced skin injury in the mini-pig: Effects of irradiation exposure on cyclooxygenase-2 expression in the skin. *J Radiat Prot Res*. 2015;40(1):65–72. doi: [10.14407/jrp.2015.40.1.065](#)
20. Kim JS, Jang H, Bae MJ, et al. Comparison of skin injury induced by β - and γ -irradiation in the minipig model. *J Radiat Prot Res*. 2017;42(4):189–196. doi: 10.14407/jrpr.2017.42.4.189
21. Calvo FA, Serrano J, Cambeiro M, et al. Intra-operative electron radiation therapy: An update of the evidence collected in 40 years to search for models for Electron-FLASH studies. *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):3693. doi: 10.3390/cancers14153693 EDN: [CQBI EW](#)
22. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and anti-inflammatory activity of ascorbic acid. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(10):1993. doi: 10.3390/antiox11101993 EDN: [BZOSDJ](#)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

AUTHORS INFO

Автор, ответственный за переписку:	
*Демьяшкин Григорий Александрович , д-р мед. наук; адрес: Россия, 249036, Обнинск, ул. Королёва, д. 4; ORCID: 0000-0001-8447-2600; eLibrary SPIN: 5157-0177; e-mail: dr.dga@mail.ru	*Grigory A. Demyashkin , Dr. Sci. (Medicine); address: 4 Korolyova st, 249036, Obninsk, Russia; ORCID: 0000-0001-8447-2600; eLibrary SPIN: 5157-0177; e-mail: dr.dga@mail.ru
Соавторы:	
Вадюхин Матвей Анатольевич ; ORCID: 0000-0002-6235-1020; eLibrary SPIN: 9485-7722 e-mail: vma20@mail.ru	Matvey A. Vadyukhin ; ORCID: 0000-0002-6235-1020; eLibrary SPIN: 9485-7722; e-mail: vma20@mail.ru
Марукян Анна Хачиковна ; ORCID: 0000-0002-4619-7385; eLibrary SPIN: 4320-6507; e-mail: Marukyan87@mail.ru	Anna Kh. Marukyan ; ORCID: 0000-0002-4619-7385; eLibrary SPIN: 4320-6507; e-mail: Marukyan87@mail.ru
Саакян Сюзанна Вачагановна ; ORCID: 0000-0001-8606-8716; eLibrary SPIN: 7742-1420; e-mail: drsaakyan@icloud.com	Susanna V. Saakyan ; ORCID: 0000-0001-8606-8716; eLibrary SPIN: 7742-1420; e-mail: drsaakyan@icloud.com
Каракаева Эльза Бахты-Гереевна ; ORCID: 0000-0001-9833-3433; eLibrary SPIN: 8221-3003; e-mail: kchr09@mail.ru	Elza B.-G. Karakaeva ; ORCID: 0000-0001-9833-3433; eLibrary SPIN: 8221-3003; e-mail: kchr09@mail.ru
Корякин Сергей Николаевич , канд. биол. наук; ORCID: 0000-0003-0128-4538; eLibrary SPIN: 8153-5789; e-mail: korsernic@mail.ru	Sergey N. Koryakin , Cand. Sci. (Biology); ORCID: 0000-0003-0128-4538; eLibrary SPIN: 8153-5789; e-mail: korsernic@mail.ru
Шаповалова Елена Юрьевна , д-р мед. наук, профессор; ORCID: 0000-0003-2544-7696; eLibrary SPIN: 5321-1246; e-mail: shapovalova_l@mail.ru	Elena Yu. Shapovalova , Dr. Sci. (Medicine), Professor; ORCID: 0000-0003-2544-7696; eLibrary SPIN: 5321-1246; e-mail: shapovalova_l@mail.ru
Канторович Алексей Александрович ; ORCID: 0009-0007-9370-3600; eLibrary SPIN: 9376-2847; e-mail: w.q.989@mail.ru	Alexey A. Kantorovich ; ORCID: 0009-0007-9370-3600; eLibrary SPIN: 9376-2847; e-mail: w.q.989@mail.ru
Андриевских Анастасия Сергеевна ; ORCID: 0009-0007-1787-5910; eLibrary SPIN: 4929-7862; e-mail: Andrievskikh2002@mail.ru	Anastasiia S. Andrievskikh ; ORCID: 0009-0007-1787-5910; eLibrary SPIN: 4929-7862; e-mail: Andrievskikh2002@mail.ru

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Концентрация малонового диальдегида и активность супероксиддисмутазы в гомогенатах кожи, толщина эпидермиса спустя 10 суток после облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты

Table 1. Concentration of malondialdehyde and activity of superoxide dismutase in skin homogenate as well as epidermis thickness 10 days after electron irradiation and administration of ascorbic acid

Группа	Малоновый диальдегид, нМоль/мг белка	Супероксиддисмутаза, Ед/мг белка	Толщина эпидермиса, мкм
Контрольная (I)	3,8±0,1	58,6±2,7	22,7±1,0
Облучение 40 Гр (II)	11,5±0,5*	44,7±2,1*	4,1±0,2*
Облучение 40 Гр + аскорбиновая кислота (III)	5,7±0,2**	53,9±2,5**	18,3±0,8**
Аскорбиновая кислота (IV)	3,7±0,1	54,6±2,6	22,2±1,0

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой (I); ** $p \leq 0,05$ по сравнению с группой после облучения 40 Гр (II).

Таблица 2. Количество кератиноцитов, экспрессирующих Ki-67 и каспазу-3, спустя 10 суток после облучения электронами и введения аскорбиновой кислоты

Table 2. The number of Ki-67 and caspase-3-positive keratinocytes 10 days after electron irradiation and administration of ascorbic acid

Группа	Количество клеток, %	
	Ki-67	Каспаза-3
Контрольная (I)	37,2±1,8	5,4±0,2
Облучение 40 Гр (II)	14,5±0,7*	35,5±1,7*
Облучение 40 Гр + аскорбиновая кислота (III)	28,7±1,3**	21,7±1,0**
Аскорбиновая кислота	39,3±1,9	5,7±0,2

Примечание. * $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой (I); ** $p \leq 0,05$ по сравнению с группой после облучения 40 Гр (II).

РИСУНКИ

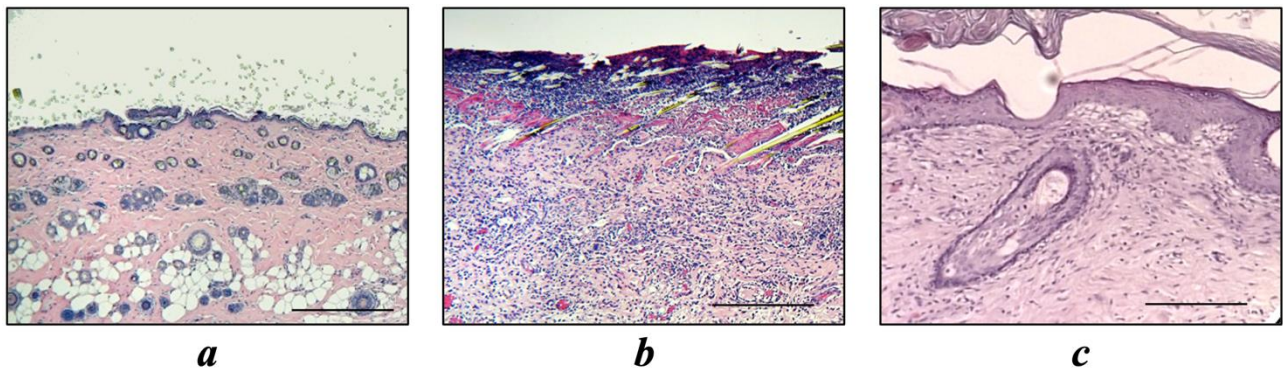


Рис. 1. Фрагменты кожи крыс на 10-е сутки эксперимента: *a* — контрольная (I) группа; *b* — после однократного облучения электронами в дозе 40 Гр (II группа); *c* — после предлучевого введения аскорбиновой кислоты (III группа). Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 100$, масштабный отрезок 50 мкм.

Fig. 1. Skin fragments on the 10th day of the experiment (I – III groups); stained with hematoxylin and eosin, magn. $\times 100$. A – control; B – after a single irradiation with electrons at a dose of 40 Gy; C – pre-irradiation administration of ascorbic acid. Scale bar 50 μm .

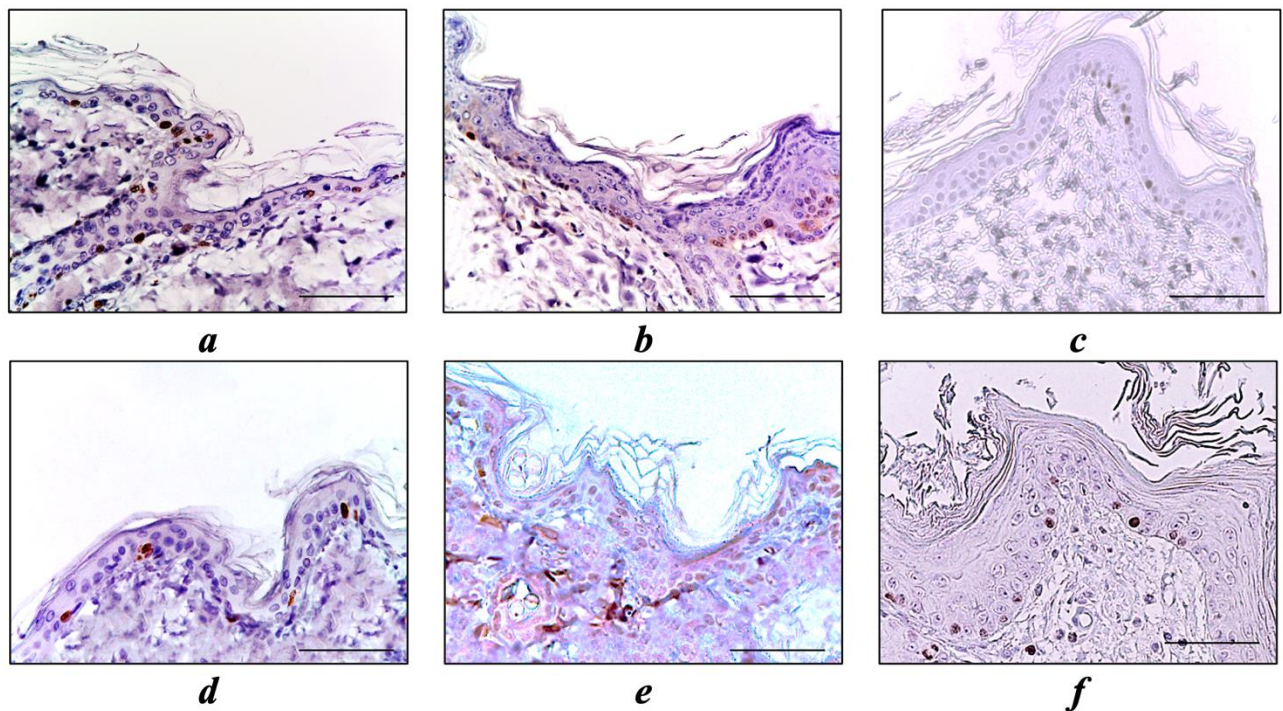


Рис. 2. Фрагменты кожи на 10-е сутки эксперимента, иммуногистохимическое исследование с докраской ядер гематоксилином Майера: *a–c* — антитела к Ki-67, *d–f* — антитела к каспазе-3; *a, d* — контрольная (I) группа; *b, e* — после однократного облучения электронами в дозе 40 Гр (II группа); *c, f* — после предлучевого введения аскорбиновой кислоты (III группа). Увеличение $\times 400$; масштабный отрезок 50 мкм.

Fig. 2. Immunohistochemical study of the skin on the 10th day of the experiment (I – III groups) with antibodies to the markers of proliferation – Ki-67 (A – C) and apoptosis – caspase 3 (D – F), magnification $\times 400$: A, D – control; B, E – after a single irradiation with electrons at a dose of 40 Gy; C, F – in the group of pre-irradiation administration of ascorbic acid (AA). Scale bar 50 μm .