

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА НА АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ И ПРОДУКЦИЮ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДАНА ПРИ МОДЕЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ ПРОТОНАМИ

А.Р.Мартirosян¹, Е.Д.Тарасова¹, Д.В.Ускалова¹, Е.И.Сарапульцева²

¹-ИАТЭ НИЯУ МИФИ, г. Обнинск, Россия. ²-НИЯУ МИФИ, г. Москва, Россия.

Всероссийская конференция с международным участием «Генетика. Эволюция. Радиоэкология», посвященной 125-летию со дня рождения Николая Владимировича Тимофеева-Ресовского и 70-летию созданной им лаборатории биофизики (г. Екатеринбург, 15-19 сентября 2025 г.).

Цель работы – оценка цитотоксического эффекта
раздельного и сочетанного действия наночастиц и
облучения протонами на модельном тест-организме
Daphnia magna.

Объект исследования – ракообразные *Daphnia magna* Straus

Преимущества:

- Простота культивирования
- Прозрачное тело
- Короткий жизненный цикл
- Большая плодовитость

Условия культивирования:

- плотность посадки - 10 особей на 500 мл культуральной воды;
- освещённость - 700 люкс;
- режим «свет/тьма» - 12ч/12ч;
- $T^{\circ} = 20 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Кормление - через день суспензией зелёных водорослей *Chlorella vulgaris*.



Климатостат Р2
(Россия).

Характеристика наночастиц золота (AuНЧ)

AuНЧ - стабильный коллоидный раствор со следующими характеристиками:

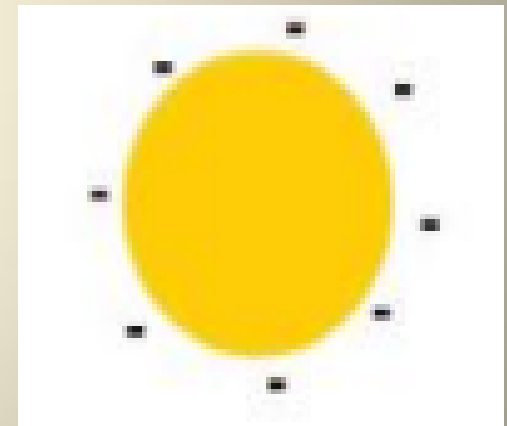
- размер - 50 нм;
- сферическая форма;
- поверхностный заряд -30мВ;
- концентрация - 10 мкг/мл.



Биораспределение AuНЧ в организме *Daphnia magna*: 1 – кишечник; 2 – эмбрионы в выводковой камере



Внешний вид AuНЧ



Внешний отрицательный заряд на поверхности AuНЧ

Схема эксперимента

4 экспериментальные группы односуточных дафний (от 80 до 100 особей в каждой):

- 1) Контроль;
- 2) *АиНЧ*;
- 3) 10 Гр;
- 4) *АиНЧ* + 10Гр;
- Перед облучением группы *АиНЧ* и *АиНЧ* + 10Гр выдерживали в растворе *АиНЧ*. Затем – промывка от наночастиц и облучение;
- Тесты проводились на следующие сутки после облучения.

Условия облучения:

- $D = 10 \text{ Гр}$, $E = 150 \text{ МэВ}$;
- зона пучка = 65x70 мм;
- размер одиночного пучка = 7,1x6,4 нм;
- T вывода пучка = 150 мс, пауза = 1,8 мс;
- $T = 30 \text{ мин.}$



Синхротрон комплекса для протонной терапии «Прометеус» (МРНЦ им. Цыба, г. Обнинск, Россия).

ТБК-тест для определения уровня малонового диальдегида (МДА)

- Оценку уровня МДА проводили колориметрическим методом [1];
- От 4 до 7 образцов по 50 десятисуточных особей;
- Из дозовой и контрольной групп дафний переносили в микропробирки типа «Эппендорф»;
- После удаления воды к суспензии добавляли предварительно охлажденный физраствор (NaCl 0,9%) в объеме 80 мкл, далее содержимое пробирок гомогенизировали в течении 30 секунд при температуре 4°C;
- К получившейся суспензии добавляли 200 мкл реакционной смеси (0,57% ТБК, 10% уксусной кислоты, 0,8% додецилсульфата натрия, рН = 3,5), после чего пробы инкубировали при 95°C в течении 90 минут;
- Далее 200 мкл супернатанта каждого образца переносили в лунки 96-луночного планшета;
- Измерение оптической плотности образцов проводилось на планшетном спектрофотометре Multiskan FC (Thermoscientific instruments Co, Ltd (Китай) при длине волны 530 нм;
- Результаты анализировали по изменению интегрального показателя оптической плотности (ОП) в контрольных и облучённых группах.



Планшетный спектрофотометр Multiskan FC (Thermoscientific instruments Co, Ltd (Китай)

Определение уровня фермента пероксидазы (Рх)

- Определение активности Рх проводили по методике [2];
- От 21 до 30 образцов по 50 двадцатисуточных особей;
- Из дозовой и контрольной групп дафний переносили в микропробирки типа «Эппендорф»;
- После удаления воды к суспензии добавляли раствор ацетатного буфера (0,1 М, с рН 5,4) и бензидина (0,92 г/л) в объеме 300 мкл и далее содержимое пробирок гомогенизировали в течении 30 секунд;
- К получившейся смеси добавляли 300 мкл перекиси водорода (0,03% раствор);
- Далее 200 мкл супернатанта каждого образца переносили в лунки 96-луночного планшета;
- Измерение оптической плотности образцов проводилось на планшетном иммуноферментном анализаторе «StatFax» 2100 («Awareness Technology», США, VIS-модель) при длине волны 450 (рабочая) и 630 (шумовая);
- Маркером активности успешно протекающей реакции в пробах является изменение своего цвета на синий, благодаря окислившемуся бензидину;
- Статистическую обработку производили по критерию Манна-Уитни.



Планшетный иммуноферментный анализатор «StatFax» 2100 («Awareness Technology», США, VIS-модель)

Значения показателей МДА

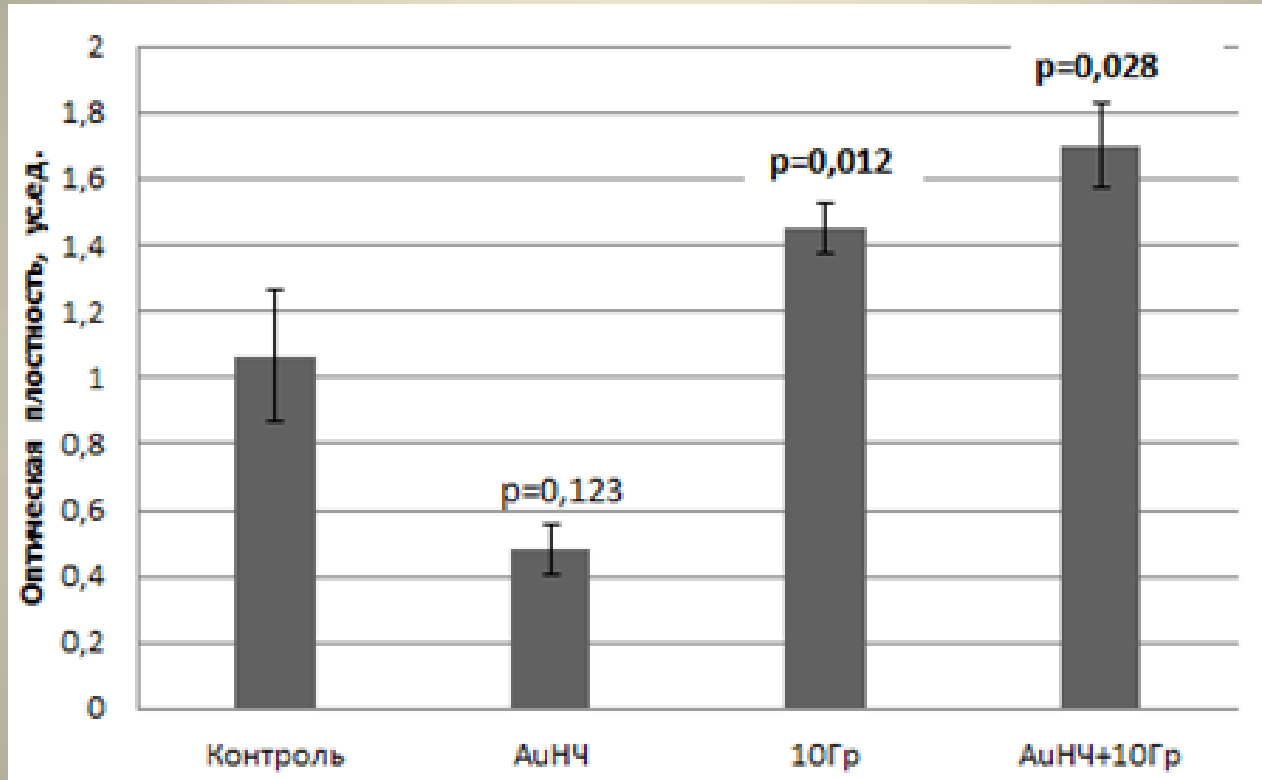


Рис. 1. Изменение показателей МДА в единицах оптической плотности при раздельном и сочетанном действии наночастиц золота и облучения протонами

Значения активности РХ

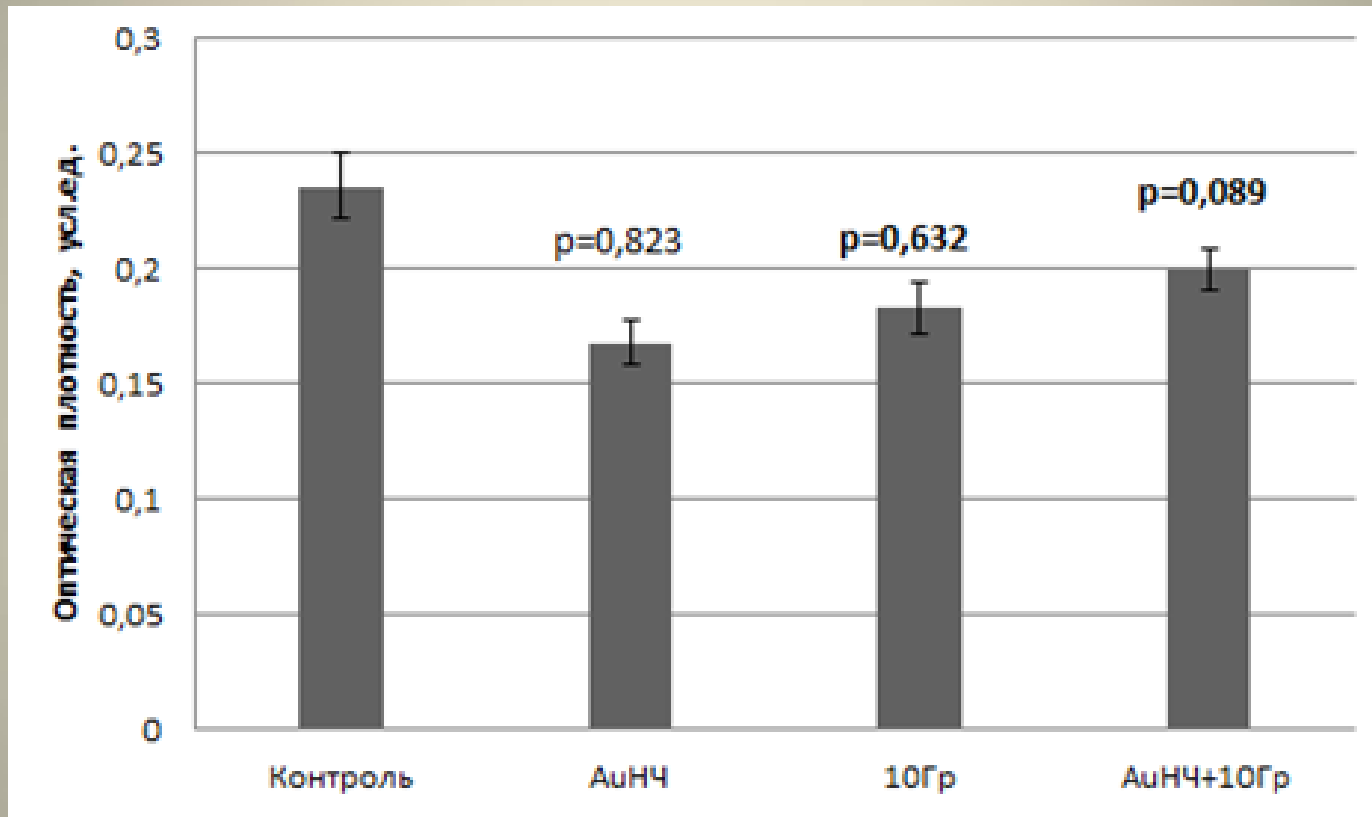


Рис. 2. Изменение активности Рх в единицах оптической плотности при раздельном и сочетанном действии наночастиц золота и облучения протонами

Выводы:

- При раздельном действии AuНЧ не оказали токсического действия ($p=0,123$) на метаболизм тест-организма, хотя известно, что они накапливаются и длительно сохраняются в кишечнике, выводковой камере и покровах ракообразных.
- Облучение в дозе 10 Гр вызвало повышение уровня МДА ($p=0,012$). Эффект усиливался при сочетанном действии с AuНЧ ($p= 0,028$).
- Изменения активности Рх не обнаружено.

Авторы работы выражают искреннюю
благодарность сотрудникам комплекса протонной
терапии «Прометеус» МРНЦ им. Цыба (г.
Обнинск).

Спасибо за внимание!

Список используемой литературы:

1. Nogueira T. Genomic Analysis of Antibiotics Resistance in Pathogens// Antibiotics (Basel) 2022. V.11 № 8. P. 1013
2. OECD, Test Guideline No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilization Test, Paris: Organization for Economic Cooperation and Development, 2012.
3. Петросова 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.
4. Сарапульцева Е.И. Биологические эффекты радиационного воздействия у низших ракообразных Daphnia magna. Аналитический обзор // Радиационная биология. Радиоэкология. 2017. Т. 57. № 4. С. 414-428.
5. 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.