

НАНОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ: СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

А. Б. ЩЕРБАКОВ¹, Н. М. ЖОЛОБАК¹, В. К. ИВАНОВ²,
Ю. Д. ТРЕТЬЯКОВ³, Н. Я. СПИВАК¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

²Институт общей и неорганической химии им. Н. С. Курнакова
РАН, Москва, Российская Федерация

³МГУ им. М. Ю. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

E-mail: n.zholobak@gmail.com

В обзоре представлены данные о физико-химических свойствах, токсичности и биологической активности нанокристаллического диоксида церия. Проанализирована их связь с размером, удельной поверхностью и зарядом частиц. Детально описаны способы получения наночастиц диоксида церия с заданными свойствами, показана возможность иммобилизации на их поверхности биологически активных молекул. Изложены современные данные литературы и результаты собственных исследований авторов, свидетельствующие о перспективах применения нанокристаллического диоксида церия в биологии и медицине.

Ключевые слова: нанокристаллический диоксид церия, моделирование, синтез, коллоидные системы, золи, окислительный стресс, антиоксиданты, нанобиоматериалы, антивирусный эффект, интерферон, противоопухолевое, цито- и радиопротекторное действие.

Нанотехнология — одно из самых перспективных направлений в современной науке и технике. *Наномедицина* подразумевает применение технологических возможностей и объектов нанотехнологии с целью диагностики и лечения заболеваний или улучшения биологических функций организма. В таксономии технологий наномедицины определяющую базовую позицию занимают *нанокристаллические материалы* [1], к числу которых относятся и нанобиоматериалы на основе диоксида церия.

Нанокристаллический диоксид церия (НДЦ)

Диоксид церия CeO_2 — неорганический материал, который находит широкое применение в сенсорах, электрохромных и противокоррозионных покрытиях. Он входит в состав катализаторов селективного окис-

ления и дегидрогенизации. При переходе в нанокристаллическое состояние диоксид церия значительно изменяет свои физико-химические свойства, причем характер этих изменений достаточно необычен [2]. В частности, в отличие от целого ряда веществ, с уменьшением размеров частиц параметр элементарной ячейки CeO_2 увеличивается [3]. Одновременно с этим изменяется кислородная нестехиометрия вследствие увеличения доли атомов, находящихся на поверхности частиц.

На рис. 1 представлены модели кристаллической решетки макрокристаллического (1) и наноразмерного (2) CeO_2 , где показано, каким образом образование кислородных вакансий приводит к увеличению кислородной нестехиометрии и повышению доли атомов церия, находящихся в степени окисления (III). Деконволюция рентгеновских

фотоэлектронных спектров (рис. 1, справа) наглядно доказывает увеличение относительного содержания Ce^{3+} в образцах с уменьшением размеров частиц (рис. 2). Определен критический размер НДЦ (в пределах 1,1–1,3 нм), при котором все ионы церия в кристаллической решетке находятся в состоянии Ce(III) [3, 4]. Значительная кислородная нестехиометрия наблюдается для частиц CeO_2 размером менее 5 нм, и именно такие частицы проявляют максимальную активность в окислительно-восстановительных процессах.

Например, уменьшение размера частиц НДЦ приводит к возрастанию способности разлагать пероксид водорода. Процесс протекает в несколько стадий, в результате которых происходит окисление НДЦ с последующей регенерацией до исходного состояния. При этом в качестве интермедиата на первой стадии в водном растворе H_2O_2 при $\text{pH} > 7$ на поверхности частицы, по-видимому, образуется темноокрашенный моноперокситригидроксид церия (уравнение 1б):

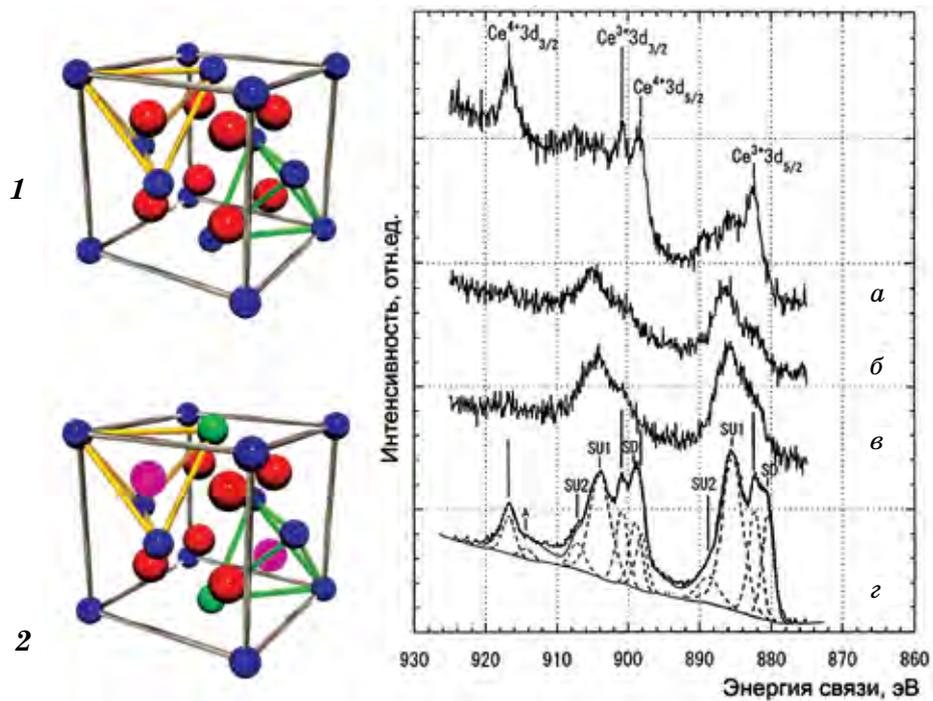


Рис. 1. Слева — кристаллическая структура стехиометрического макрокристаллического (1) и нестехиометрического нанокристаллического (2) диоксида церия.

Условные обозначения:

● — Ce^{3+} ; ● — Ce^{4+} ; ● — O^{2-} ; ● — кислородная вакансия.

Справа — рентгеновские фотоэлектронные спектры монодисперсных образцов CeO_2 различного размера: а — $3,8 \pm 0,6$ нм; б — $3,0 \pm 0,4$ нм; в — $2,2 \pm 0,3$ нм; г — крупнокристаллический диоксид церия [2]

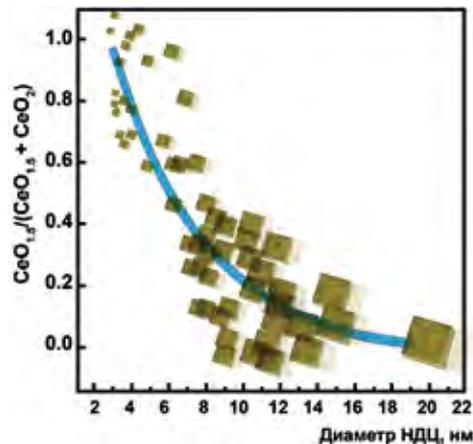


Рис. 2. Зависимость относительного содержания Ce^{3+} в НДЦ от размера частицы [3]

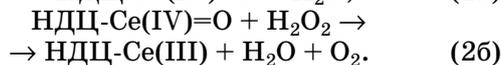
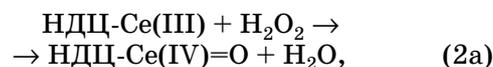


На рис. 3 показано несколько циклов разложения пероксида водорода золевм НДЦ в растворе. Поведение системы можно визу- ально регистрировать как в УФ-режиме (врезка, верхний ряд), так и при нормальном освещении (врезка, нижний ряд). Исходный раствор (кривая 1) обработан пероксидом во- дорода (кривая 1а). Через некоторое время система возвращается в исходное состояние (кривая 2), после чего ее снова обрабатывают пероксидом (2а), и цикл окисления–восста- новления повторяется.

Колебательные редокс-процессы пред- ставляют собой важнейшую функцию био- логических систем. Зная механизм этих процессов, можно целенаправленно их кор- ректировать в случае дисфункции. В 1951 г. Б. П. Белоусов, пытаясь найти неорганичес- кий аналог цикла Кребса [5, 6], открыл яв- ление автоколебательной химической реак- ции, катализатором которой выступали ионы церия Ce^{+3} . С развитием нанотехноло-

гий и исследованием физико-химических свойств НДЦ появился новый объект для мо- делирования и регулирования циклических окислительно-восстановительных процессов.

Совокупность процессов, происходящих на поверхности НДЦ, можно представить в виде системы уравнений:



Регенеративное поведение наночастиц CeO_2 напоминает свойства ферментов — в слу- чае разложения пероксида водорода НДЦ выполняет функцию фермента каталазы, сово- купный механизм действия которой можно представить в виде системы уравнений (3), аналогичных системе уравнений (2а, б):

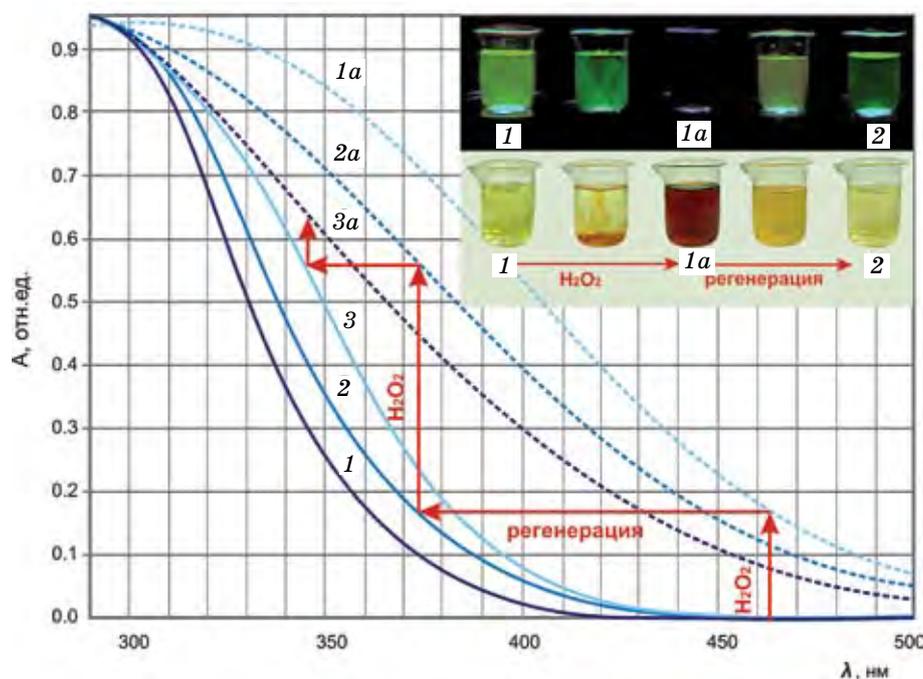
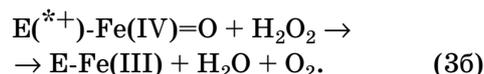
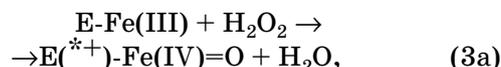


Рис. 3. Динамика изменения УФ-спектров поглощения 0,3 мМ водного золя НДЦ, стабилизированного полиакрилатом натрия (размер частиц 2–3 нм), в процессе обработки пероксидом водорода при pH = 8: 1 — исходный коллоидный раствор; 1а — раствор после введения 1 мМ H_2O_2 ; 2 — раствор после экспозиции 12 ч при 50 °С; 2а — повторное введение 1 мМ H_2O_2 ; 3 — раствор после экспозиции 12 ч при 50 °С; 3а — очередное введение 1 мМ H_2O_2 .

Вверху на врезке — люминесценция растворов 1, 1а и 2 под действием УФ-облучения и переходные состояния. Внизу на врезке — те же растворы при естественном освещении

особенно активно окисление происходит в нейтральной и слабощелочной средах. Введение пероксида водорода повышает скорость разложения полифенолов за счет радикального окисления и разрушения гетероциклов [17].

В наших исследованиях показано [18], что частицы НДЦ размером 1–3 нм, стабилизированные цитратом или полиакрилатом натрия, способны защищать антоцианы от разрушения под действием пероксида водорода в нейтральных и щелочных растворах. Напротив, при $\text{pH} < 6$ частицы НДЦ ускоряли разрушение полифенолов как в присутствии, так и в отсутствие активных форм кислорода (АФК). Высказано предположение, что антиоксидантная активность наночастиц диоксида церия превосходит таковую для флавоноидов, по крайней мере для антоцианов в нейтральных и щелочных растворах. Также нами показано, что золи НДЦ (размер частиц 2–5 нм) в неполярных растворителях защищают от окислительной дегградации важнейший олеофильный антиоксидант — β -каротин (провитамин А) [4].

Токсичность НДЦ

Одна из наиболее важных характеристик НДЦ с биомедицинской точки зрения — его токсичность. Результаты исследований влияния наночастиц CeO_2 на человека многочисленны и свидетельствуют о его низкой токсичности. Известны два основных пути попадания НДЦ в организм: ингаляционный и с продуктами питания [19]. Если дыхательные пути освобождаются от НДЦ различными способами и с различной скоростью в зависимости от растворимости в жидкостях организма, то принятые внутрь частицы плохо поглощаются клетками кишечника и выделяются с фекалиями после прохождения по желудочно-кишечному тракту [20].

Исследования на животных показали [21], что внутривенное введение крысам золя наночастиц размером 6–7 нм в дозе 175–250 мг/кг сопровождается смертью 60% животных, тогда как доза 100 мг/кг является совершенно нетоксичной: не вызывает изменений показателей окислительного стресса по сравнению с контрольными интактными животными. На токсичность НДЦ влияют несколько факторов. Прежде всего — это размер частиц. Известно, что частицы CeO_2 размером 1 000 нм обладают незначительной токсичностью в культуре гиппокампальных нервных клеток (HT22) и макрофагов мыши (RAW164) [22]. Исследования на

культуре клеток фибробластов легкого человека (MRC-9) [23] показали, что поглощение НДЦ даже в низких, но физиологически значимых концентрациях 0,1–100,0 мкг/мл существенно зависит именно от размеров частиц, а их плотность и величина удельной поверхности имеют второстепенное значение. Размерный диапазон 10–30 нм — переходная область, где начинают проявляться и усиливаться эффекты, связанные с кислородной нестехиометрией и способностью частицы CeO_2 участвовать в окислительно-восстановительных процессах. Показано [24] что в культуре бронхиальных эпителиальных клеток человека (BEAS-2B) использование НДЦ размером 15, 30 и 45 нм сопровождается увеличением уровня клеточных АФК и вызывает значительную индукцию гемоксигеназы-1. Высказано предположение, что такие токсические эффекты НДЦ исследованного размерного диапазона могут быть вызваны окислительным стрессом.

Уменьшение размеров частиц НДЦ ниже 10 нм сопровождается резким уменьшением их токсичности. Исследование НДЦ размером 9 нм показало отсутствие токсичности в культуре клеток L929, A549 и ткани легкого [25]. На макрофагах мыши (RAW 267.4) и бронхиальных эпителиальных клетках человека (BEAS-2B) НДЦ размером 8 нм не оказывал цитотоксического действия и не вызывал воспаления. Как отмечают авторы исследования [26], в присутствии НДЦ происходит подавление продукции АФК в клетках и наблюдается защитный эффект на фоне экспериментального моделирования окислительного стресса.

Исследование на животных токсичности НДЦ размером 7 нм показало отсутствие токсического действия частиц. Наоборот, внутривенное введение НДЦ (0,1 мл 0,15 мМ CeO_2) трансгенным мышам MСР-1 с ишемической кардиомиопатией дважды в неделю в течение двух недель снижало окислительный и/или эндоплазматический ретикулярный стресс и активность воспалительных процессов в миокарде, ингибируя т. о. процессы развития сердечной недостаточности [27]. После такого применения наночерия показано снижение уровня продукции провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IL-6) в миокарде. Снижение токсичности частиц диоксида церия и рост антиоксидантной активности наблюдается вплоть до достижения частицами размеров 0,6–0,8 нм. С уменьшением размеров частиц ниже этих значений корректно говорить уже о молекулярных или ионных системах.

В истинных растворах соединений церия их токсичность возрастает прежде всего за счет способности ионов церия (IV) окислять биомолекулы. Соли Се (III) менее токсичны, чем соли церия (IV), однако могут, например, выступать в роли промотора свободных радикалов: хлорид церия может катализировать разложение пероксида водорода по схеме реакции Фентона с образованием супероксид-радикала [28].

С точки зрения возможного токсического влияния на биологические объекты наиболее безопасными являются НДЦ размером 1–6 нм. Именно низкая токсичность, наряду со специфическими окислительно-восстановительными и противорадикальными свойствами, позволяет рассматривать НДЦ как перспективный объект для биомедицинских применений.

Необходимо отметить, что кроме определенных размерных диапазонов (1–6 нм) большую роль играют способ получения частиц, использованные прекурсоры и стабилизаторы. В фармакокинетике НДЦ исключительно важен заряд поверхности частиц (дзета-потенциал), а еще более существенное значение имеет рН биологической среды (в зоне накопления и активности НДЦ), которая влияет не только на дзета-потенциал, но и на редокс-свойства самой частицы.

Образцы НДЦ, имеющие положительный дзета-потенциал, лучше адсорбируют протеины, в то время как отрицательно заряженные частицы либо вообще не способны сорбировать, либо сорбируют их гораздо меньше. С другой стороны, на основании цитологических исследований показано, что отрицательно заряженные частицы легче поглощаются клеткой [29].

НДЦ одинакового размера и формы, полученные в разных условиях или с использованием разных прекурсоров, могут отличаться по своим физико-химическим и биологическим свойствам. Так, в работе [30] было показано, что при синтезе наночастиц CeO_2 из солей церия (IV) формируются образцы с меньшей шириной запрещенной зоны по сравнению с образцами, синтезированными из солей церия (III).

С целью изучения влияния прекурсора на токсичность НДЦ на культуре клеток нами синтезированы частицы размером 2–3 нм из солей Се(III) и Се(IV) с использованием в качестве стабилизатора низкомолекулярной полиакриловой кислоты (8 000 г/моль) [31]. Исследование их токсического влияния на перевиваемой культуре фибробластов мышей (L929), эпителиальных клетках

тестикул эмбрионов поросят (ЕРТ) и фибробластоподобных клетках зеленой мартышки (VERO) показало, что наименее токсичным для изученных клеточных линий был НДЦ, полученный в процессе длительной термообработки при кипячении из соли Се(IV), наиболее токсичными — частицы НДЦ, полученные из соли Се(III).

Наряду с этим следует учитывать, что содержание Ce^{3+} в анализируемых образцах может зависеть не только от исходных веществ, но и от условий синтеза. В работе [32] методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) было показано, что образцы диоксида церия, полученные осаждением аммиаком из раствора нитрата церия (III) с последующим отжигом при 250 °С, являются более стехиометричными по сравнению с аналогичными образцами, отожженными при 650 °С, несмотря на то, что размер последних (12 нм) превосходит размер первых (9 нм).

Знаменитый врач и философ эпохи Возрождения Парацельс говорил: «Все — яд, все — лекарство; то и другое определяет доза». С развитием наномедицины стало понятно, что кроме дозы нужно знать и учитывать еще и другие характеристики: размер, заряд, удельную площадь поверхности частицы, исходные вещества, условия синтеза и т. д. В связи с этим синтез НДЦ для биологических целей — непростая и многовекторная нанотехнологическая задача, и в каждом конкретном случае полученные наночастицы требуют детального изучения.

Синтез НДЦ для медико-биологического применения

Существует множество способов получения наночастиц диоксида церия, но лишь немногие из них полностью отвечают вышеуказанным требованиям биосовместимости. Помимо размерных параметров, стехиометрии и заряда НДЦ важную роль играет стабилизатор, используемый при синтезе и/или при пептизации наночастиц. Стабилизатор не должен полностью блокировать частицы в золе, поскольку только при наличии доступа к поверхности сохраняются буферные свойства НДЦ по отношению к АФК в биологической системе.

В работе [14] поставлен актуальный вопрос синтеза водорастворимого биосовместимого золя НДЦ. Использование для этих целей нетоксичного лецитина позволило получить наночастицы размером 3,5 нм, устойчивые в буферном растворе тринатрий-

цитрата [33]. В работе [34] показано, что НДЦ могут быть получены с использованием в качестве стабилизатора полигидроксильных соединений (прежде всего углеводов). Выявлена возможность образования наночастицы из комплекса с глюкозой и полисахаридами (декстран). Биологически совместимый декстран Т10 (10 000 г/моль) использовали также в работе [8]. Полученные авторами наночастицы состояли из ядра диоксида церия размером 4 нм, окруженного оболочкой декстрана, и имели общий размер ~10 нм. Установлено, что редокс-свойства НДЦ в оболочке полностью сохраняются: пероксид водорода и пероксирадикалы могут свободно проходить через декстрановую оболочку и окислять Ce^{+3} до Ce^{+4} . Авторы также обнаружили, что способность полученных частиц инактивировать АФК значительно снижается при низких значениях pH. В работе [35] в качестве стабилизатора НДЦ был использован альбумин куриного яйца. К сожалению, характеристики получаемого при этом продукта изменяются при хранении, и он не представляет практического интереса. Для стабилизации наночастиц диоксида церия в работе [36] применяли нетоксичный поливинилпирро-

лидон (4 250–18 000 г/моль), однако размер получаемых частиц CeO_2 (50–100 нм) был слишком велик, и поэтому такой золь НДЦ малопримоген для биомедицинского применения.

С целью получения наночастиц диоксида церия ультрамалых размеров (1–3 нм) нами был проведен синтез зольей [37] через стадию образования комплексных соединений церия с многоосновными кислотами *in situ* — лимонной или полиакриловой (ПАК). Эти кислоты адсорбируются на поверхности наночастиц диоксида церия и препятствуют их агрегации в процессе синтеза. Золи, полученные по предложенной методике, отличаются не только малым размером частиц, но и высокой монодисперсностью. Для повышения кристалличности и снижения количества гидроксильных групп на поверхности наночастиц CeO_2 в обоих случаях полученные щелочные золи подвергали первичной термообработке; для снижения кислородной нестехиометрии систему обрабатывали пероксидом водорода. Дзета-потенциал зольей в обоих случаях был отрицательным во всем биологическом диапазоне pH (-40 ± 10 мВ при pH = 7,5). Несмотря на малые размеры (рис. 4, А, Б), полученные частицы диоксида церия имеют высокую кристалличность.

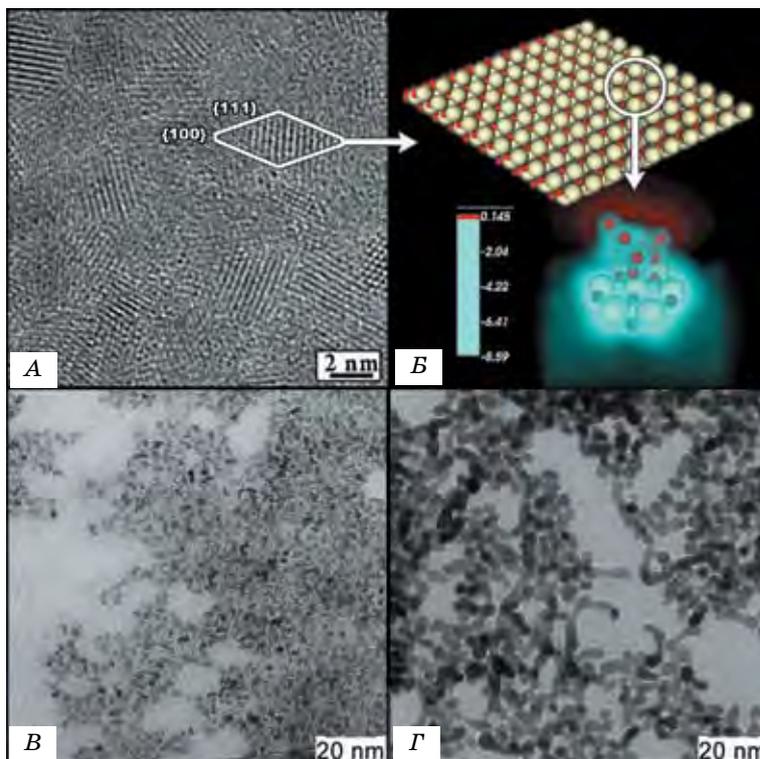


Рис. 4. А — Электронная микрофотография (HRTEM) исходного золя НДЦ (4–5 нм), стабилизированного цитратом натрия. Б — Структура нанокристалла диоксида церия (вверху) и пространственное 3D-распределение эффективного потенциала молекулы цитрата, адсорбированной на поверхности наночастицы Ce_7O_{12} (внизу). Микрофотографии золя НДЦ (А), обработанного при 180 °С в течение 15 мин (В) и 3 ч (Г)

Следует отметить, что данные золи отличаются механизмом стабилизации: если в случае ПАК основной вклад вносит стерический фактор, то для цитрата — электростатический (рис. 4 Б, внизу). В последнем случае расклинивающее давление между частицами золя можно преодолеть термодинамически. Нами предложен способ регулирования размера НДЦ соответствующей термообработкой цитратных золь диоксида церия (рис. 4, В, Г); при этом гидротермальный рост частиц CeO_2 происходит по механизму ориентированного присоединения кристаллитов, и размер НДЦ можно варьировать во всем интересующем диапазоне 1–10 нм. Все указанные золи НДЦ могут быть использованы в биологических и медицинских исследованиях без какой-либо дополнительной модификации. Они обладают низкой токсичностью, способны обратимо участвовать в редокс-процессах (рис. 3, на примере пероксида водорода), защищать от окислительной деструкции (антоцианы) и инактивировать свободные радикалы (нитроксильный радикал). Как и следовало ожидать, на фоне окислительного стресса в биологических системах такие золи имеют выраженное цитопротекторное действие. Например, полученные по предложенной схеме цитратные золи НДЦ способны защищать клетки млекопитающих от разрушающего действия УФ-излучения [38].

Вопросы доставки НДЦ в зону повышенной выработки АФК или онкогенеза, а также изучения их фармакокинетики достаточно актуальны [39]. С другой стороны, благодаря низкой токсичности НДЦ сам по себе может быть использован в качестве «транспортного средства» для доставки необходимых биологически активных соединений в организме. Для адресной доставки наночастиц диоксида церия или их визуализации в живой клетке поверхность НДЦ должна быть функционализирована с помощью биологически активных или люминесцентных соединений. Например, последовательная модификация поверхности наночастиц CeO_2 эпихлоргидрином и карбоксибензолсульфонамидом [40] или флуорофором (карбокси-флуоресцеином) [41] позволяет смоделировать специфический вектор фармпрепарата либо проследить за поведением НДЦ *in vitro* и *in vivo*. С аналогичной целью нами гидротермально-микроволновым способом [42] были получены «голые» (без использования дополнительных органических стабилизаторов) НДЦ с положительным дзета-потенциалом. Размер частиц в этих системах — 5–6 нм. Анализ микрофотографий золь CeO_2 , подвергшихся гидротермально-микроволновой обработке, свидетельствует о том, что в результате синтеза образуются хорошо закристаллизованные частицы, имеющие преимущественно гексагональную форму (рис. 5, А).

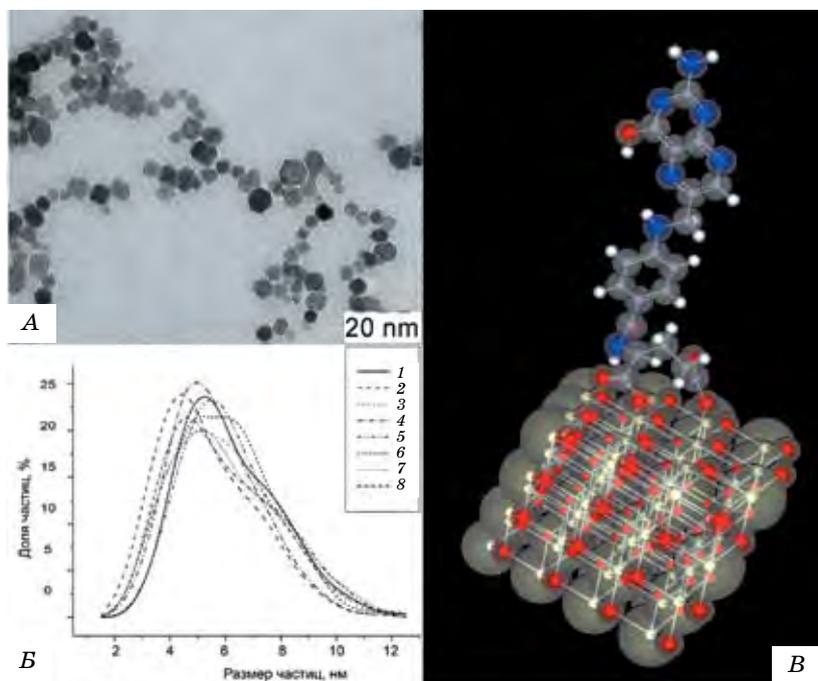


Рис. 5. А — Микрофотография образцов НДЦ, полученных гидротермально-волновым способом. Б — зависимость распределения частиц по размерам от температуры и времени обработки: 1 — 170°, 180'; 2 — 130°, 180'; 3 — 130°, 30'; 4 — 170°, 30'; 5 — 150°, 180'; 6 — 190°, 180'; 7 — 190°, 120'; 8 — 190°, 30'. В — Расчетная модель адсорбции фолиевой кислоты на частице НДЦ

Показано, что эти частицы могут быть легко функционализированы разнообразными лигандами — цитратом, аденозинтрифосфатом (АТФ), флавиномононуклеотидом, фолиевой кислотой, производными флуоресцеина и т. п. Выбор цитрата и АТФ обусловлен особенностями поведения наночастиц диоксида церия при ингибировании АФК в клетках. Цитрат-ион — основной элемент цикла Кребса, при котором, в том числе, образуется АТФ. Цикл Кребса у эукариотов протекает в митохондриях, которые одновременно являются основным источником АФК. Известно, что митохондрии — зона локализации и повышенной активности наночастиц диоксида церия [2]. С точки зрения биохимии, при использовании в качестве стабилизаторов цитрат-иона и АТФ следует ожидать дополнительной тропности модифицированных наночастиц CeO_2 к митохондриям и увеличения их концентрации именно в этих органеллах. В свою очередь, фолиевая кислота имеет повышенную тропность в зону онкогенеза [43].

На рис. 5, В представлена компьютерная модель адсорбции фолиевой кислоты на частице $\text{Ce}_{57}\text{O}_{86}$. Видно, что птериновая группа при адсорбции свободна и ориентирована в раствор, что делает ее доступной для фолатных рецепторов.

Таким образом, разработанные способы синтеза золей диоксида церия позволяют использовать полученные частицы НДЦ для широкого спектра задач в биологии и медицине.

Проблема окислительного стресса

Подавляющее большинство живых организмов на Земле в своей жизнедеятельности не может обходиться без потребления кислорода, при этом процесс метаболизма в биологических системах сопровождается образованием различных активных форм кислорода. Необходимый уровень АФК в организме регулируют антиоксидантные ферменты; в случае дисбаланса между продукцией АФК и концентрацией этих ферментов возникает окислительный стресс (ОС) [44]. Например, часть произведенных в митохондриях супероксидных радикалов проникает из электронной транспортной цепи [45]. Эти радикалы способны нарушать структуру протеинов, а также могут протонироваться с образованием еще более реакционноспособных гидроксильных радикалов [46–48]. В свою очередь, гидроксильный радикал окисляет практически все органические мо-

лекулы — в том числе протеины, нуклеиновые кислоты и другие биополимеры, а также способен отрывать атом водорода от молекул ненасыщенных жирных кислот и инициировать пероксидное окисление липидов. Избыток супероксидного радикала каталитически преобразуется в кислород и пероксид водорода с помощью супероксиддисмутазы. Пероксид водорода также может образовывать гидроксильный радикал в процессе реакций Фентона и Габера–Вейса. В свою очередь, H_2O_2 каталитически разлагается при помощи каталазы и глутатионпероксидазы [45, 49].

Неэнзиматические компоненты антиоксидантной системы (витамины А и Е, некоторые протеины, мочевиная кислота) обеспечивают еще одну линию защиты организма от АФК; дисфункция любого из них также может привести к ОС. Он может возникнуть под влиянием психологических стрессов, экзогенных и эндогенных интоксикаций, техногенных загрязнений окружающей среды и ионизирующего излучения. Например, при воздействии ионизирующей радиации в организме происходит образование гидроксильных радикалов в результате радиолитической воды. ОС участвует в патогенезе более 100 различных заболеваний (прежде всего нейродегенеративных, таких как болезнь Альцгеймера и другие типы деменций, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, эпилепсия и рассеянный склероз). ОС может быть причиной артрита, кардиологических дисфункций и многих заболеваний, вызывающих необратимую слепоту, в частности таких, как диабетическая ретинопатия, макулярная и ретиальная дегенерация. Наконец, при старении любого здорового организма может возникать возрастная ОС за счет снижения активности естественной антиоксидантной (энзиматической) системы, а также в связи с увеличением содержания продуктов пероксидного окисления липидов и свободных радикалов, образованных прежде всего за счет модифицирующего воздействия липопероксидов [50, 51].

При нарушении защитной (антиоксидантной) системы организма или при значительном повышении уровня экзогенных АФК необходим экзогенный «регулятор», способный выполнять функцию фермента или антиоксиданта. Как показано выше, в качестве подобного «регулятора» может выступать НДЦ, который благодаря своим особым физико-химическим свойствам способен предохранять клетку от разрушения под

действием неблагоприятных внутренних и внешних факторов, вызывающих ОС. Принципиальная схема защитного механизма представлена на рис. 6. При избытке АФК незащищенная клетка необратимо повреждается и разрушается, например по механизму окситоза (апоптоза, вызванного ОС). В присутствии НДЦ происходит инактивирование АФК, при этом клетка защищена от разрушения. Через непродолжительный промежуток времени наночастицы регенерируют и вновь способны выполнять функцию антиоксиданта.

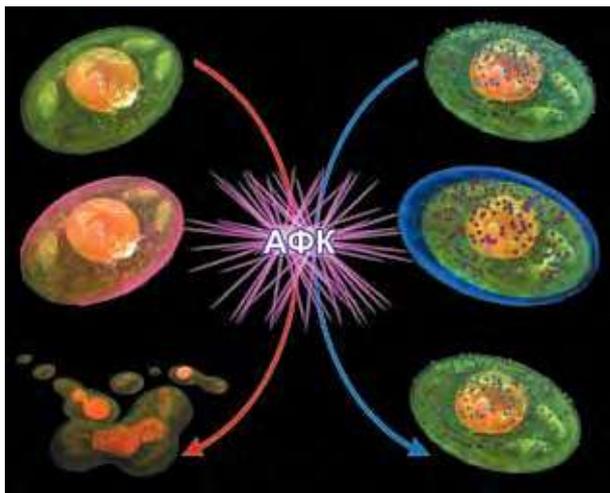


Рис. 6. Принципиальная схема воздействия АФК (например, пероксида водорода) на незащищенную клетку (слева) и клетку, обработанную НДЦ (справа)

НДЦ в биологии и медицине

Выше нами прослежено влияние размера и заряда поверхности НДЦ, наличия и свойств стабилизатора и других параметров золь диоксида церия на их токсичность и биологическую активность.

Современное состояние биомедицинского применения НДЦ изложено нами в обзоре [2]. Показано, что НДЦ способен участвовать в биологических процессах в качестве регулятора АФК и акцептора свободных радикалов [52]. В работе [22] впервые *in vitro* исследовано антиоксидантное действие НДЦ. Для изучения защитного эффекта НДЦ при окислительном стрессе к нейронам линии HT22 была добавлена суспензия наночастиц диоксида церия в ростовой среде, после чего клетки были обработаны глутаминовой кислотой, вызывающей их гибель по механизму окситоза. Установлено, что присутствие наночастиц диоксида церия в значительной степени предотвращает ги-

бель клеток; эксперименты подтвердили, что защитный механизм нейропротекторного действия НДЦ связан с его кислородной нестехиометрией [22].

Авторы работы [53] исследовали активность НДЦ (частицы 3,7 нм, стабилизированные лецитином) в условиях окислительного стресса в клетках млекопитающих. Частицы вводили в βТС-tet клетки инсулиномы крыс и определяли концентрацию свободных радикалов, возникающих под воздействием гидрохинона. Полученные результаты свидетельствуют, что в присутствии НДЦ концентрация свободных радикалов снижается до первоначального значения; кроме того, показано, что НДЦ значительно повышает выживаемость клеток в условиях ОС. Установлено также [54], что НДЦ защищает нейроны от токсичного Аβ₁₋₄₂ бета-амилоидного пептида болезни Альцгеймера, производящего свободные радикалы. В работе [55] продемонстрирована способность НДЦ регулировать образование нитрозилрадикала в мышечных макрофагах J774A.1. Авторы [27] впервые показали *in vivo*, что наночастицы CeO₂, вводимые внутривенно, благодаря своим антиоксидантным свойствам снижают миокардиальный окислительный стресс, ER-стресс и воспалительные процессы у мышей и, таким образом, защищают против прогрессирования сердечной дисфункции.

Золи нанодисперсного диоксида церия не менее эффективны и в случае экзогенного поступления АФК. Пероксид водорода относится к АФК, его избыток способен повреждать биомолекулы и клеточные мембраны; концентрация H₂O₂ в цитоплазме выше 1 мкМ вызывает состояние окислительного стресса и приводит к гибели клеток. В работе [56] показано, что благодаря введению НДЦ (d = 3–5 нм) в культуру нейронов мышей гибель клеток после обработки H₂O₂ снижается примерно в три раза. В аналогичных наших исследованиях были использованы фибробластоподобные клетки почек зеленой мартышки VERO и золи НДЦ с размером частиц 1–2 нм, стабилизированные цитратом натрия. Защитное действие НДЦ представлено на рис. 8 и 9. На рис. 8 серия фотографий клеточных культур, окрашенных кристалл-виолетом, выполнена при обычном освещении. Окрашивание люминесцентными красителями (*Hoechst 33422* — *Propidium iodide*) позволяет визуализировать процесс гибели клеток [57]. Ядра клеток с нарушенными мембранами окрашиваются йодидом пропидия в оранжевый цвет. Кра-

ситель Хехст проникает через неповрежденные мембраны и окрашивает ядра живых клеток в зелено-синий цвет (рис. 9). Полученные экспериментальные данные подтверждают справедливость представленной на рис. 6 теоретической модели защитного действия НДЦ в условиях ОС.

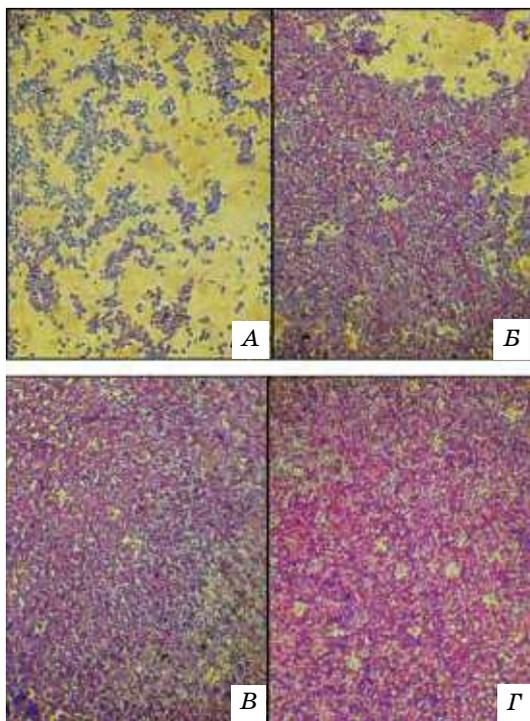


Рис. 7. Культура клеток VERO, обработанная:
 А — 0,8 М Н₂О₂;
 Б — 0,8 М Н₂О₂ + 0,29 мг/мл НДЦ;
 В — 0,8 М Н₂О₂ + 1,17 мг/мл НДЦ;
 Г — 0,8 М Н₂О₂ + 2,3 мг/мл НДЦ

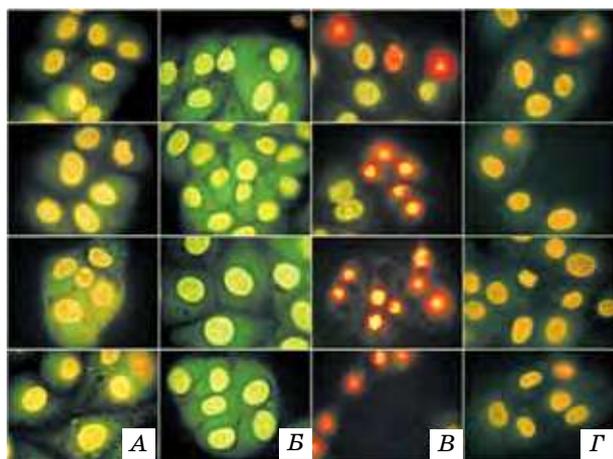


Рис. 8. Люминесцентная микрофотография культуры клеток L929, обработанной:
 А — без обработки;
 Б — 2,3 мг/мл НДЦ;
 В — 0,8 М Н₂О₂;
 Г — 0,8 М Н₂О₂ + 2,3 мг/мл НДЦ

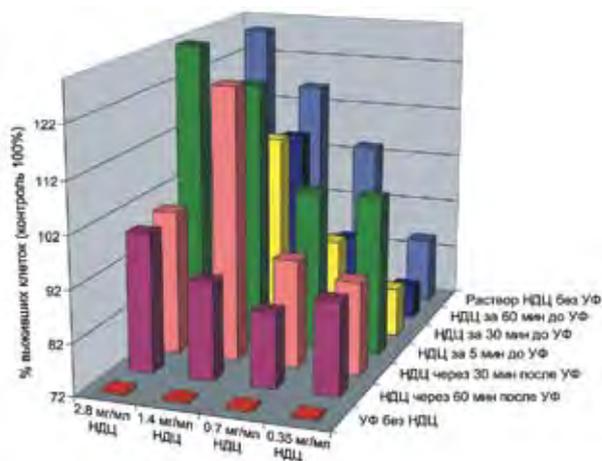


Рис. 9. Зависимость процента выживших клеток в культуре VERO от последовательности обработки и концентрации НДЦ при УФ-облучении (доза 1 TLV, ~30 Дж/м²)

Как указано выше, помимо каталазаподобной активности НДЦ способен выполнять функции другого фермента — супероксиддисмутазы (СОД). Лактобактерии (в частности, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) не содержат СОД, а в механизме защиты от супероксид-аниона эти организмы используют неорганические соединения (например, ионы марганца) [58, 59]. В то же время сама по себе *L. bulgaricus* способна продуцировать большое количество пероксида водорода [59]. В наших экспериментах [60] показано, что использование НДЦ в культуре лактобактерий существенно повышает пробиотические свойства последней. Животным перорально вводили НДЦ и 18-часовую суспензию лактобактерий *L. bulgaricus*. Полученные результаты сравнивали с данными активности клеток интактных животных и тех, которые получали отдельно наночастицы CeO₂ или *L. bulgaricus*. Установлено, что совместное применение *L. bulgaricus* и НДЦ сопровождается достоверной активацией NO-продуцирующей активности клеток селезенки и угнетением процессов оксидативного стресса в клетках перитонеального экссудата мышей в сравнении как с интактными животными, так и с животными, получавшими отдельно НДЦ или *L. bulgaricus*. Только у животных, которые одновременно получали золи CeO₂ и *L. bulgaricus*, наблюдается активация всех исследованных звеньев системы ИФН. Полученные результаты интересны с точки зрения перспективы создания и применения активных наноконпозиций на основе НДЦ и пробиотиков, способных активировать системы клеточной и гуморальной иммунной защиты.

Поскольку ОС может возникать не только под действием АФК, но и как реакция клетки на бактериальное (вирусное) заражение, НДЦ оказался эффективным в качестве физиологически активного соединения, способного влиять на цитопатическое действие (ЦПД) вируса и формирование противовирусной резистентности. В работе [61] нами представлены результаты исследования противовирусного действия частиц НДЦ размером 2–3 нм, синтезированных из солей Се(III) и Се(IV) и стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой. Профилактическая обработка (24-часовой предварительный контакт) культуры референтной клеточной линии фибробластов мышей (L929) и эпителиальных клеток тесткул эмбрионов поросят (ЕРТ) золями НДЦ в концентрации 2,0–10,0 мкг/мл вызывала формирование в клетках состояния противовирусной резистентности. При этом растворы наночастиц, полученные с использованием солей Се(IV) в качестве прекурсора, характеризовались более высокой антивирусной активностью против тест-вируса везикулярного стоматита (VSV). При внесении НДЦ в культуру фибробластов мышей через 30 мин после инфицирования наблюдался 100%-й защитный эффект для золя, полученного из солей Се(III).

Синтезированные нами наночастицы СеО₂, стабилизированные цитратом, также оказывали ингибирующее действие на развитие ЦПД тест-вируса VSV [62, 63]. В условиях *in vitro* формирование состояния 100%-й противовирусной резистентности наблюдалось как в профилактической, так и в лечебной схемах. Вероятно, указанный противовирусный эффект в обработанных НДЦ клетках связан с наличием на поверхности частиц цитратной оболочки, которая и облегчает их транспортировку в клетку, а также с непосредственным влиянием НДЦ на внутриклеточные регуляторные метаболические пути и окислительные процессы, обеспечивающие жизнеспособность клетки. Известно, что именно клеточные пероксисомы (наряду с митохондриями) являются одним из важнейших звеньев развития каскада антивирусных реакций врожденного иммунитета [64]. Нами также обнаружено, что НДЦ существенно угнетает репродукцию вирусов в модельных системах L929/VSV и RF/GSV-1 [62]: снижение титра вируса составило 2,6–4,8 lg. Механизм обнаруженного эффекта антивирусного действия НДЦ представляет особый интерес и подлежит дальнейшему исследованию, поскольку отк-

рывает перспективу для использования НДЦ в профилактике и терапии вирусных заболеваний.

Как показано выше, цитратный стабилизатор обеспечивает отрицательный дзета-потенциал золя НДЦ, препятствуя связыванию наночастиц протеинами, что облегчает их транспортировку в клетку и способность непосредственно влиять на внутриклеточные окислительные процессы. С другой стороны, не содержащие дополнительного органического стабилизатора золи СеО₂ имеют положительный дзета-потенциал, при этом свободная поверхность частиц благоприятна для их специфической адсорбции на макромолекулах протеинов [65]. Использование НДЦ с указанными свойствами позволило достичь резкого увеличения противовирусного потенциала интерферона. Нашими исследованиями показано [62, 63], что эффект 100%-й задержки развития цитопатического действия VSV в культуре клеток L929, обработанных НДЦ совместно с человеческим рекомбинантным интерфероном, наблюдается в концентрациях, на 2 порядка меньших, чем в случае использования только латиферона. Полученные результаты позволяют говорить о перспективности совместного использования композитов НДЦ и интерферона, в результате чего будет достигнуто повышение эффективности и уменьшение (в связи с возможностью снижения эффективной дозы) побочных токсических эффектов при использовании препаратов интерферона.

Золи НДЦ также эффективны против действия внешних факторов, которые обычно сопровождаются образованием АФК или свободных радикалов. В качестве примера подобных процессов можно привести механическую травму, химический или термический ожог, УФ- или рентгеновское облучение и пр. Так, смешанные органотипические культуры клеток мозга были травмированы *in vitro* [54]; показано, что в присутствии НДЦ жизнеспособность нейронов существенно возрастает, при этом НДЦ может выполнять как профилактическую, так и терапевтическую функцию защиты клеток головного мозга от травматического стресса. Подтверждение защитного действия НДЦ получено в работе [66] при травмировании нейронов сетчатки глаза в результате интенсивного светового облучения: предварительное введение НДЦ в сетчатку глаза крыс в существенной степени предотвращает гибель фоторецепторных клеток. При этом использование 1 мкМ суспензии СеО₂ обеспечивает практически полную защиту этих

клеток. По данным электроретинографии, функции сетчатки также сохраняются практически полностью. Особый интерес представляют данные по введению НДЦ в стекловидное тело после облучения; показано, что выживаемость фоторецепторных клеток возрастает и в этом случае. Эти данные были подтверждены экспериментами [67], в которых установлено, что наночастицы диоксида церия могут инактивировать свободные радикалы (реакционно-активные молекулы) и предотвращать дегенеративные нарушения сетчатки глаз у крыс. Авторы предполагают, что наночастицы диоксида церия могут быть использованы для устранения ряда факторов, приводящих к слепоте. Данное направление активно развивается [68], запатентованы метод и препарат для защиты сетчатки глаза [69].

Лучевое поражение вызывает гибель клеток за счет повреждения клеточной ДНК, РНК и протеинов образующимися свободными радикалами. Очевидно, наночастицы диоксида церия должны влиять на процессы, происходящие в клетке под действием жесткого ультрафиолетового или проникающего ионизирующего излучения.

В наших исследованиях по влиянию НДЦ на УФ-повреждение клеток (референтная клеточная линия фибробластов мышей (L929) и фибробластоподобных клеток почек зеленой мартышки VERO) [38] показано, что наночастицы диоксида церия (размером 1–2 нм, стабилизированные цитратом натрия) оказывают выраженное защитное действие. Максимально эффективным оказалось внесение исследуемого золя CeO_2 за 5 мин до облучения (рис. 9): во всем диапазоне исследованных концентраций наблюдалась 100%-я защита клеточного монослоя от разрушительного действия УФ-облучения. Внесение золя CeO_2 в культуру за 60 и 30 мин до облучения обеспечивало 100%-ю защиту клеток в концентрации 1,0–2,8 мг/мл. Обработка клеток CeO_2 в диапазоне концентраций 0,35–2,8 мг/мл через 30 мин после облучения позволила защитить от 70 до 100% клеток. Даже более позднее (через 60 мин после облучения) внесение золя CeO_2 в концентрации 2,8 мг/мл обеспечивало 100%-е сохранение активности клеточного монослоя. Полученные данные представляют несомненный интерес, поскольку открывают перспективу использования золь наночастиц CeO_2 не только в составе профилактических препаратов, защищающих клетки от УФ-облучения, но и в качестве терапевтических препаратов при лечении ожогов, в том числе

и солнечных. Особо важно, что в отличие от традиционных неорганических компонентов фильтров УФ-облучения (ZnO , TiO_2), НДЦ практически не обладает фотокаталитической активностью [38].

На примере защиты от УФ-облучения показано [70], что разовая доза НДЦ защищает клетки в большей степени, чем разовое или многократное использование витамина С, Е, *n*-ацетилцистеина или мелатонина (рис. 10, А), т. е. УФ-протекторные свойства НДЦ превосходят все традиционные антиоксиданты. Уникальным свойством наночастиц диоксида церия является способность регенерировать свои восстановительные свойства в биологической среде [71, 72].

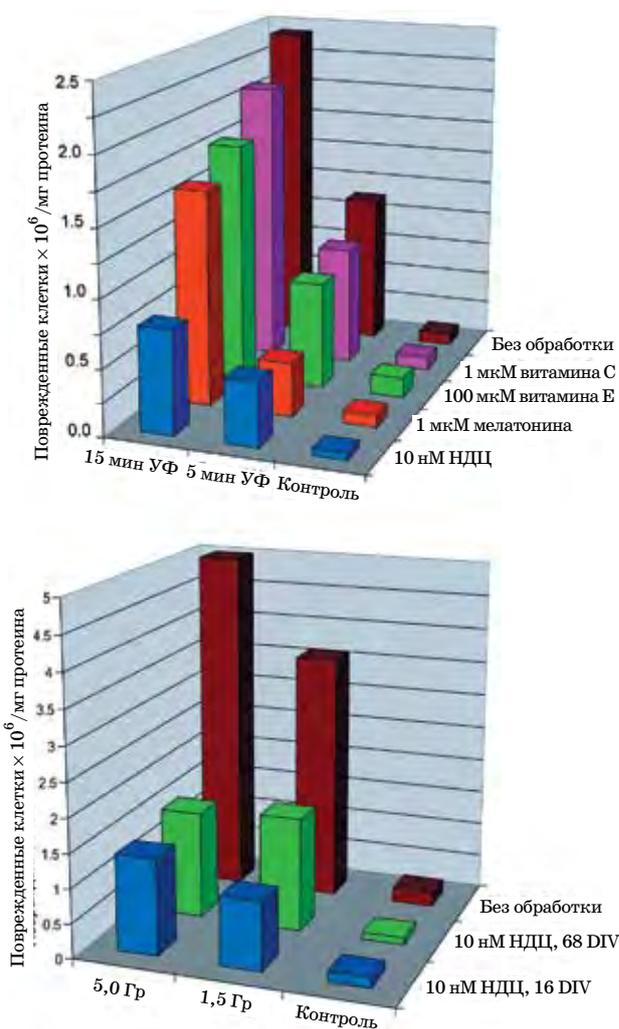


Рис. 10. А — Влияние предварительной обработки НДЦ и традиционными антиоксидантами на повреждение клеток под действием УФ-излучения. Б — Изменение чувствительности культуры клеток мозга, предварительно обработанной наночастицами диоксида церия, к повреждающему действию гамма-облучения. DIV — дни *in vitro*. Гистограммы построены по данным [65]

Пример радиопротекторного действия наночастиц диоксида церия приведен на рис. 10, Б. Смешанные органотипические клетки мозга крысы *in vitro* обрабатывали 10 нМ наночастиц CeO_2 на 10-й день культивирования. Через 14–16 дней культуру подвергали УФ-облучению в течение 5 или 15 мин и оценивали ущерб, нанесенный свободными радикалами. Для исследования защиты от гамма-облучения клетки облучали (1,5 или 5,0 Гр) в течение 1 мин. Дополнительно на 68-й день культивирования обработанные клетки подвергали повторному УФ- и гамма-облучению, чтобы определить, сохраняется ли защитный эффект в клетках во времени. Оказалось, что на 68-й день культивирования все клетки, обработанные НДЦ, оставались живыми, хотя для смешанной культуры клеток мозга такая продолжительность жизни *in vitro* нехарактерна [70].

Особый интерес представляет использование CeO_2 в качестве профилактического средства при радиотерапии раковых заболеваний. При однократном внесении 10 нМ наночастиц диоксида церия в культуру клеток *in vitro* перед облучением в дозах 1,0, 3,0 и 5,0 Гр гибель клеток мозга мышей снизилась соответственно на 78, 62 и 48% [70]. Эффект восстановления клеток наблюдался даже если наночастицы вводили в культуру через 3 ч после облучения. Исследователи обращают внимание также на тот факт, что наночастицы диоксида церия сохраняют активность в течение продолжительного времени и, таким образом, за счет введения единичной дозы можно обеспечить длительный эффект. Радиопротекторные свойства НДЦ по отношению к гастроинтестинальному эпителию исследованы в работе [73]. Одно-разовая предварительная обработка (за 24 часа до облучения) НДЦ нормальных клеток толстой кишки человека (CRL 1541) обеспечивала защиту от лучевого повреждения, снижала продукцию АФК и увеличивала экспрессию супероксиддисмутазы-2 (СОД2) в образце (пропорционально дозе НДЦ).

В работе [74] нормальные и опухолевые клетки человека (рак молочной железы, линия MCF-7) обрабатывали НДЦ (2–5 нм), выдерживали 24 ч, после чего облучали обычным способом и определяли количество выживших клеток. Обработка нормальных клеток обеспечивала защиту от радиационной гибели почти на 99%, но практически не влияла на гибель клеток опухоли. Дополнительное исследование показало, что здоровые клетки накапливают больше наночастиц диоксида церия, чем клетки опухоли.

Очевидно, механизм избирательного угнетения малигнизированных клеток аналогичен описанному в работе [75]. Известно, что в зоне злокачественной опухоли значение рН среды понижено. Как показано выше, редокс-свойства НДЦ существенно зависят от рН среды: с уменьшением рН снижается способность инактивирования АФК и возрастает способность выполнять функции оксидазы. Авторы [75] подтвердили, что наночастицы диоксида церия (4 нм, стабилизированные декстраном) активно разрушают АФК в нейтральных и щелочных растворах и практически неактивны в слабокислых. Опыты с окислительным разрушением клеток нормальных тканей (кардиомиоциты, фибробласты) и клеток опухолей (карцинома легкого, рак молочной железы) показали справедливость такого предположения (рис. 11).

Редокс-терапия злокачественных опухолей — новое, многообещающее направление в онкологии [76], а НДЦ в данном случае представляется очень интересным объектом [77]. Сегодня однозначно можно утверждать, что использование наночастиц диоксида церия целесообразно для повышения эффективности и облегчения последствий химио- или радиотерапии злокачественных новообразований.

Использование НДЦ при культивировании клеток *in vitro* также весьма перспективно. запатентован способ стимулирования пролиферации стволовых клеток с помощью НДЦ размером 3–20 нм [78]. Сферические частицы размером 10 нм максимально стимулировали (более 50%) пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток мышей и человека. В работе [79] кардиальные и мезенхимальные стволовые клетки мышей (CSCs и MSCs) выращивали на подложке из поли-D,L-молочной-со-гликолевой кислоты (PLGA). Материал подложки наполняли наночастицами оксидов металлов, в том числе наночастицами диоксида церия и титана. Показано, что процессы пролиферации и роста стволовых клеток на подложке, содержащей наночастицы CeO_2 , происходили значительно лучше, чем на ненаполненной полимерной или на подложке, содержащей любой другой оксидный наполнитель.

АФК и свободные радикалы играют важную (если не определяющую) роль в процессах старения биологических объектов [45, 49–51]. В работе [70] представлены результаты экспериментов по определению влияния НДЦ на максимальную продолжительность жизни органотипических клеток мозга в культуре. Смешанные культуры

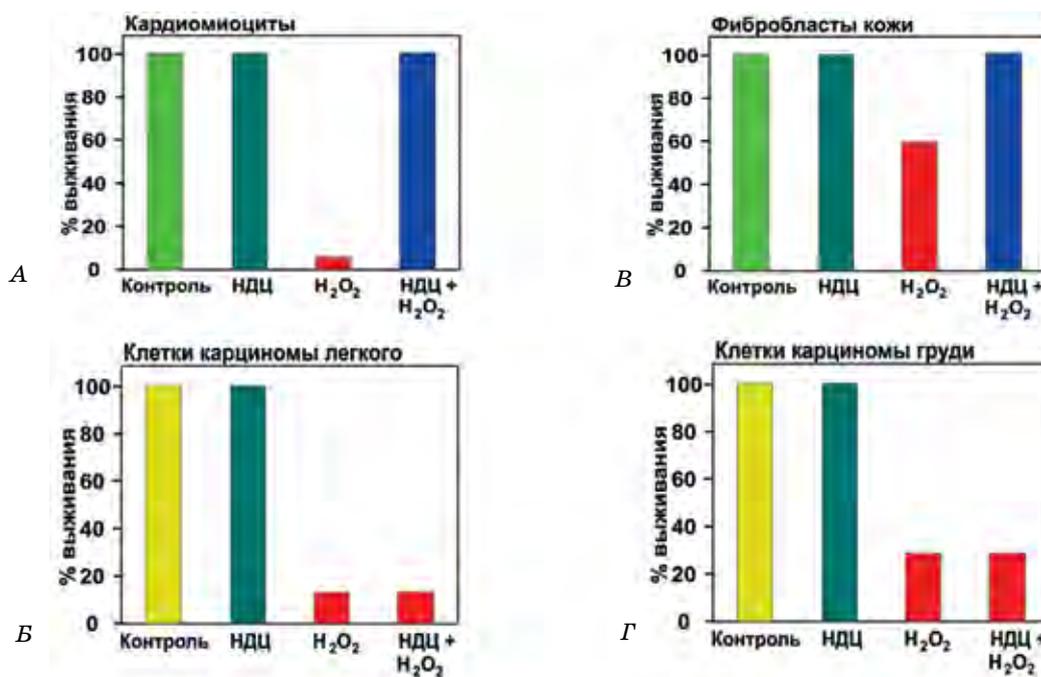


Рис. 11. Процент выживших кардиомиоцитов (А), фибробластов кожи (Б), клеток карциномы легкого (В) и карциномы молочной железы (Г) при действии (слева направо): контроль, только наночастицы диоксида церия, пероксид водорода, пероксид водорода и НДЦ [2]

клеток мозга из коры головного мозга крысы были обработаны на 10-й день инкубации *in vitro* раствором наночастиц диоксида церия; контроль обработали только буферным раствором. Введение НДЦ в любых концентрациях увеличивает продолжительность жизни клеток мозга. Помимо этого было изучено влияние НДЦ ($d = 3-5$ нм) на выживаемость нейронов спинного мозга крысы [56]. Полученные результаты свидетельствуют, что введение НДЦ способствует существенному уменьшению скорости отмирания клеток в колониях вследствие ярко выраженной способности диоксида церия связывать свободные радикалы. Предполагается, что использование НДЦ в сочетании с другими антиоксидантами может смягчить последствия травм спинного мозга.

Приведенные в работе [19] данные позволяют сделать вывод, что введение наночастиц CeO_2 значительно повышает жизнеспособность целого ряда клеток головного мозга, включая астроциты, нейроны, микроглиальные клетки и олигодендроциты. Было показано, что культуры указанных клеток в присутствии НДЦ сохраняют свои морфологические и биохимические характеристики в течение 6–8 мес, тогда как продолжительность жизни аналогичных культур в обычных условиях не превышает 26–30 дней. Отмечается, что использование

микрористаллического диоксида церия, а также нанокристаллических порошков оксидов других металлов (включая празеодим, лантан, титан и рутений) не позволяет достичь подобного эффекта.

Согласно данным, приведенным в работах [19, 80], введение наночастиц CeO_2 может способствовать увеличению продолжительности жизни не только микро-, но и макроорганизмов; в частности, таким способом удалось достичь увеличения средней и максимальной продолжительности жизни дрозофил (в отличие от раствора соли Ce(IV)) [81]. На рис. 12 приведены результаты экспериментов по влиянию наночастиц на продолжительность жизни плодовой мушки *Drosophila melanogaster* [2]. Из представленных данных следует, что продолжительность жизни мушек под влиянием НДЦ значительно увеличилась. Обращает на себя внимание тот факт, что увеличивалась не только максимальная продолжительность жизни, но и время до 50% смерти колонии, особи которой употребляли с пищей наночастицы (пунктирные линии на рис. 12). Введение НДЦ также поддерживало у группы дрозофил нормальный геотаксис при старении. Показано, что дозы, в 100 раз превышающие необходимые для увеличения продолжительности жизни клеточной культуры, нетоксичны для дрозофил.

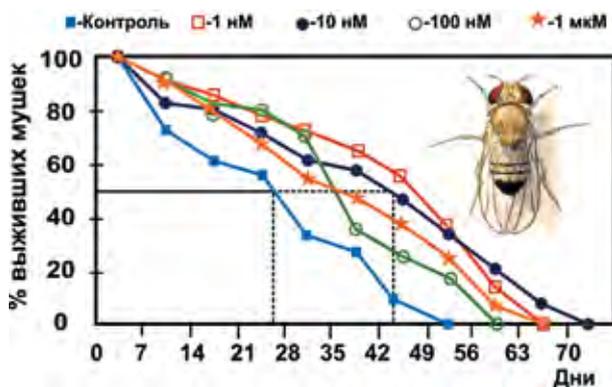


Рис. 12. Влияние наночастиц диоксида церия на продолжительность жизни мужских особей мушки *D. melanogaster* [2]

Таким образом, НДЦ обладает рядом уникальных свойств. Однако, несмотря на успехи применения НДЦ в радикальной наномедицине [14, 70, 82–85] и нанофармацевтике [84], механизм его действия на биологические объекты до конца не изучен. Так, в работе [86] получены данные, которые свидетельствуют, что НДЦ характеризуется не только (и не столько) простой антиоксидантной эффективностью, но и способен оказывать модулирующее воздействие на жизнеспособность нейронов. Авторами показано его нейротрофическое действие, связанное (прямо или косвенно) с влиянием на внутриклеточные сигнальные пути, участвующие в гибели нейронов и нейропротекции: ERK1, 2, ERK5 и BDNF. На основе этих данных наночастицы CeO₂ рассматриваются как возможный перспективный инструмент для терапии нейродегенеративных заболеваний.

НДЦ эффективен везде, где образуются активные формы кислорода, присутствует окислительный стресс, и представляет собой

принципиально новый инструмент для влияния на течение окислительных процессов в клетке. Его специфические физико-химические свойства позволяют оптимизировать характер течения внутриклеточных реакций, обеспечивая таким образом целый спектр защитных эффектов.

Актуальность решения задачи защиты живого от окислительного стресса не подлежит сомнению. И в ряду веществ, обеспечивающих высокую антиоксидантную защиту, смело можно назвать нанокристаллический диоксид церия. Перспективы и особенности его применения определяются двумя основными факторами: низкой токсичностью и высокой кислородной нестехиометрией. Первый фактор обеспечивает сравнительную безопасность применения наночастицы диоксида церия *in vivo*. Вторым обуславливает активность нанокристаллического CeO₂ в биохимических окислительно-восстановительных процессах в живой клетке, особенно при инактивации АФК. К специфическим свойствам НДЦ следует также отнести способность к регенерации, которая выражается в том, что наночастицы диоксида церия после участия в окислительно-восстановительном процессе за сравнительно небольшой промежуток времени способны возвращаться (в отношении кислородной нестехиометрии) к исходному состоянию.

Авторы выражают благодарность доктору Андерсу Блему (QuantumWise, Дания) за любезно предоставленную возможность тестирования программного обеспечения *Virtual NanoLab*TM, а также профессору Судипте Силу (Университет Центральной Флориды, США) за помощь в исследовании зольей НДЦ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Freitas R. A. Jr. What is nanomedicine? // *Nanomedicine*. — 2005. — V. 1, N 1. — P. 2–9.
2. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // *Успехи химии*. — 2009. — Т. 78, №9. — С. 924–941.
3. Baranchikov A. E., Polezhaeva O. S., Ivanov V. K., Tretyakov Y. D. Lattice expansion and oxygen non-stoichiometry of nanocrystalline ceria // *Cryst. Eng. Comm.* — 2010. — V. 12. — P. 3531–3533.
4. Полежаева О.С., Иванов В.К., Щербаков А.Б. и др. Синтез и биомедицинские применения нанокристаллического диоксида церия //

- Тезисы конф. с междунар. участ. «Нанотехнологии в онкологии», 09–10 октября 2009 г., Москва. — С. 55.
5. Winfree A. T. The prehistory of the Belousov-Zhabotinsky oscillator // *J. Chem. Educ.* — 1984. — V. 61, N8. — P. 661–663.
6. Печенкин А.А. Мировоззренческое значение колебательных химических реакций // *Вестник Моск. ун-та. Серия 7. Философия*. — 2005. — № 6. — С. 20–35.
7. Pirmohamed T., Dowding J.M., Singh S. et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity // *Chem. Commun. (Camb)*. — 2010. — V. 46, N 16. — P. 2736–2738.
8. Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis A. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant

- properties // Small. — 2008. — V.4. — P. 552–556.
9. Asati A., Santra S., Kaittanis C. et al. Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles // *Angewandte Chemie*. — 2009. — V. 121, Iss.13. — P. 2344–2348.
 10. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W. T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles // *Chem. Commun. (Camb)*. — 2007. — V. 14, N 10. — P. 1056–1058.
 11. Heckert E. G., Karakoti A. S., Seal S., Self W. T. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria // *Biomaterials*. — 2008. — V. 29, N 18. — P. 2705–2709.
 12. Karakoti A. S., Singh S., Kumar A. et al. PEGylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry // *J. Am. Chem. Soc.* — 2009. — V. 131, N 40. — P. 14144–14145.
 13. Pat. US 7504356 B1. B01J23/10; B01J37/00; C01B15/01; C01F17/00. Nanoparticles of cerium oxide having superoxide dismutase activity / Self W., Seal S. — Filed: 20.02.2008, Publication: 17.03.2009.
 14. Karakoti A. S., Monteiro-Riviere N. A., Aggarwal R. et al. Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications // *JOM J. Min. Met. Mat. Soc.* — 2008. — V. 60, N 3. — P. 33–37.
 15. Babu S., Velez A., Wozniak K. et al. Electron paramagnetic study on radical scavenging properties of ceria nanoparticles // *Chem. Phys. Lett.* — 2007. — V. 442. — P. 405–408.
 16. Иванов В. К., Щербаков А. Б., Рябоконь И. Г. и др. Инактивирование нитроксильного радикала наночастицами диоксида церия // *ДАН*. — 2010. — Т. 430, № 5. — С. 639–642.
 17. Falcao L. D., Falcao A. P., Gris E. F. Spectrophotometric study of the stability of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape skins in a model system // *Braz. J. Food Technol.* — 2008. — V. 11, N 1. — P. 63–69.
 18. Иванов В. К., Усатенко А. В., Щербаков А. Б. Антиоксидантная активность нанокристаллического диоксида церия по отношению к антоцианам // *Журн. неорг. химии*. — 2009. — Т. 54, № 10. — С. 1596–1601.
 19. Rzigalinski, B. Nanoparticles and cell longevity // *Technol. Cancer Res. Treat.* — 2005. — V. 4, N 6. — P. 651–659.
 20. Limbach L. K., Bereiter R., Muller E. et al. Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency // *Environ. Sci. Technol.* — 2008. — V. 42, N15. — P. 5828–5833.
 21. Hardas S. S., Butterfield D. A., Sultana R. et al. Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria // *Toxicol. Sci.* — 2010. — 65 p.
 22. Schubert D., Dargusch R., Raitano J., Chan S. W. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2006. — V. 342, N 1. — P. 86–91.
 23. Limbach L. K., Li Y., Grass R. N. et al. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations // *Environ. Sci. Technol.* — 2005. — V. 39. — P. 9370–9376.
 24. Eom H.-J., Choi J. Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles Via P38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2b // *Toxicol. Lett.* — 2009. — V. 187, N 2. — P. 77–83.
 25. Park B., Donaldson K., Duffin R. et al. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive — a case study // *Inh. Toxicol.* — 2008. — V. 20, N 6. — P. 547–566.
 26. Xia T., Kovochich M., Nel A. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties // *ACS Nano*. — 2008. — V. 2, N 10. — P. 2121–2134.
 27. Niu J., Azfer A., Rogers L. M. et al. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy // *Cardiovasc. Res.* — 2007. — V. 73, N 3. — P. 549–559.
 28. Heckert E. G., Seal S., Self W. T. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium // *Environ. Sci. Technol.* — 2008. — V. 42, N 13. — P. 5014–5019.
 29. Suh W. H., Suslick K. S., Stucky G. D., Suh Y.-H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience // *Progr. Neurobiol.* — 2009. — V. 87. — P. 133–170.
 30. Zhang Ya-W., Si R., Liao Ch.-S., Yan Ch.-H. Facile alcoholthermal synthesis, size-dependent ultraviolet absorption, and enhanced CO conversion activity of ceria nanocrystals // *J. Phys. Chem. B*. — 2003. — V. 107, N 37. — P. 10159–10167.
 31. Жолобак Н. М., Олевинская З. М., Спивак Н. Я. и др. Цитотоксичность водных золь наночастиц CeO₂, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // *Биол. сист.* — 2010. — Т. 2, вып. 1. — С. 3–7.
 32. Tsai Y. Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al. Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // *Nanomedicine*. — 2007. — V. 2, N 3. — P. 325–332.
 33. Tsai Y.Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al. Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // *Nanomed.* — 2007. — V.2, N 3. — P. 325–332.
 34. Karakoti A. S., Kuchibhatla Satyanarayana V. N. T., Babu K. S., Seal S. Direct synthesis

- of nanoceria in aqueous polyhydroxyl solutions // *J. Phys. Chem. C.* — 2007. — V. 111, N 46. — P. 17232–17240.
35. *Maensiri S., Masingboon C., Laokul P. et al.* White synthesis and photoluminescence of platelike clusters of CeO₂ nanoparticles // *Cryst. Growth Design.* — 2007. — V. 7, N 5. — P. 950–955.
 36. *Izu N., Matsubara I., Itoh T. et al.* Controlled synthesis of monodispersed cerium oxide nanoparticle sols applicable to preparing ordered self-assemblies // *Bul. Chem. Soc. Japan* — 2008. — V. 81, N 6. — P. 761–766.
 37. *Иванов В. К., Полежаева О. С.; Шаповров А. С. и др.* Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // *Журн. неорг. химии.* — 2010. — Т. 55, № 3. — С. 368–373.
 38. *Zholobak N. M., Ivanov V. K., Shcherbakov A. B. et al.* UV-shielding property, photocatalytic activity and phototoxicity of ceria colloid solutions // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* — 2010. — V. 101, N 4. — P. 1123–1131.
 39. *Vincent A., Babu S., Heckert E. et al.* Protonated nanoparticle surface governing ligand tethering and cellular targeting // *ACS Nano.* — 2009. — V. 3, N 5. — P. 1203–1211.
 40. *Patil S., Reshetnikov S., Haldar M. K. et al.* Cerium oxide nanoparticles used in glaucoma treatment // *J. Phys. Chem. B.* — 2007. — V. 111. — P. 8437–8442.
 41. *Patil S., Reshetnikov S., Haldar M. K. et al.* Surface-derivatized nanoceria with human carbonic anhydrase II inhibitors and fluorophores: A potential drug delivery device // *J. Phys. Chem. C.* — 2007. — V. 111, N 24. — P. 8437–8442.
 42. *Иванов В. К., Полежаев, О. С., Щербаков А. Б. и др.* Гидротермально-микроволновой синтез стабильных золей нанокристаллического диоксида церия для биомедицинского применения // *Журн. неорг. химии.* — 2010. — Т. 55, № 1. — С. 3–8.
 43. *Leamon C. P., Jackman A. L.* Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease // *Vitam. Horm.* — 2008. — V. 79. — P. 203–233.
 44. *Brunner T. J., Wick P., Manser P. et al.* In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // *Environ. Sci. Technol.* — 2006. — V. 40. — P. 4374–4381.
 45. *Poon H. F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D. A.* Free radicals and brain aging // *Clin. Geriatr. Med.* — 2004. — V. 20. — P. 329–359.
 46. *Darley-Usmar V. M., O'Leary V. J., Wilson M. T., Hogg N.* Hydroxyl radical formation from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide: mechanisms and implications for the pathogenesis of atherosclerosis // *Free Rad. Res. Commun.* — 1992. — V. 16, Spl. 1. — P. A.13.1.
 47. *Beckman J. S., Ischiropoulos H., Zhu L. et al.* Production of peroxynitrite by activated rat alveolar macrophages // *Ibid.* — 1992. — V. 16, Spl. 1. — P. A.13.4.
 48. *Beckman J. S., Beckman T. W., Chen J. et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1990. — V. 87. — P. 1620–1624.
 49. *Evans P., Halliwell B.* Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria // *Ann. NY Acad. Sci.* — 1999. — V. 884. — P. 19–40.
 50. *Harman D.* Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life // *Radiat. Res.* — 1962. — V. 16. — P. 753–763.
 51. *Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // *J. Gerontol.* — 1956. — V. 11, N 3. — P. 298–300.
 52. *Leamon C. P., Jackman A. L.* Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease // *Vitam. Horm.* — 2008. — V. 79. — P. 203–233.
 53. *Tsai Y. Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al.* Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // *Nanomed.* — 2007. — V. 2, N 3. — P. 325–332.
 54. *Singh N., Amateis E., Mahaney J. E. et al.* The antioxidant activity of cerium oxide nanoparticles is size dependant and blocks Ав1-42-induced free radical production and neurotoxicity. // *FASEB J.* — 2008. — V. 22. — P. 624.2.
 55. *Hirst S. M., Karakoti A. S., Tyler R. D. et al.* Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles // *Small.* — 2009. — V. 5, N 24. — P. 2848–2856.
 56. *Das M., Patil S., Bhargava N. et al.* Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons // *Biomaterials.* — 2007. — V. 28, N 10. — P. 1918–1925.
 57. *Ciancio G., Pollack A., Taupier M. A. et al.* Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation // *J. Histochem. Cytochem.* — 1988. — V. 36, N 9. — P. 1147–1152.
 58. *Archibald F. S., Fridovich I.* Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria // *J. Bacteriol.* — 1981. — V. 146, N 3. — P. 928–936.
 59. *Marty-Teyssset C., de la Torre F., Garel J.-R.* Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgari-*

- cus upon aeration: Involvement of an NADH oxidase in oxidative stress // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2000. — V. 66, N 1. — P. 262–267.
60. Жолобак Н. М., Журавська Т. К., Качмарська І. І. та ін. Ефективність застосування наночастинок колоїдного церію та *L. bulgaricus* у мишей // Матеріали конф. «Довкілля та здоров'я», 14–16 квітня 2009 р., Тернопіль. — С. 32.
 61. Жолобак Н. М., Олевинская З. М., Спивак Н. Я. и др. Антивирусное действие наночастиц диоксида церия, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // *Мікробіол. журн.* — 2010. — Т. 72, № 3. — С. 42–47.
 62. Zholobak N. M., Shcherbakov A. B., Ivanov V. K. et al. Antiviral activity of cerium dioxide nanoparticles // VIth International conference «Bioresources and viruses», 14–17 September 2010, Kyiv. — P. 39–40.
 63. Жолобак Н. М., Кривохатская Л. Д., Щербачков А. Б. и др. Влияние нанокристаллического диоксида церия на активность препарата Лаферон-ФармБиотек // Тезисы конф. с междунар. участ. «Нанотехнологии в онкологии», 30 октября 2010 г., Москва. — С. 44–48.
 64. Dixit E., Boulant S., Zhang Y. et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity // *Cell.* — 2009. — V. 141, Iss. 4. — P. 668–681.
 65. Patil S., Sandberg A., Heckert E. et al. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential // *Biomaterials.* — 2007. — V. 28, N 31. — P. 4600–4607.
 66. Chen J., Patil S., Seal S., McGinnis J. F. Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides // *Nature Nanotechnol.* — 2006. — V. 1. — P. 142–150.
 67. Silva G. A. Nanomedicine: Seeing the benefits of ceria // *Ibid.* — 2006. — V. 1, Iss. 2. — P. 92–94.
 68. Chen J., Patil S., Seal S. et al. Nanoceria particles prevent ROI-induced blindness // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2008. — P. 53–59.
 69. *Pat. US 7347987 App. N.: 11/796347 A61K 8/00 (20060101)*. Inhibition of reactive oxygen species and protection of mammalian cells / McGinnis J.F., Chen J., Wong L., Sezate S., Seal S., Patil S. — Filing: 27.04.2007; Public.: 25.03.2008.
 70. *Pat. US WO/2007/002662 PCT/US2006/024963 A61K 33/24 (2006.01)*. Anti-inflammatory, radioprotective and longevity enhancing capabilities of cerium oxide nanoparticles / Rzigalinski B.A., Clark A.M. — Filing: 27.06.2006; Public.: 04.01.2007.
 71. Karakoti A. S., Monteiro-Riviere N. A., Aggarwal R. et al. Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications // *JOM J. Miner. Met. Mater. Soc.* — 2008. — V. 60, N 3. — P. 33–37.
 72. *Pat. US WO/2008/064357, PCT/US2007/085470, C12N 15/06, C12M 1/36, C12M 3/00*. Nanoparticles for protection of cells from oxidative stress / Sigmund W.M., Tsai Yi-Y., Constantinidis I. et al. — Filing: 23.11.2007; Public.: 29.05.2008
 73. Colon J., Hsieh N., Ferguson A. et al. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2 // *Nanomedecine.* — 2010. — V. 6, N 5. — P. 698–705.
 74. Tarnuzzer R. W., Colon J., Patil S., Seal S. Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage // *Nano Lett.* — 2005. — V. 5, N 12. — P. 2573–2577.
 75. Perez J. M., Asati A., Nath S., Kaittanis A. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // *Small.* — 2008. — V. 4. — P. 552–556.
 76. Wondrak G. T. Redox-directed cancer therapeutics: Molecular mechanisms and opportunities // *Antioxid. Redox Signal.* — 2009. — V. 11, N 12. — P. 3015–3055.
 77. *Pat. US 2009/0269410 A61K33/24; A61K9/14; A61P29/00; A61P27/02; A61P9/00; A61P19/02; A61P1/00; A61P17/00*. Inhibition of neovascularization by cerium oxide nanoparticles / McGinnis J.F., Wong L.L., Zhou X. — Filing: 24.04.2009; Public.: 29.10.2009.
 78. *Pat. US 2008/0166412 A1 A61K9/16; A61K35/12; A61K33/24; C12N5/02*. Methods and materials for stimulating proliferation of stem cell / Sugaya K., Seal S. — Filing: 01.02.2008; Public.: 07.10.2008.
 79. Mandoli C., Pagliari F., Pagliari S. et al. Stem cell aligned growth induced by CeO₂ nanoparticles in PLGA Scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine // *Adv. Funct. Mater.* — 2010. — V. 20. — P. 1617–1624.
 80. Cohen A., Karfakis J. A., Kurnick M. D., Rzigalinski B. A. Cerium oxide nanoparticles reduce free radical-mediated toxicity in *Drosophila melanogaster* // *FASEB J.* — 2008. — V. 22. — P. 624.1.
 81. Huang Shu-Feng, Li Zong-Yun, Wang Xiu-Qin et al. Cerium caused life span shortening and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster* // *Ecotoxicol. Environm. Saf.* — 2010. — V. 73, Iss. 1. — P. 89–93.

82. *Rzagalinski B. A., Meehan K., Davis R. M. et al.* Radical nanomedicine // *Nanomedicine*. (Lond). — 2006. — V. 1, N 4. — P. 399–412.
83. *Olgun S., Rzagalinski B. A., Reilly C. M.* Cerium oxide nanoparticles decreases disease severity in lupus mice // *J. Immunol.* — 2006. — V. 24. — P. 162.
84. *Singh N., Cohen C. A., Rzagalinski B. A.* Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine // *Ann. N-Y. Acad. Sci.* — 2007. — V. 1122, N 1. — P. 219–230.
85. *Stineman C. H., Massaro E. J., Lown B. A. et al.* Cerium tissue/organ distribution and alterations in open field and exploratory behavior following acute exposure of the mouse to cerium (citrate) // *J. Environm. Pathol. Toxicol.* — 1978. — V. 2, N 2. — P. 553–570.
86. *Angelo B. D., Santucci S., Benedetti E. et al.* Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal survival in a human Alzheimer disease model by modulating BDNF pathway // *Cur. Nanoscience.* — 2009. — V. 5, N 2. — P. 167–176.

**НАНОМАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ
ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ:
ВЛАСТИВОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ
ЗАСТОСУВАННЯ В БІОЛОГІЇ
ТА МЕДИЦИНІ**

*О. В. Щербак¹
Н. М. Жолобак¹
В. К. Іванов²
Ю. Д. Третьяков³
М. Я. Співак¹*

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

²Інститут загальної і неорганічної хімії
ім. М. С. Курнакова

РАН, Москва, Російська Федерація

³МДУ ім. М. Ю. Ломоносова, Москва,
Російська Федерація

В огляді наведено дані про фізико-хімічні властивості, токсичність та біологічну активність нанокристалічного діоксиду церію. Проаналізовано їх зв'язок із розміром, питомою поверхнею та зарядом частинок. Детально описано способи отримання наночастинок діоксиду церію із заданими властивостями, продемонстрована можливість іммобілізації на їхній поверхні біологічно активних молекул. Викладено сучасні дані літератури та результати власних досліджень авторів, що свідчать про перспективи застосування нанокристалічного діоксиду церію в біології та медицині.

Ключові слова: нанокристалічний діоксид церію, моделювання, синтез, колоїдні системи, золі, окиснювальний стрес, антиоксиданти, нанобіоматеріали, антивірусний ефект, інтерферон, протипухлинна, цито- та радіопротективна дія.

**NANOMATERIALS BASED
ON THE NANOCRYSTALLINE CERIA:
PROPERTIES AND USE
PERSPECTIVES IN BIOLOGY
AND MEDICINE**

*A. B. Shcherbakov¹
N. M. Zholobak¹
V. K. Ivanov²
Yu. D. Tretyakov³
N. Ya. Spivak¹*

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology
of National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

²Kurnakov Institute of General
and Inorganic Chemistry
of Academy of Sciences of Russia, Moscow,
Russian Federation

³Moscow State University M. Lomonosov,
Moscow, Russian Federation

The review presents data on the physico-chemical properties, toxicity and biological activity of nanocrystalline ceria. The relationship between the properties of nanocrystalline ceria and its size, surface area and surface charge are analyzed. Methods of ceria nanoparticles synthesis and modification using biologically active molecules are reviewed. The contemporary literature data and authors' own results show prospects for use of the nanocrystalline cerium dioxide in biology and medicine.

Key words: nanocrystalline ceria, design, synthesis, colloid systems, sols, oxidative stress, antioxidants, nanobiomaterials, antiviral effect, interferon, antitumor, cyto- and radioprotective action.