

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЛУЧЕНИЯ ПРОТОНАМИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЧЕЛОВЕКА А 549 В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА

А.В. Рзянина¹, Г.В. Мицын¹, С.В. Швидкий¹, А.Г. Молоканов¹, К.Н. Шипулин¹,
А.В. Агапов¹, В.Н. Гаевский¹, И. Хасенова^{1,2}

¹ Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

² Институт ядерной физики, Алма-Ата, Казахстан

Цель: Изучение влияния наночастиц золота на опухолевые клетки карциномы легкого человека А 549 при облучении протонами.

Материал и методы:

Клеточная культура: Клетки карциномы легкого человека А 549.

Наночастицы золота Au/PEG 6000/W 200/30 нм: в работе использовался коллоидный раствор наночастиц золота, приобретенный в фирме М 9 Nanomaterials & Technologies.

Облучение протонами: Облучение клеток проводилось на терапевтическом протонном пучке в медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований.

Определение радиочувствительности клеток: оценка клоногенной выживаемости клеток.

Определение генотоксической активности наночастиц под действием протонного облучения: микроядерный тест с блокированием цитокинеза. Генотоксичность наночастиц золота оценивалась по количеству микроядер на 1000 бинуклеарных клеток. Микроядра считали только в бинуклеарных клетках. Для каждой дозы просчитывалось не менее 1000 бинуклеарных клеток, эксперименты проводились в трех повторах.

Результаты:

Частота образования микроядер свидетельствует о повышении генотоксического действия наночастиц при облучении протонами в дозе 2 Гр. Протонное облучение вызывало увеличение частоты образования микроядер в зависимости от концентрации наночастиц. При облучении протонами дозой 2 Гр в присутствии и отсутствие наночастиц различие по частоте образования микроядер составило для концентрации наночастиц 2,5 мкг/мл – 1,1; для 5 мкг/мл и 10 мкг/мл – 1,2; для 15 мкг/мл – 1,3 и для 30 мкг/мл – 1,5. Кривые выживаемости клеток отражают снижение их выживаемости при добавлении металлических наночастиц с высоким Z, что отражает возникновение эффектов радиосенсибилизации. Коэффициент усиления для уровней выживаемости 10 % и 50 % составляет 1,4 и 2,5 соответственно.

Выводы:

Под действием протонного облучения повышается генотоксическая активность наночастиц золота в клетках карциномы легкого человека А 549 в зависимости от их концентрации. Снижается выживаемость клеток карциномы легкого человека А 549, облученных протонами в присутствии наночастиц золота.

Ключевые слова: протонное облучение, наночастицы золота, клетки А 549, выживаемость

DOI: 10.52775/1810-200X-2022-96-4-21-29

Введение

Одной из главных задач лучевой терапии является доставка лечебной дозы излучения в опухоль с сохранением при этом окружающих ее здоровых тканей. Основные усилия сосредоточены в двух направлениях: приведение доставляемой дозы в соответствие с объемом опухоли и повышение чувствительности опухоли к терапевтическому облучению. С задачей согласования доставляемой дозы с формой опухоли достаточно успешно справляется протонная терапия за счет высокой степени конформности распределения дозы протонных пучков. Это приводит к уменьшению побочных эффектов и более низкой интегральной дозе по сравнению с обычной фотонной терапией.

Одним из вариантов радиосенсибилизации является искусственное повышение энерговыделения в опухоли. В частности, действие протонной терапии может быть дополнительно усилено за счет использования наноразмерных радиосенсибилизаторов. Увеличение поглощенной дозы достигается путем введения или доставки в опухолевые клетки веществ с существенно большим сечением поглощения излучения, чем у нормальных клеток. Таковыми являются химические элементы с высоким атомным номером (Z), более 52 (I, Gd, Au, Pt и др.). За счет большей вероятности взаимодействия таких элементов с излучением можно достичь локального увеличения поглощенной дозы в области накопления вещества с высоким атомным номером. Возникающее вторичное короткопробежное излучение локализует энерговыделение вблизи этих элементов и поражает лишь близлежащие биологические структуры [1, 2].

Для этих целей хорошо подходят наночастицы золота. Они обладают рядом свойств, которые делают их идеальными радиосенсибилизаторами, а именно, высоким атомным номером ($Z=79$), биосовместимостью и низкой цитотоксичностью [3, 4]. Ряд доклинических исследований проиллюстрировал, что наночастицы золота являются мощным радиосенсибилизирующим агентом при проведении фотонной терапии [5–8].

Первоначально большинство исследований радиосенсибилизирующего действия наночастиц металлов были сосредоточены на высокоэнергетическом мегавольтном (МэВ) и низкоэнергетическом киловольтном (кэВ) фотонном излучении [9–14]. Наилучшей эффек-

тивностью для радиосенсибилизации обладают наночастицы в сочетании с фотонами, энергия которых не превышает 500 кэВ [10], т.е. в области энергий, где преобладает фотоэффект. При взаимодействии фотонов такой энергии с наночастицами образуется много вторичных электронов, которые ответственны за большинство повреждений клеток [15].

Однако в клинических условиях киловольтные фотоны имеют ограниченную эффективность, т.к. у них относительно малая глубина проникновения в ткани, и они не могут доставлять дозу облучения в глубоко расположенные опухоли. Поэтому в большинстве случаев для радиотерапии используется мегавольтное тормозное излучение в диапазоне номинальных энергий от 1 до 25 МэВ или протонные пучки.

Теоретические работы по моделированию методом Монте-Карло предсказывали незначительное повышение дозы при сочетании наночастиц золота с мегавольтным фотонным излучением [11–14, 16]. Однако, эксперименты *in vitro* продемонстрировали существенное повышение дозы с помощью наночастиц золота при облучении таким излучением [17–24]. Вероятно, существуют дополнительные биологические факторы, изменяющие сенсибилизацию клеток к мегавольтному излучению, которые не были учтены физическими расчетными методами [25].

Исходя из первоначальных теоретических расчетов также не ожидалось, что наночастицы золота будут эффективными радиосенсибилизаторами при протонном облучении, главным образом, из-за ограниченной Z -зависимости взаимодействий, в отличие от высокого фотоэлектрического поглощения с сильной Z -зависимостью для киловольтных фотонов. Однако, экспериментальные исследования на клетках опухоли предстательной железы, облученных протонами с энергией 160 МэВ, продемонстрировали снижение выживаемости клеток при применении наночастиц золота [26].

Аналогичное наблюдение Kim J.K. et al показало снижение выживаемости раковых клеток, облученных протонами с энергией 45 МэВ при использовании наночастиц золота и железа [27].

Дальнейшие теоретические и экспериментальные исследования показали, что наночастицы золота также способны быть эффективными радиосенсибилизаторами при протонном облучении [28–30].

Взаимодействие между наночастицами и протонами может генерировать коллективные электронные возбуждения (плазмоны) на поверхности металлических наночастиц, в результате чего с поверхности наночастиц испускаются характеристические рентгеновские фотоны и электроны низкой энергии через каскады Оже [31, 32]. В биологических мишенях такое излучение способно генерировать активные формы кислорода, что в свою очередь может привести к повреждению ДНК и к апоптозу [33, 34]. Соответственно, комбинируя протонное облучение с введением металлических наночастиц можно улучшить эффективность протонной терапии.

Цель исследования – изучение влияния наночастиц золота ^{79}Au на опухолевые клетки карциномы легкого человека А 549 при облучении протонами.

Материал и методы

Клеточная культура. Клетки карциномы легкого человека А 549 культивировали в чашках Петри, либо культуральных флаконах в зависимости от задачи эксперимента. Клетки инкубировали в стандартных условиях (37°C, 5 % CO_2). Для культивирования использовалась питательная среда Игла MEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамин, пенициллина-стрептомицин (50 ед./мл).

Наночастицы золота Au/PEG 6000/W 200/30 нм: в работе использовался коллоидный раствор наночастиц золота, приобретенный в фирме M 9 Nanomaterials & Technologies, Тольятти, с известными характеристиками: наночастицы стабилизированы полимером PEG (полиэтиленгликоль, W6000), исходная концентрация наночастиц 200 ppm, средний размер частиц составляет 30 нм. Необходимая для эксперимента концентрация наночастиц достигалась непосредственным разведением исходного раствора в среде культивирования.

Наночастицы золота в различных концентрациях (2,5; 5; 10; 15; 30 мкг/мл) добавляли в питательную среду за 24 часа до облучения с предварительной 10-минутной обработкой ультразвуком (35 кГц). Перед облучением среду с наночастицами удаляли, дважды промывали клетки раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и добавляли свежую питательную среду.

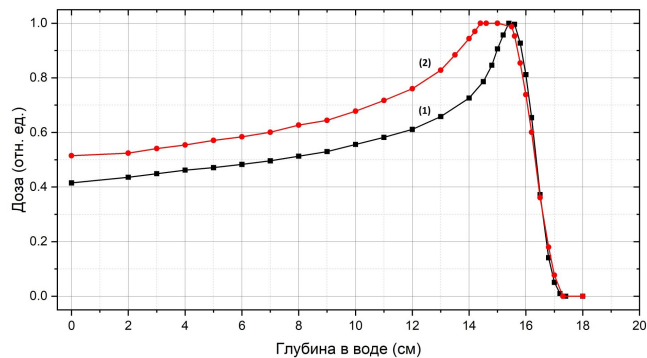


Рис. 1. Глубинные дозовые распределения исходного (1) и модифицированного (2) пучка

Облучение протонами: Облучение клеток проводилось на терапевтическом протонном пучке в медико-техническом комплексе Лаборатории ядерных проблем Объединенного института ядерных исследований [40].

Выведенные из ускорителя фазотрона протоны с энергией 660 МэВ замедлялись в углеродных блоках до средней энергии около 150 МэВ. После коллимации и магнитного анализа пучок протонов транспортировался в одну из процедурных кабин, предназначенных для облучения пациентов. Поперечные размеры пучка в точке облучения составляли 7×7 см по 90 %-изоуровню. Использовался пучок с модифицированным пиком Брэгга с протяженностью плоской вершины 2 см, глубинное дозовое распределение пучка представлено на рис. 1.

Облучаемые образцы располагались в центральной части плоской вершины. Спектр значений линейной передачи энергии (ЛПЭ) протонов в точке облучения, измеренный с помощью многопиксельной кремниевой камеры MiniPIX компании Advacam (Чехия) [41], приведен на рис. 2.

Дозиметрическая калибровка пучка проводилась с помощью клинического дозиметра PTW UNIDOS-E (PTW-Freiburg, Германия) с ионизационной камерой TM30013 с погрешностью около 3 %. Мощность дозы во время облучения клеток была около 1 Гр/мин.

Определение выживаемости клеток. За 24 часа перед облучением клетки обрабатывались наночастицами золота в концентрации 15 мкг/мл. Перед облучением среда, содержащая наночастицы, удалялась, клетки дважды промывали ФСБ, снимали с культурального флакона с помощью раствора трипсина, ресуспендировали в эппендорфы и облучали

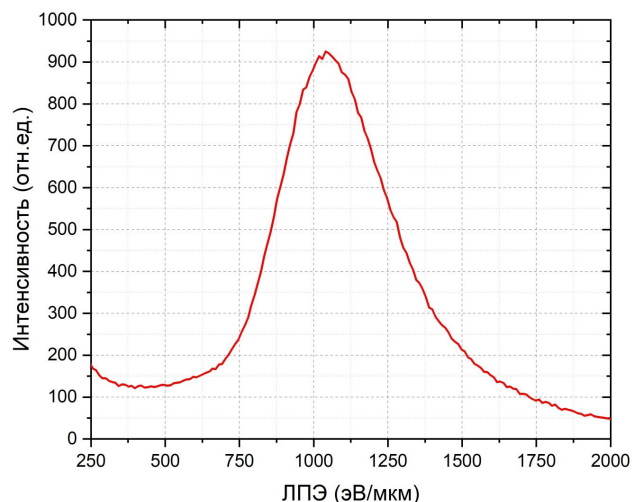


Рис. 2. Измеренный спектр ЛПЭ в точке облучения

протонами в дозе 0, 1, 2, 4, 6 и 8 Гр. Затем клетки высеивали в культуральные флаконы из расчета 50 клеток/мл среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в течение времени, необходимого для формирования колоний. Далее клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и окрашивали смесью метанола и кристаллического фиолетового в течение 30 мин при комнатной температуре. Для определения выживаемости клеток, через 12–14 сут после посева подсчитывалось количество выросших колоний, где каждая колония считается представляющей выжившую клетку, способную к пролиферации. Для определения выживаемости рассчитывали по формуле (1) эффективность посева (ЭП) для облученных и необлученных клеток:

$$\text{ЭП} = \left(\frac{\text{число выросших колоний}}{\text{число посеянных клеток}} \right) \times 100 \%. \quad (1)$$

Далее по формуле (2) рассчитывали выживаемость (S – survival):

$$S = \left(\frac{\text{ЭП облученных клеток}}{\text{ЭП контрольных клеток}} \right) \times 100 \%. \quad (2)$$

Микроядерный тест с блокированием цитокинеза. Является классическим методом оценки факторов окружающей среды (как химической, так и физической природы) и служит для выявления потенциально опасных генотоксических соединений [39]. Частота образования микроядер позволяет количественно оценить цитогенетические нарушения, которые формируют микроядра, содержащие от-

ставшие фрагменты хромосом или целые хромосомы.

Клетки карциномы легкого человека А 549 выращивали на покровных стеклах в чашках Петри. При достижении клетками 70–80 % монослоя за 24 часа до облучения добавляли наночастицы золота в концентрациях 0, 2,5; 5; 10; 15; 30 мкг/мл. Перед облучением питательная среда с наночастицами удалялась. Клетки дважды промывались ФСБ, добавлялась свежая питательная среда. В течение 30 минут после облучения в питательную среду для блокировки цитокинеза добавляли цитохалазин В (3 мкл/мл) не менее чем за 24 часа до фиксации клеток. Затем среду удаляли, дважды промывали ФСБ, фиксировали смесью метанол-уксусная кислота (3:1), промывали ФСБ, красили акридиновым оранжевым и вновь промывали ФСБ. Окрашенные стекла подсушивали и монтировали препараты на предметных стеклах.

Генотоксичность наночастиц золота оценивалась по количеству микроядер на 1000 бинуклеарных клеток. Микроядра (МЯ) считали только в бинуклеарных клетках (рис. 3). Для каждой дозы просчитывалось не менее 1000 бинуклеарных клеток, эксперименты проводились в трех повторах.

Статистическая обработка. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета статистических программ Statistica 8.0 (StatSoft). Результаты исследований представлены как среднее арифметическое результатов трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Статистические сравнения уровня значимости отличий проводились с помощью t-критерия Стьюдента для двух выборок. Уровень значимости отличий $p < 0,05$ обозначался (*), $p < 0,01$ – (**) и $p < 0,001$ – (***)

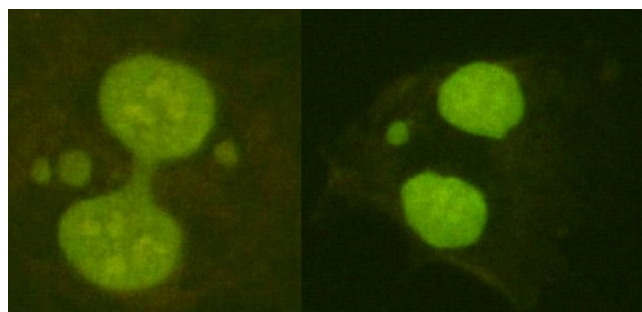


Рис. 3. Микроядра в бинуклеарных клетках карциномы легкого человека А 549

Таблица 1

Количество микроядер на 1000 бинуклеарных клеток, не подвергавшихся облучению протонами

Концентрация наночастиц Au, мкг/мл	Контроль	2,5	5	10	15	30
Число МЯ на 1000 бинуклеаров	22,7±1,5	19,6±4,9	20,2±5,6	25,5±7	24,2±7,3	20,2±4,5

Результаты

Для исследования были выбраны концентрации наночастиц золота, не оказывающие влияния на жизнеспособность клеток [35]. Как можно видеть из табл. 1, частота микроядер в необлученных клетках, которые культивировались в присутствии наночастиц в диапазоне концентраций от 2,5–30 мкг/мл, находится на уровне контроля. Не было обнаружено статистически значимой разницы между группами клеток, культивируемых в присутствии и в отсутствии наночастиц золота.

Частота образования микроядер свидетельствует о повышении генотоксического действия наночастиц при облучении протонами в дозе 2 Гр. На рис. 4 показана зависимость образования микроядер в клетках карциномы легкого человека А 549 при облучении протонами. Как уже отмечалось, количество микроядер в клетках, которые культивировались в присутствии наночастиц в диапазоне концентраций 0,1–30 мкг/мл без облучения,

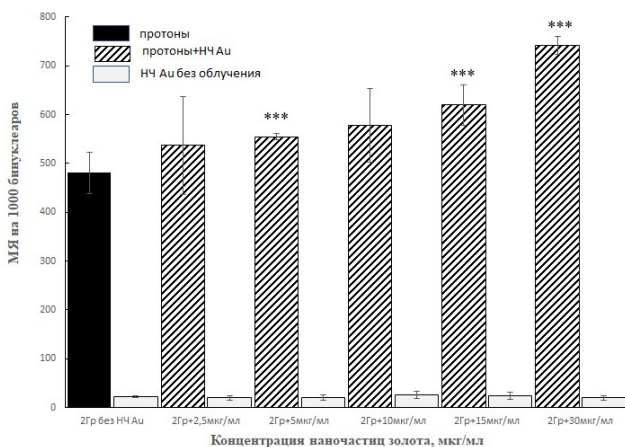


Рис. 4. Число микроядер на 1000 бинуклеарных клеток. Клетки А 549 за 24 часа до облучения протонами в дозе 2 Гр культивировались с наночастицами золота в концентрациях 0, 2,5; 5; 10; 15; 30 мкг/мл; уровень значимости отличий $p < 0,05$ обозначается (*), $p < 0,01$ – (**) и $p < 0,001$ – (***)

находится на уровне контроля. Протонное облучение вызывало увеличение частоты образования микроядер в зависимости от концентрации наночастиц. При облучении протонами дозой 2 Гр в присутствии и отсутствии наночастиц различие по частоте образования микроядер составило для концентрации наночастиц 2,5 мкг/мл – 1,1; для 5 мкг/мл и 10 мкг/мл – 1,2; для 15 мкг/мл – 1,3 и для 30 мкг/мл – 1,5.

Изменение радиочувствительности клеток в присутствии наночастиц золота представлено изменением их выживаемости при облучении протонным пучком разной дозой (рис. 5).

Кривые выживаемости клеток отражают снижение их выживаемости при добавлении металлических наночастиц с высоким Z, что отражает возникновение эффектов радиосенсибилизации. Коэффициент усиления для 10 % и 50 % уровней выживаемости составляет 1,4 и 2,5 соответственно, что согласуется с имеющи-

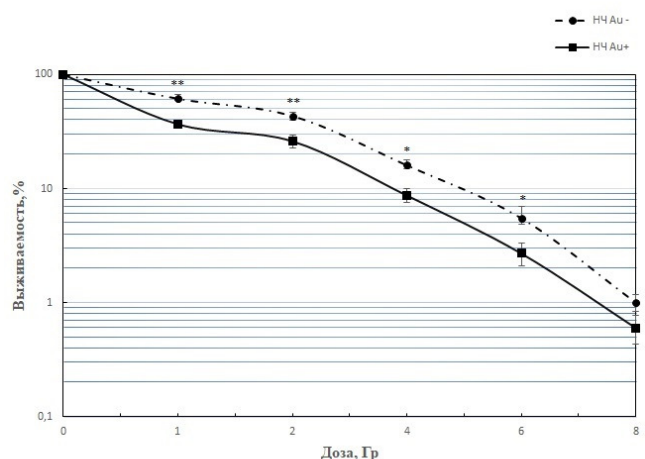


Рис. 5. Кривая выживаемости клеток А 549 после облучения протонами с предварительным культивированием с наночастицами золота в концентрации 15 мкг/мл (НЧ Au+) и без наночастиц (НЧ Au-). Статистическая обработка показала, что для выживаемости при дозах 1 Гр и 2 Гр уровень значимости отличий $p < 0,01$ – (**) для клеток обработанных и не обработанных наночастицами. Для 4 Гр и 6 Гр – $p < 0,05$ (*), для точки 8 Гр не смогли определить статистически значимое отличие

мися литературными данными [26, 36–38]. Коэффициент усиления рассчитывали, как отношение дозы, при которой выживаемость составляет 10 % или 50 % для необработанных наночастицами клеток и обработанных. Статистическая обработка показала, что для выживаемости при дозах 1 Гр и 2 Гр уровень значимости отличий $p < 0,01$ – (**) для клеток обработанных и не обработанных наночастицами. Для 4 Гр и 6 Гр – $p < 0,05$ (*), для точки 8 Гр не смогли определить статистически значимое отличие.

Обсуждение

Проведенные в работе исследования подтверждают, что использование наночастиц золота в сочетании с протонным облучением повышает эффективность повреждений опухолевых клеток.

В настоящее время имеются экспериментальные доказательства, полученные как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*, что наблюдается эффект радиосенсибилизации, обусловленный присутствием металлических наночастиц в клетках при облучении протонным пучком [26, 27, 42]. Экспериментальные наблюдения также позволяют сделать предположения о механизмах повышения радиосенсибилизации. Вероятно, определенную роль в этом процессе играет значительное увеличение образования вторичных электронов низкой энергии в металлических наночастицах в результате возбуждения плазмонов на поверхности металлических наночастиц [31, 32]. Было обнаружено, что поверхностные плазмонные возбуждения вносят большой вклад в усиление излучения вторичных электронов очень низкой энергии – 5 кэВ или менее [43, 44]. В результате, в клетках повышается генерация активных форм кислорода, что в свою очередь может привести к повреждению ДНК и апоптозу [33, 34, 45, 46].

Выбранные концентрации наночастиц ^{79}Au , будучи нетоксичными для клеток А 549, могут усиливать действие протонного облучения. Снижение выживаемости наблюдалось между клетками А 549, облученными протонами в отсутствие наночастиц золота, и облученными клетками, их содержащими. Коэффициент усиления для уровня выживаемости 10 % составил 1,4 и 2,5 для уровня выживаемости 50 %. Полученные результаты согласуются с другими литературными данными [26, 36–38].

Имеющие место различия результатов можно связать методологическими факторами: различиями используемых клеточных линий, размерами наночастиц, характеристиками протонного пучка. Это может способствовать некоторым расхождениям в результатах различных групп исследований.

Протонное облучение в присутствии наночастиц золота также повышает частоту образования микроядер в клетках карциномы легкого человека А 549. Частота образования микроядер позволяет количественно оценить цитогенетические нарушения, которые формируют микроядра, содержащие отставшие фрагменты хромосом или целые хромосомы. Полученные результаты свидетельствуют о повышении генотоксического действия наночастиц при облучении протонами в дозе 2 Гр. Протонное облучение вызывало увеличение частоты образования микроядер в зависимости от концентрации наночастиц. При облучении протонами дозой 2 Гр в присутствии и отсутствии наночастиц различие по частоте образования микроядер составило для концентрации наночастиц 2,5 мкг/мл – 1,1; для 5 мкг/мл и 10 мкг/мл – 1,2; для 15 мкг/мл – 1,3 и для 30 мкг/мл – 1,5. / Таким образом, увеличение количества микроядер после облучения протонами в клетках, содержащих наночастицы золота, свидетельствует о повышении генотоксического эффекта.

Заключение

На основании проведенных нами исследований можно сделать следующие выводы:

1. Применение наночастиц золота совместно с протонами увеличивает потенциал протонного облучения. Следует отметить, что в работе использовались нетоксичные концентрации наночастиц золота, сравнимые по влиянию на образование микроядер с необлученным контролем.
2. Под действием протонного облучения повышается генотоксическая активность наночастиц золота в клетках карциномы легкого человека А 549 в зависимости от их концентрации.
3. Снижается выживаемость клеток карциномы легкого человека А 549, облученных протонами в присутствии наночастиц золота.

Список литературы

1. Butterworth KT, McMahon SJ, Currell FJ, Prise KM. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*. 2012; 4: 4830.
2. Hubbell JH, Seltzer SM. Tables of X-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients. 1996. <http://www.nist.gov/pml/data/xraycoef/>.
3. Cui L, Her S, Borst GR, et al. Radiosensitization by gold nanoparticles: will they ever make it to the clinic? *Radiother Oncol*. 2017; 124: 344-56.
4. Gerosa C, Crisponi G, Nurchi VM, et al. Gold nanoparticles: a new golden era in oncology? *Pharmaceuticals*. 2020; 13: 192.
5. Jain S, Hirst DG, O'Sullivan JM. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *Br J Radiol*. 2012; 85: 101-3.
6. Chen Y, Yang J, Fu S, Wu J. Gold nanoparticles as radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int J Nanomedicine*. 2020; 15: 9407-30.
7. Torrisi L. Physical aspects of gold nanoparticles as cancer killer therapy. *Indian Journal of Physics*. 2021; 95: 225-34.
8. Penninckx S, Heuskin AC, Michiels C, Lucas S. Gold nanoparticles as a potent radiosensitizer: a transdisciplinary approach from physics to patient. *Cancers*. 2020; 12: 1-36.
9. Liu CJ, Wang CH, Chen ST, et al. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Medicine Biol*. 2010; 55(4): 931-45.
10. Mesbahi A. A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2010; 15(6): 176-80.
11. Robar JL, Riccio SA, Martin M. Tumour dose enhancement using modified megavoltage photon beams and contrast media. *Phys Med Biol*. 2002; 47(14): 2433-49.
12. Cho SH. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys Med Biol*. 2005; 50(15): 163-73.
13. Mesbahi A, Jamali F. Effect of photon beam energy, gold nanoparticle size and concentration on the dose enhancement in radiation therapy. *BioImpacts*. 2013; 3(1): 29-35.
14. Roeske JC, Nucez L, Hoggarth M, et al. Characterization of the theoretical radiation dose enhancement from nanoparticles. *Technol Cancer Res Treat*. 2007; 6(5): 395-401.
15. Rezaee M., Hill RP, Jaffray DA. The Exploitation of Low-Energy Electrons in Cancer Treatment. *Radiat Res*. 2017; 188: 123-43.
16. Lechtman E, Chattopadhyay N, Cai Z, et al. Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys Med Biol*. 2011; 56(15): 4631-47.
17. Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res*. 2010; 173(6): 719-28.
18. Geng F, Song K, Xing JZ, et al. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology*. 2011; 22(28): 285101.
19. Wang C, Li X, Wang Y, et al. Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *J Nanopart Res*. 2013; 15(5): 1642.
20. Wang C, Jiang Y, Li X, Hu L. Thioglucose-bound gold nanoparticles increase the radiosensitivity of a triple-negative breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Breast Cancer*. 2015; 22(4): 413-20.
21. Jain S, Coulter JA, Hounsell AR, et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011; 79(2): 531-9.
22. Liu CJ, Wang CH, Chien CC, et al. Enhanced X-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology*. 2008; 19(29): 295104.
23. Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine*. 2009; 5(2): 136-42.
24. Wolfe T, Chatterjee D, Lee J, et al. Targeted gold nanoparticles enhance sensitization of prostate tumors to megavoltage radiation therapy *in vivo*. *Nanomedicine*. 2015; 11(5): 1277-83.
25. Ghita M, McMahon SJ, Taggart LE, et al. A mechanistic study of gold nanoparticle radiosensitisation using targeted microbeam irradiation. *Sci Rep*. 2017; 7: 44752.
26. Polf JC, Bronk LF, Driessen WH, et al. Enhanced relative biological effectiveness of proton radiotherapy in tumor cells with internal-

- ized gold nanoparticles, *App. Phys. Lett.* 2011; 98: 1937026.
27. Kim JK, Seo SJ, Kim HT, et al, Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiatoreffects on metallic nanoparticles. *Phys Med Biol.* 2012; 57: 83027.
28. Kuncic Z, Lacombe S. Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment. *Phys Med Biol.* 2018; 63: 02tr1.
29. Verkhovtsev A, Korol AV, Solov'yov AV. Irradiation-induced processes with atomic clusters and nanoparticles. In: Solov'yov AV, editor. *Nanoscale Insights into Ion-Beam Cancer Therapy.* Cham: Springer International Publishing, 2017: 237-76.
30. Peukert D, Kempson I, Douglass M, Bezak E. Metallic nanoparticle radiosensitisation of ion radiotherapy: a review. *Phys Med.* 2018; 47: 121-8.
31. Seo Seung Jun, Jae Kun Jeon, Sung Mi Han, Jong Ki Kim. Reactive Oxygen Species-Based Measurement of the Dependence of the Coulomb Nanoradiator Effect on Proton Energy and Atomic Z Value. *Int J Rad Biol.* 2017.
32. Belkic' D. Review of theories on ionization in fast ion-atom collisions with prospects for applications to hadron therapy, *J Math Chem.* 2010; 47: 1366-141922.
33. Mitter RA, Wang Y, Shah J, et al. Proton beam radiation induces DNA damage and cell apoptosis in glioma stem cells through reactive oxygen species. *Sci Rep.* 2015; 5: 13961.
34. Baluchamy S, Ravichandran, Periyakaruppan A, et al. Induction of cell death through alteration of oxidants and antioxidants in lung epithelial cells exposed to high energy protons. *J Biol Chem.* 2010; 32: 24769-2477420.
35. Рзянина АВ, Мицын ГВ, Восканян КШ, Гаевский ВН. Повышение генотоксической активности в клетках карциномы легкого человека А 549 при γ -облучении в присутствии наночастиц золота. *Медицинская физика.* 2021; (4(92)): 24-31.
36. Abdul Rashid R, Zainal Abidin S, Khairil Anuar MA, et al. Radiosensitization effects and ROS generation by high Z metallic nanoparticles on human colon carcinoma cell (HCT116) irradiated under 150 MeV proton beam. *Open-Nano.* 2019; 4: 100027.
37. Cunningham C, de Kock M, Engelbrecht M, et al. Radiosensitization Effect of Gold Nanoparticles in Proton Therapy. *Frontiers in Public Health.* Article 699822. 2021; 9(7): 1-12.
38. Enferadi M, Fu SY, Hong JH, et al. Radiosensitization of ultras-small GNP-PEG-cRGDfK in ALTS1C1 exposed to therapeutic protons and kilovoltage and megavoltage photons. *Int J Radiat Biol.* 2018; 94: 124-36.
39. Michael Fenech Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols* 2007; 2(5): 1084-104.
40. Джелепов ВП и др. Шестикабинный клинико-физический комплекс. *Медицинская радиология* 1987; (8): 81-85.
41. Molokanov A, Shvidkiy S, Khassenova I, Gnanina C. Detectors for measurements at heavy charged particles beams for radiation therapy. *New Trends in Nuclear Physics Detectors (NT-NPD-2021).* 2021. Warsaw, Poland, P. 14.
42. Kim J-K, Seo S-J, Kim K-H, et al. Therapeutic application of metallic nanoparticles combined with particle-induced X-ray emission effect. *Nanotechnology.* 2010 Oct 22; 21(42): 425102.
43. Verkhovtsev AV, Korol AV, Solov'yov AV. Electron production by sensitizing gold nanoparticles irradiated by fast ions. *J Phys Chem C* 2015; 119: 11000-13.
44. Verkhovtsev AV, Korol AV, Solov'yov AV. Revealing the mechanism of the low energy electron yield enhancement from sensitizing nanoparticles. *Phys Rev Lett* 2015; 1143: 24.
45. Li S, Penninckx S, Karmani L, Heuskin A-C, Watillon K, Marega R, et al. LET-dependent radiosensitization effects of gold nanoparticles for proton irradiation. *Nanotechnology* 2016 Nov 11; 27(45): 455101.
46. Schlathoelter T, Eustache P, Porcel E, et al. Improving proton therapy by metal-containing nanoparticles: nanoscale insights. *Int J Nanomed* 2016; 11: 1549-56.

IMPROVEMENT OF PROTON IRRADIATION EFFECTIVENESS OF HUMAN LUNG CARCINOMA CELLS A 549 IN THE PRESENCE OF GOLD NANOPARTICLES

A.V. Rzyanina¹, G.V. Mitsyn¹, S.V. Shvidkij¹, A.G. Molokanov¹, K.N. Shipulin¹,
A.V. Agapov¹, V.N. Gaevsky¹, I. Khassenova^{1,2}

¹ Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia

² The Institute of Nuclear Physics, Almaty, Kazakhstan

Purpose: To study was to study the effect of GNP nanoparticles on tumor cells of human lung carcinoma A 549 when irradiated with protons.

Materials and methods:

Cell culture: Human lung carcinoma cells A 549.

Gold nanoparticles Au/PEG 6000/W 200/30 nm: A colloidal solution of gold nanoparticles purchased from the firm M 9 Nanomaterials & Technologies was used in the work.

Proton irradiation: The irradiation of cells was carried out on a therapeutic proton beam in the Medical and Technical Complex of the Laboratory of Nuclear Problems Joint Institute for Nuclear Research.

Determination of radiosensitivity of cells: By determining the clonogenic survival of cells.

Determination of the genotoxic activity of nanoparticles under the action of proton irradiation: investigated using a micronucleus test with blocking cytokinesis. The genotoxicity of gold nanoparticles was estimated by the number of micronuclei per 1000 binuclear cells. Micronucleus were counted only in binuclear cells. At least 1000 binuclear cells were calculated for each dose, experiments were carried out in three repeats.

Results:

The frequency of micronucleus formation indicates an increase in the genotoxic effect of nanoparticles when irradiated with protons at a dose of 2 Gy. Proton irradiation caused an increase in the frequency of micronucleus formation depending on the concentration of nanoparticles. When irradiated with protons at a dose of 2 Gy in the presence and absence of nanoparticles, the difference in the frequency of micronucleus formation for the concentration of nanoparticles was 2.5 µg/ml – 1.1; for 5 µg/ml and 10 µg/ml – 1.2; for 15 µg/ml – 1.3 and for 30 µg/ml – 1.5. Cell survival curves reflect a decrease in their survival rate when metal nanoparticles with high Z are added, which reflects the occurrence of radiosensitization effects. The gain for 10 % and 50 % survival rates is 1.4 and 2.5, respectively.

Conclusions:

Under the influence of proton irradiation, the genotoxic activity of gold nanoparticles in human lung carcinoma cells A 549 increases, depending on their concentration. The survival rate of human lung carcinoma A 549 cells irradiated with protons in the presence of gold nanoparticles decreases.

Key words: *proton irradiation, Au nanoparticles, cells A 549, clonogenic survival*

E-mail: rzjanina@mail.ru