

Д.Т. Петросова¹, Д.В. Ускалова¹, О.В. Кузьмичева¹, В.О. Сабуров³, Е.И. Сарапульцева^{1,2}

УСИЛЕНИЕ НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ В ОПЫТАХ *IN VIVO*

¹ Обнинский институт атомной энергетики, Обнинск

² Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

³ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба Минздрава России, Обнинск

Контактное лицо: Диана Тиграновна Петросова, e-mail: petrosovad@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Цель: Оценить биоэффективность и биобезопасность совместного применения в биомедицине и возможного воздействия на окружающую среду облучения протонами и наночастиц золота (AuНЧ) на модели высшего беспозвоночного животного из подотряда ракообразные *Daphnia magna* в опытах *in vivo*.

Материал и методы: Синтез AuНЧ осуществляли одностадийным методом фемтосекундной лазерной абляции. В качестве модельного тест-организма использовали лабораторную культуру *Daphnia magna*. Культивировали животных в оптимальных условиях климатостата (модель Р2). Биологические показатели (выживаемость, плодовитость и цитотоксичность) оценивали в двух последовательных поколениях (F_0) и (F_1). Острому облучению подвергали только животных родительского поколения (F_0) на протонном комплексе «Прометеус» сканирующим пучком протонов (энергия 150 МэВ). Выживаемость и плодовитость *D. magna* оценивали в 21-суточном эксперименте на ежедневной основе. Всего было проанализировано от 10 до 60 особей в контрольных и экспериментальных группах. Цитотоксичность анализировали модифицированным для исследования эффекта на беспозвоночных животных в опытах *in vivo* MTT-тестом на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (США, VIS-модель). На цитотоксичность проанализировано от 11 до 97 образцов. В каждом образце было по 20 десятисуточных животных. Результаты обработаны методами математической статистики с поправкой на множественное сравнение.

Результаты: Облучение в дозах 10 и 30 Гр вызывало снижение выживаемости животных, которое усиливалось AuНЧ в 1,35 раза. Нарушение репродуктивной функции обнаружено как в облученном, так и в первом поколении животных. Применение НЧ не вызывало оксидативный стресс у *D. magna*, однако усиливало цитотоксическое действие облучения протонами. Вклад в цитотоксический эффект вносили AuНЧ.

Выводы: Поскольку полученные результаты согласуются с данными, опубликованными в цитируемых работах на позвоночных животных, можно предположить универсальный механизм цитотоксического действия облучения протонами в сочетании с AuНЧ как на беспозвоночных, так и позвоночных животных, включая человека и возможность применения AuНЧ в качестве радиосенсибилизаторов для усиления эффекта облучения в бинарных технологиях протонной терапии.

Ключевые слова: *Daphnia magna*, протоны, наночастицы золота, жизнеспособность, плодовитость, цитотоксический эффект, трансгенерационный эффект

Для цитирования: Петровова Д.Т., Ускалова Д.В., Кузьмичева О.В., Сабуров В.О., Сарапульцева Е.И. Усиление наночастицами золота цитотоксического действия облучения протонами в опытах *in vivo* // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 4. С. 13–19. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-13-19

DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-13-19

D.T. Petrosova¹, D.V. Uskalova¹, O.V. Kuzmicheva¹, V.O. Saburov³, E.I. Sarapultseva^{1,2}

Enhancement of the Cytotoxic Effect of Proton Irradiation by Gold Nanoparticles

¹ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, Obninsk, Russia

² National Research Nuclear University “MEPhI”, Moscow, Russia

³ A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center, Obninsk, Russia

Contact person: D.T. Petrosova, e-mail: petrosovad@yandex.ru

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the bioefficiency and biosafety of proton irradiation in combination with gold nanoparticles (AuNPs) on a model of a higher invertebrate animal *Daphnia magna* from the suborder crustaceans in *in vivo* experiments.

Materials and methods: The synthesis of AuNPs was carried out by a single-stage method of femtosecond laser ablation. A laboratory culture of *Daphnia magna* (*D. magna*) was used. Animals were cultured in a climatostat (model P2). Biological parameters (viability, fertility and cytotoxicity) were evaluated in two consecutive generations (F_0) and (F_1). Only animals of the parental generation (F_0) were exposed to acute irradiation with a scanning proton beam (energy 150 MeV) on the Prometheus proton complex. Viability and fertility *D. magna* were evaluated in a 21-day experiment on a daily basis. A total of 10 to 60 individuals were analyzed in control and experimental groups. Cytotoxicity was analyzed by an MTT test modified for studies of the effect on invertebrates in *in vivo* experiments. From 11 to 97 samples were analyzed for cytotoxicity. There were 20 animals in each sample. The results are analyzed by methods of mathematical statistics adjusted for multiple comparisons.

Results: Irradiation at doses of 10 and 30 Gy caused a decrease in animal viability, which was increased in 1.35 times. Reproductive dysfunction was found in both irradiated and first-generation animals. The use of AuNPs did not cause oxidative stress in *D. magna*, but increased the cytotoxic effect of proton irradiation. AuNPs contributed to the cytotoxic effect.

Conclusions: Since the results obtained are consistent with the data published in the cited articles on vertebrates, it is possible to assume a universal mechanism of cytotoxic effect of proton irradiation in combination with AuNPs on both invertebrates and vertebrates, including humans, and the possibility of using AuNPs as radiosensitizers to enhance the effect of irradiation in binary proton therapy technologies.

Keywords: *Daphnia magna*, protons, gold nanoparticles (AuNPs), viability, fertility, cytotoxicity, transgeneration effect

For citation: Petrosova DT, Uskalova DV, Kuzmicheva OV, Saburov VO., Sarapultseva E.I. Enhancement of the Cytotoxic Effect of Proton Irradiation by Gold Nanoparticles. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(4):13–19. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-4-13-19

Введение

Наночастицы золота (AuНЧ) имеют перспективы широкого применения в биомедицине в качестве средств адресной доставки лекарственных препаратов, контрастных веществ или сенсибилизаторов радиотерапии [1, 2]. Однако вызывают обеспокоенность известные факты токсичности наночастиц (НЧ) для разных представителей биоты в связи с их растущим использованием в коммерческих продуктах и потенциальным выделением в окружающую среду через отходы потребительских товаров, биомедицинских химиков, продуктов сельского хозяйства и промышленности [3]. В исследованиях на водных беспозвоночных *Daphnia magna* была обнаружена высокая токсичность ацетилированных и карбоксилированных углеродных нанотрубок, используемых для улучшения физико-механических свойств текстиля [4]. Наночастицы золота (AuНЧ) активно изучаются на предмет их биодоступности и биобезопасности в медицинских целях.

Поскольку за последнее десятилетие существенно увеличилось количество установок протонной терапии и клинически используются пучки протонов высокой энергии совместно с НЧ тяжелых металлов для лечения рака, целью данного исследования было оценить биоэффективность и биобезопасность раздельного и сочетанного действия облучения протонами и наночастиц золота (AuНЧ) на модели высшего беспозвоночного животного из подотряда ракообразные *D. magna* в опытах *in vivo*.

D. magna является распространенной моделью для радиобиологических исследований и экотоксикологического тестирования наноматериалов из-за ее чувствительности к изменениям окружающей среды, клonalного размножения и простоте культивирования [5, 6]. Дафниды естественным образом поглощают частицы из толщи воды или из донных отложений, являясь фильтраторами, они легко поглощают и накапливают НЧ в кишечнике в течение 6–12 ч после воздействия [7].

AuНЧ выбраны для тестирования, поскольку они легко функционализируются, химически инертны, а также в связи с их широким использованием в биомедицинских исследованиях, пищевой промышленности и электронике [1, 8, 9]. Для выявления механизмов, ответственных за токсичность AuНЧ, изучены молекулярно-клеточные реакции, которые происходят при контакте с тканями внутри организма. В частности, окислительный стресс свидетельствует о повреждении и/или восстановлении клеток, а также является естественной реакцией на инородный объект.

Материал и методы

Общая характеристика наночастиц золота

Синтез AuНЧ был осуществлен в лаборатории «Бионанофотоники» (ИФИБ НИЯУ МИФИ) одностадийным методом фемтосекундной лазерной абляции в водном растворе 1 mM NaCl. Для синтеза использовали Nd:YAG лазер (длина волны 1030 нм, длительность импульсов 270 фс, частота импульсов 200 кГц, энергия в импульсе

75 мкДж) (ТЕТА-20, Авеста, Москва, Россия). В результате лазерной абляции мишени Au был получен стабильный коллоидный раствор сферических AuНЧ размером 50 нм со стандартным отклонением 13 нм. Массовая концентрация золота в растворе составляла 59,5 мкг/мл. Размеры и характеристики AuНЧ контролировали спектрофотометрическим методом [10].

Культивирование тест-организма

В качестве модельного тест-организма использовали беспозвоночных животных *D. magna*, культивируемых более 12 лет в оптимальных условиях лаборатории отделения биотехнологий ИАТЭ НИЯУ МИФИ в климатостате (модель Р2) в дехлорированной дважды фильтрованной водопроводной воде согласно международному протоколу [11]. Кормление осуществляли суспензией одноклеточных водорослей *Chlorella vulgaris* в концентрации 0,2 мг С на особь в день (2 мг С/л). Жизненный цикл *D. magna* в лабораторных условиях составляет около 10–11 недель. Период партеногенетического созревания животных длится около 9 сут, после чего каждая особь начинает вымет новорожденной молоди с периодичностью 3–5 сут. Помет может достигать от 1 до 20–30 особей. В эксперимент отбирали одно- и двухсуточных животных из третьего помета маточной культуры.

Анализ жизнеспособности тест-организма по критериям выживаемости и плодовитости

Выживаемость и плодовитость *D. magna* в родительском поколении (F_0) оценивали в 21-суточном эксперименте на ежедневной основе в контрольной и экспериментальных группах. Культивировали *D. magna* по одной особи в 50 мл лабораторных стеклянных стаканах в климатостате (модель Р2) при температуре 20 ± 1 °C, автоматическом регулировании освещения 12/12 день/ночь и вентилировании. Культуральную среду меняли еженедельно. Новорожденных и погибших животных учитывали и удаляли из экспериментальных сосудов. Кормили через сутки суспензией *Ch. vulgaris* в концентрации 2 мгС/л. В каждой контрольной и экспериментальной группе было от 10 до 60 особей. Первое поколение (F_1) было получено из третьего помета соответствующей группы родительского поколения. Культивирование животных в первом поколении проводили в 21-суточном эксперименте по той же схеме, что и в родительском поколении (F_0), только без воздействия.

Молекулярно-клеточные механизмы токсического действия исследуемых факторов

Цитотоксичность исследуемых факторов анализировали МТТ-тестом, который интегрально характеризует активность митохондриальных дегидрогеназ, соотношение живых и мертвых клеток и работу системы антиоксидантных ферментов [12]. Анализ проведен на планшетном иммуноферментном анализаторе StatFax 2100 (Awareness Technology, США, VIS-модель) при длине волны 492 нм (фоновая 630 нм) по переходу бесцветного 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола

(МТТ) в фиолетово окрашенный формазан. Оценку МТТ-показателя провели по изменению оптической плотности (ОП) подготовленных образцов из экспериментальных и контрольных групп животных в родительском (F_0) и первом (F_1) поколениях. Согласно методике, ОП образов пропорциональна количеству формазана, образованного при восстановлении МТТ дегидрогеназами живых клеток. Всего в контрольных и экспериментальных группах было проанализировано от 11 до 97 образцов. В каждом образце было по 20 десятисуточных животных.

Облучение пучками протонов

Острое облучение родительского поколения (F_0) *D. magna* проводили на протонном комплексе «Прометеус» в МРНЦ им. А.Ф. Цыба (Обнинск, Россия) сканирующим пучком протонов (энергия 150 МэВ), покрывающим зону 65×70 мм с равномерностью 99 %. Размер одиночного пучка составлял $7,1 \times 6,4$ мм. Длительность вывода пучка – 150 мс, пауза между циклами – 1,8 с. Исследование проведено для варианта протонного облучения с пиком Брэгга, находящимся за пределами тест-объекта («прострельное» облучение).

Схема эксперимента

Односуточных *D. magna* из третьего помета отбирали в эксперимент и помещали в культуральную воду, распределив на следующие группы: контроль; облучение – 3, 10 и 30 Гр; наночастицы (НЧ); НЧ + 3 Гр; НЧ + 10 Гр и НЧ + 30 Гр.

D. magna из контрольной группы не подвергали воздействию исследуемых факторов и до 21-суточного возраста культивировали поодиночно в 50 мл культуральной среды в стеклянных лабораторных стаканах в условиях климатостата для анализа выживаемости и плодовитости. Для облучения протонами односуточ-

ных животных соответствующих групп переносили в пластиковые контейнеры с 20 мл культуральной воды. Облучение в дозах 3–30 Гр занимало от 15 до 30 мин. После облучения животных рассаживали поодиночно в стеклянные лабораторные стаканы с 50 мл и культивировали до 21-суточного возраста в условиях климатостата. В растворе AuНЧ животных выдерживали 24 ч, затем поодиночно рассаживали в лабораторные стаканы для дальнейшего наблюдения за выживаемостью и плодовитостью. В экспериментальных группах, где проводили анализ сочетанного действия облучения и НЧ, манипуляции выполняли в последовательности, прописанной в схеме эксперимента.

Биологические показатели (выживаемость, плодовитость и цитотоксичность) оценивали в двух последовательных поколениях (F_0) и (F_1). Воздействию подвергали только животных родительского поколения (F_0). В первом поколении (F_1) исследовали трансгенерационные эффекты.

Статистический анализ

Анализ динамики выживаемости проводили методом Каплана–Мейера. Сравнение проводили пермутационным омнибус-тестом KONP [13] в программе R с поправкой на множественное сравнение тестом Стила. Для анализа плодовитости и цитотоксичности использовали непараметрические критерии Крускала–Уоллиса для нескольких групп сравнения и Манна–Уитни для парных сравнений с поправкой Стила.

Результаты и обсуждение

Выживаемость *Daphnia magna* в родительском (F_0) и первом (F_1) поколении

На рис. 1 показана динамика выживаемости *D. magna* в контроле и после облучения пучками протонов, а так-

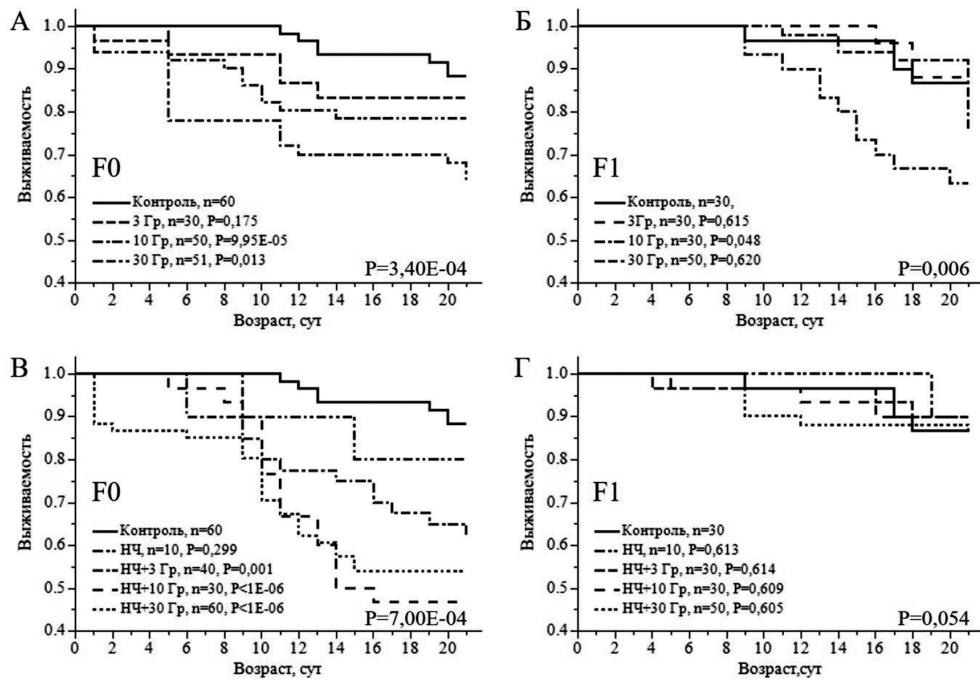


Рис. 1. Доля выживших *Daphnia magna* в контроле и после облучения пучками протонов в дозах 3, 10 и 30 Гр (А, Б), а также при взаимодействии облучения с наночастицами (НЧ) золота (В, Г) в родительском (F_0) и первом поколениях (F_1). На графиках показаны скорректированные тестом Стила вероятности (P) отличия от контроля и исходные размеры выборки (n) для всех групп, а также вероятности по всей выборке

Fig. 1. The proportion of *Daphnia magna* survivors in the control and after irradiation with proton beams at doses of 3, 10 and 30 Gy (A, B), as well as during the interaction of irradiation with gold nanoparticles (B, Г) in the parent (F_0) and first generations (F_1). The graphs show the probabilities adjusted by the Steele test (P) of differences from the control and the initial sample sizes (n) for all groups, as well as probabilities for the entire sample

же при взаимодействии с НЧ золота в двух поколениях. Из рис. 1А видно, что выживаемость экспериментальных *D. magna* к 21-суточному возрасту снижалась на 5–28,3 % при облучении в дозах 3–30 Гр. Трансгенерационный эффект облучения не наблюдали (рис. 1Б). НЧ в концентрации 10 мкг/мл снижали выживаемость не более чем на 8 % (рис. 1В). Согласно данным из литературы, полулетальная концентрация AuНЧ для *D. magna* составляет около 65–75 мкг/мл [14]. AuНЧ усиливали эффект облучения протонами примерно в 1,35 раз при их сочетанном действии на животных (рис. 1В, $p = 0,001$ и 10^{-6}). Эффект взаимодействия нивелировался в первом поколении (рис. 1Г). Согласно проведенному анализу, в контрольных выборках животных из родительского и первого поколений значимых отличий в выживаемости не обнаружено ($p = 0,345$).

В табл. 1 представлены результаты по оценке вклада облучения, НЧ и их взаимодействия в изменение выживаемости *D. magna* к 21-суточному возрасту в родительском (F_0) и первом (F_1) поколениях. Облучение в дозе 30 Гр приводило к снижению выживаемости на грани статистической значимости с учётом поправки на множественное сравнение ($p = 0,013$). Сочетанное действие облучения с наночастицами золота вызывало значимое усиление эффекта уже при дозе облучения протонами 10 Гр ($p = 1E-06$).

Данные по негативному действию облучения согласуются с результатами исследований, проведенных на позвоночных животных. При облучении мышей линии Balb/C пучками протонов в дозах 10 – 100 Гр (45 МэВ) «в пристреле» выявлена гибель клеток опухоли СТ26 у 10–25 % животных с усилением эффекта до 50–100 % при воздействии AuНЧ [15]. Введение НЧ перед облучением в дозах 5–50 Гр задерживало развитие рака молочной и предстательной железы, плоскоклеточного рака головы и шеи, ортотипической глиомы и глиобластомы, фибро- и глиосаркомы, способствовало снижению рост опухолей, уменьшению их размера, а также увеличивало продолжительность жизни подопытных крыс [9]. Комбинированное действие AuНЧ (10 мкг/мл, 50 нм, 4 ч перед облучением) и протонов (6 Гр, 200 МэВ) приводило к усилению гибели клеток линии СНО-К1 [16]. В исследовании [14] наблюдали снижение на 40 % выживаемости клеток линии А431 при комбинированном действии AuНЧ (0,05 мг/мл) и облучения протонами с ЛПЭ 25 кэВ/мкм. В цитируемых исследованиях обнаружено накопление НЧ клетками опухоли и формирование активных радикалов при взаимодействии частиц с протонами за счет усиления радиолиза воды. Хорошо известно, что излучение протонов нарушает пролиферацию клеток, снижая их количество в фазах G1/S и увеличивая в фазах G2/M клеточного цикла.

Плодовитость *Daphnia magna* в родительском (F_0) и первом поколении (F_1)

Плодовитость оценивали по количеству новорожденных *D. magna* на помет в каждой экспериментальной и контрольной группе в двух последовательных поколениях к 21-суточному возрасту животных.

В табл. 2 приведены медианные значения анализируемой выборки к 21-суточному возрасту и значимость отличия показателей от контроля по критерию Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение. Согласно полученным данным, в контрольных выборках животных из родительского и первого поколений значимых отличий в плодовитости не обнаружено ($p = 0,989$). *D. magna* начали откладывать яйца в 9-суточном возрас-

Таблица 1

Вклад облучения, наночастиц золота (НЧ) и их взаимодействия в наблюдаемый эффект в поколениях *D. magna*
The contribution of irradiation, gold nanoparticles and their interactions to the observed effect in *D. magna* generations

Фактор	p^*		
	Выживаемость	Плодовитость	Цитотоксичность
Родительское поколение, F_0			
НЧ + Облучение 3 Гр	0,215**	0,165**	5,27×10⁻⁶**
Облучение 3 Гр	0,376	0,371	1,000
НЧ	1,000	0,183	1,22×10⁻⁵
НЧ + Облучение 10 Гр	0,002**	0,247**	2,94×10⁻⁶
Облучение 10 Гр	0,018	0,425	0,093
НЧ	0,150	0,242	1,08×10⁻⁵
НЧ + Облучение 30 Гр	0,066**	0,169**	6,74×10⁻⁷
Облучение 30 Гр	0,162	0,247	0,204
НЧ	0,314	0,279	1,58×10⁻⁵
Первое поколение, F_1			
НЧ + Облучение 3 Гр	0,168**	0,008**	0,056**
Облучение 3 Гр	0,322	0,757	0,575
НЧ	0,316	0,022	0,243
НЧ + Облучение 10 Гр	0,162**	0,005**	0,111**
Облучение 10 Гр	0,326	0,828	0,903
НЧ	0,306	0,001	0,094
НЧ + Облучение 30 Гр	0,159**	0,002**	0,066**
Облучение 30 Гр	0,324	0,042	0,359
НЧ	0,320	0,167	0,392

Примечание: * – по критерию Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение; ** – тест Крускалла–Уоллиса для трех групп сравнения. Здесь и далее жирным шрифтом выделены значимые отличия от соответствующего контроля

Таблица 2

Эффект облучения протонами и воздействие наночастиц золота на плодовитость *D. magna* в родительском (F_0) и первом (F_1) поколениях
The effect of proton irradiation and gold nanoparticles on the fertility of *D. magna* in the parental (F_0) and first (F_1) generations

Фактор	Размер выборки	Медиана (мр)*, особей	p^{**}	p^{***}
Родительское поколение, F_0 , $p^{***} = 5,98 \times 10^{-5}$				
Контроль, К	25	11,50 (6,83)	–	–
Облучение, 3 Гр	17	7,33 (5,50)	0,002	0,045
Облучение, 10 Гр	21	7,00 (5,33)	0,001	0,021
Облучение, 30 Гр	21	7,00 (4,17)	0,001	0,007
Наночастицы, 10 мкг/мл	5	5,00 (6,34)	0,003	0,102
НЧ + 3 Гр	17	9,60 (4,26)	0,052	0,252
НЧ + 10 Гр	17	8,00 (6,00)	0,028	0,227
НЧ + 30 Гр	25	9,00 (4,34)	0,008	0,038
Контроль F_1	19	14,00 (8,67)	0,492	0,989
Первое поколение, F_1 , $p^{***} = 7,86 \times 10^{-5}$				
Контроль, К	19	14,00 (8,67)	–	–
Облучение, 3 Гр	20	9,00 (4,25)	0,055	0,143
Облучение, 10 Гр	21	7,33 (2,67)	0,005	0,044
Облучение, 30 Гр	28	6,00 (5,00)	0,001	0,002
Наночастицы, 10 мкг/мл	10	16,38 (5,00)	0,219	0,847
НЧ + 3 Гр	19	10,00 (6,20)	0,108	0,386
НЧ + 10 Гр	20	6,75 (4,83)	0,002	0,012
НЧ + 30 Гр	19	10,00 (11,54)	0,045	0,735

Примечание: * – межквартильный размах; ** – тест Манна–Уитни; *** – поправка на множественное сравнение; **** – тест Крускалла–Уоллиса

те и реализовали 3–4 помета в течение периода наблюдения. Поскольку воздействие ионизирующего излучения ставило под угрозу жизнеспособность, мы анализировали плодовитость животных, которые дожили до конца эксперимента. Негативное влияние облучения протонами в дозах 10 и 30 Гр на плодовитость наблюдали во всех исследуемых поколениях.

Ранее нами было обнаружено негативное влияние родительского γ -облучения на размер помета *D. magna*, причем показатель был очень близок к таковому для интегральной fertильности, оцениваемой как количество новорожденных на самку. Плодовитость в F_0 и F_1 снижалась при дозе 100 мГр и выше [17]. Из литературы известно, что острое γ -облучение в высоких дозах значительно уменьшает количество яиц, продуцируемых почвенным беспозвоночным *Folsomia candida* [18] и морским веслоногим *Paracyclops nana* [19]. Облучение протонами в дозе 100 Гр не влияло на выживаемость тихоходок, но снижало количество и жизнеспособность отложенных яиц [20]. Уменьшение количества новорожденных на помет в нашем эксперименте, как и в эксперименте с γ -квантами, может быть объяснено цитотоксическим действием облучения протонами на половые клетки. Хотя облученные односуточные *D. magna* еще не отложили яйца [21], их первичные половые клетки были поражены, что может поставить под угрозу выживание особей либо их способность формировать яйца. На модели нематоды *Caenorhabditis elegans* описаны трансгенерационные эффекты снижения плодовитости после облучения протонами в дозе 10 Гр, вызванные повреждением гонад, разрывами ДНК, окислительным стрессом и эпигенетическими нарушениями, сохраняющимися в двух последовательных поколениях [22].

Из литературы известно, что облучение протонами вне пика Брегга может оказывать негативное действие на fertильность пациентов после лучевой терапии, вызывая олигоспермию, повышение pH, снижение подвижности и аномальный вид сперматозоидов [23]. Согласно сведениям из литературы, лучевая терапия оказывает негативное влияние на функцию яичников в виде атрофии и уменьшения запасов фолликулов [24]. Это, по мнению авторов цитируемых работ, может привести к нарушению выработки гормонов яичниками, дисфункции матки из-за недостаточного воздействия эстрогена, ранней менопаузе и бесплодию, что и обнаружено в модельных экспериментах на позвоночных и у пациенток с раковыми опухолями в области таза.

Как показано в исследованиях на позвоночных и беспозвоночных животных, развивающиеся эмбрионы более чувствительны к облучению, чем взрослые особи [18, 21, 25]. В этом отношении могут представлять интерес результаты раздельного и сочетанного с протонами действия AuНЧ в нашем эксперименте. Из табл. 2 видно, что AuНЧ снижают плодовитость экспериментальных животных родительского поколения в 1,75 раз ($p = 0,102$), а облучение в дозе 30 Гр – в 1,45 раз ($p = 0,007$). Обнаружен трансгенерационный эффект облучения на исследуемый параметр плодовитости при облучении в дозах 10 и 30 Гр ($p = 0,044$ и $0,002$ соответственно).

Анализ вклада излучения, НЧ и их взаимодействия, рассчитанный тестом Крускала–Уоллиса, показал, что раздельное действие факторов не вносит вклад в изменение размера пометов в родительском поколении (табл. 1). Как известно из наших ранних исследований, размер помета не является чувствительным к облучению показателем [17], но он в целом характеризует репродуктивное состояние популяции. В данном исследовании обнаружен трансгенерационный эффект взаимодействия об-

лучения с НЧ во всех исследуемых дозах в первом поколении животных. Как видно из табл. 1, при облучении в дозах 3 и 10 Гр основной вклад в суммарный эффект вносили НЧ, а при дозе 30 Гр – протоны.

Цитотоксический эффект действия на *Daphnia magna* исследуемых факторов в родительском (F_0) и первом поколении (F_1)

В табл. 3 приведены результаты анализа МТТ-показателя, характеризующего цитотоксическое действие исследуемых факторов. Медианные значения (M) приведены в единицах оптической плотности (ОП). Парное сравнение с контролем проведено по критерию Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение. Из табл. 3 видно, что контроли в поколении (F_0) и (F_1) гомогенны ($p = 0,999$). Анализ вклада действующих факторов в формирование эффекта в клетках *D. magna* показал, что облучение вызывает цитотоксический эффект, AuНЧ не оказывают цитотоксического действия ($p = 0,324$), но значимо усиливают негативный эффект облучения протонами ($p \sim 0,001$). В первом поколении трансгенерационный эффект взаимодействия факторов не обнаружен.

Из литературы известно, что радиосенсибилизация НЧ определяется образованием и пространственно-временным распределением свободных радикалов, которые появляются в биохимических процессах [26]. Золото ($Z = 79$) является биосовместимым и химически инертным металлом, при этом поверхность AuНЧ электронно-активна. При взаимодействии золота с кислородом образуется супероксид, который может привести к дисмутации. Основными биологическими механизмами ответной реакции клеток на радиосенсибилизацию AuНЧ являются выработка активных форм кислорода (АФК),

Таблица 3

Влияние облучения протонами и действие наночастиц золота на изменение МТТ-показателя в клетках *Daphnia magna* в родительском (F_0) и первом (F_1) поколениях

The effect of proton irradiation and gold nanoparticles on the change in the MTT index in *Daphnia magna* cells in the parental (F_0) and first (F_1) generations

Фактор	Количество образцов ⁺⁺	Медиана (мр)*, усл.ед.	p^{**}	p^{***}
Родительское поколение, F_0, $p^{***} = 8,35 \times 10^{-5}$				
Контроль, K	29	0,367(0,362)	–	–
Облучение, 3 Гр	36	0,234(0,096)	0,001	0,001
Облучение, 10 Гр	30	0,282(0,204)	0,037	0,200
Облучение, 30 Гр	47	0,215(0,088)	2,06 \times 10^{-5}	0,001
Наночастицы, 10 мкг/мл	11	0,473(0,132)	0,056	0,283
НЧ + 3 Гр	20	0,231(0,097)	0,001	0,002
НЧ + 10 Гр	30	0,212(0,065)	0,001	0,001
НЧ + 30 Гр	25	0,173(0,122)	3,37 \times 10^{-5}	0,001
Контроль, F_1	27	0,330(0,208)	0,658	0,999
Первое поколение, F_1, $p^{***} = 7,90 \times 10^{-5}$				
Контроль, K	27	0,330(0,208)	–	–
Облучение, 3 Гр	27	0,222(0,101)	0,004	0,022
Облучение, 10 Гр	21	0,257(0,135)	0,090	0,392
Облучение, 30 Гр	50	0,238(0,158)	0,002	0,012
Наночастицы, 10 мкг/мл	6	0,402(0,229)	0,401	0,942
НЧ + 3 Гр	20	0,257(0,184)	0,121	0,491
НЧ + 10 Гр	29	0,233(0,123)	0,019	0,104
НЧ + 30 Гр	21	0,293(0,256)	0,258	0,834

Примечание: * – межквартильный размах; ** – тест Манна–Уитни; *** – поправка на множественное сравнение; **** – тест Крускала–Уоллиса; ++ – в каждом образце по 20 особей

окислительный стресс и индукция повреждений ДНК [27]. Повышение уровня АФК при облучении протонами мышей в дозе 10 Гр было на фоне AuНЧ на 12–36 % выше, чем при раздельном облучении [15]. При этом терапевтическая концентрация AuНЧ, которая приводила к 100 %-ному лизису злокачественных клеток при дозе ионизирующего излучения 30 Гр, составляла 41 мкг Au/g ткани. Авторы сделали вывод об увеличении дозы облучения на опухоль за счет вторичного облучения, индуцированного взаимодействием с НЧ. При сочетанном действии облучения и НЧ выживаемость мышей с перевитой опухолью за год составила 58–100 % по сравнению с 11–13 %-й выживаемостью при использовании только терапии протонами. Методом конфокальной микроскопии было установлено, что поглощенные AuНЧ повышали образование АФК в кишечнике *D. magna*, на что указывала ярко-зеленая флуоресценция в цитоплазме энteroцитов после 24-часового воздействия НЧ [28].

Согласно приведенным в табл. 1 данным, совместное действие облучения протонами в дозах 3–30 Гр и AuНЧ, проанализированное тестом Крускалла–Уоллиса, оказывало значимое цитотоксическое воздействие на животных. При этом НЧ вносили основной вклад в цитотоксический эффект, оцененный тестом Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение. Трансгенерационный цитотоксический эффект в первом поколении не обнаружен.

Заключение

Проведенное нами исследование показало, что однократное воздействие AuНЧ усиливает поражающий эффект острого облучения протонами у модельного беспозвоночного *D. magna* по критерию выживаемости в 1,35 раз. В первом поколении при отсутствии повторного воздействия жизнеспособность животных восстанавливается.

Возможным механизмом повышения радиочувствительности является создание условий для реализации цитотоксического эффекта, вызванного облучением, что обнаружено в наших экспериментах. Известно, что комплексные биологические процессы, лежащие в основе сенсибилизирующего взаимодействия НЧ и облучения, включают в себя окислительный стресс, остановку клеточного цикла, ингибирование репарации ДНК и др. [26]. Для лучшего понимания механизмов действия НЧ необходим анализ молекулярных реакций, лежащих в основе выработки активных форм кислорода, а также анализ экспрессии генов, связанных с антиоксидантной системой. Использование данного подхода может представить дополнительную информацию о потенциальных механизмах токсичности НЧ в сочетании с облучением для экосистемы, а также в биомедицинских целях, что будет являться темой отдельного сообщения.

Полученные нами данные согласуются с результатами исследований на позвоночных животных, проанализированных в цитируемых статьях, а также в обзорной статье [1] при взаимодействии протонов с НЧ тяжелых металлов, в том числе золота. Сопоставление результатов может указывать на универсальный механизм цитотоксического действия облучения протонами как на беспозвоночных, так и позвоночных животных, включая человека, а также на возможность применения AuНЧ в качестве радиосенсибилизаторов для усиления эффекта облучения в бинарных технологиях протонной терапии.

Благодарности

Авторы благодарят сотрудника лаборатории «Бионаnofотоники» НИЯУ МИФИ Шахова П.В. за синтез НЧ и аспирантку Савину Н.Б. за помощь в культивировании тест-организма.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Бушманов А.Ю., Шейно И.Н., Липенгольц А.А., Соловьев А.Н., Корякин С.Н. Перспективы применения комбинированных технологий в протонной терапии злокачественных новообразований // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2019. Т. 64, № 3. С. 11–18 [Bushmanov AYu, Sheino IN, Lipengolts AA, Soloviev AN, Koryakin SN. Prospects of Proton Therapy Combined Technologies in the Treatment of Cancer. Medical Radiology and Radiation Safety. 2019;64(3):11–18 (In Russ.)]. DOI: 10.12737/article_5cf237bf846b67.57514871
2. Peukert D, Kempson I, Douglass M, Bezak E. Gold Nanoparticle Enhanced Proton Therapy: a Monte Carlo Simulation of the Effects of Proton Energy, Nanoparticle Size, Coating Material, and Coating Thickness on Dose and Radiolysis Yield. Med Phys. 2020; 47(2):651–661. DOI: 10.1002/mp.13923. PMID: 31725910
3. Benn TM, Westerhoff P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. Environ Sci Technol. 2008;42(11):4133–9. Erratum in: Environ Sci Technol. 2008; 42(18):7025–6. DOI: 10.1021/es7032718. PMID: 18589977
4. Petersen EJ, Pinto RA, Mai DJ, Landrum PF, Weber WJ Jr. Influence of Polyethyleneimine Graftings of Multi-Walled Carbon Nanotubes on their Accumulation and Elimination by and Toxicity to *Daphnia Magna*. Environ Sci Technol. 2011;45(3):1133–8. DOI: 10.1021/es1030239. PMID: 21182278.
5. Baun A, Hartmann NB, Grieger K, Kusk KO. Ecotoxicity of Engineered Nanoparticles to Aquatic Invertebrates: a Brief Review and Recommendations for Future Toxicity Testing. Ecotoxicology. 2008;17(5):387–95. DOI: 10.1007/s10646-008-0208-y. PMID: 18425578
6. Fuller N., Lerebours A., Smith J.T., Ford A.T. The Biological Effects of Ionising Radiation on Crustaceans: a Review. Aquat Toxicol. 2015;167:55–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.07.013>
7. Feswick A, Griffitt RJ, Siebein K, Barber DS. Uptake, Retention and Internalization of Quantum Dots in *Daphnia* is Influenced by Particle Surface Functionalization. Aquat Toxicol. 2013;130-131:210-8. DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.01.002. PMID: 23419536.
8. Liu A, Ye B. Application of Gold Nanoparticles in Biomedical Researches and Diagnosis. Clin Lab. 2013;59(1-2):23-36. PMID: 23505903.
9. Финогенова Ю.А., Липенгольц А.А., Скрибицкий В.А., Шпакова К.Е., Смирнова А.В., Скрибицкая А.В., Сычева Н.Н., Григорьева Е.Ю. Металлсодержащие наноразмерные радиосенсибилизаторы для лучевой терапии злокачественных новообразований // Медицинская физика, 2023. № 3. С 70-86 [Finogenova YA, Lipengolts AA, Skribitskiy VA, Shpakova KE, Smirnova AV, Skribitskaya AV, Sycheva NN, Grigorieva EY. Metal Nanoparticles as Radiosensitizers for Cancer Radiotherapy in Vivo. *Meditinskaya Fizika* = Medical Physics, 2023;3:70-86 (In Russ.)]. DOI: 10.52775/1810-2000x-2023-99-3-70-86
10. Скрибицкий В.А., Позднякова Н.В., Липенгольц А.А., Попов А.А., Тихоновский Г.В., Финогенова Ю.А., Смирнова А.В., Григорьева Е.Ю. Спектрофотометрический метод оценки размера и концентрации лазерно-аблированных золотых наночастиц // Биофизика. 2022. Т. 67, № 1. С. 30–36 [Skribitskiy VA, Pozdnyakova NV, Lipengolts AA, Popov AA, Tikhonovskiy GV, Finogenova YuA, Smirnova AV, Grigorieva EYu. A Spectrophotometric Method for Evaluation of Size and Concentration of Laser Ablated Gold Nanoparticles. *Bio-*

- fizika = Biophysics.* 67(1):30–36 (In Russ.).] DOI: 10.31857/S0006302922010045.
11. Test Guideline. Daphnia Magna Reproduction Test. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Paris, OECD Publ., 2012. No. 211. P. 26. <http://dx.doi.org/10.1787/20745761>.
 12. Cancer Cell Culture. Methods and Protocols / Ed. I.A.Cree. New York, Dordrecht, Heidelberg, London, Springer, Human Press, 2011. P. 237-244.
 13. Gorfine M, Schlesinger M, Hsu L. K-Sample Omnibus Non-Proportional Hazards Tests Based on Right-Censored Data. *Stat Methods Med Res.* 2020;29(10):2830-2850. doi: 10.1177/0962280220907355
 14. Li S, Pennincx S, Karmani L, Heuskin AC, Watillon K, Marega R, Zola J, Corvaglia V, Genard G, Gallez B, Feron O, Martinive P, Bonifazi D, Michiels C, Lucas S. LET-Dependent Radiosensitization Effects of Gold Nanoparticles for Proton Irradiation. *Nanotechnology.* 2016;27(45):455101. Epub 2016 Oct 3. DOI: 10.1088/0957-4484/27/45/455101. PMID: 27694702
 15. Kim JK, Seo SJ, Kim HT, Kim KH, Chung MH, Kim KR, et al. Enhanced Proton Treatment in Mouse Tumors Through Proton Irradiated Nanoradiator Effects on Metallic Nanoparticles. *Phys Med Biol.* 2012;57(24):8309-23. DOI: 10.1088/0031-9155/57/24/8309
 16. Cunningham C, de Kock M, Engelbrecht M, Miles X, Slabbert J, Vandevoorde C. Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles in Proton Therapy. *Front Public Health.* 2021;9:699822. DOI: 10.3389/fpubh.2021.699822. PMID: 34395371; PMCID: PMC8358148
 17. Sarapultseva EI, Dubrova YE. The Long-Term Effects of Acute Exposure to Ionising Radiation on Survival and Fertility in Daphnia Magna. *Environ Res.* 2016;150:138-143. doi: 10.1016/j.envres.2016.05.046. PMID: 27288911.
 18. Nakamori T, Yoshida S, Kubota Y, Ban-nai T, Kaneko N, Hasegawa M, Itoh R. Effects of Acute Gamma Irradiation on Folsomia Candida (Collembola) in a Standard Test. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;71(2):590-6. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.10.029. PMID: 18155145
 19. Won EJ, Lee JS. Gamma Radiation Induces Growth Retardation, Impaired Egg Production, and Oxidative Stress in the Marine Copepod Paracyclopsina Nana. *Aquat Toxicol.* 2014;150:17-26. DOI: 10.1016/j.aquatox.2014.02.010. PMID: 24632311
 20. Jönsson K.I. Radiation Tolerance in Tardigrades: Current Knowledge and Potential Applications in Medicine. *Cancers* 2019;11(9):1333; <https://doi.org/10.3390/cancers11091333>.
 21. Dubrova YE, Sarapultseva EI. Radiation-Induced Transgenerational Effects in Animals. *Int J Radiat Biol.* 2022;98(6):1047-1053. DOI: 10.1080/09553002.2020.1793027. PMID: 32658553.
 22. Min H, Sung M, Son M, Kawasaki I, Shim YH. Transgenerational Effects of Proton Beam Irradiation on Caenorhabditis Elegans Germline Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;490(3):608-615. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.085. PMID: 28630005.
 23. Hoppe BS, Harris S, Rhoton-Vlasak A, Bryant C, Morris CG, Dagan R, Nichols RC, Mendenhall WM, Henderson RH, Li Z, Mendenhall NP. Sperm Preservation and Neutron Contamination Following Proton Therapy for Prostate Cancer Study. *Acta Oncol.* 2017;56(1):17-20. DOI: 10.1080/0284186X.2016.1205219. PMID: 27420031
 24. Wo JY, Viswanathan AN. The Impact of Radiotherapy on Fertility, Pregnancy, and Neonatal Outcomes in Female Cancer Patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73:1304–1312. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.12.016.
 25. Streffer C, Shore R, Konermann G, Meadows A, Uma Devi P, Preston Withers J, Holm LE, Stather J, Mabuchi K, H R. Biological Effects after Prenatal Irradiation (Embryo and Fetus). A Report of the International Commission on Radiological Protection. *Ann ICRP.* 2003;33(1-2):5-206. PMID: 12963090.
 26. Falk M. Nanodiamonds and Nanoparticles as Tumor Cell Radiosensitizers-Promising Results but an Obscure Mechanism of Action. *Ann Transl Med.* 2017;5(1):18. DOI: 10.21037/atm.2016.12.62. PMID: 28164103; PMCID: PMC5253274
 27. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kaled-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold Nanoparticles Enhance the Radiation Therapy of a Murine Squamous Cell Carcinoma. *Phys Med Biol.* 2010;55(11):3045-59. DOI: 10.1088/0031-9155/55/11/004. PMID: 20463371
 28. Ates M, Danabas D, Ertit Tastan B, Unal I, Cicek Cimen IC, Aksu O, Kutlu B, Arslan Z. Assessment of Oxidative Stress on Artemia salina and Daphnia magna After Exposure to Zn and ZnO Nanoparticles. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2020; 104(2):206-214. doi: 10.1007/s00128-019-02751-6. PMID: 31748865.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 23-24-10041. Облучение осуществлено на оборудовании ЦКП «Радиологические и клеточные технологии» ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.
Поступила: 20.03.2024. Принята к публикации: 25.04.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out with the financial support of the Russian Academy of Sciences within the framework of scientific project No. 23-24-10041. The irradiation was carried out on the equipment of the Central Research Center «Radiological and Cellular Technologies» of the Federal State Budgetary Institution «NMIC Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.
Article received: 20.03.2024. Accepted for publication: 25.04.2024.