

Попов Антон Леонидович

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТРАТ-
СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ (CeO₂)**

03.01.02.- биофизика

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Пушино - 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук и Школе инженерии и материаловедения Лондонского университета Королевы Марии (Лондон, Великобритания).

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат физико-математических наук
Селезнева Ирина Ивановна

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук
Межевикина Людмила Михайловна
в.н.с. лаборатории механизмов рецепции
ИБК РАН

кандидат биологических наук
Андреева Елена Ромуальдовна,
в.н.с. лаборатории клеточной физиологии
ГНЦ РФ ИМБП РАН

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова», Биологический
факультет

Защита состоится « 01 » марта 2017 г. в 13-30 на заседании совета Д 002.093.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН:
<http://web.iteb.psn.ru>.

Автореферат разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.ф.-м.н.

Ланина Н.Ф.

Актуальность темы:

Современный уровень развития нанотехнологий позволяет получать новые полифункциональные материалы, обладающие уникальными физико-химическими свойствами, которые находят свое широкое применение в биомедицинских приложениях. Одним из наиболее перспективных материалов для биомедицинских целей является нанокристаллический диоксид церия (CeO_2) (Patil S. et al, 2007, Colon J. et al, 2011, Rubio L. et al, 2015, Liying H. et al, 2015). Наличие дефектов кристаллической решетки («кислородных вакансий»), двух стабильных степеней окисления (Ce^{3+} и Ce^{4+}) и низкая энергия их образования, обуславливают уникальную редокс-активность данного соединения, в том числе его антиоксидантное действие в системах *in vitro* и *in vivo* (Shcherbakov A. et al, 2015, Walkey C. et al, 2015, Vinardell M. et al, 2015). В отличие от классических природных антиоксидантов (мелатонин, цистеин, аскорбиновая кислота), наночастицы CeO_2 способны восстанавливать свою антиоксидантную активность, что позволяет им многократно участвовать во внутриклеточных редокс-реакциях, инактивируя широкий спектр свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) (Dowding D. et al, 2012, Xue Y. et al, 2011).

Ранее показано, что наночастицы CeO_2 обладают защитным действием в некоторых моделях окислительного стресса (Zholobak N. et al, 2011) и при воздействии ксенобиотиков (Zhang Q. et al, 2014). Большинство исследователей рассматривают его способность инактивировать АФК и свободные радикалы как основной механизм защитного действия в условиях окислительного стресса (Baker C., 2013, von Montfort C. et al, 2015). Однако совсем недавно было показано, что наночастицы CeO_2 также способны модулировать экспрессию ряда генов (Rim T. et al, 2012, Cai X. et al, 2013) и влиять на внутриклеточные сигнальные пути (Niu J. et al, 2011, Selvaraj V. et al, 2015, Nelson B. et al, 2016). В связи с этим исследование механизмов защитного действия нового типа цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 , в условиях окислительного стресса, индуцированного различными физико-химическими факторами, является актуальной задачей.

Ультрамалые размеры и высокая реакционная активность поверхности наночастиц ограничивают возможность их эффективной и высокоточной доставки в целевые ткани и органы (Wilczewska A. et al, 2012). В частности, физико-химические свойства поверхности наночастиц CeO_2 обуславливают адсорбцию различных белков (Patil S. et al, 2007), пептидов (Shruti R. et al, 2013), ионов (Horie M. et al, 2011), функциональных групп биомолекул (Singh S. et al, 2011), оказывая влияние на время их циркуляции в кровотоке, органную локализацию и биологический эффект (Portioli C. et al, 2015). Взаимодействие наночастиц с белками крови может приводить к образованию так называемой «белковой короны» на ее поверхности (Horie M. et al, 2009), что определяет тип (Cedervall T. et al, 2007) и время эндоцитоза (Patil S. et al, 2007), а также их финальную внутриклеточную локализацию (Vertegel A. et al, 2007, Maiorano G. et al, 2010). В связи с этим разработка эффективных систем адресной доставки наночастиц CeO_2 , способных обеспечить процессы их дозирования и контролируемого выхода, а также заданную биологическую активность, является актуальной задачей современной биомедицины.

Вместе с тем существует ряд работ, демонстрирующих токсические эффекты наночастиц CeO_2 в моделях *in vitro* и *in vivo* (Frieke K. et al, 2015, Pulido-Reyes G. et al 2015), которые связывают с их способностью генерировать АФК за счет их редокс-активной поверхности (Park et al. 2008, Kumari et al. 2014). Вследствие этого основным в определении перспектив применения НДЦ в биомедицинских технологиях является вопрос биобезопасности, в том числе вопрос вопроса клиренса (Yang S. et al, 2013, Li R. et al, 2015, Rui Q. et al, 2013). Форма, размер, кристалличность, заряд поверхности являются ключевыми физико-химическими

характеристиками наночастиц, обуславливающими их биологическую активность (Shin S. et al, 2015, Ould-Moussa et al. 2014, Kim Y. et al, 2014). Данные параметры зависят от схемы и условий синтеза, природы использованных прекурсоров и сурфактантов (Asati A. 2010, Dahle J., 2015). В связи с этим каждая новая схема синтеза наночастиц CeO_2 требует проведения комплексной оценки их агрегативной стабильности в различных средах, цитотоксичности и биологической активности в системах *in vitro* и *in vivo*.

Цель работы

Исследование физико-химических характеристик и биологической активности цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в моделях *in vitro* и *in vivo*, а также разработка систем их внутриклеточной доставки.

Задачи исследования:

1. Исследовать влияние цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток млекопитающих различного типа.
2. Исследовать биологическую активность цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в моделях окислительного стресса, индуцированного различными химическими и физическими факторами *in vitro* и *in vivo*.
3. Разработать систему внутриклеточной доставки наночастиц CeO_2 на основе полиэлектролитных микрокапсул.

Научная новизна.

- Показано, что цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 не обладают эмбрио- и цитотоксическим действием в широком диапазоне концентраций (10^{-4} - 10^{-9} М) и способны стимулировать пролиферацию первичных эмбриональных фибробластов мыши и мезенхимальных стволовых клеток человека.
- Выявлено, что цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 способны эффективно защищать клетки млекопитающих от окислительного стресса, индуцированного различными физико-химическими факторами, включающими ионизирующее излучение и экзогенные оксиданты. Выдвинута гипотеза о комплексном механизме радиозащитного действия наночастиц CeO_2 .
- Показана возможность инкапсуляции цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в полиэлектролитный матрикс из синтетических (полиаллиламин гидрохлорид 56 кДа и полистиролсульфонат натрия 70 кДа) и биodeградируемых полимеров (поли-L- аргинин 15-70 кДа и декстран сульфат 40 кДа). Показано, что синтезированные микрокапсулы являются биосовместимыми, проникают в клетку и защищают ее от окислительного стресса, индуцированного экзогенным пероксидом водорода, при этом время деградации микрокапсулы зависит от природы инкапсулирующего полимера.

Практическая ценность

Разработанные подходы к культивированию МСК мыши и человека с использованием наночастиц CeO_2 , регламент их пробоподготовки и схемы внесения в культуру клеток могут быть использованы для создания протоколов клеточных технологий.

Полученные данные биологической активности цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 могут быть использованы при разработке нового класса антиоксидантных препаратов для биомедицинских целей.

Предложенная схема интеграции наночастиц в структуру полиэлектролитных микрокапсул закладывает основы для создания новой системы внутриклеточной доставки терапевтически активных наноматериалов с возможностью сохранения их заданных свойств.

Работа выполнялась в соответствии с планами проектов РФФИ № 14-04-32199 мол_а, 14-44-03615 р_центр_а, проекта УМНИК-2011, а также «*Стипендии Президента РФ для обучения за рубежом-2014*» в рамках зарубежной стажировки под руководством профессора Сухорукова Г.Б. по теме «Разработка дистанционно управляемых микро-и наноразмерных систем для адресной доставки терапевтических нанобиоматериалов в клетку» в Лондонском университете Королевы Марии.

Личный вклад автора.

Основная экспериментальная часть выполнена лично автором (работа с клеточными культурами, анализ биологической активности наночастиц CeO_2 после воздействия различных стресс-факторов, синтез и исследование микрокапсул) в период с 2010 по 2016 гг., а также совместно с сотрудниками лаборатории роста клеток и тканей ИТЭБ РАН. В работе использованы материалы, полученные как автором лично, так и в результате сотрудничества: в части синтеза образцов нанокристаллического диоксида церия с лабораторией синтеза функциональных материалов и переработки минерального сырья ИОНХ РАН (чл.-корр. РАН, проф., д.х.н., Иванов В.К.), в части разработки систем внутриклеточной доставки наноматериалов с лабораторией нано-и биоматериалов Школы инженерии и материаловедения Лондонского университета Королевы Марии (профессор Сухоруков Г.Б.).

Публикации и апробация работы.

По теме диссертации опубликовано 28 работ, включая 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК. Отдельные части работы были представлены на российских и международных конференциях в виде устных и стендовых докладов, в том числе на Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука 21 века» - 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 (Пущино, Россия), Международной конференции молодых ученых Экспериментальная и теоретическая биофизика – 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 (Пущино, Россия), Конкурсе молодых ученых ИТЭБ РАН-2011, 2012, 2013, 2014, 2015 (Пущино, Россия), Международной научной конференции «Полифункциональные химические материалы и технологии» (Томск, 2013), Первой региональной конференции инновационных проектов Московской области «УМНИК»-2011 (Москва), The European Human Genetics Conference 2015, (Glasgow, UK), Конференции молодых ученых «Перспективные направления онкологии и радиологии-2015» (г. Обнинск, Россия), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов- 2015 (Москва, Россия), научной конференции ToxRad-2015 (Санкт-Петербург), Конгрессе молодых ученых-биологов «СИМБИОЗ» 2013, 2015 (Воронеж, Новосибирск), IX Международной конференции «Биоантиоксидант-2015» (Москва), IV и V Съезд биофизиков России-2014, 2015 (Нижний Новгород, Ростов-на-Дону), в рамках Международных школ DoReMi InterRAD Course, «Modelling radiation effects from initial physical events -2014» (Pavia, Italy), DoReMi InterRAD course, «Integrating Low Dose Research-2013» (Munich, Germany), DoReMi InterRAD course «The Molecular Mechanisms of Radiation Carcinogenesis-2015» (Munich, Germany), Международной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии-2016» (Севастополь), Международной конференции «Nanomaterials and Living Systems» NLS-2016 (Москва).

Структура и объем диссертации:

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация изложена на 144 страницах печатного текста, иллюстрирована 54 рисунками, содержит 2 таблицы, список цитируемой литературы включает 251 ссылку.

Список принятых сокращений

НДЦ, CeO_2 . наночастицы диоксида церия
ПАА - полиаллиламин гидрохлорид
ПСС - полистиролсульфонат натрия
ПЛА - поли L-аргинин гидрохлорид
ДС - декстран сульфат
АФК - активные формы кислорода
в/в - внутривенное введение
в/б - внутрибрюшинное введение
0,9% NaCl - физиологический раствор
ПХЭ-полихроматофильные эритроциты
МЯ – микроядра
НТАП - низкотемпературная аргонная плазма
 ζ – дзета потенциал
СОД-супероксиддисмутаза

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробоподготовка наночастиц CeO_2 . В работе был использован золь НДЦ, стабилизированный мономолекулярным слоем цитрат-ионов, синтезированный в ИОНХ РАН по оригинальной методике (Ивановой О. и др., 2011). Для биологических исследований проводили осаждение наночастиц CeO_2 путем добавления 10% соляной кислоты (до pH=3) с последующим центрифугированием при 20°C, 11 200 g в течение 10 минут. Осадок наночастиц ресуспендировали в дистиллированной воде и повторно центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок снова ресуспендировали в воде и доводили до pH=7,2-7,4 путем добавления 10% раствора аммиака.

Модели окислительного стресса

Облучение ультрафиолетовым излучением проводили с использованием лампы Camelion 26-3U E27 blacklight мощностью 24,6 КДж/м². Лампа располагалась снизу облучаемого планшета на расстоянии 15 см.

Облучение НТАП проводили с использованием установки MicroPlaSter β, (AD'TEK Plasma Technology Co.Ltd, Япония, Германия, предоставленную в ИТЭБ РАН Объединенным Институтом Высоких Температур РАН (Москва). Культуру клеток линии NCTC clone L929 облучали в 96 луночных планшетах в ламинарном боксе. Все эксперименты с клетками проводили при расстоянии от апертуры плазматрона 3 см, с продолжительностью облучения 10 минут. Облучение производили однократно.

Облучение рентгеновским излучением проводили с использованием терапевтической установки РУТ-15 (Россия) в дозе 1 Гр для суспензий наночастиц CeO_2 , 1,5 Гр для микроядерного теста *in vivo*, 15 Гр для культуры клеток *in vitro*, 7 Гр для теста на выживаемость *in vivo*, при мощности дозы 1 Гр/ мин, напряжении 200 кВ, фокусном расстоянии 37,5 см и силе тока 20 мА.

Увеличение концентрации H_2O_2 в цитоплазме клетки выше 1 мкМ вызывает нарушение жизнедеятельности клеток и приводит к их гибели (Nakamura J. et al, 2003). Исследование протекторного действия наночастиц CeO_2 при воздействии экзогенного пероксида водорода, проводилось путем внесения в культуральную среду на 30 минут 500мкМ H_2O_2 для клеток NCTC clone L929 и 1,5 мМ для клеток В-50. После инкубации клеток с H_2O_2 среда заменялась на свежую.

Анализ гидродинамического радиуса и дзета-потенциала проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Распределение по размерам и гидродинамический радиус наночастиц были определены при формировании суспензий на основе деионизованной воды, физиологического раствора, культуральной среды DMEM/F12 и культуральной среды DMEM/F12, содержащей 5% телячью фетальную сыворотку.

Культуры клеток. В работе использовали перевиваемые линии мышинных фибробластов NCTC clone L929, первичные эмбриональные фибробласты мыши и линию нейробластомы крысы B-50. Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 (1:1, "Life Technologies", США), с 10% сывороткой, 2 mM L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, раствор витаминов (ПанЭко, Россия) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂.

Культивирование эмбрионов. Эксперименты проводились на двухклеточных эмбрионах, полученных от 8-10-недельных самок мышей (линия SHK), которых умерщвляли путем цервикальной дислокации. Эмбрионы выращивали в течение четырех дней в модифицированной среде M16 (Sigma, США) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, пока зародыши контрольной группы не достигли конечной стадии предимплантационного развития (бластоцисты). Каждые 24 часа проводили морфологический анализ эмбрионов, с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200M (Zeiss). На стадии бластоцисты состояние эмбрионов оценивали путем изучения формы, размера и расположения клеток трофобласта и внутренней клеточной массы (ВКМ). Определяли общее количество эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты. Количество клеток, вошедших в стадию апоптоза, и количество мертвых клеток определяли с использованием набора флуоресцентных красителей YoPro-1/PI (Life Technologies, USA) согласно протоколу производителя.

МТТ тест. Уровень жизнеспособности клеток определяли по уровню активности митохондриальных дегидрогеназ через 24, 48, 72 часа культивирования в присутствии наночастиц CeO₂.

Анализ пролиферативной активности клеточных культур проводили путем оценки их конфлюэнтности и подсчета количества клеток с использованием планшетного ридера Clone Select Imager (Molecular Device, USA).

Оценка уровня лактатдегидрогеназы. Гибель клеток оценивали по количеству свободной лактатдегидрогеназы в культуральной среде через 24 часа после внесения наночастиц CeO₂ в культуру клеток. Анализ проводился в соответствии с протоколом производителя (Thermo Scientific™ Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit).

Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентными красителями. Для оценки соотношения количества живых и мертвых клеток в культуре использовали набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen), содержащий красители SYTO 9 (окрашивает все клетки, $\lambda = 485/498$ нм) и пропидий йодид (окрашивает ядра мертвых клеток, $\lambda = 535/617$ нм). Клетки окрашивали смесью красителей (1 мкг/мл) путем смены культуральной среды. Наблюдение за морфологией проводилось на инвертированном микроскопе Axiovert 200 (Carl Zeiss). Микрофотосъемка осуществлялась с использованием цифрового фотоаппарата Power Shot A620 (Canon).

Конфокальная микроскопия. Посев клеток на поверхность покровных стекол проводили с плотностью 10 тыс/см². Через 24 часа после посева клеток в среду культивирования вносили 10⁻⁵ М наночастиц CeO₂. Через 24 часа среду в чашке заменяли на PBS, содержащий ДНК-тропный люминесцентный краситель Hoechst-33342 ($\lambda_{ex}=345$ нм, $\lambda_{em}=487$). Микрофотосъемка проводилась на прямом конфокальном микроскопе LSM -510 (Leica, Германия).

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Для подготовки образцов к исследованию методом просвечивающей электронной микроскопии после фиксации образцы

промывали PBS и в течение 2 часов проводили фиксацию в 1% растворе четырехокси осмия. Обезжизнение образцов производили в спиртах восходящей концентрации, затем в ацетоне и заливали в эпон-812. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-3 и контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Исследование образцов проводили в электронном микроскопе Tesla BS-500 при увеличении 10000.

Концентрацию пероксида водорода при воздействии рентгеновского излучения на суспензии наночастиц CeO_2 в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) определяли методом усиленной хемилюминесценции в системе люминол – 4-йодофенол – пероксидаза хрена.

Концентрацию гидроксильных радикалов при воздействии рентгеновского излучения на суспензии наночастиц CeO_2 в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) определяли с помощью их реакции с кумарин-3-карбоновой кислотой.

Скорость разложения пероксида водорода в присутствии наночастиц CeO_2 оценивали полярографическим методом с использованием кислородного электрода Кларка.

Микроядерный тест. Уровень цитогенетических повреждений исследовали на самцах белых мышей аутбредной линий SHK весом 24-26 грамм, которым внутрибрюшинно и внутривенно вводили суспензию наночастиц CeO_2 (0.00013 мг/кг) в 0,9 % NaCl. В качестве контроля использовали группу мышей, которым вводили изотонический раствор 0,9 % NaCl. Через 24 часа мышей облучали в дозе 1,5 Гр рентгеновского излучения. Эвтаназию мышей проводили путем декапитации через 28 часов. Цитологические препараты костного мозга готовили по стандартной методике (Schmid, 1975), с некоторыми модификациями. Препараты костного мозга окрашивали краской Гимза по Романовскому. На каждую экспериментальную точку использовали не менее 6 животных, анализировали по 2 препарата от одной мыши по 1000 ПХЭ в каждом препарате, а в контроле – до 3000 клеток. Критерием уровня цитогенетического повреждения служил процент клеток с микроядрами (Дурнев А., 1998).

Радиозащитный эффект наночастиц CeO_2 in vivo определяли на 2-х месячных самцах белых мышей аутбредной линий SHK весом 24-26 грамм, которым внутрибрюшинно вводили раствор наночастиц CeO_2 (0.00013 мг/кг) за 15 мин до или через 15 мин после облучения в дозе 7 Гр. Контролем служили две группы мышей: инъектированные изотоническим раствором NaCl и облученные в дозе 7 Гр, и не подвергавшиеся облучению. Каждая экспериментальная группа состояла из 30 мышей, ежедневно проводилось взвешивание каждого животного и учёт количества потребляемой воды и пищи на каждую группу мышей.

ПЦР в реальном времени. мРНК из суспензии клеток (10^3 - 10^5) выделяли с использованием реагента Trizol (Invitrogen, USA). Обратную транскрипцию проводили набором фирмы Sileks (Россия). ПЦР выполняли в реакционной смеси с SybrGreen (Syntol, Россия) на амплификаторе АНК 32 (ДНК-Технологии, Россия).

Схема синтеза полиэлектролитных микрокапсул. Полиэлектролитные микрокапсулы были синтезированы методом layer-by-layer с использованием биodeградируемых (ДС \approx 40 кДа, ПЛА \approx 15-70 кДа) и синтетических (ПАА \approx 56 кДа, ПСС \approx 70 кДа) полиэлектролитов и кальций-карбонатной подложки. Инкапсуляция наночастиц CeO_2 проводилась путем замены слоя полиэлектролита на золь наночастиц CeO_2 .

Просвечивающая электронная микроскопия полиэлектролитных микрокапсул была произведена на электронном микроскопе JEOL-JEM 2010 (Япония). После испарения жидкой фракции, образец был помещен в вакуумную камеру и проанализирован при напряжении 200 кВ и увеличениях до 300000.

Сканирующая электронная микроскопия микрокапсул была произведена с использованием электронного микроскопа FEI Inspect F (USA). Напыление проводили с использованием золота или платины.

Статистический анализ. Опыты проводили в 3-4 кратной повторности, аналитические определения для каждой пробы осуществляли в двух повторностях. Результаты опытов сравнивали с контролем. Для определения достоверности результатов исследований применяли метод вариационной статистики. Полученные данные обрабатывали с использованием статистических критериев (U- критерий Манна-Уитни). Статистически достоверные различия при $p \leq 0,001$ до $p \leq 0,05$. Полученные данные обрабатывали с использованием программ ORIGIN 7.5 и Microsoft Excel 2007.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование физико-химических характеристик и агрегативной устойчивости цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в различных биологических средах

Метод синтеза наночастиц CeO_2 , основанный на использовании лимонной кислоты в качестве биологически допустимого лиганда, обеспечивает ультрамалый их размер (~ 2 нм) и агрегативную устойчивость в воде. Согласно данным УФ- видимой спектроскопии, CeO_2 имеет широкую полосу поглощения в УФ диапазоне (рис. 1 Б). Согласно данным ПЭМ (рис. 1 В), полученный золь состоит из слабо агрегированных частиц CeO_2 размером 1.5–2.5 нм, имеющих форму, близкую к сферической. По данным динамического светорассеяния (табл. 1), средний гидродинамический диаметр частиц CeO_2 в исходном растворе составляет 3,4 нм. Это хорошо согласуется с данными ПЭМ и свидетельствует о том, что присутствие мономолекулярного (или субмономолекулярного) слоя цитрат-ионов существенно не сказывается на размерах частиц. Разведение наночастиц CeO_2 в биологических растворах приводит к изменению их гидродинамического радиуса и дзета-потенциала (табл.1). При разведении наночастиц CeO_2 в деионизованной воде (рН воды $\approx 7,2$) гидродинамический радиус наночастиц CeO_2 сохраняется близким к исходному (3–4 нм). Разведение в физиологическом растворе (0,9 % NaCl) приводит к агрегации наночастиц до 20–30 нм и снижению дзета-потенциала. Размер наночастиц CeO_2 в суспензиях, приготовленных на основе культуральной среды DMEM/F12, содержащих буфер с рН=7.2 составляет 30–40 нм, при этом в растворе наблюдаются частицы также субмикронного размера (300–400 нм). Разведение наночастиц CeO_2 в среде DMEM/F-12, содержащую телячью фетальную сыворотку, обеспечивает монодисперность системы, в которой гидродинамический радиус наночастиц составляет порядка 6–7 нм (рис. 1 Д). Ранее показано, что отрицательный дзета

Таблица 1. Гидродинамический радиус и дзета-потенциал цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 при разведении в различных биологических жидкостях.

	Исходный золь	Вода MQ (18 МОм·см) рН=7,2	Физ. Раствор 0,9%	Среда DMEM/F12	Среда DMEM/F12+ 5% сыворотка
Гидродинамический радиус, нм	3,4 \pm 1,2	3,4 \pm 3,8	24,7 \pm 4,7	34,9 \pm 6,4	6,7 \pm 2,5
Дзета-потенциал, мВ	-63,2 \pm 2,7	-57,1 \pm 4,7	-31,1 \pm 2,8	-7,79 \pm 4,8	-14,7 \pm 5,1

потенциал поверхности наночастиц обуславливает минимальную адсорбцию белков (либо полное ее отсутствие) на поверхности наночастицы (Patil S. et. al, 2007). Поскольку слой цитрат - ионов, покрывающий поверхность наночастицы, обеспечивает отрицательный дзета-потенциал поверхности, то можно предположить, что фактором стабилизирующим размер наночастиц, являются белки сыворотки, частично адсорбируемые на их поверхности. На основе этих результатов можно сделать вывод,

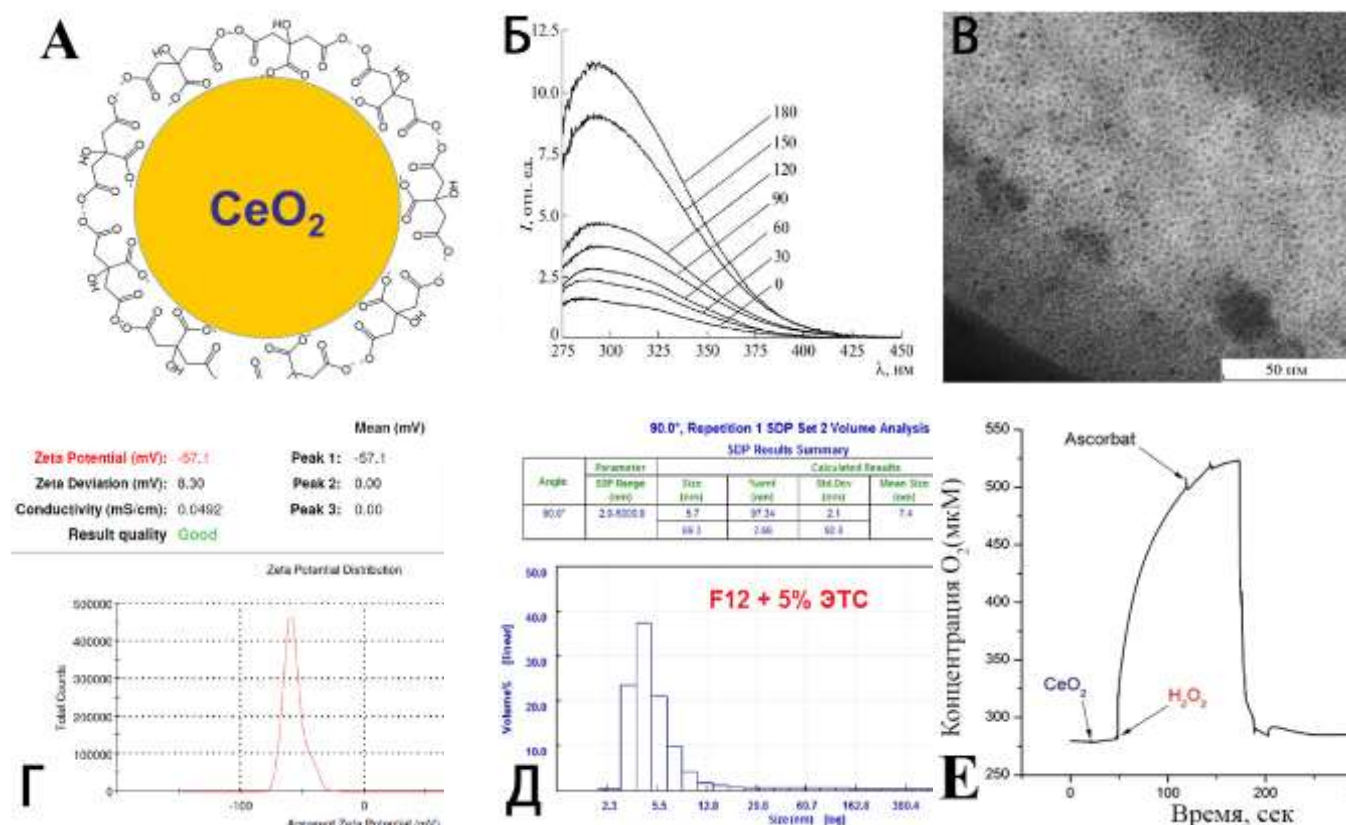


Рисунок 1. Схематическое изображение структуры наночастицы CeO_2 , синтезированной цитратным способом (А), УФ - спектры поглощения коллоидных растворов, образующихся при смешении водных растворов нитрата церия (III), лимонной кислоты и аммиака. Справа указана продолжительность синтеза (в минутах) (Б), ПЭМ микрофотография наночастиц CeO_2 в цитратном золе (В), ζ – потенциал наночастиц CeO_2 при разведении в воде MQ (Г). Гидродинамический радиус наночастиц CeO_2 при разведении в культуральной среде, содержащей 5 % сыворотки КРС (Д), Оценка скорости диссоциации H_2O_2 (1 mM) в присутствии наночастиц CeO_2 (1,4 мкМ) полярографическим методом (Е).

что разведение наночастиц CeO_2 в культуральной среде, содержащей сыворотку, сохраняет размер наночастиц в пределах 10 нм. Полярографическим методом было показано, что наночастицы CeO_2 обладают ярко выраженной каталазо-подобной активностью и способны эффективно разлагать пероксид водорода в концентрациях многократно превышающих концентрацию наночастиц (рис. 1 Е).

2. Исследование влияния цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток млекопитающих.

2.1. Исследование внутриклеточной локализации цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 и их влияния на морфологические характеристики клеток.

Исследование внутриклеточной локализации наночастиц CeO_2 и их влияния на морфологию клеток было проведено методом конфокальной, сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии. Культивирование клеток линии NCTC clone L929 в течение 24 часов в присутствии наночастиц CeO_2 (10^{-5} M) не приводило к изменению их морфологических характеристик (рис. 2 В-Г). Клетки в контрольных и обработанных наночастицами препаратах имеют характерные для активных фибробластов овальные клеточные ядра, развитые мембраны с микрошипами, выпячиваниями, ламело- и филоподиями. Анализ морфологических характеристик клеточной культуры после инкубации с наночастицами CeO_2 позволяет сделать вывод об отсутствии негативного воздействия: клетки, имеют распластывание по типу лидирующего края, а

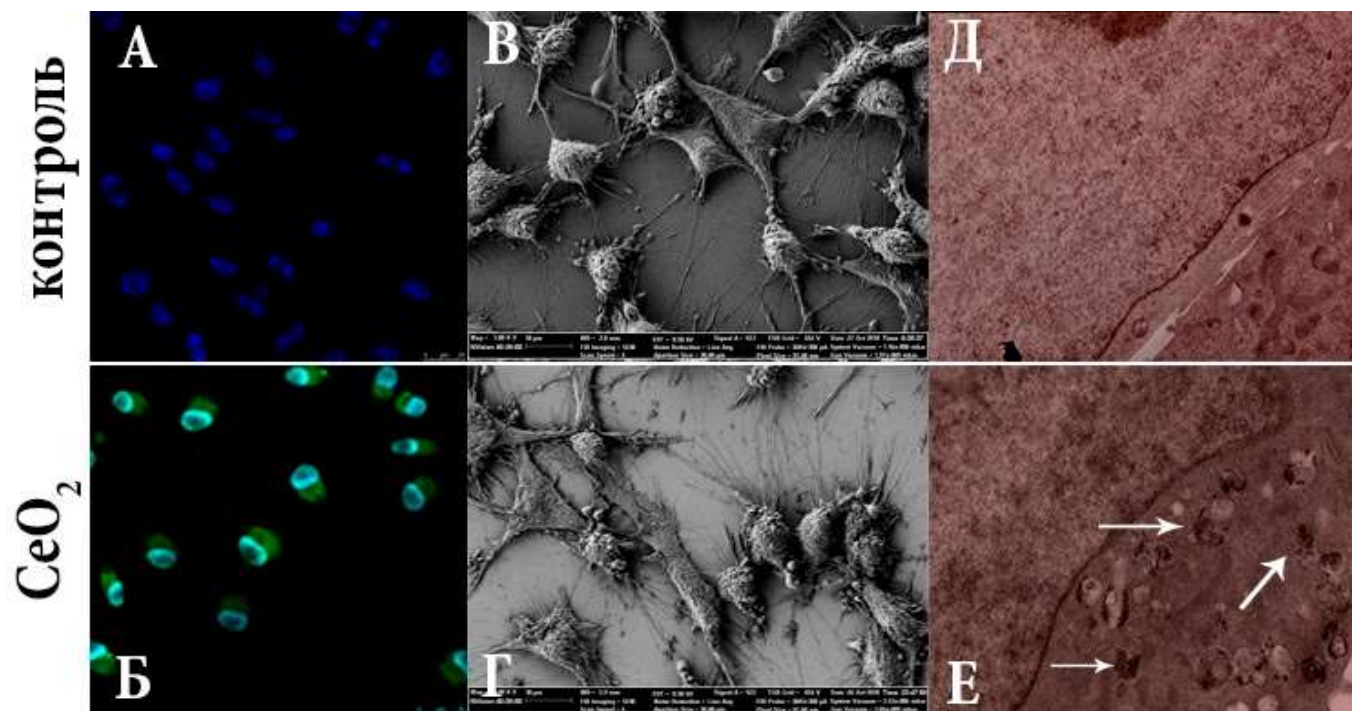


Рисунок 2 Микрофотографии клеток линии NCTC clone L929 без наночастиц CeO_2 (А- конфокальная микроскопия, В- сканирующая электронная микроскопия, Д -просвечивающая электронная микроскопия); Микрофотографии клеток линии NCTC clone L929 через 24 часа после внесения наночастиц CeO_2 в концентрации 10^{-5}M (Б, Г, Е соответственно). Стрелками указана внутриклеточная локализация наночастиц CeO_2 .

присутствие некоторого количества округленных клеток с развитой мембраной говорит об их пролиферативной активности.

Методом конфокальной и просвечивающей электронной микроскопии исследована внутриклеточная локализация наночастиц CeO_2 . Зеленоватое свечение в околоядерном пространстве фибробластов подтверждает проникновение и внутриклеточную локализацию наночастиц CeO_2 (рис. 2 А-Б). При этом анализ ПЭМ микрофотографий достоверно подтвердил лишь лизосомальную локализацию наночастиц CeO_2 (рис. 2 Д-Е). Стрелками показаны электронплотные участки конгломератов наночастиц CeO_2 . При этом характерное свечение цитоплазмы косвенно подтверждает и цитоплазматическую локализацию наночастиц CeO_2 . Таким образом, наночастицы CeO_2 встречаются в виде включений в эндосомы и свободно в цитоплазме, что может говорить о различных путях их эндоцитоза.

2.2. Влияние цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на жизнеспособность и пролиферативную активность перевиваемой клеточной линии мышинных фибробластов NCTC L929

Исследование влияния цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 (10^{-3} - 10^{-9} М) на морфофункциональные свойства и пролиферативный потенциал клеточной линии мышинных фибробластов NCTC clone L929 показал отсутствие острой токсичности. Активность митохондриальных дегидрогеназ во всем диапазоне исследованных концентраций составила 90-120 % от контроля (рис.3 А). Концентрации 10^{-3} М и 10^{-4} М приводили к незначительному снижению сигнала МТТ, что говорит о возможном нарушении внутриклеточного метаболизма. При этом результаты ЛДГ-теста (рис. 3 Б), а также анализ соотношения количества живых и мертвых клеток (рис. 3 фото) не выявил достоверного увеличения доли нежизнеспособных клеток во всех образцах по отношению к контролю.

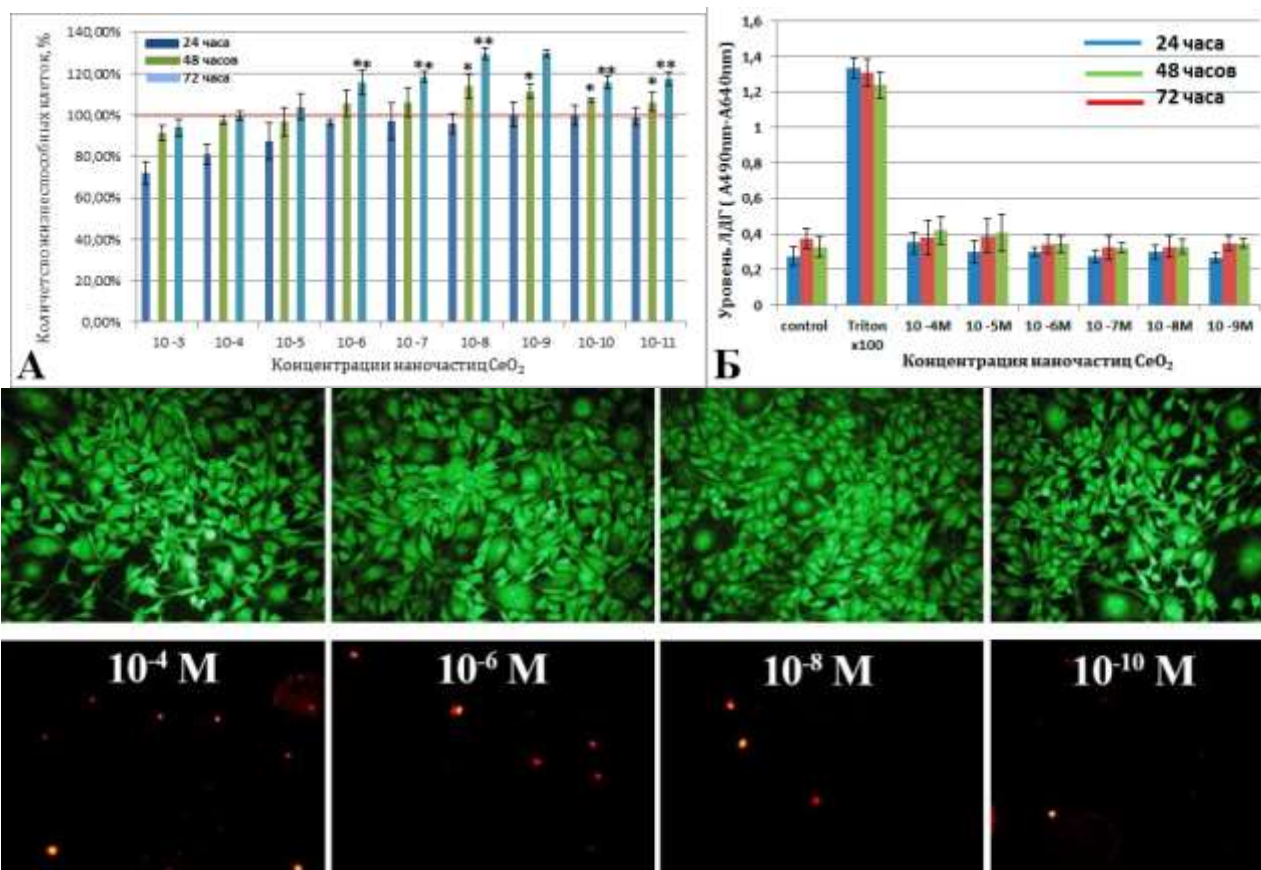


Рисунок 3 Уровень дегидрогеназной активности (А) и уровень свободной лактатдегидрогеназы (Б) в клетках линии NCTC clone L929 в присутствии наночастиц CeO_2 через 24, 48 и 72 часа культивирования. Микрофотографии клеток NCTC clone L929 через 24 часа культивирования (нижняя панель-окраска набором Live/Dead Viability kit). Контроль (100%) – без внесения наночастиц CeO_2 достоверное различие по отношению к контролю, * - $p \leq 0,05$, ** - $p \leq 0,001$ (U-критерий Манна-Уитни)

Поскольку интенсивность превращения МТТ в формазан отражает общий уровень дегидрогеназной активности исследуемых клеток, в том числе присутствующих в дыхательной цепи переноса электронов, можно говорить о том, что снижение активности дегидрогеназ при высоких концентрациях (10^{-3} – 10^{-4} М) наночастиц CeO_2 происходит, не за счет гибели клеток, а вследствие снижения их дыхательной активности. Таким образом, анализ влияния наночастиц CeO_2 на уровень активности митохондриальных дегидрогеназ и свободной лактатдегидрогеназы в культуре мышинных фибробластов линии NCTC clone L929 не выявил цитотоксического действия в диапазоне 10^{-4} – 10^{-11} М.

2.3. Исследование влияния наночастиц CeO_2 на жизнеспособность и пролиферативную активность первичных эмбриональных фибробластов *in vitro*

Далее было проведено исследование влияния наночастиц CeO_2 (10^{-3} - 10^{-9} М) на морфофункциональные свойства и пролиферативную активность эмбриональных мышинных фибробластов. По результатам анализа пролиферативной активности выявлена зависимость от дозы стимуляция пролиферативной активности первичных эмбриональных фибробластов мыши (рис. 4 А). Наночастицы CeO_2 в концентрациях с 10^{-5} по 10^{-9} М стимулируют пролиферацию эмбриональных фибробластов, при этом высокие концентрации (10^{-3} - 10^{-4} М) также оказывают стимулирующий эффект, который сопровождался значительным увеличением количества транскриптов мРНК антиоксидантных ферментов (СОД1, СОД2, каталаза) (рис. 4В).

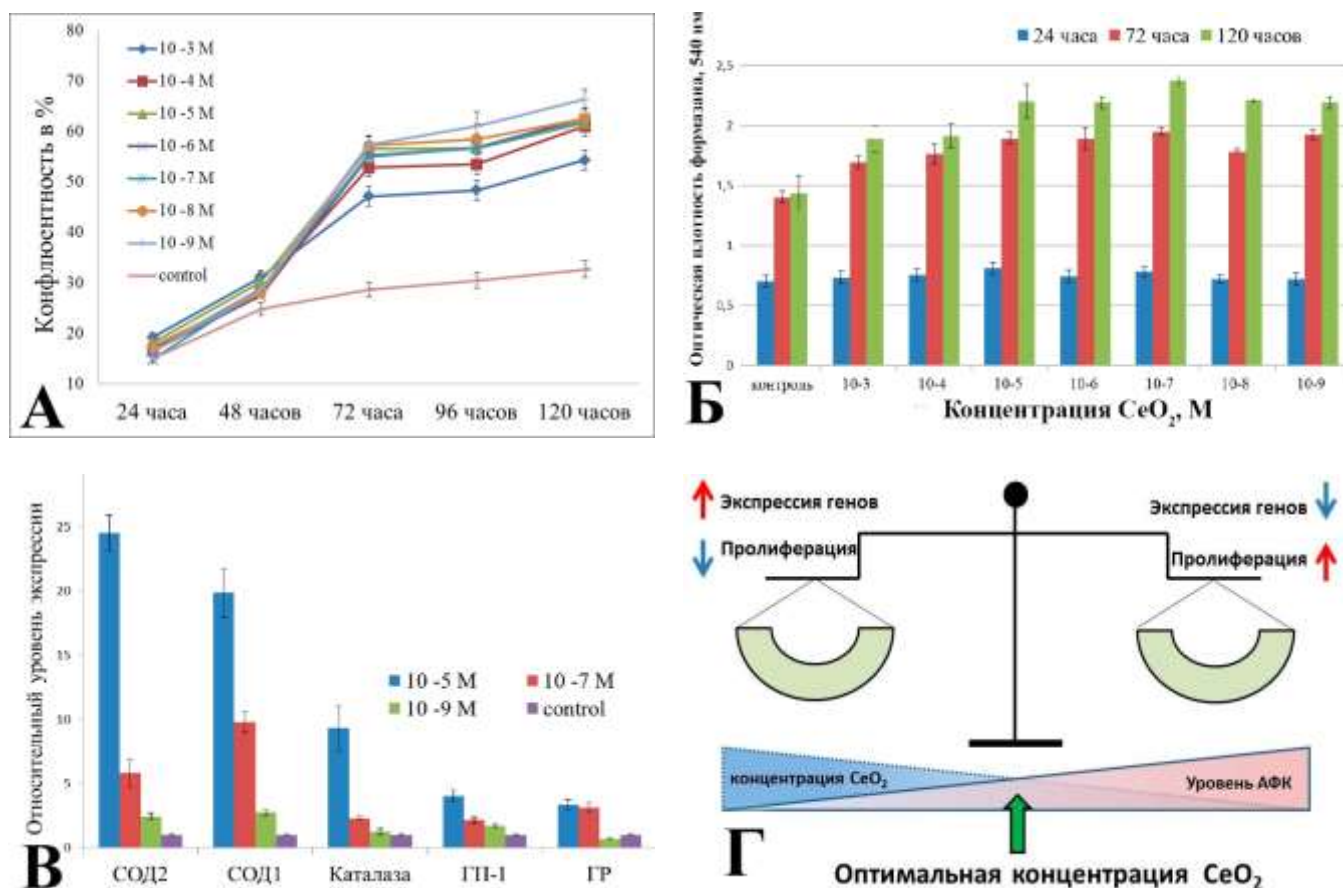


Рисунок 4 Ростовые кривые (А), уровни дегидрогеназной активности (Б) и экспрессии антиоксидантных ферментов (В) в эмбриональных фибробластах мыши в присутствии наночастиц CeO_2 . Схематическое изображение предполагаемого механизма влияния наночастиц CeO_2 на пролиферативную активность эмбриональных фибробластов мыши (Г).

Таким образом, показано что цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 способны оказывать стимулирующее влияние на пролиферативную активность первичных эмбриональных фибробластов мыши *in vitro* в широком диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М) за счет регуляции уровня внутриклеточных АФК и экспрессии ключевых антиоксидантных генов в период лаг-фазы клеточного роста.

2.4. Исследование эмбриотоксического действия наночастиц CeO_2 и их влияния на эмбриогенез *in vitro*.

Результаты культивирования ранних эмбрионов мыши в присутствии цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 показывают отсутствие эмбриотоксического действия в широком диапазоне исследованных концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М), при этом происходит нормализация развития и уменьшается количество аномалий развития. Наночастицы CeO_2 в концентрации 10^{-5} М оказывают стимулирующий эффект: все эмбрионы данной группы развивались до стадии бластоцисты (рис. 5, гистограмма). Количество эмбрионов в подопытных группах (10^{-7} и 10^{-9} М), развившихся до конечной стадии доимплантационного развития – бластоцисты, было на уровне контрольных значений. Известно, что при внешней нормальной морфологии (рис. 5 А, Б), могут возникать клеточные нарушения в трофобласте и внутренней клеточной массе (ВКМ) бластоцист, которые в дальнейшем способны приводить к нарушению процессов имплантации и постимплантационного развития (Marikawa Y. et al, 2009). Однако анализ количества мертвых и апоптотических клеток в сформировавшихся бластоцистах, культивируемых с наночастицами CeO_2 , позволяет нам опровергнуть данный факт (рис. 6 А). Из

полученных результатов можно предположить, что наночастицы CeO_2 не обладают эмбриотоксическим действием, а также могут опосредованно оказывать свое влияние на протекание клеточного цикла эмбрионов и тем самым обеспечивать наиболее благоприятные условия культивирования эмбрионов, приближая условия культивирования *in vitro* к таковым *in vivo*.



Рисунок 5 Развитие 2-клеточных эмбрионов до конечной предимплантационной стадии развития - бластоцисты. А-контроль; Б - с наночастицами CeO_2 (10^{-5} М), В – Оценка количества развившихся эмбрионов. * достоверное различие по отношению к контролю, $P < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни)

По сравнению с контрольной группой, у бластоцист, сформировавшихся в присутствии CeO_2 (10^{-5} М), количество погибших клеток было ниже, а также отсутствовали апоптотические клетки (рис. 6 Б).

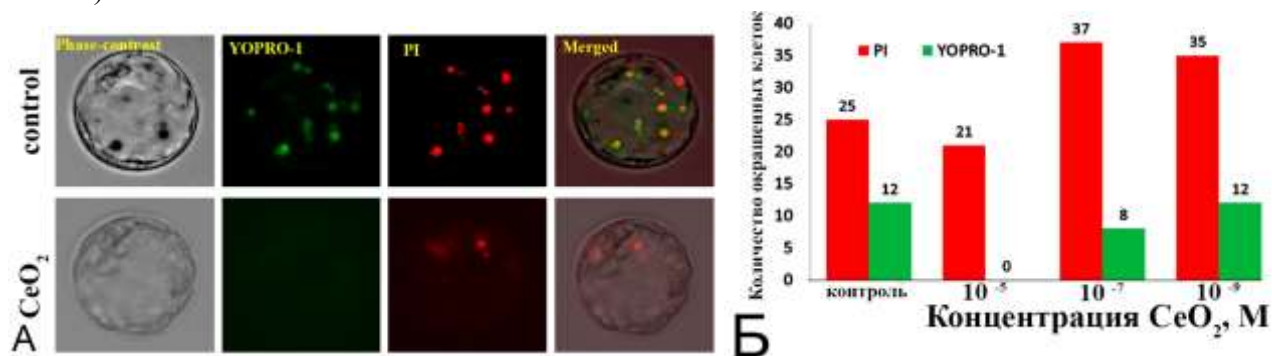


Рисунок 6 Микрофотографии бластоцист через 5 дней культивирования с наночастицами CeO_2 (А). Анализ соотношения мертвых/апоптотических клеток в бластоцисте (Б). Пропидиум йодид (PI) мертвые клетки; YO-PRO-1- апоптотические клетки.

Дополнительно стоит отметить, что анализ влияния цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на морфо-функциональные свойства и пролиферативную активность был проведен на различных типах клеток: эмбриональные МСК мыши и человека, фибробласты человека, МСК пульпы зуба человека, который подтвердил отсутствие цитотоксического и наличие стимулирующего действия в концентрациях (10^{-4} - 10^{-11} М).

3. Исследование биологической активности наночастиц CeO_2 в моделях окислительного стресса, индуцированного различными химическими и физическими факторами *in vitro* и *in vivo*.

3.1. Протекторное действие цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 при воздействии экзогенного пероксида водорода.

Известно, что одним из маркеров окислительного стресса является пероксид водорода (H_2O_2), который в значительной степени накапливается в клетках при нарушении функциональной активности антиоксидантной системы, а также при различных внешних воздействиях (Wijeratne S. et al, 2005, Coyle C. et al, 2007).

Обработка культуры клеток NCTC clone L929 H_2O_2 (500 μM) в течение 30 минут приводила к снижению жизнеспособности клеточной культуры до 40% по сравнению с контролем. Предварительная обработка клеток наночастицами CeO_2 сохраняла жизнеспособность на уровне 55-60 % (рис. 7 А). Обработка клеток сразу же после воздействия H_2O_2 также увеличивала общее количество (до 60%) жизнеспособных клеток во всем диапазоне исследованных концентраций (10^{-5} – 10^{-9} М) через 24 часа инкубации (рис. 7 Б).

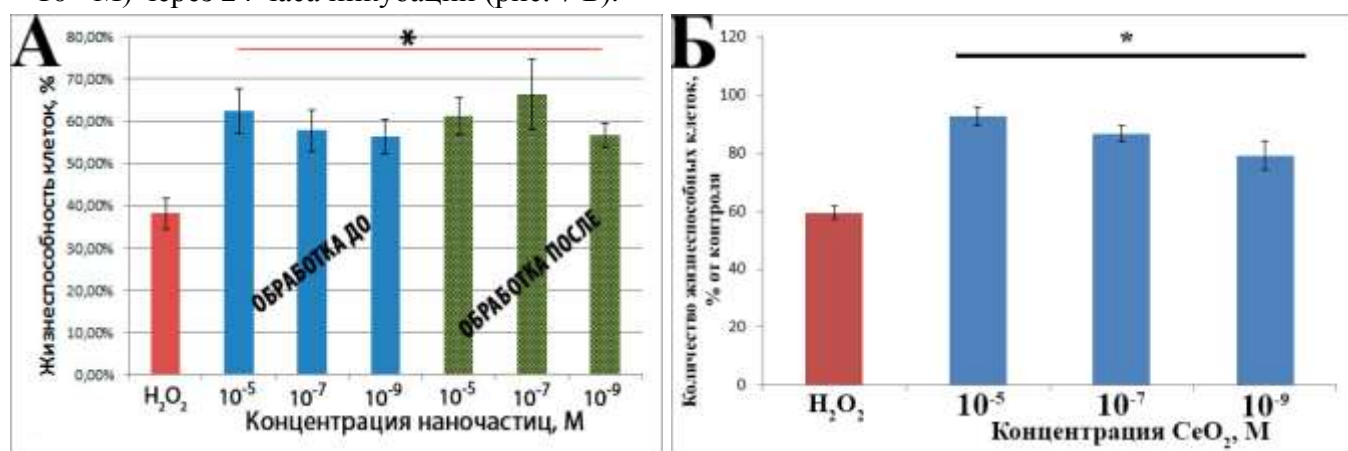


Рисунок 7. Жизнеспособность клеток линии NCTC clone L929 до и после воздействия экзогенного пероксида водорода (500 μM на 30 мин) по данным МТТ теста (А) и подсчет количества жизнеспособных клеток по микрофотографиям (Б) (набор *LIVE/DEAD kit*), * достоверное различие по отношению к контролю, $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Полученные данные свидетельствуют о том, что предварительная обработка клеток NCTC clone L929 наночастицами CeO_2 в концентрациях 10^{-5}M , 10^{-7}M , 10^{-9}M приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с клетками, не обработанными наночастицами CeO_2 . При этом максимальный защитный эффект, достигается при концентрации 10^{-5}M .

3.2. Протекторное действие цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 , в модели окислительного стресса, индуцированного воздействием УФ излучения.

Ультрафиолетовое (УФ) излучение является мощным стресс- фактором для живых систем, под воздействием которого изменяются многие морфо-физиологические и биохимические параметры клеток (Sharma A., 2010). УФ-излучение действует как индуктор образования свободных радикалов и ДНК-повреждающий агент, вызывающий нарушения процесса репликации в клетках (Жестяников В., 2000).

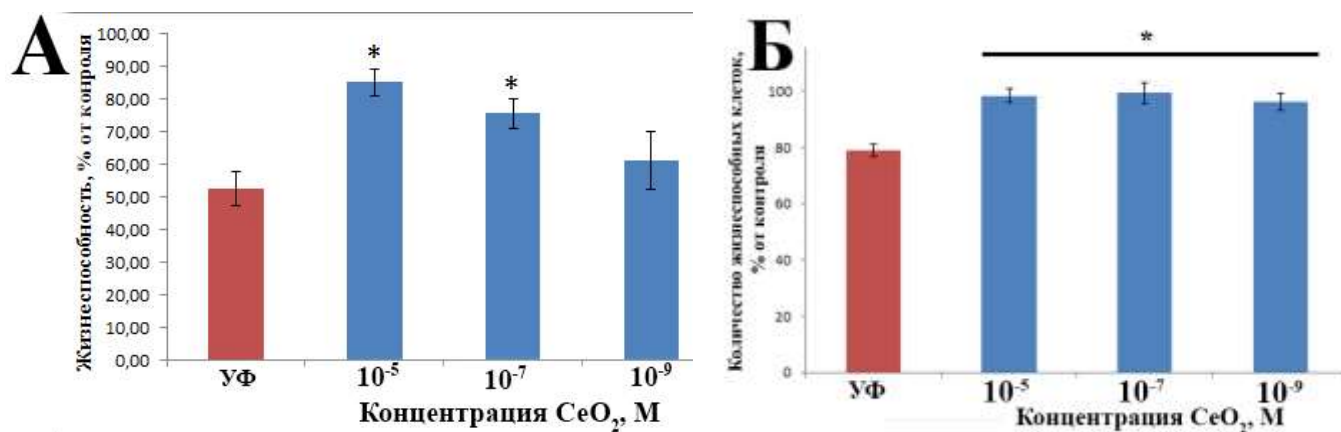


Рисунок 8. Жизнеспособность клеток линии NCTC L929 после 5 мин облучения УФ излучением по данным МТТ теста (А) и подсчет количества жизнеспособных клеток по микрофотографиям (Б) (набор *LIVE/DEAD kit*), * достоверное различие по отношению к контролю, $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Предварительная инкубация клеток NCTC clone L929 с наночастицами CeO_2 в концентрациях 10^{-5} М и 10^{-7} М в условиях УФ-индуцируемого ($24,6 \text{ Кдж/м}^2$) окислительного стресса приводит к достоверному увеличению количества жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (рис. 8 А). Таким образом, наночастицы CeO_2 защищают клетки от повреждения УФ-излучением, причем концентрации 10^{-5} М обеспечивает максимальный защитный эффект, увеличивая выживаемость на 32 % по сравнению с контролем. Анализ количества мертвых клеток (рис. 8 Б) после воздействия УФ излучения выявил концентрационную зависимость протекторного эффекта.

3.3. Протекторное действие цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в модели окислительного стресса, индуцированного воздействием низкотемпературной аргоновой плазмы.

Для исследования протекторного действия наночастиц CeO_2 в качестве модели окислительного стресса использовали воздействие низкотемпературной (не выше 40°C) аргоновой плазмы (НТАП), генерируемой СВЧ генератором. Данная модель обеспечивает одновременное воздействие повреждающих факторов различной природы. Основные действующие факторы НТАП включают ультрафиолетовое (УФ) и инфракрасное (ИК) излучение, потоки свободных электронов, свободных радикалов, ионов, нейтральных атомов и молекул, продуктов взаимодействия плазменного луча с окружающим воздухом (Hong S. et al, 2010, Uchiyama H. et al, 2015). В качестве контроля был применен режим «плацебо», представляющий собой обдув образцов потоком аргона.

Результаты показывают, что во всех концентрациях 10^{-5} М, 10^{-7} М, 10^{-9} М наночастицы CeO_2 обладают протекторным действием, сохраняя жизнеспособность фибробластов практически на уровне контрольных значений (рис. 9 А). Анализ количества мертвых клеток (рис. 9 Б) после воздействия НТАП также выявил концентрационную зависимость протекторного эффекта.

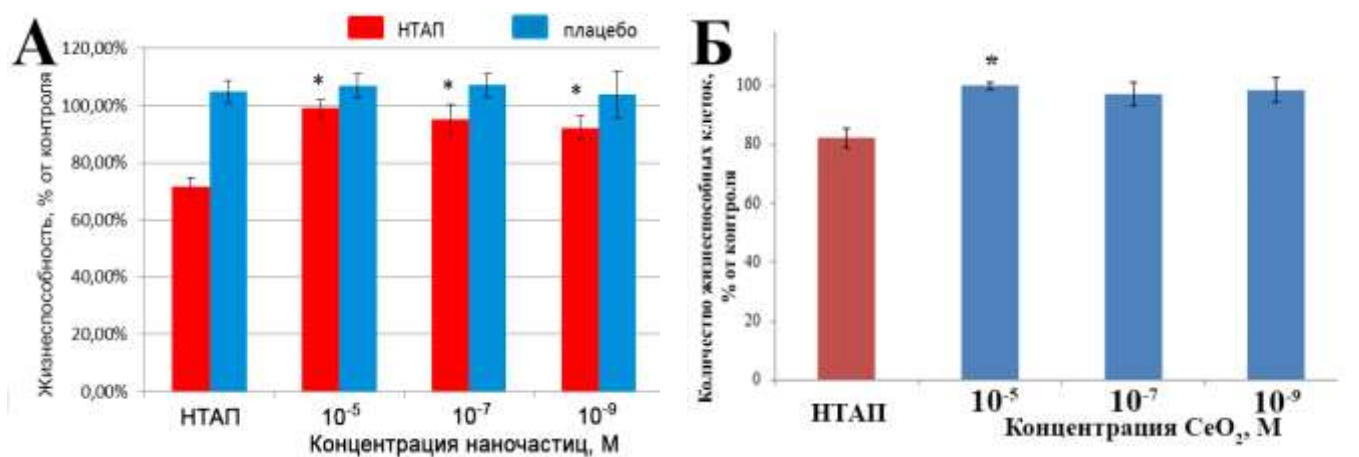


Рисунок 9. Жизнеспособность клеток линии NCTC clone L929 после 10 мин облучения HTAP по данным МТТ теста (А) и подсчет количества жизнеспособных клеток по микрофотографиям (Б) (набор *LIVE/DEAD kit*), * достоверное различие по отношению к контролю, $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Полученные результаты доказывают, что наночастицы CeO₂ способны обеспечивать защиту клетки при одновременном воздействии повреждающих факторов различной природы.

3.4. Протекторное действие цитрат-стабилизированных наночастиц CeO₂ в модели окислительного стресса, индуцированного воздействием рентгеновского излучения.

На следующем этапе для оценки антиоксидантных и радиопротекторных активности цитрат-стабилизированных наночастиц CeO₂, нами была выбрана модель радиационно-индуцированного окислительного стресса *in vitro* и *in vivo*. Пероксид водорода и гидроксильный радикал являются продуктами ионизации воды, которые вызывают многочисленные структурные и функциональные перестройки в клетке (Кудряшов В., 2004, Vandenbroucke K. et al, 2008). Исследование влияния наночастиц CeO₂ на образование пероксида водорода и гидроксильного радикала в фосфатно-солевом буфере (pH=7,4) после воздействия ионизирующего излучения в дозе 1 Гр представлено на рисунке 10.

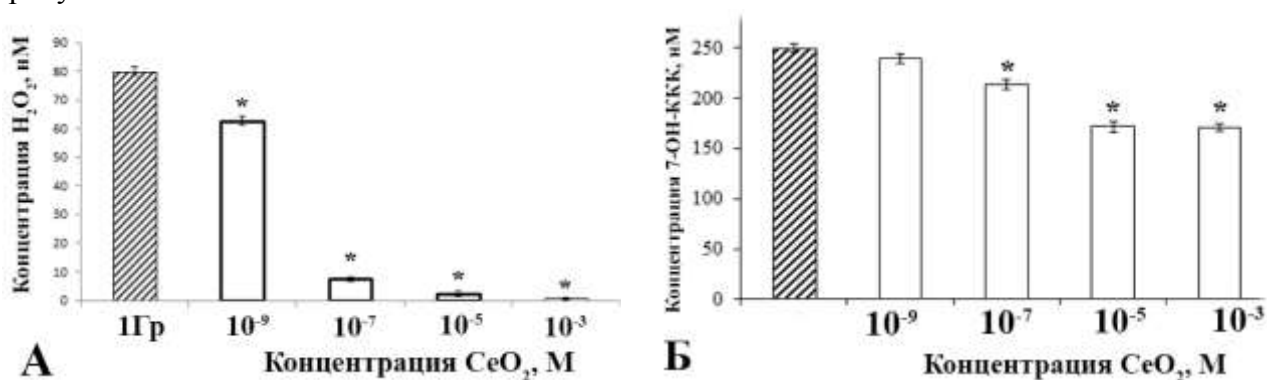


Рисунок 10 Количество пероксида водорода (А) и •ОН радикала (Б) в воде при облучении в дозе 1 Гр и добавлении наночастиц CeO₂. Контроль - 1 Гр без добавления наночастиц. *- достоверные различия с контролем по U-критерию Манна-Уитни, $p < 0,001$

Установлен зависимый от дозы характер снижения концентрации H₂O₂ в присутствии наночастиц CeO₂, при этом максимальная концентрация наночастиц полностью (до 0%) инактивирует H₂O₂, образующуюся после облучения в дозе 1 Гр (рис. 10 А). Под действием

ионизирующего излучения в клетке также образуются высокие концентрации гидроксильных радикалов ($\cdot\text{OH}$), время жизни которых составляет несколько наносекунд (Pryor W. A., 1986). Показано, что наночастицы CeO_2 в концентрациях от 10^{-3} – 10^{-5} М снижают концентрацию OH° радикалов в фосфатно-солевом буфере (рН=7,4) после воздействия рентгеновского излучения в дозе 1 Гр (рис. 10 Б).

Исследование радиозащитного действия наночастиц диоксида церия в условиях *in vitro* проводили с использованием первичной культуры фибробластов, полученных из зародышей эмбрионов белых мышей аутбредной линии SHK. Показано, что предварительная обработка первичных эмбриональных фибробластов мыши наночастицами CeO_2 в широком диапазоне концентрация (10^{-5} - 10^{-9} М), защищает клетки от радиационно-индуцированного окислительного стресса, сохраняя высокий уровень дегидрогеназной активности (рис. 11 А) и жизнеспособности клеточной культуры (рис. 11 Б).

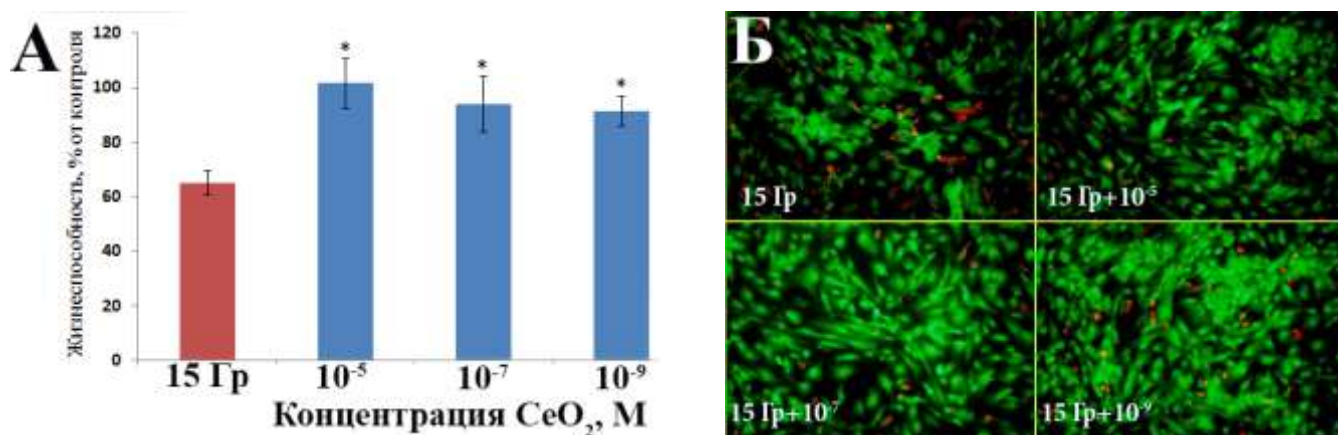


Рисунок 11 Жизнеспособность первичных эмбриональных фибробластов мыши через 48 часов после облучения в дозе 15 Гр рентгеновским излучением по данным МТТ теста (А) и окрашивания набором *LIVE/DEAD kit* (Б) * достоверное различие с контролем, $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Исследование цитогенетических повреждений в клетках костного мозга *in vivo* после воздействия рентгеновского излучения показало, что однократное введение наночастиц CeO_2 перед облучением животных приводит к значительному снижению количества ПХЭ с МЯ в сравнении с контролем: при внутрибрюшинном введении на 51,74 %, а при внутривенном на 39,55% (рис. 12 А).

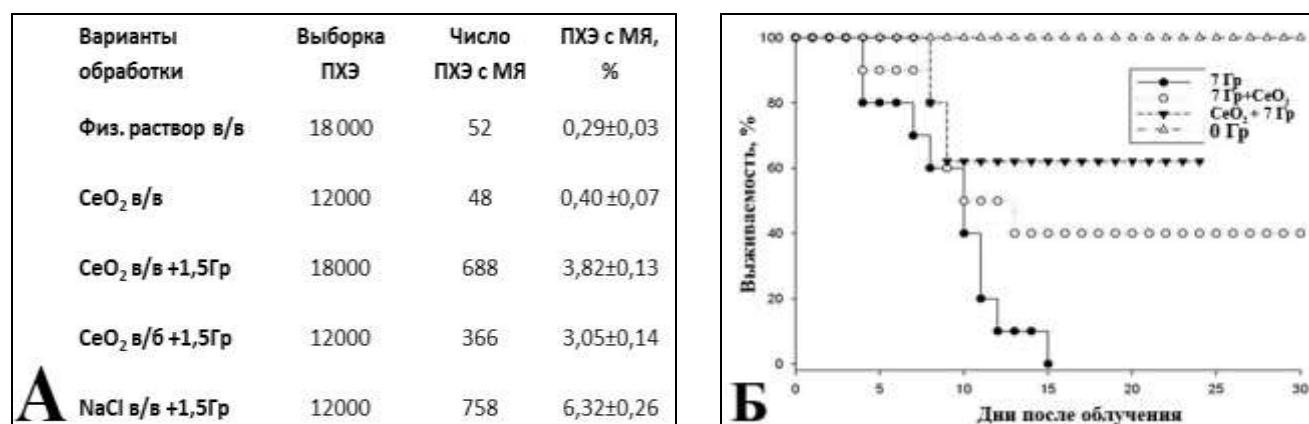


Рисунок 12 Микроядерный тест (А) и выживаемость животных (Б) после воздействия рентгеновского излучения и предварительного введения наночастиц CeO_2 *in vivo*.

Результаты выживаемости животных после облучения в дозе 7 Гр с предварительной внутрибрюшинной инъекцией наночастиц CeO_2 представлены в виде графика выживаемости (рис.12 Б). В контрольной группе облученных животных на 12 сутки после облучения наблюдалась 90% гибель животных. Предварительная инъекция наночастиц CeO_2 за 15 минут до облучения увеличивала продолжительность жизни животных (до 60%), что подтверждает возможность наночастиц CeO_2 выступать в качестве эффективного радиопротектора. В группе животных, которым вводили наночастицы CeO_2 через 15 минут после облучения, к концу эксперимента выживаемость животных составила 40%, что является косвенным доказательством того, что наночастицы CeO_2 способны стимулировать процессы внутриклеточной репарации. Радиозащитный эффект наночастиц CeO_2 может быть связан с возможностью влияния на процессы пострадиационного восстановления критических (наиболее радиочувствительных) органов и тканей, репарацию лучевых повреждений, а также на нейтрализацию долгоживущих активных форм белка, которые способны генерировать вторичные АФК в течение длительного времени после облучения *in vivo*.

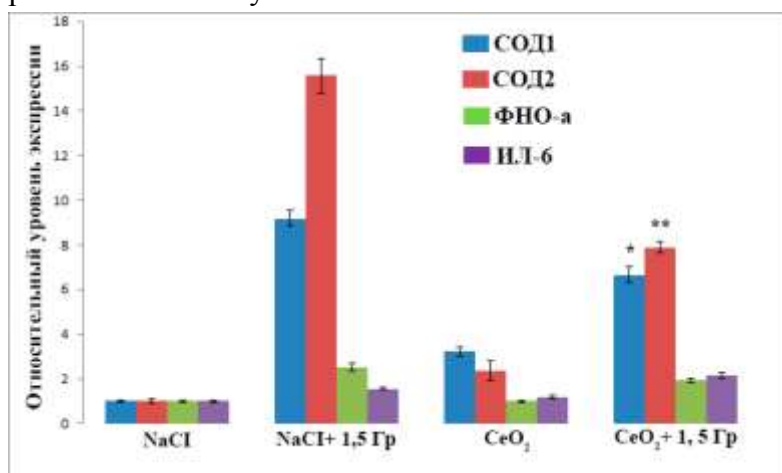


Рисунок 13 Уровень экспрессии СОД1, СОД2, ФНО-а, ИЛ-6 в печени облученных в дозе 1,5 Гр животных через 24 часа после облучения, которым предварительно внутрибрюшинно вводили наночастицы CeO_2 .

Для выяснения механизма радиозащитного действия нами проведено исследование уровней мРНК некоторых антиоксидантных ферментов и провоспалительных цитокинов в печени мышей подвергшихся воздействию рентгеновского излучения (рис. 13). Печень была выбрана в качестве исследуемого органа ввиду максимального накопления цетерия (данные представлены в диссертации). Видно, что облучение в дозе 1,5 Гр приводит к увеличению уровней мРНК СОД1и СОД2, а также модулирует уровень экспрессии мРНК фактора некроза опухоли и интерлейкина 6.

При этом в печени мышей, которым предварительно вводили наночастицы CeO_2 (0.00013 мг/кг), уровень экспрессии генов СОД1 и СОД2 достоверно снижался. Уровень провоспалительных цитокинов также модулировался, но менее значительно. Опираясь на результаты антиоксидантного действия наночастиц при облучении в суспензии, подобный характер изменения экспрессии генов СОД можно связать с тем, что наночастицы CeO_2 обладают активностью, подобной активности СОД (Heckert E. et al, 2008). При этом стоит заметить, что предварительное введение наночастиц CeO_2 , без последующего облучения животных, также вызывало незначительное увеличение уровней транскриптов мРНК антиоксидантных ферментов. В данном случае наночастицы CeO_2 выступают в качестве некоего адаптогена (за счет высокой редокс-активной поверхности), активируя собственную систему антиоксидантной защиты, что, в конечном счете, обеспечивает снижение количества повреждений в клетке после воздействия ионизирующего излучения.

Основываясь на полученных данных мы выдвинули гипотезу о мультифакторном защитном действии наночастиц CeO_2 при воздействии ионизирующего излучения, которое включает три основных механизма (Рис. 14). «**Химическая защита**» основана на антиоксидантных свойствах наночастиц CeO_2 и защите от повреждающего действия свободных радикалов и АФК, образующихся в процессе радиолиза воды. Большинство АФК образуется непосредственно в процессе облучения и быстро разрушается (Ogawa Y. et al, 2003).

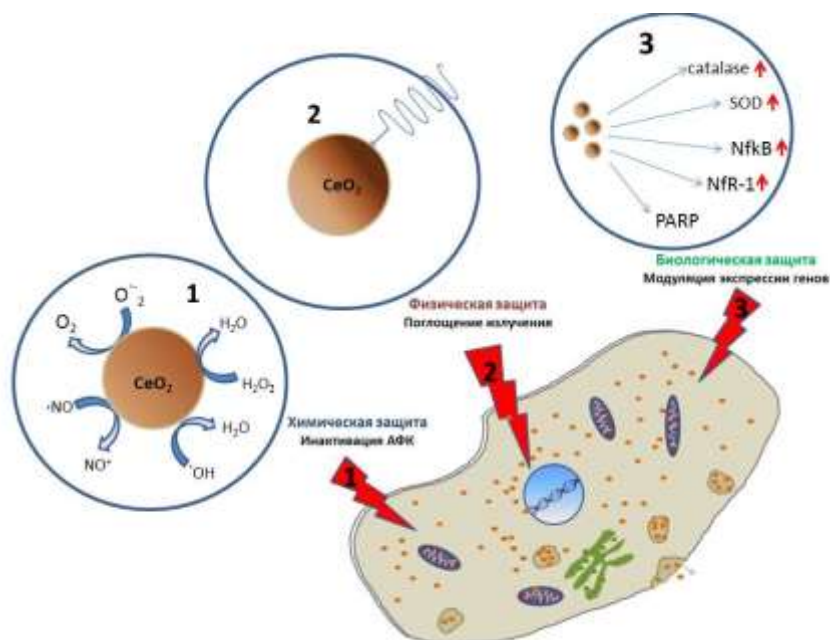


Рисунок 14 Предполагаемая схема защитного действия наночастиц CeO_2 в условиях воздействия ионизирующего излучения

наночастиц CeO_2 минимальный, что обусловлено их низкой концентрацией в организме. «**Биологический механизм**» защитного действия наночастиц CeO_2 в основном связан с их способностью модулировать экспрессию различных групп генов и транскрипционных факторов (Niu J. et al, 2011, Fiorani L. et al, 2015 Xu C. et al, 2014), в том числе отвечающих за репарацию поврежденных участков ДНК. В частности, это подтверждается изменением уровней мРНК ключевых антиоксидантных ферментов и провоспалительных цитокинов, а также увеличением доли выживших животных, которым наночастицы CeO_2 вводили сразу после облучения.

Проведенный комплексный анализ влияния цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на жизнеспособность, пролиферативную активность, морфо-функциональные характеристики и уровни транскриптов мРНК на мышинных клетках и моделях показал наличие корреляционных признаков его биологической активности при сравнении с данными полученными на мезенхимальных стволовых клетках человека (данные представлены в диссертации). Все эти свойства позволяют рассматривать наночастицы CeO_2 как основу для разработки перспективных препаратов биомедицинского назначения.

4. Разработка системы внутриклеточной доставки цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 на основе полиэлектролитных микрокапсул.

Был проведен синтез 2-х типов полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных цитрат-стабилизированными наночастицами CeO_2 . Зета-потенциал биodeградируемых полиэлектролитных микрокапсул (ПЛА/ДС) составил -25мэВ, для синтетических микрокапсул (ПАА/ПСС) -40,6 мэВ. По данным УФ видимой спектроскопии, максимум поглощения биосовместимых и синтетических микрокапсул совпадают с полосой поглощения золя наночастиц CeO_2 (рис. 15 А, Б).

Морфологический анализ синтезированных микрокапсул с помощью сканирующей электронной микроскопии определил типичную для этих микроструктур сферическую форму с характерными складками, которые формируются при подготовке образцов для анализа (рис.15 Ж-

Присутствие наночастиц CeO_2 в момент облучения обеспечивает инактивацию свободных радикалов и АФК в момент их генерации. Механизм «**физической защиты**» можно объяснить способностью наночастиц CeO_2 поглощать высокоплотное излучение за счет наличия метастабильных состояний в кристаллической решетке (Ce^{3+} - Ce^{4+}). Эти свойства диоксида церия давно используется в различных промышленных применениях (Wirtenson R. et al, 1992, Zhang Y. et al, 2011, Kir'yanov A. et al, 2014). По всей видимости, вклад данного механизма в радиозащитное действие

К). Наличие собственной флуоресценции наночастиц CeO_2 позволяет визуализировать микрокапсулы при их анализе методом флуоресцентной микроскопии (рис. 15 Д, Е).

Размеры синтезированных микрокапсул незначительно варьировались (3-4 мкм). Характерная микроструктура и зернистость поверхности микрокапсул косвенно подтверждает наличие наночастиц CeO_2 в их структуре (рис. 15 И, К). Анализ микрофотографий просвечивающей электронной микроскопии позволил подтвердить факт интеграции наночастиц CeO_2 и определить их локализацию в структуре полиэлектrolитной микрокапсулы. Для областей локализации наночастиц CeO_2 характерны более электронплотные участки (рис. 15 В, Г).

Видно, что наночастицы CeO_2 равномерно распределены по всей площади микрокапсулы. При более крупном увеличении на микрофотографиях, полученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа, отчетливо прослеживаются характерные для металлических наночастиц структурированные линии кристаллической решетки (рис. 14 В, Г вставки).

Полиэлектrolитные микрокапсулы, модифицированные наночастицами CeO_2 , быстро

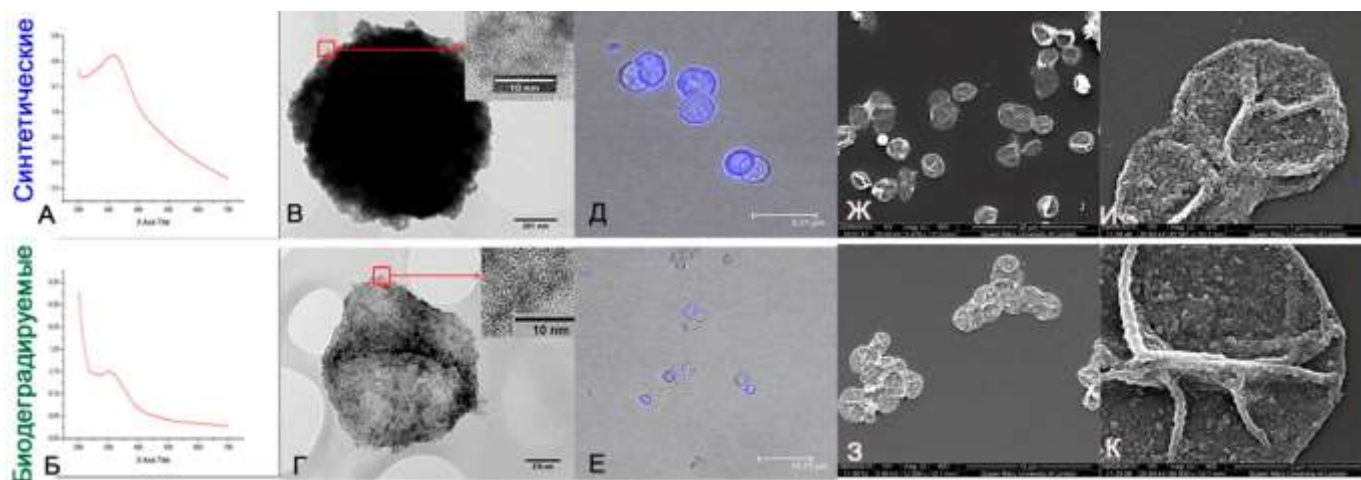


Рисунок 15 УФ видимая спектроскопия (А, Б), просвечивающая электронная (В, Г), сканирующая электронная (Ж-К) и конфокальная (Д, Е) микроскопия синтетических и биодеградируемых полиэлектrolитных микрокапсул, модифицированных наночастицами CeO_2 .

поглощаются клетками линии В50 (около 1-2 часов) и проникают непосредственно в цитоплазму. Биодеградируемые (ПЛА/ДС) микрокапсулы, проникнув в цитоплазму, разрушаются под действием эндогенных ферментов, высвобождая наночастицы CeO_2 , что подтверждается характерным свечением цитоплазмы клетки (рисунок 16 А - нижняя панель). Синтетические (ПАА/ПСС) микрокапсулы также фагоцитируются клетками и локализуются в цитоплазме, не подвергаясь деградации в течение длительного периода времени (более 48 часов), сохраняя исходную округлую форму (рисунок 16 А - верхняя панель). Нами показано, что оба типа микрокапсул успешно поглощаются клетками нейробластомы В-50, при этом их дальнейшая судьба внутри клетки значительно различается.

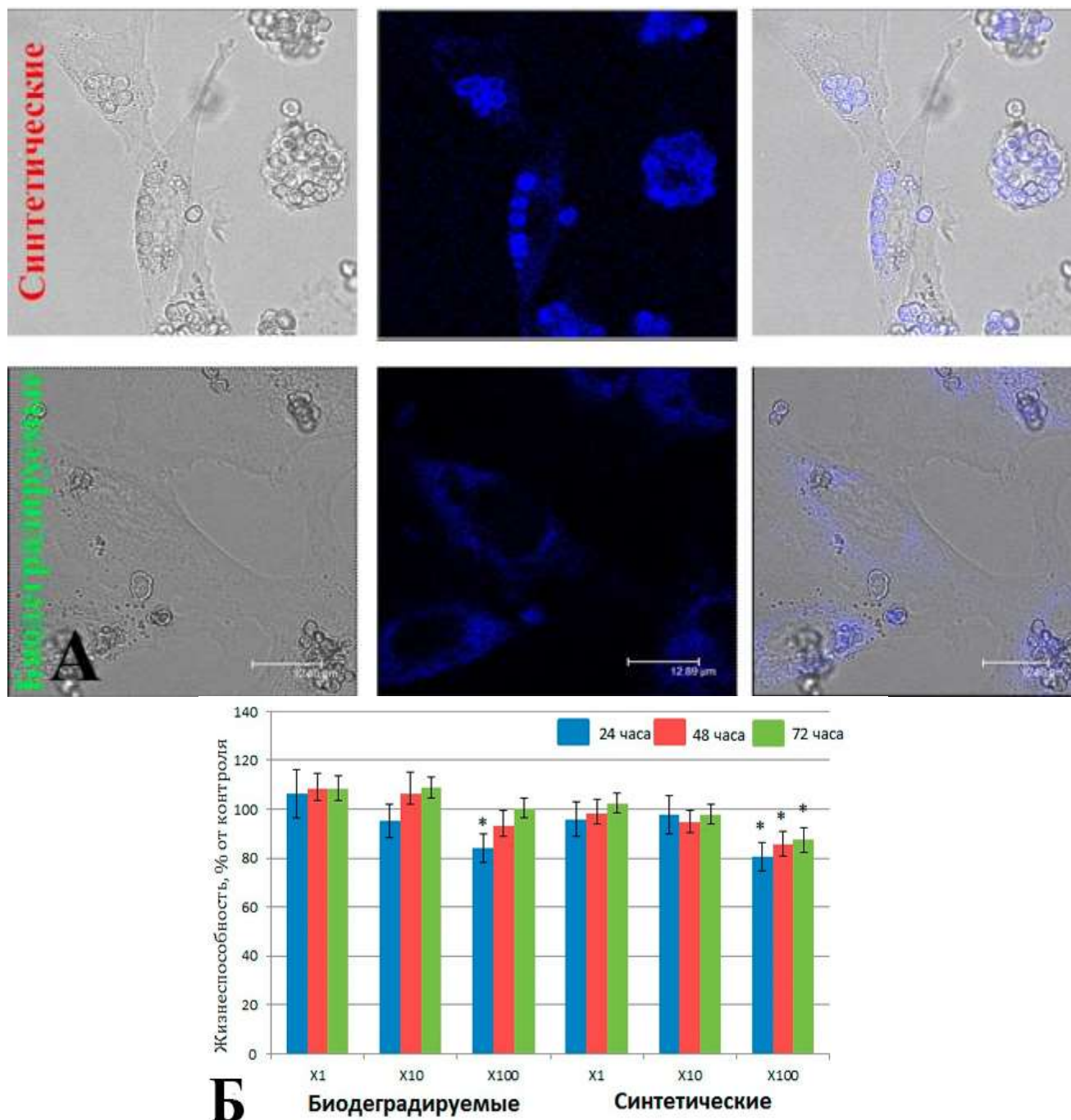


Рисунок 16 Поглощение клетками линии В-50 полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных наночастицами CeO_2 (А). Микрофотографии сделаны через 48 часов сокультивирования. Жизнеспособность клеток линии В-50 (Б) через 24, 48 и 72 часа сокультивирования с микрокапсулами, содержащими наночастицы CeO_2 . * достоверное различие по отношению к контролю, $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни)

Проведенный анализ цитотоксичности синтезированных микрокапсул (МТТ-тест) на культуре клеток линии В-50 показал отсутствие острой токсичности в концентрациях 1 и 10 капсул на клетку (рис. 16 Б). Концентрация в 100 микрокапсул на 1 клетку приводила к достоверному снижению дегидрогеназной активности, что может быть связано с достаточно высокой концентрацией наночастиц CeO_2 , а также механическим воздействием микрокапсул на клеточные структуры. Взаимодействие полиэлектролитной матрицы микрокапсул с поверхностью наночастицы CeO_2 может изменить исходные физико-химические характеристики наночастиц CeO_2 и дальнейшую их биологическую активность. Для подтверждения того факта, что процесс интеграция наночастиц CeO_2 в полиэлектролитную микрокапсулу не приводит к потере их

нативной антиоксидантной активности, была проведена оценка защитного действия микрокапсул в модели окислительного стресса, индуцированного воздействием экзогенной H_2O_2 . Обработка клеток H_2O_2 (1,5мМ) в течение 30 минут приводит к практически 100 % гибели клеток через 24 часа, при этом предварительное внесение микрокапсул приводит к увеличению количества жизнеспособных клеток: до 50% для синтетических микрокапсул (рис. 17 Б) и 65 % для биodeградируемых микрокапсул (рис.17 А). Стоит отметить, что внесение микрокапсул из расчета 1 капсула/клетка является недостаточным для защиты клетки от повреждений, индуцированных 1,5 мМ пероксида водорода.

Однако концентрации 10 и 100 микрокапсул на клетку в равной степени защищали клетки от воздействия экзогенного оксиданта. На основании этого можно сделать вывод, что оптимальная концентрация микрокапсул находится в диапазоне от 5 до 10 на клетку. По всей видимости, это связано с некоторым лимитом поглощения микрокапсул клеткой и концентрацией наночастиц SeO_2 в них. Также стоит отметить, что предобработка культуры клеток биodeградируемыми микрокапсулами защищает в большей степени (~65 % жизнеспособных клеток), нежели синтетическими (~50 % жизнеспособных клеток). Данный факт можно объяснить тем, что при попадании в клетку, биodeградируемые микрокапсулы достаточно быстро (менее 6 часов) разрушаются под действием ферментов цитоплазмы, высвобождая наночастицы SeO_2 .

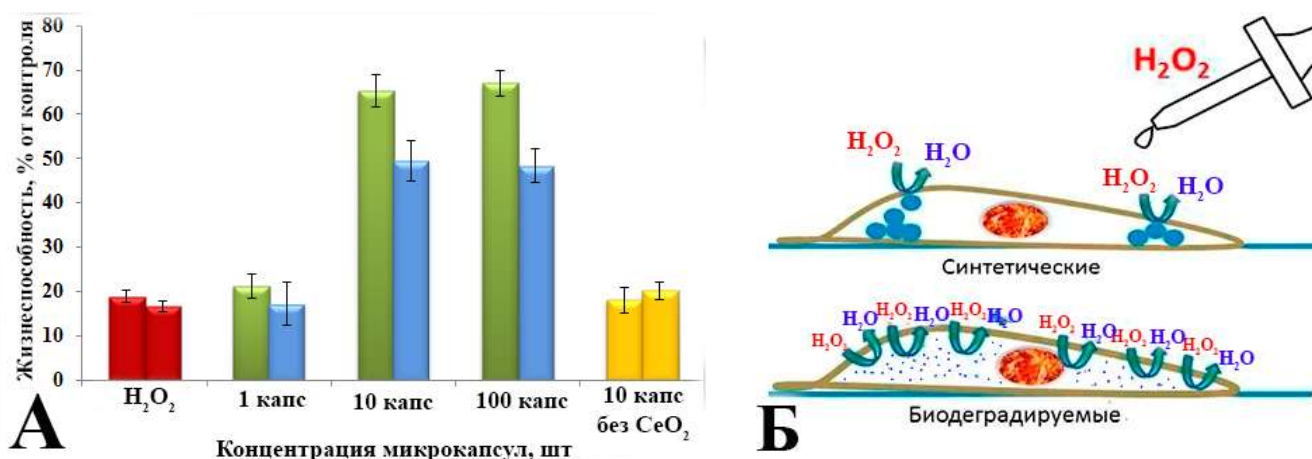


Рисунок 17 Выживаемость клеток линии В-50 по данным МТТ теста в условиях окислительного стресса, индуцированного экзогенной H_2O_2 в присутствии синтетических и биodeградируемых микрокапсул (А). Предполагаемый механизм защитного действия SeO_2 -модифицированных микрокапсул в условиях окислительного стресса, индуцированного экзогенным пероксидом водорода (Б). Концентрация пероксида водорода -1,5 мМ.

Возможным объяснением различной эффективности может быть тот факт, что наночастицы SeO_2 после деградации биodeградируемых микрокапсул локализуются по всей цитоплазме клетки, обеспечивая более эффективную защиту клетки, в отличие от синтетических микрокапсул, которые располагаются локально в цитоплазме, и способны инактивировать лишь те молекулы H_2O_2 , которые попали в непосредственный контакт с ними. Таким образом можно сделать вывод, что интеграция наночастиц SeO_2 в полиэлектролитную матрицу не приводит к потере их антиоксидантных свойств (в частности, способности разлагать H_2O_2) и может рассматриваться как безопасная и эффективная система их внутриклеточной доставки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе было проведено изучение физико-химических характеристик и биологической активности цитрат-стабилизированных наночастиц диоксида церия и разработана система их внутриклеточной доставки на основе полиэлектролитных микрокапсул. Высокая степень биосовместимости наночастиц CeO_2 и доказанные антиоксидантные и радиопротекторные свойства делают их перспективными для использования в качестве основы для разработки фармакологических препаратов и средств защиты. Разработанный способ инкапсуляции наночастиц CeO_2 в полиэлектролитный матрикс, позволяет обеспечить дозированную доставку наночастиц в клетки, микрокапсулы являются биосовместимыми, проникают в клетку и защищают ее от окислительного стресса, индуцированного экзогенным пероксидом водорода.

ВЫВОДЫ:

1. Цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 в диапазоне концентраций (10^{-4} - 10^{-11} М) не проявляют цитотоксического действия в отношении клеток млекопитающих различного типа, в концентрациях (10^{-5} - 10^{-9} М) наночастицы CeO_2 стимулируют пролиферацию первичных эмбриональных фибробластов мыши и мезенхимальных стволовых клеток человека. Стимулирующее воздействие наночастиц CeO_2 связано с модуляцией экспрессии генов, ответственных за пролиферативную активность и систему антиоксидантной защиты клетки.
2. Цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 в диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М) не обладают эмбриотоксическим действием в условиях *in vitro* и *in vivo*. Внесение наночастиц CeO_2 (10^{-5} М) в культуральную среду нормализует развитие ранних эмбрионов мыши в условиях культивирования *in vitro*, повышая качество формирующихся клеток трофобласта и ВКМ, а также увеличивая жизнеспособность эмбрионов в целом.
3. Цитрат-стабилизированные наночастицы CeO_2 в диапазоне концентраций (10^{-5} - 10^{-9} М) ингибируют развитие окислительного стресса после воздействия экзогенного пероксида водорода, низкотемпературной аргоновой плазмы, ультрафиолетового и рентгеновского излучения. Защитное действие наночастиц CeO_2 обусловлено их антиоксидантной активностью, способностью стимулировать экспрессию ключевых генов, вовлеченных в клеточный ответ на окислительный стресс, а также их способностью снижать количество цитогенетических повреждений в костном мозге облученных животных после их внутривенного или внутрибрюшинного введения.
4. Показана возможность инкапсуляции цитрат-стабилизированных наночастиц CeO_2 в полиэлектролитный матрикс из синтетических (полиаллиламин гидрохлорид 56 кДа и полистиролсульфонат натрия 70 кДа) и биodeградируемых полимеров (поли-L- аргинин 15-70 кДа и декстран сульфат 40 кДа). Показано, что синтезированные микрокапсулы являются биосовместимыми, проникают в клетку и защищают ее от окислительного стресса, индуцированного экзогенным пероксидом водорода.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность руководителю работы к.ф.-м.н. Селезневой И.И., и.о. зав. лаборатории роста клеток и тканей ИТЭБ РАН и директору ИОНХ РАН члену-корреспонденту РАН, д.х.н., проф. Иванову В.К. за всестороннюю помощь в выполнении работы. За помощь в проведении экспериментов и обсуждении результатов автор выражает огромную признательность сотрудникам ИТЭБ РАН д.б.н., в.н.с., Косенко Е.А., в.н.с., к.б.н., с.н.с., Ермакову А.М., н.с., Савинцевой И.И., м.н.с. Мироновой Е.А., к.б.н., в.н.с., Заичкиной С.И., с.н.с., Розановой О.М., с.н.с., к.б.н., Шаталину Ю.В., а также к.х.н., н.с. Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины Щербакову А.Б. и профессору Лондонского университета Королевы Марии Сухорукову Г.Б.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Попов А.**, Popova N., Selezneva I., Akkizov A., Ivanov V., Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts *in vitro*, Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications, V. 68, 2016, P. 406–413
2. **А. Л. Попов**, S. I. Zaichkina, N. R. Popova, O. M. Rozanova, S. P. Romanchenko, O. S. Ivanova, A. A. Smirnov, E.V. Mironova, I. I. Selezneva, V. K. Ivanov, Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles, RSC Advances, 2016, 6, 106141-106149
3. **Попов А.Л.**, Selezneva I.I., Kurnakov N.S., Ivanov V.K., Grigoriev P.A Study of CeO₂ nanoparticles interactions with biological cells and lipid bilayers, Journal of Biological Physics and Chemistry 2014, V. 14, p. 6–10
4. Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К., Щербаков А.Б., **Попов А.Л.**, Давыдова Г.А., Селезнева И.И., Копица Г.П., Третьяков Ю.Д. Одностадийный синтез коллоидных растворов диоксида церия для биомедицинского применения, Докл. Ак. Наук, 2011. Т. 437. №5. С. 638-641.

Статьи в сборниках:

1. **Попов А.Л.**, Popova N.R., Selezneva I.I., Ivanov V.K., Modulation of the expression of antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines by cerium oxide nanoparticles *in vitro*., European Journal of Human Genetics, 2015 Vol. 23, Sup. 1, p. 450
2. **Попов А.Л.**, Попова Н.Р., Иванов В.К. Наночастицы диоксида церия не являются токсичными для МСК человека и способны стимулировать их пролиферацию *in vitro*, Материалы XI международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии», БФФХ – 2016, стр. 47-51

Тезисы докладов:

1. Попова Н.Р., **Попов А.Л.** Синтез и физико-химический анализ полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных наночастицами диоксида церия. Сборник материалов 20-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология-наука 21 века», 2016, стр. 329-330
2. Попова Н.Р., **Попов А.Л.**, Селезнева И.И., Иванов В.К. Анализ влияния полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных цитрат-стабилизированными наночастицами Ce_{1-x}Gd_xO_{2-δ}, на жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro*. Сборник тезисов конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика -2016», стр. 20
3. **Попов А.Л.**, Попова Н.Р., Селезнева И.И., Иванов В.К., Наноцерий как основа для разработки специальных добавок и подложек для культивирования МСК человека, Сборник тезисов конференции «Экспериментальная и теоретическая биофизика -2016», стр. 25
4. **А.Л. Попов**, Н.Р. Попова, И.И. Селезнева, В.К. Иванов «Механизмы дозозависимой регуляции пролиферации эмбриональных фибробластов мыши наночастицами CeO₂ *in vitro*», Тезисы докладов Первой российской конференции «Физика — наукам о жизни-2016», стр.147
5. **Попов А.Л.**, Смирнов А.С., Попова Н.Р., Селезнева И.И., Иванов В.К. Влияние наночастиц диоксида церия (CeO₂ и CeGdO₂) на развитие беременности у мышей линии SHK. Сборник материалов VIII Всероссийского с международным участием Конгресса молодых ученых-биологов "Симбиоз-Россия 2015", стр.16
6. **Попов А. Л.**, Попова Н.Р., Возможные механизмы формирования устойчивости к окислительному стрессу наночастицами диоксида церия при воздействии рентгеновского излучения, Сборник тезисов 19-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2015, стр. 365-366
7. Татарникова О.Г., **Попов А.Л.**, Попова Н.Р., Селезнева И.И., Иванов В. К., Исследование воздействия водорастворимых материалов на основе CeGdO₂ на функциональное состояние клеток линии NCTC clone L929, Сборник материалов Международной конференции "ЛОМОНОСОВ -2015", стр. 143-144

8. **Попов А.Л.**, Попова Н.Р., Механизмы радиозащитного действия нанокристаллического диоксида церия, Сборник материалов Российской научной конференции «Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии» Санкт-Петербург, 4 – 6 июня 2015 г. ToxRad-2015, стр. 157-158
9. **Попов А.Л.**, Сухоруков Г.Б., Попова Н.Р. Полиэлектролитные микрокапсулы как система внутриклеточной доставки наночастиц диоксида церия, Сборник тезисов V Съезда биофизиков России, 2015, т.1, стр. 327
10. **Попов А.Л.**, Сухоруков Г.Б., Попова Н.Р. Антиоксидантные свойства наночастиц диоксида церия и способ их внутриклеточной доставки, Сборник тезисов молодежной конференции «Перспективные направления онкологии и радиологии», 2015, стр. 82
11. **Попов А.Л.**, Сухоруков Г.Б., Попова Н.Р. Разработка подходов к созданию новой системы внутриклеточной доставки наночастиц диоксида церия, Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика -2015», стр. 48
12. **Попов А.Л.**, Селезнева И.И., Иванов В.К. Радиозащитные свойства нанокристаллического диоксида церия *in vitro* и *in vivo*. Перспективы практического применения. Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика - 2014», стр. 57
13. **Попов А.Л.**, Попова Н.Р., Селезнева И.И., Иванов В.К. Радиозащитный эффект наночастиц диоксида церия *in vitro* Сборник тезисов 18-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2014 стр. 112
14. Татарникова О.Ю., **Попов А.Л.**, Селезнева И.И. Исследование агрегативной устойчивости диоксида церия, допированного гадолинием, в различных биологических средах Сборник тезисов 17-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2013 стр. 142-143
15. **Попов А.Л.**, Селезнева И.И., Иванов В.К. Наночастицы диоксида церия как перспективный полифункциональный материал для санации ран. Материалы Всероссийской с международным участием научной конференции «Полифункциональные химические материалы и технологии-2013», стр. 222-223
16. **Попов А.Л.**, Искусных И.Ю., Селезнева И.И. Исследование влияние наночастиц диоксида церия на экспрессию в культуре фибробластов CuSOD, MnSOD И IL-6 Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика - 2012», стр. 23-24
17. **Попов А.Л.** Разработка и исследование нового класса антиоксидантных препаратов на основе нанокристаллического диоксида церия. Сборник тезисов Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика -2011», стр. 17
18. **Попов А.Л.**, Селезнёва И.И., Гришина Е.А. Исследования устойчивости суспензий нанодисперсного диоксида церия в условиях биологического окружения Сборник тезисов 14-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2010, стр. 167
19. **Попов А.Л.**, Григорьев П.А. Исследование взаимодействия наночастиц диоксида церия, синтезированных в оболочке цитратных ионов, с модельными фосфолипидными мембранами. Сборник тезисов 16-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2012, стр. 67-68
20. Татарникова О.Г., **Попов А.Л.** Радиопротекторный эффект наночастиц диоксида церия на культуре клеток первичных фибробластов мыши Сборник тезисов 16-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2012, стр. 338-339
21. Искусных И.Ю., **Попов А.Л.** Исследование цитотоксичности наночастиц диоксида церия, синтезированных в оболочке цитратных ионов, на культуре первичных фибробластов мыши Сборник тезисов 16-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Биология-наука 21 века", 2012, стр. 417
22. **Попов А.Л.**, Селезнева И.И., Татарникова О.Ю. Исследование защитного действия наночастиц диоксида церия при воздействии низкотемпературной аргоновой плазмы Сборник тезисов IV Съезда биофизиков России, 2012, стр. 78