

УДК 577.29

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И ПУЧКОВ ПРОТОНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO* НА МОДЕЛИ БЕСПОЗВОНОЧНОГО ЖИВОТНОГО

© 2025 г. Д. Т. Петросова^а, *, Д. В. Ускалова^а, О. В. Кузьмичева^а,
П. В. Шахов^б, С. Н. Корякин^{а,с}, Е. И. Сарапульцева^{а,б}

^а Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального
исследовательского ядерного университета “МИФИ”, Обнинск, 249040 Россия

^б Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^с Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал Национального медицинского
исследовательского центра радиологии МЗ РФ, Обнинск, Калужская обл, 249031 Россия

*E-mail: petrosovadianaa@gmail.com

Поступила в редакцию 03.05.2024 г.

После доработки 28.05.2024 г.

Принята к публикации 17.06.2024 г.

В статье проанализирована биоэффективность применения наночастиц золота (AuНЧ) сферической формы размером 50 нм в сочетании с облучением протонами в дозе 30 Гр (энергия 150 МэВ) с целью усиления цитотоксического эффекта бинарной терапии. Анализ проведен в опытах *in vivo* на примере модельного беспозвоночного животного из подотряда ракообразные *Daphnia magna*. Изучено биораспределение AuНЧ в организме животного и проанализирован биохимический эффект раздельного и сочетанного с облучением действия AuНЧ. Обнаружено накопление AuНЧ в кишечнике *D. magna*, а также в формирующихся яйцах и эмбрионах следующего поколения. МТТ- и МДА-тестом выявлено усиление наночастицами цитотоксического действия облучения.

Ключевые слова: наночастицы золота, облучение протонами, *Daphnia magna*, визуализация, цитотоксичность, МТТ-тест, малоновый диальдегид

DOI: 10.56304/S2079562925010166

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы золота (AuНЧ) имеют перспективу широкого применения в качестве радиосенсибилизаторов при клиническом использовании пучков протонов высокой энергии для лечения злокачественных новообразований [1–5]. Анализ результатов и схем исследований выявил значительные различия в экспериментальных условиях. В первую очередь обращает на себя внимание различие в размере, форме и функционализации используемых AuНЧ. Вариация свойств и геометрии поверхности AuНЧ играют важную роль в биораспределении и биодоступности внутри организма. Например, обнаружено, что сферические AuНЧ не вызывают цитотоксический эффект в клетках остеобластов плода человека, остеосаркомы и протоков поджелудочной железы [6]. Однако, AuНЧ размером 50 нм и более, накапливаясь в кровяном русле и костном мозге, вызывают биохимические нарушения в печени и почках мышей [7]. За счет того, что AuНЧ химически инертны и легко функционализируются, их широко используют

также в пищевой промышленности [8] и электронике [9].

Целью данного исследования являлся анализ распределения в организме и эффективность применения AuНЧ сферической формы размером 50 нм в сочетании с облучением протонами в дозе 30 Гр (энергия 150 МэВ) для усиления цитотоксического эффекта бинарной терапии. Анализ выполнен на примере модельного беспозвоночного животного из подотряда ракообразные *Daphnia magna*.

D. magna является распространенной моделью для радиобиологических исследований и экотоксикологического тестирования наноматериалов из-за ее чувствительности к изменениям окружающей среды, клонального размножения, простоты культивирования, прозрачного тела и малых размеров [10–12]. Дафнии естественным образом поглощают частицы из толщи воды, являясь фильтраторами, и накапливают их в кишечнике в течение 6–12 ч после воздействия [13–15]. Проведенный нами ранее анализ выживаемости *D. magna* в 21-суточном эксперименте показал 1.5-крат-

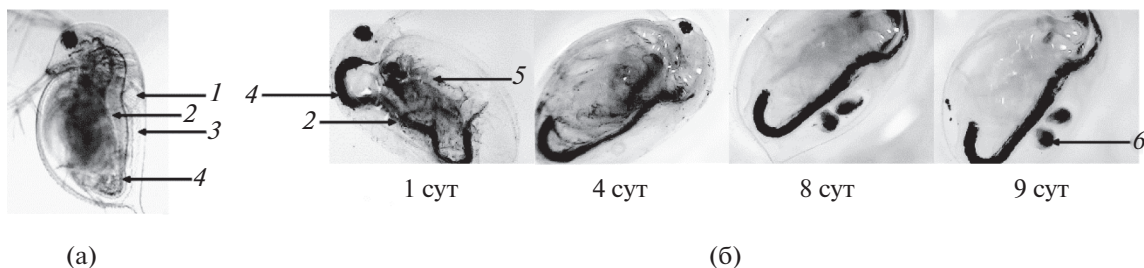


Рис. 1. *D. magna* (а) до начала эксперимента и (б) на 1, 4, 8, и 9 сутки после культивирования животных в растворе АuНЧ: 1 – сердце, 2 – яичник, 3 – выводковая камера, 4 – кишечник, 5 – грудные конечности, 6 – эмбрионы в выводковой камере.

ное усиление наночастицами золота токсического эффекта облучения протонами [16].

Новорожденную молодь и погибших животных регулярно удаляли. Воду меняли раз в месяц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика наночастиц

АuНЧ были синтезированы в лаборатории “Бионанوفотоники” НИЯУ МИФИ. В результате лазерной абляции мишени золота был получен стабильный коллоидный раствор сферических наночастиц золота, размер которых равен 50 нм со стандартным отклонением 13 нм. Поверхностный заряд составил -30 мВ. Размер и характеристики АuНЧ контролировали спектрофотометрическим методом [17]. Из литературы известно, что АuНЧ в концентрации 10 мкг/мл оказывают радиосенсибилизирующее действие на клетки [18].

Облучение протонами

Острое облучение *D. magna* проводили на протонном комплексе “Прометеус” в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск) сканирующим пучком протонов (энергия 150 МэВ) в дозе 30 Гр до пика Брэгга (прострельное облучение), как наиболее перспективное расположение применительно к бинарным технологиям [1]. Во время облучения животные находились в пластиковых флаконах-матрасах с 20 мл культуральной воды (высота водяного столба 2 см, горизонтальный вывод пучка).

Культивирование *D. magna*

Культура *D. magna* Straus в течение более 15 лет культивируется в лаборатории отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ в соответствии с международным протоколом [19]. Маточную культуру содержали в климатостате (модель Р2, Россия) в стеклянных сосудах объемом 500 мл с плотностью посадки до 10 особей в режиме свет-тьма 12 : 12 ч при оптимальной температуре 20°C, поддерживаемой терморегулятором. Кормили животных через сутки суспензией зеленых водорослей (*Chlorella vulgaris*) в концентрации 2 мг С/л.

Визуализация биораспределения наночастиц золота

Для оценки биораспределения АuНЧ десять *D. magna* были отобраны из маточной культуры и перенесены в отдельный сосуд. Перед началом эксперимента животных не кормили неделю, чтобы очистить кишечник от хлореллы. Полученную односукточную новорожденную молодь брали в эксперимент (рис. 1а).

Животных помещали в раствор АuНЧ ($C = 10$ мкг/мл) на 24 ч. По истечении времени инкубации отмывали от наночастиц, перенося пластиковой пипеткой на 15–20 мин в чистую культуральную воду, и проводили первую фото- и видеосъемку с использованием системы визуализации, включающей в себя портативную цифровую камеру W05A (Китай) с увеличением 10 \times , подключенную к компьютеру Pentium IV. Для визуализации *D. magna* поодиночно размещали на предметном стекле в капле воды. Съемку проводили не более минуты, после чего животных возвращали в культуральные стаканы. Визуализацию проводили на ежедневной основе до появления первого помета. Обработку изображения осуществляли в лицензированной программе DLScope. Животных в ходе эксперимента не кормили.

Схема эксперимента

Для анализа механизмов раздельного и сочетанного действия исследуемых факторов односуточных *D. magna* из маточной культуры распределяли на следующие группы: контроль; облучение; АuНЧ и (АuНЧ + облучение). Животных культивировали в лабораторных стаканах объемом 150 мл по 50 особей на сосуд. *D. magna* из контрольной группы не подвергали воздействию исследуемых факторов. В растворе АuНЧ (10 мкг/мл) животных выдерживали 24 ч, затем отмывали от наночастиц, пересаживая пластиковой пипеткой в чистую культуральную воду. Для облучения протонами жи-

вотных переносили в пластиковые контейнеры с 20 мл культуральной воды.

МТТ-анализ цитотоксического действия исследуемых факторов

Интегральную характеристику цитотоксического действия облучения протонами и AuНЧ проводили МТТ-тестом, который демонстрирует активность митохондриальных дегидрогеназ, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов по изменению оптической плотности (ОП) перехода бесцветного 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола (МТТ) в фиолетово окрашенный формазан [20]. Цитотоксичность оценивали по модифицированной для работы с беспозвоночными животными методике [21].

Анализ проводили на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology, США, VIS-модель) при длине волны 492 нм (фоновая 630 нм). Для этого по 20 животных из контрольной и каждой экспериментальной группы помещали в микропробирки типа “Эппендорф”. После удаления воды к суспензии добавляли 100 мкл водного раствора 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. Далее 100 мкл суспензии каждого образца переносили в лунки 96-луночного планшета. Согласно методике [20], ОП образцов пропорциональна количеству формазана, образованного при восстановлении МТТ дегидрогеназами живых клеток. Всего в контрольных и экспериментальных группах было проанализировано от 11 до 47 образцов.

МДА-анализ цитотоксического действия исследуемых факторов

Малоновый диальдегид (МДА) является конечным продуктом перекисного окисления липидов. Благодаря этому свойству МДА используют в качестве маркера окислительного стресса в организме [22].

Для анализа накопления МДА из контрольной и каждой экспериментальной группы отбирали по 50 животных и помещали в микропробирки типа “Эппендорф”. Воду в эппендорфах замещали на физраствор (80 мкл). Образцы с *D. magna* механически гомогенизировали, добавляли реакционную смесь (рН = 3.5) в объеме 200 мкл, содержащую 0.57% тиобарбитуровой кислотой (ТБК), 10% уксусной кислоты, 0.8% SDS. Далее образцы инкубировали на водяной бане 60 мин при 95°C. ОП измеряли на планшетном спектрофотометре Mul-

tiskan FC (Thermoscientific instruments Co, Ltd (Китай) при длине волны 530 нм. МДА представляет собой органическое соединение с трехчленной углеродной цепью и двумя альдегидными группами на концах, который, реагируя с ТБК, образует три-метиновый комплекс. Количество образованного триметинового комплекса пропорционально количеству прореагировавшего МДА [22]. Всего в контрольных и экспериментальных группах было от 5 до 13 образцов.

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили по критерию Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение в программе STATISTICA 8. Для оценки вклада исследуемых факторов в наблюдаемый эффект проведен двухфакторный ANOVA-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

D. magna, культивируемые в лабораторных условиях, имеют короткий жизненный цикл, который редко превышает 2–3 месяца. При температуре около 20°C *D. magna* производит партеногенетические (амейотические) яйца [12]. Ранний эмбриогенез начинается, когда яйцо созревает на пути к выводковой сумке к двухсуточному возрасту животных. Выход эмбрионов из яиц происходит примерно на 3–4 сутки, однако, они остаются в выводковой сумке еще около трех суток. Период половозрелости начинается на 8–10 сут. Как правило, в первом помете бывает от одного до пяти новорожденных. Далее в оптимальных условиях (освещение, температура, рН, O₂) каждые трое – четверо суток самка производит партеногенетические яйца и вымет молоди. В помете бывает от 10 до 30 и более новорожденных [23].

На рис. 16 представлено распределение AuНЧ в теле *D. magna* после культивирования односуточных животных в растворе наночастиц в течение 24 ч. Видно, что AuНЧ попадают в организме *D. magna* через кишечник в результате фильтрации уже на первые сутки. Наши данные согласуются с результатами, полученными методом конфокальной микроскопии [13]. В цитируемой статье также обнаружено, что поглощенные AuНЧ повышали образование активных форм кислорода в кишечнике *D. magna*, на что указывала ярко-зеленая флуоресценция в цитоплазме энтероцитов после 24-часового воздействия наночастицами. Нами обнаружено налипание AuНЧ на грудные конечности *D. magna* в области эпиподит, что может вызывать блокировку дыхания и создать условия гипоксии во время облучения [23]. Из рисунка также видно, что наночастицы находятся в районе яичников и, видимо, проникают внутрь, т.к. на 8 и 9 сутки визуализируются вышедшие в вы-

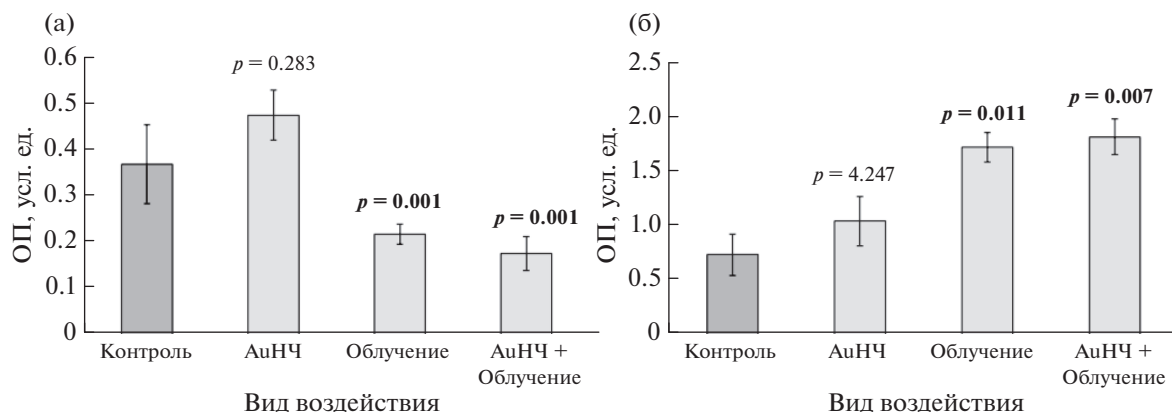


Рис. 2. Изменение МТТ- (а) и МДА- (б) показателей в единицах ОП в клетках *D. magna* в контроле, при облучении животных протонами в дозе 30 Гр, воздействии AuNC в концентрации 10 мкг/мл и при сочетанном действии облучения с AuNC.

водковую камеру эмбрионы, наполненные AuNC. Наши данные согласуются с исследованиями, в которых методом конфокальной микроскопии обнаружено, что квантовые точки — разновидность металлических наночастиц, накапливались в кишечнике и яйцах *D. magna* [24]. С помощью электронного микроскопа авторы цитируемой статьи обнаружили накопление наночастиц в ворсинках кишечника.

На рис. 2 приведены медианные значения и доверительные интервалы МТТ- и МДА-показателей в единицах ОП, которые характеризуют уровень окислительного стресса в клетках экспериментальных и контрольных *D. magna*.

Из рис. 2а видно, что облучение и сочетанное с наночастицами действие вызывали цитотоксический эффект. Наше более раннее исследование на модели другого беспозвоночного из подтипа плоские черви *Schmidtea mediterranea* также выявило цитотоксический эффект облучения протонами в дозе 30 Гр, приводивший к нарушению регенерации тканей животного [25]. Цитотоксичность AuNC была не значима. Двусторонний ANOVA-анализ показал усиление эффекта при взаимодействии AuNC с облучением ($p = 6.74 \cdot 10^{-7}$). Вклад в сочетанный эффект вносили наночастицы ($p = 1.58 \cdot 10^{-5}$), а не облучение ($p = 0.204$). Снижение жизнеспособности клеток, выявленное нами ранее [16], а также усиление цитотоксичности при совместном действии факторов, обнаруженное в данном исследовании, можно объяснить уходом клеток в апоптоз, что было описано и другими авторами [26].

На рис. 2б видно, что облучение протонами в дозе 30 Гр вызывает значимое увеличение продукции МДА, что свидетельствует об усилении токсического эффекта за счет перекисного окисления липидов мембран [22]. AuNC не оказывали цитотоксического действия на клетки эксперимен-

тальных животных. При сочетанном действии с облучением наблюдали значимый радиационно-индуцированный эффект сенсibilизации ($p = 0.007$). Наши данные согласуются с результатами исследования, проведенного на самцах крыс линии Вистар [27]. В цитируемой статье AuNC (1000 мг/кг) перорально вводили животным за один час до облучения гамма-квантами (7 Гр). Через сутки после облучения в тканях коры головного мозга и гиппокампа экспериментальных животных был обнаружен повышенный уровень биомаркеров окислительного стресса — МДА и глутатионпероксидазы, а также уменьшение фрагментации ДНК и гистопатологические изменения в исследуемых тканях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании обнаружено, что при суточном культивировании модельных беспозвоночных животных *D. magna* в водной среде с AuNC (10 мкг/мл), происходит поступление наночастиц в кишечник животных, о чем свидетельствует длительная визуализация с помощью портативной цифровой камеры W05A (Китай). AuNC поступают в яйцники животных, а далее в формирующиеся к 9-суточному возрасту в теле экспериментальных животных яйца и эмбрионы.

Облучение пучками протонов в дозе 30 Гр вызывало снижение МТТ-показателя в клетках облученных животных. Двусторонний ANOVA-анализ показал усиление эффекта при взаимодействии AuNC с облучением. Вклад в сочетанный эффект вносили наночастицы. Содержание МДА, как конечного продукта перекисного окисления липидов клеточных мембран и маркера окислительного стресса в клетках, значимо усиливалось при комбинированном действии AuNC с облучением.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 23-24-10041. Облучение осуществлено на оборудовании ЦКП “Радиологические и клеточные технологии” ФГБУ “НМИЦ радиология” Минздрава России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Бушманов А.Ю., Шейно И.Н., Липенгольц А.А., Соловьев А.Н., Корякин С.Н. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64 (3). С. 11–18. https://doi.org/10.12737/article_5cf237bf846b67.57514871
2. Peukert D., Kempson I., Douglass M., Bezak E. // Med. Phys. 2020. V. 47 (2). P. 651–661. <https://doi.org/10.1002/mp.13923>
3. Liu A., Ye B. // Clin. Lab. 2013. V. 59. P. 23–36.
4. Финогенова Ю.А., Липенгольц А.А., Скрибицкий В.А., Шпакова К.Е., Смирнова А.В., Скрибицкая А.В., Сычева Н.Н., Григорьева Е.Ю. // Медицинская физика. 2023. №3. С. 70–86. <https://doi.org/10.52775/1810-200x-2023-99-3-70-86>
5. Марченков Н.С., Марченко Н.В. // Медицинская физика. 2014. № 4 (64). С. 64–77.
6. Steckiewicz K.P., Barcinska E., Malankowska A., Zauszkiewicz-Pawlak A., Nowaczyk G., Zaleska-Medynska A., Inkieliewicz-Stepniak I. // Mater. Sci. Mater. Med. 2019. V. 30 (22). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6221-2>
7. Zhang X.-D., Wu D., Shen X., Liu P.-X., Yang N., Zhao B., Zhang H., Sun Y.-M., Zhang L.-A., Fan F.-Y. // Int. J. Nanomed. 2011. V. 6. P. 2071–2081. <https://doi.org/10.2147/IJN.S21657>
8. Shah V., Belozherova I. // Water Air Soil Pollut. 2009. V. 197. P. 143–148.
9. Tsoukalas D. // Philos. Trans. R. Soc. A. 2009. P. 4169–4179.
10. Baun A., Hartmann N.B., Grieger K., Kusk K.O. // Ecotoxicology. 2008. V. 17 (5). P. 387–395. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0208-y>
11. Fuller N., Lerebours A., Smith J.T., Ford A.T. // Aquat. Toxicol. 2015. V. 167. P. 55–67. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.013>
12. Сарапульцева Е.И. // Радиационная биология. Радиоэкология 2017. Т. 57 (4). С. 414–428.
13. Feswick A., Griffitt R.J., Siebein K., Barber D.S. // Aquat Toxicol. 2013. V. 15 (130–131). P. 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.002>
14. Lee B.T., Ranville J.F. // Hazard. Mater. 2012. V. 30. P. 213–214; 434–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.02.025>
15. Lovern S.B., Owen H.A., Klaper R. // Nanotoxicology. 2008. V. 2. P. 43–48.
16. Петросова Д.Т., Ускалова Д.В., Кузьмичева О.В., Сабуров В.О., Сарапульцева Е.И. // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69 (4). С. 13–19.
17. Скрибицкий В.А., Позднякова Н.В., Липенгольц А.А., Попов А.А., Тихоновский Г.В., Финогенова Ю.А., Смирнова А.В., Григорьева Е.Ю. // Биофизика. 2021. Т. 67 (1). С. 30–36. <https://doi.org/10.31857/S0006302922010045>
18. Cunningham C., de Kock M., Engelbrecht M., Miles X., Slabbert J., Vandevoorde C. // Front. Public Health. 2021. V. 29 (9). P. 699822.
19. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2. 2012. <https://doi.org/10.1787/20745761>
20. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols. 2nd Ed. Cree I.A. (Ed.). 2011. New York: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_P.237-244
21. Сарапульцева Е.И., Рябченко Н.И., Иголкина Ю.В., Иванник Б.П. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т. 53 (6). С. 634–638.
22. Belaid C., Sbartaï I. // Chemosphere. 2021. V. 268. P. 128808.
23. Kwon D., Kim M.J., Park C., Park J., Choi K., Yoon T.H. // Aquatic Toxicol. 2012. V. 114. P. 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.033>
24. Smirnov N. Physiology of the Cladocera. 2017. Boston: Academic.
25. Жалнина А.А., Ускалова Д.В., Савина Н.Б., Якимова А.О., Сарапульцева Е.И. // Тез. докл. XVI Междунар. конф. “Безопасность АЭС и подготовка кадров”. 26–27 окт. 2023. Обнинск, Россия. 2023. Обнинск: ООО “Оптим-Пресс”. С. 201–203.
26. Tian F., Clift M.J.D., Casey A., del Pino P., Pelaz B., Conde J., Byrne H.J., Rothen-Rutishauser B., Estrada G., de la Fuente J.M., Stoeger T. // Nanomedicine. 2015. V. 10. P. 2643–2657. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.103>
27. Fawzy N., El-Batal A., Yara A., Hawas A., Hassan S., Eid N. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 9640. <https://doi.org/10.3390/ijms23179640>

Combined Effect of Gold Nanoparticles and Proton Beams in *In Vivo* Experiments with Invertebrates

D. T. Petrosova^{1, *}, D. V. Uskalova¹, O. V. Kuzmicheva¹,
P. V. Shakhov², S. N. Koryakin^{1, 3}, and E. I. Sarapultseva^{1, 2}

¹ Obninsk Institute of Nuclear Power Engineering, National Research Nuclear University MEPhI
(Moscow Engineering Physics Institute), Obninsk, Kaluga oblast, 249040 Russia

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

³ Tsyb Medical Radiological Research Centre, National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health
of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga oblast, 249036 Russia

*e-mail: petrosovadianaa@gmail.com

Received May 3, 2024; revised May 28, 2024; accepted June 17, 2024

Abstract—The article analyzes the effectiveness of using spherical gold nanoparticles (AuNPs) with a size of 50 nm in combination with proton irradiation at a dose of 30 Gy (energy 150 MeV) in order to enhance the cytotoxic effect of binary therapy. The analysis was carried out *in vivo* experiments using the model invertebrate animal *Daphnia magna*. The biodistribution of AuNPs in the animal body was studied and the biochemical effect of the separate and combined action of the AuNPs with irradiation was analyzed. Accumulation of AuNPs in the intestine as well as in the eggs and embryos of the next generation was detected. Analysis of the level of free radicals and malondialdehyde revealed an increase in the cytotoxic effect of irradiation with nanoparticles.

Keywords: gold nanoparticles, proton irradiation, *Daphnia magna*, visualization, cytotoxicity, MTT test, malondialdehyde