

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
И НАНОМАТЕРИАЛЫ

УДК 546.655.4–31

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА РАДИКАЛ-ПЕРЕХВАТЫВАЮЩИХ
СВОЙСТВ И СОД-ПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ НАНОЧАСТИЦ
ДИОКСИДА ЦЕРИЯ В БИОХИМИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ

© 2020 г. М. М. Созарукова^{а, *}, М. А. Шестакова^б, М. А. Теплоногова^с,
Д. Ю. Измайлов^с, Е. В. Проскурнина^д, В. К. Иванов^а

^аИнститут общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Ленинский пр-т, 31, Москва, 119991 Россия

^бРоссийский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
ул. Островитянова, 1, Москва, 117997 Россия

^сМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

^дМедико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, ул. Москворечье, 1, Москва, 115522 Россия

*e-mail: S_MadinaM@bk.ru

Поступила в редакцию 13.11.2019 г.

После доработки 21.11.2019 г.

Принята к публикации 27.11.2019 г.

Методом активированной хемилюминесценции в сочетании с математическим моделированием впервые проведена количественная оценка антиоксидантных свойств и исследована супероксиддисмутазаподобная (СОД-подобная) активность цитрат-стабилизированного коллоидного раствора ультрамалых наночастиц (3 нм) CeO_2 в биохимических моделях. Антиоксидантная емкость 1 мкмоль/л золя CeO_2 относительно тролокса – водорастворимого аналога витамина Е – составила 0.049 ± 0.004 мкмоль/л; таким образом, способность CeO_2 выступать в качестве перехватчика свободных радикалов примерно в 20 раз ниже тролокса. Методом математического моделирования оценена антиоксидантная активность. Константы скорости перехвата свободных радикалов равны $2000 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ для тролокса и $k_1 = 300 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 4 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ для диоксида церия. СОД-подобная активность 1 мкмоль/л CeO_2 в единицах активности СОД составила 2.00 ± 0.03 нмоль/л. Следовательно, активность CeO_2 как миметика СОД примерно на 6 порядков ниже активности нативного фермента.

Ключевые слова: наночастицы диоксида церия, нанозимы, супероксиддисмутаза, антиоксиданты, хемилюминесценция

DOI: 10.31857/S0044457X20040200

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие одной из наиболее динамично развивающихся областей науки является наномедицина. Разработка нанотехнологий и нанопрепаратов для профилактики, диагностики и лечения заболеваний привлекает все большее внимание исследователей, о чем свидетельствует резкий рост числа публикаций по данной тематике. Так, начиная с 1999 г., когда был впервые предложен термин “наномедицина” [1], в базе данных Pubmed появилось почти 48 тыс. статей, включающих слова “наномедицина” или “наноматериалы”, при этом одних только обзоров опубликовано более 2000. Вместе с тем число официально зарегистрированных нанопрепаратов на порядок меньше, чем описано в литературе [2], и составляет около 50 [3].

Нанопрепараты для медицинского применения можно классифицировать следующим обра-

зом: 1) инкапсулированные препараты на основе давно и успешно применяющихся липосом, 2) неорганические наночастицы, 3) полимерные наносистемы, 4) лекарственные конъюгаты с антителами или белками, 5) конструкции на основе вирусов и фагов. Исследования структурных и функциональных особенностей наноматериалов расширяют область их биомедицинского применения не только в качестве лекарств, но и как биосовместимых агентов для адресной доставки лекарственных препаратов [4, 5], биосенсоров [6] и составляющих компонентов при изготовлении имплантов в тканевой инженерии [7, 8].

В 2009 г. экспертной группой по наномедицине Европейского медицинского агентства было определено, что 90% предлагаемых исследователями наноматериалов непригодны для дальнейшего биомедицинского использования, что связано с недостаточно полным анализом их без-

опасности — как прямой токсичности, так и воздействия на гомеостаз [9]. В этих вопросах, несмотря на большой объем исследований, остается много белых пятен: плохо изучены механизмы биодegradации, накопления и выведения из организма, краткосрочные и отложенные эффекты, участие в метаболизме на клеточном уровне.

Повреждающее действие свободных радикалов (активных форм кислорода, АФК) по отношению к биомолекулам известно с 50-х гг. прошлого века [10–13]. Окислительная модификация белков, окислительное повреждение ДНК, перекисное окисление липидов — все эти биохимические процессы приводят к повреждению клеток и нарушению их функции, что дало основание Г. Зису в 1985 г. ввести понятие окислительного стресса [14]. В последние годы роль свободных радикалов подверглась существенному пересмотру — они привлекают внимание не только в отношении патологического процесса, но и с точки зрения их участия в нормальной жизнедеятельности клеток. Следовательно, любые потенциальные диагностические или терапевтические фармацевтические препараты должны быть охарактеризованы в отношении их про- или антиоксидантной активности.

Наночастицы диоксида церия обладают комплексом уникальных физико-химических свойств, среди которых особый интерес вызывает ферментоподобная активность [15]. Наночастицы CeO_2 способны выполнять функции супероксиддисмутазы (СОД) [16], каталазы [17], пероксидазы [18], оксидазы [19] и фосфатазы [20]. Одним из важнейших первичных радикалов является супероксид-анион-радикал, постоянно образующийся при дыхании митохондрий и участии ряда ферментов, таких как ксантиноксидаза и НАДФН-оксидаза. Ферментом, метаболизирующим супероксид-анион-радикал, является СОД. СОД-подобная активность была продемонстрирована для диоксида церия одной из первых [16, 21–23]. С учетом низкой токсичности CeO_2 можно надеяться на сравнительную безопасность применения этого препарата *in vivo*.

Антиоксидантную ферментоподобную активность CeO_2 целесообразно исследовать как по отношению к дисмутации супероксидного анион-радикала, так и с точки зрения радикал-перехватывающих свойств наночастиц CeO_2 . Общепринятым подходом к количественному описанию антиоксидантных свойств низкомолекулярного перехватчика радикалов является количественное определение какого-либо параметра относительно единиц концентрации стандартного соединения, отражающего способность веществ обрывать цепи свободнорадикальных реакций. Такой подход использует, например, метод TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Potential*), осно-

ванный на способности перехватывать радикалы, образующиеся при распаде термолабильных азосоединений [24]. Вместе с тем такой подход является неполным и не учитывает индивидуальных физико-химических характеристик антиоксиданта. Разные по химической природе антиоксиданты имеют различный характер хемиллюминесцентных кривых, что делает невозможным применение какого-либо универсального параметра для характеристики количества или активности антиоксидантов различной химической природы. Другой способ описания антиоксидантных свойств основан на определении не только концентрации антиоксиданта, но и константы скорости перехвата радикалов [25, 26].

В настоящей работе для исследования антиоксидантных свойств диоксида церия впервые применен метод активированной хемиллюминесценции (ХЛ) в сочетании с математическим моделированием кинетических кривых. Антиоксидантная емкость препарата в единицах водорастворимого аналога витамина Е, тролокса, была определена модифицированным методом TRAP [27]. Для этого использовали биохимическую модель, в которой контролируемым источником свободных радикалов выступает 2,2'-азо-*bis*(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП). Математическое моделирование кинетики полученных хемиллюминограмм проводили с помощью программы Kinetic Analyzer. В результате определяли константы скорости перехвата радикалов, характеризующие антиоксидантную активность. Супероксиддисмутазную активность оценивали в стандартной биохимической модели генерации супероксидного анион-радикала на основе фермента ксантиноксидазы и субстрата ксантина, используя СОД в качестве стандартного соединения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рентгенофазовый анализ образцов CeO_2 проводили с использованием дифрактометра Bruker D8 Advance (CuK_α -излучение, геометрия θ – 2θ). Для расшифровки рентгенограмм использовали банк данных ICDD PDF2. Средний гидродинамический диаметр наночастиц CeO_2 оценивали методом динамического рассеяния света с применением анализатора Photocor Complex. Анализ образцов методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) был проведен с использованием микроскопа Leo 912 AB Omega при ускоряющем напряжении 100 кВ.

Антиоксидантную емкость препаратов определяли методом активированной ХЛ в системе генерации свободных радикалов 2,2'-азо-*bis*(2-амидинопропан) дигидрохлоридом (АБАП, Sigma-Aldrich, США) в присутствии активатора хемиллюминесценции — люминола (Sigma-Aldrich, США)

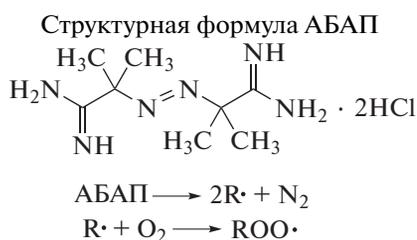


Рис. 1. Термолиз АБАП в присутствии кислорода [28].

согласно методике, описанной нами ранее [27]. В результате термолиза АБАП разлагается мономолекулярно на два симметричных свободных радикала, которые быстро вступают в реакцию с кислородом с образованием алкилпероксильных радикалов (рис. 1) [28].

В качестве стандарта использовали водорастворимый аналог витамина Е – тролокс (Sigma-Aldrich, США). Исходный 100 мМ раствор тролокса готовили в 100 мМ фосфатном буферном растворе (ФБР, pH 7.4), рабочие концентрации получали разбавлением исходного раствора буферным (100 мМ, pH 7.4).

СОД-подобную активность определяли методом активированной ХЛ в системе ксантин/ксантинооксидаза. Фосфатные буферные растворы с концентрацией 100 мМ и pH 7.4 или 8.6 готовили растворением навески KН₂РO₄ (Sigma-Aldrich, США) в 1.00 л дистиллированной воды с последующим доведением до нужного значения pH, контролируя кислотность при помощи pH-метра HANNA pH-211 (США).

Ксантин (3,7-дигидропурин-2,6-дион, Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 1 мМ готовили растворением соответствующей навески в ФБР (pH 8.6). Рабочий раствор ксантинооксидазы (Sigma-Aldrich, США, X4875-10UN) с активностью $a = 0.27$ ед/мл получали разбавлением исходной суспензии ФБР (pH 7.4). Ксантинооксидаза представляет собой комплекс молибден- и железосодержащих нестабильных цитозольных ферментов с широкой субстратной специфичностью, содержащихся в различных органах и тканях. Ксанти-

нооксидаза участвует в метаболизме пуринов (гипоксантина и ксантина) с образованием мочевой кислоты, а также в окислении пиримидинов, жирных кислот, катехоламинов, глутатиона, дегидрировании восстановленных форм никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) [29]. По определению каталитической активности, одна единица фермента превращает 1.0 мкмоль ксантина в мочевую кислоту за 1 мин при 25°C и pH 7.5 (рис. 2).

Селективный ХЛ-зонд на супероксид анион-радикал, люцигенин (10,10'-диметил-9,9'-биакридиния динитрат, Sigma-Aldrich, США), с концентрацией 1 мМ готовили растворением навески в ФБР (pH 7.4).

В ХЛ-кювету помещали необходимое количество ФБР (pH 7.4) до конечного объема 1.000 мл, аликвоту люцигенина ($c = 100$ мкМ), ксантина ($c = 40$ мкМ) и пробы наночастиц СеО₂ в разных конечных концентрациях и перемешивали. Регистрировали фоновое свечение в течение 60–100 с, затем добавляли ксантинооксидазу ($a = 0.027$ ед/мл). В качестве аналитического сигнала использовали площадь под ХЛ-кривой, пропорциональную количеству перехваченных радикалов. ХЛ-измерения проводили при 37°C.

Градуировочную зависимость строили по супероксиддисмутазе (Sigma-Aldrich, США). Исходный раствор активностью 4600 ед/мл получали растворением навески в дистиллированной воде. Растворы с рабочими концентрациями получали разбавлением маточного раствора дистиллированной водой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате синтеза по методике, основанной на термогидролизе водного раствора гексанитратоцерата(IV) аммония [30], был получен электростатически стабилизированный золь нанокристаллического диоксида церия. Концентрация полученного золя СеО₂ составила 23 г/л (по диоксиду церия). По данным рентгенофазового анализа высушенного образца золя, он содержал од-

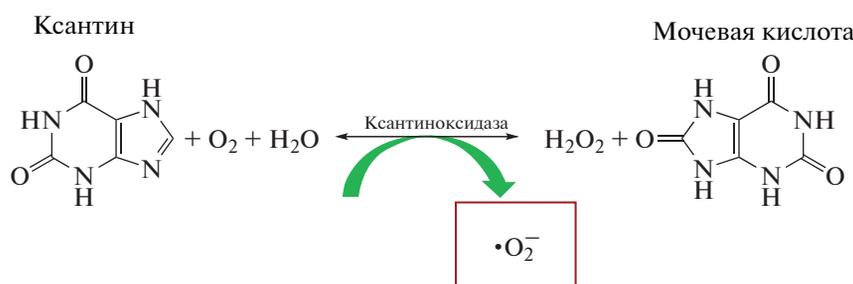


Рис. 2. Схема реакций в ХЛ-системе ксантин + ксантинооксидаза.

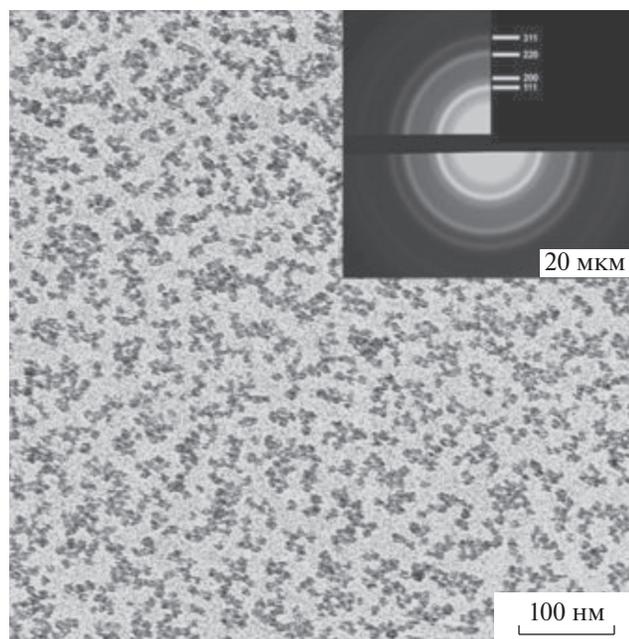


Рис. 3. Электронная микрофотография (ПЭМ) и данные электронной дифракции для наночастиц CeO_2 .

нофазный диоксид церия (PDF2 34-0394). Размер частиц CeO_2 , определенный по соотношению Шеррера, составил 3 нм. Методом динамического рассеяния света была определена величина среднего гидродинамического диаметра наночастиц, равная 10–11 нм. Результаты анализа образца золя CeO_2 методом просвечивающей электронной микроскопии и электронной дифракции подтверждают данные о размере частиц и фазовом составе полученного материала (рис. 3).

Для проведения биохимических экспериментов полученный золь был дополнительно стабилизирован цитратом аммония (молярное соотношение цитрат аммония : $\text{CeO}_2 = 1 : 1$).

Определение антиоксидантной емкости

Градуировочную зависимость строили по тролоксу – стандартному соединению, которое реагирует со свободными радикалами в соотношении 1 : 2 в соответствии с наличием двух гидроксильных групп в структуре. Форма аналитического сигнала и градуировочная зависимость по тролоксу приведены на рис. 4а и 4б соответственно.

Расчет концентрации проводили по площади области подавления свечения после добавления антиоксиданта к системе (заштрихованная площадь на рис. 4а). Полученное уравнение градуировочной прямой имело вид:

$$S = (2.16 \pm 0.04) \times c(\text{тролокс, нмоль/л}) + (3.82 \pm 0.02), \quad r = 0.988 \quad (P = 0.95, \quad n = 5).$$

Влияние тролокса на кинетику ХЛ выражается в полном подавлении свечения в течение фиксированного интервала времени, который определяется как латентный период. Такое действие характерно для сильных антиоксидантов, полностью перехватывающих все свободные радикалы, образующиеся в системе. Завершение латентного периода связано с полным истощением антиоксиданта и характеризуется крутым ростом интенсивности ХЛ и возвращением на прежний стационарный уровень, наблюдаемый в отсутствие антиоксиданта (рис. 4а).

Для диоксида церия получили кривые другого вида, когда после добавления антиоксиданта наблюдалось существенное, но неполное подавление

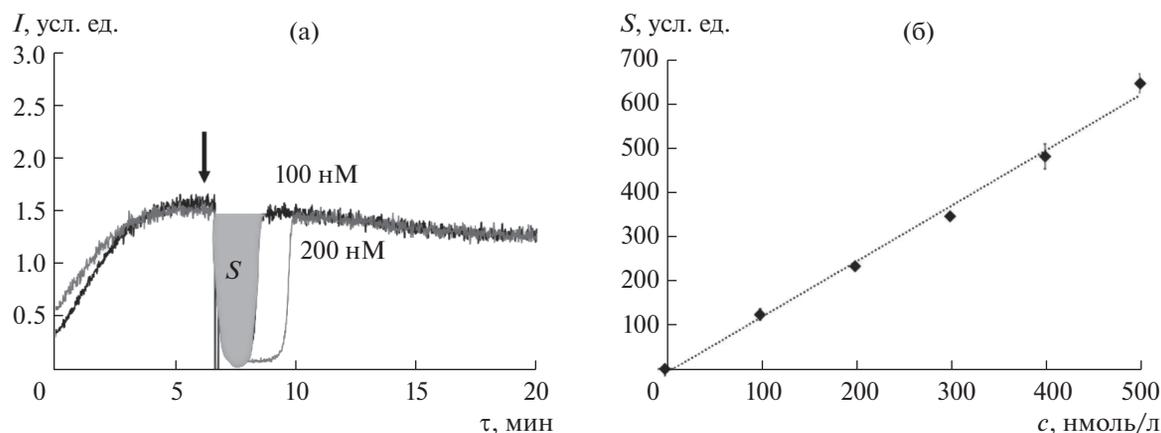


Рис. 4. (а) – Хемилуминограммы тролокса в системе 2.5 мМ АБАП + 2.0 мкМ люминол, стрелкой показан момент добавления тролокса, заштрихована область подавления свечения на ХЛ-кривой, пропорциональная количеству перехваченных радикалов; (б) – градуировочная зависимость площади области подавления свечения (S , усл. ед.) от концентрации тролокса (c , нмоль/л) в системе.

ние интенсивности, что качественно свидетельствует о более слабой антиоксидантной активности диоксида церия по сравнению с тролоксом (рис. 5).

Площадь области подавления свечения (S) линейно зависит от концентрации диоксида церия, уравнение градуировочной прямой имеет вид: $S = (0.27 \pm 0.01) \times c$ (CeO_2 , мкмоль/л) + (69 ± 10) , $r = 0.986$ ($P = 0.95$, $n = 5$). По площади области подавления рассчитана антиоксидантная емкость 1 мкмоль/л диоксида церия в единицах концентрации тролокса, мкмоль/л (число параллельных опытов $n = 9$), равная 0.049 ± 0.004 . Таким образом, способность CeO_2 выступать в качестве перехватчика свободных радикалов примерно в 20 раз ниже тролокса. В нашем исследовании цитрат аммония обладал собственной незначительной антиоксидантной активностью, вклад которой учитывали при расчете антиоксидантной емкости наночастиц CeO_2 .

Применение нанодисперсного CeO_2 в качестве регулятора уровня АФК и акцептора свободных радикалов как *in vitro*, так и *in vivo* подробно рассмотрено в обзорах [18, 31, 32]. Многочисленные исследования были проведены на биохимических, субклеточных, клеточных и животных моделях. В случае исследований в биологических системах (субклеточный, клеточный, организменный уровни) антиоксидантную активность оценивали качественно по наличию или отсутствию соответствующего эффекта. Так, в работе Квона и соавт. [33] сообщается о подавлении гибели нейронов у трансгенных мышей 5xFAD (модель болезни Альцгеймера) модифицированными трифенилфосфином наночастицами CeO_2 , локализующимися в митохондриях. Продемонстрировано применение наночастиц CeO_2 в условиях окислительного стресса и при нарушениях митохондриального метаболизма на первичной культуре фибробластов кожи человека [34]. Показано значительное снижение роста опухоли яичников при воздействии нанодисперсного CeO_2 , модифицированного фолиевой кислотой (модель ксенотрансплантата рака) [35]. В последнем исследовании мышам делали внутрибрюшинные инъекции нативных и модифицированных фолиевой кислотой наночастиц CeO_2 , а также цитотоксического препарата — цисплатина. Наилучший терапевтический эффект был получен в серии опытов с введением модифицированных наночастиц CeO_2 в сочетании с цисплатином. Кроме того, модифицированные наночастицы CeO_2 восстанавливали экспрессию виментина, что указывает на потенциальную способность ограничивать метастазирование опухоли. Вонг и соавт. [36] использовали крыс линии P23H-1 (модель аутосомнодоминантной формы пигментного ретинита) для анализа клеточных механизмов защитного дей-

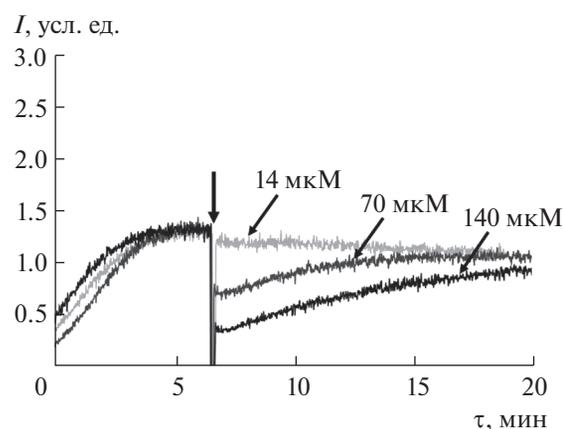


Рис. 5. Хемилюминограммы цитрат-стабилизированного коллоидного раствора CeO_2 в системе 2.5 мМ АБАП + 2.0 мкМ люминол, стрелкой показан момент добавления образца CeO_2 ; I_0 — начальный уровень свечения до добавления образца, I — стационарный уровень свечения после добавления образца.

ствия наночастиц CeO_2 , предотвращающих потерю клетками фоторецепторной функции, и продолжительности их каталитической активности. После инъекции наблюдалось восстановление функции клеток палочек и колбочек, а при систематическом введении нанодисперсного CeO_2 — уменьшение числа апоптотических клеток и замедление процессов перекисного окисления липидов в сетчатке. Это исследование дополняет собой ряд известных моделей заболеваний сетчатки грызунов, демонстрирующих эффективное защитное действие наночастиц CeO_2 против прогрессирования патологического процесса. Известны результаты успешных исследований антиоксидантных свойств наночастиц CeO_2 при лечении ожирения (на примере крыс линии Wistar) [37] и ишемического реперфузионного повреждения гепатоцитов (крысы линии Sprague-Dawley) [38].

В экспериментах на биохимических моделях проводились не только качественные, но и количественные оценки радикал-перехватывающей способности наночастиц CeO_2 . В частности, было изучено влияние диаметра наночастиц CeO_2 и их поверхностной модификации на реакционную способность наночастиц в отношении пероксида водорода (один из видов АФК) на молекулярной и клеточной моделях [39]. Было обнаружено, что наибольшей реакционной способностью обладают частицы CeO_2 диаметром 3.8 нм, модифицированные олеиновой кислотой. Сравнительный анализ антиоксидантной активности методом ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) показал, что радикал-перехватывающая способность наночастиц CeO_2 превышает аналогичную характеристику тролокса в 9 раз. Эти данные свидетельствуют о том, что органические лиганды, ис-

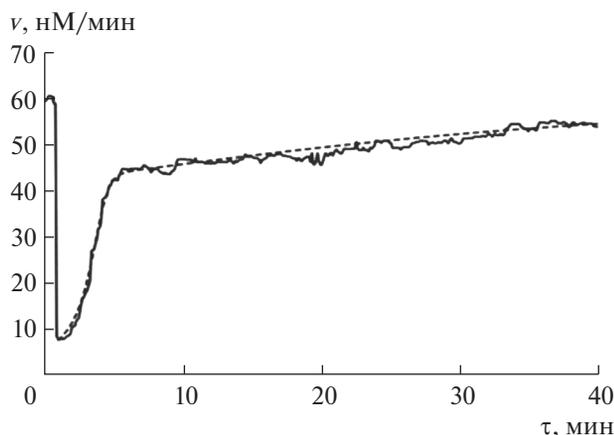


Рис. 6. Экспериментальная (сплошная линия) и расчетная (пунктирная линия) хемилюминограммы для диоксида церия.

пользуемые для стабилизации наночастиц CeO_2 , не препятствуют проявлению последними антиоксидантных свойств. Тиан и соавт. [40] установили взаимосвязь между поверхностными свойствами наночастиц CeO_2 и их способностью нейтрализовывать свободные радикалы на модели окислительного стресса, вызванного доксорубицином, являющимся противоопухолевым препаратом. Было установлено, что пористые наностержни CeO_2 с большой площадью поверхности ($141 \text{ м}^2/\text{г}$) и значительной концентрацией поверхностных ионов Ce^{3+} (32.8%) в 15.5 раз превосходят тролокс по своим антиоксидантным свойствам.

В настоящей работе нам впервые удалось надежно оценить антиоксидантные свойства наночастиц CeO_2 с применением оригинального подхода, заключающегося в использовании модифицированного метода TRAP в сочетании с математическим моделированием. Необходимо отметить, что предшествующие работы, основанные на измерении длительности латентного периода, степени подавления интенсивности свечения или угла наклона начального участка хемилюминесцентной кривой, не позволяют проводить достоверное сравнение активности антиоксидантов различной химической природы, даже если такую активность выражают в единицах активности эталонного антиоксиданта. Используемый нами способ позволяет определить действительную начальную концентрацию антиоксиданта в реакционной смеси, а значение константы скорости реакции взаимодействия антиоксиданта с радикалом является универсальной мерой антиоксидантной активности любого вещества, независимо от химической природы. Константа скорости реакции позволяет удовлетворительным образом предсказать характер влияния антиоксиданта с известной начальной кон-

центрацией на протекание свободнорадикальных процессов, в частности, позволяет рассчитать период защитного действия и степень окисленности компонентов реакционной смеси в зависимости от длительности свободнорадикального процесса и т.п.

Оценка антиоксидантной активности методом математического моделирования

Для оценки антиоксидантной активности диоксида церия был применен метод математического моделирования, включающий построение математической модели системы химических реакций и вычисление констант скоростей этих реакций путем решения прямой задачи и поиска констант, при которых совпадение рассчитанной по предложенной модели кинетической и экспериментальной кривых будет удовлетворительным.

Для упрощения математического моделирования брали временной участок длительностью 40 мин. Экспериментальные кривые, полученные для 100 нМ тролокса и диоксида церия, использованные для математического моделирования, приведены на рис. 4а и 5 соответственно.

Для моделирования стационарного уровня ХЛ (контроль без антиоксидантов) была использована простая математическая модель, состоящая из двух реакций: 1) реакция генерирования свободных радикалов и 2) хемилюминесцентная реакция:

- 1) АБАП + Lum \rightarrow $\text{R}\cdot$ (константа k_R),
- 2) $\text{R}\cdot \rightarrow$ P + свет (константа k_{Lum}),

где $\text{R}\cdot$ – свободный радикал или продукт реакции в электронно-возбужденном состоянии, с которым реагирует антиоксидант.

Для моделирования действия антиоксидантов в систему уравнений добавляли реакцию для одного антиоксиданта. Такая модель удовлетворительно описывала кинетику антиоксидантного действия тролокса, для которого известен механизм перехвата радикалов 1 : 1:

- 3) $\text{R}\cdot + \text{In} \rightarrow$ P (константа k_{In}).

Для диоксида церия эта модель оказалась недостаточной, поэтому учитывали две независимые реакции перехвата радикалов:

- 4) $\text{R}\cdot + \text{In1} \rightarrow$ P (константа k_{In1}),
- 5) $\text{R}\cdot + \text{In2} \rightarrow$ P (константа k_{In2}).

На рис. 6 приведены совмещенные расчетная и экспериментальная кривые для CeO_2 .

Для тролокса оценена константа скорости перехвата свободных радикалов, равная $k_{\text{In}} = 2000 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Для диоксида церия были получены следующие константы скорости: $k_{\text{In1}} = 300 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_{\text{In2}} = 4 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$.

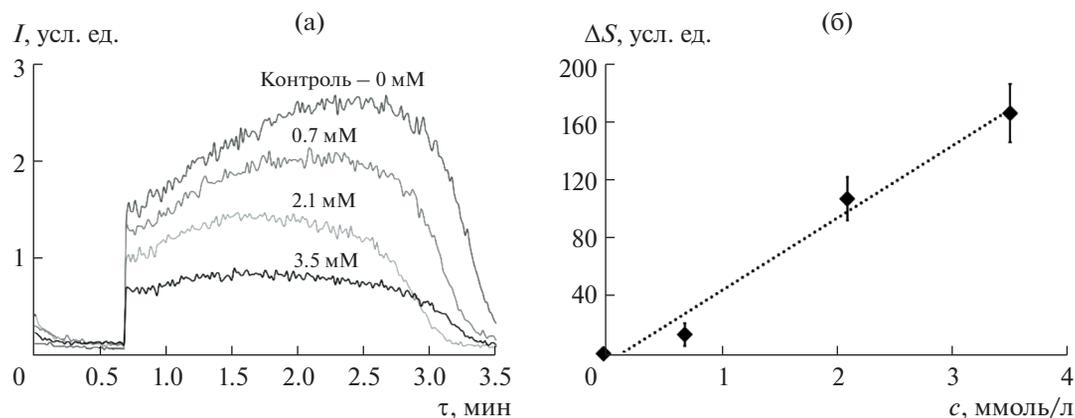


Рис. 7. (а) – Хемилуминограммы коллоидного раствора диоксида церия (концентрации указаны на рисунке) в системе 40 мкМ ксантин + 0.027 ед/мл ксантиноксидаза + 100 мкМ люцигенин; (б) – разность площадей под хемилуминесцентными кривыми, пропорциональная числу перехваченных супероксидных анион-радикалов, как функция концентрации коллоидного раствора диоксида церия.

Определение СОД-подобной активности

СОД-подобную активность определяли в модельной системе, содержащей ксантин (40 мкМ), ксантиноксидазу (0.027 ед/мл) и люцигенин (100 мкМ) в ФБР 100 мМ (рН 7.4). Добавление к системе диоксида церия приводило к снижению стационарного уровня хемилуминесценции, что свидетельствует о его СОД-подобной активности (рис. 7а).

Разности площадей под кривыми для контрольного опыта и эксперимента (с добавлением диоксида церия) линейно зависели от концентрации CeO_2 (рис. 7б):

$$\Delta S = S_0 - S = (52 \pm 9) \times c(\text{CeO}_2, \text{ ммоль/л}) - (4.58 \pm 0.84), \quad r = 0.992.$$

Добавление супероксиддисмутазы к системе генерации супероксидного анион-радикала приводило к подавлению ХЛ, аналогичному действию диоксида церия (рис. 7а). Уравнение аппроксимирующей функции: $\Delta S = (22 \pm 3) \times c(\text{СОД}, \text{ нмоль/л}) + (7.33 \pm 0.84)$, $r = 0.996$ ($P = 0.95$, $n = 5$).

Анализ зависимостей $\Delta S(c)$ позволяет провести сопоставление диоксида церия и супероксиддисмутазы по их антиоксидантной активности по отношению к супероксидному анион-радикалу (табл. 1).

Антиоксидантная активность 1 ммоль/л диоксида церия в единицах активности СОД, нмоль/л ($n = 5$) составила 2.00 ± 0.03 .

Таким образом, экспериментально показана и количественно оценена активность наночастиц стабилизированного золя диоксида церия по отношению к первичному свободному радикалу живых систем – супероксидному анион-радикалу. По сравнению с СОД его активность была примерно на 6 порядков ниже. Сам по себе су-

пероксидный анион-радикал не проявляет сильных деструктивных или модифицирующих свойств по отношению к биомолекулам, однако он может реагировать, например, с NO с образованием чрезвычайно токсичного пероксинитрита. С другой стороны, дисмутация супероксидного анион-радикала приводит к образованию пероксида водорода – соединения, играющего ключевую роль в поддержании редокс-статуса и редокс-зависимых клеточных сигнальных путей. Таким образом, поддержание определенного уровня генерации супероксидного анион-радикала является важным компонентом в обеспечении нормальной жизнедеятельности клетки. При патологии его продукция может резко возрастать. Это случается, например, при реперфузионном повреждении, когда поступление кислорода к тканям после ишемии ведет к реэнергизации электрон-транспортной цепи в митохондриях, ее активации и неконтролируемой продукции большого количества супероксидного анион-радикала, липидному окислительному стрессу и, как следствие, повреждению мембран и апоптозу клеток.

Единственным природным ферментом, катализирующим дисмутацию супероксидного анион-радикала, является супероксиддисмутаза. Многочисленные исследования доказали эффективность использования этого фермента при те-

Таблица 1. Антиоксидантная активность диоксида церия и СОД, приводящая к одинаковому подавлению свечения $\Delta S = 100$ усл. ед.

Антиоксидант	Концентрация или активность
СОД	4.13 ± 0.04 нМ
CeO_2	2.00 ± 0.02 мМ

рапии воспалительных заболеваний респираторного тракта, при повреждении нервной ткани (на модели крыс), при воспалении суставов, инфекционных и токсических поражениях [41]. Сходное действие оказывают миметики СОД — соединения, обладающие СОД-подобной структурой, например, комплексы Cu(II), Zn, Mn(II), Co(II), Co(III) [42]. Как правило, СОД-миметики обладают более низкой (на два—четыре порядка) активностью, чем нативный фермент [43], однако легче проникают в клетку вследствие меньшего размера (что очень важно, поскольку главным источником супероксидного анион-радикала являются клеточные органеллы — митохондрии), а также обладают меньшей иммуногенностью.

СОД-подобная активность нанодисперсного CeO_2 была впервые оценена Корсвиком и соавт. с использованием феррицитохрома С *in vitro* ($\text{O}_2^- + \text{Ce}^{4+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Ce}^{3+}$, $\text{O}_2^- + \text{Ce}^{3+} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{Ce}^{4+}$) [16]. Было установлено, что наночастицы CeO_2 с высоким соотношением $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ демонстрируют более высокую СОД-подобную активность, что было впоследствии подтверждено работой Селардо и соавт. [44]. Были рассчитаны константы скоростей восстановления феррицитохрома С СОД и наночастицами CeO_2 , которые оказались равными 1.1×10^5 и $3.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ соответственно [16]. Результаты этого исследования позволили сделать вывод о большей энзимоподобной активности наночастиц CeO_2 в сравнении с нативным ферментом. Батинич—Хаберле и соавт. [45] подробно исследовали и сопоставили СОД-подобную активность диоксида церия с рядом СОД-миметиков, включая соединения марганца, производные порфирина и металлопорфирины, фуллерены, оксиды металлов и др. СОД-подобная активность наночастиц диоксида церия оказалась практически сопоставима с активностью нативного фермента. Следует отметить, что наноматериалы могут взаимодействовать с биомолекулами, что вызывает модификацию их поверхности и приводит к снижению каталитической активности [46, 47]. Взаимодействие наночастиц CeO_2 с культуральными средами и различными буферными растворами было всесторонне изучено в [47]. Было показано, что взаимодействие наночастиц CeO_2 с фосфатным буферным раствором, обычно используемым для работы с клеточными культурами и животными моделями, приводит к потере СОД-подобной активности и дозозависимому возрастанию каталазоподобной активности. Использование сульфатных и карбонатных буферных растворов не оказывало влияния на ферментоподобную активность наночастиц. С учетом того, что фосфат-ионы в значительном количестве присутствуют в цитоплазме клетки, фосфатный буферный рас-

твор (ФБР) был выбран нами с целью исследования свойств наночастиц CeO_2 в условиях, максимально приближенных к организму. Можно видеть, что использование ФБР действительно приводит к сравнительно невысокой СОД-подобной активности CeO_2 , которая, тем не менее, оказывается сопоставимой с активностью других СОД-миметиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом активированной хемилюминесценции в сочетании с математическим моделированием впервые выполнена количественная оценка антиоксидантных свойств и исследована СОД-подобная активность стабилизированного цитратом аммония коллоидного раствора ультрамалых наночастиц (3 нм) CeO_2 . Антиоксидантная емкость 1 мкмоль/л золя CeO_2 относительно тролокса — водорастворимого аналога витамина Е — составила 0.049 ± 0.004 мкмоль/л. На основании математического моделирования предложен механизм антиоксидантного действия и оценены константы скорости перехвата свободных радикалов, равные $2000 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ для тролокса и $k_1 = 300 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 4 \text{ нМ}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ для наночастиц диоксида церия. Количественно проанализирована СОД-подобная активность CeO_2 : активность 1 ммоль/л коллоидного раствора диоксида эквивалентна активности 2.00 ± 0.03 нмоль/л СОД.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Анализ антиоксидантной активности образцов выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00416). Синтез нанокристаллического золя CeO_2 и исследование его физико-химических свойств были проведены в соответствии с государственным заданием (тема № АААА-А19-119011490135-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber D.O. // Health Forum J. 1999. V. 42. № 4. P. 36.
2. Fornaguera C., Garcia-Celma M.J. // J. Pers. Med. 2017. V. 7. № 4. P. 1. <https://doi.org/10.3390/jpm7040012>
3. British society for nanomedicine. <https://www.britishsocietyofnanomedicine.org/existing-nanomedicines/>
4. De Jong W.H., Borm P.J. // Int. J. Nanomedicine. 2008. V. 3. № 2. P. 133. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>

5. *Naderi S., Morsalir A., Bozorgmehr M.R. et al.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2019. V. 64. № 4. P. 503.
<https://doi.org/10.1134/S0036023619040156>
6. *Neelam, Chhillar A.K., Rana J.S.* // Anal. Biochem. 2019. V. 581. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113345>
7. *Ezhova Zh.A., Zakharov N.A., Koval' E.M. et al.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2018. V. 63. № 8. P. 1001. [Ежова Ж.А., Захарова Н.А., Коваль Е.М. и др. // Журн. неорган. химии. 2018. Т. 63. № 8. С. 961.]
<https://doi.org/10.1134/S0036023618080065>
8. *Priyadarsini S., Mukherjee S., Mishra M.* // J. Oral. Biol. Craniofac. Res. 2018. V. 8. № 1. P. 58.
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2017.12.004>
9. *Owen A.* // Br. J. Pharmacol. 2014. V. 171. № 17. P. 3961.
<https://doi.org/10.1111/bph.12820>
10. *Roubal W.T., Tappel A.L.* // Arch. Biochem. Biophys. 1966. V. 113. № 1. P. 5.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(66\)90150-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(66)90150-0)
11. *Borg D.C., Schaich K.M., Elmore J.J. Jr. et al.* // Photochem. Photobiol. 1978. V. 28. № 4. P. 887.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1978.tb07037>
12. *Dixit R., Mukhtar H., Bickers D.R.* // J. Invest. Dermatol. 1983. V. 81. № 4. P. 369.
<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12519980>
13. *Mittag T.* // Exp. Eye Res. 1984. V. 39. № 6. P. 759.
[https://doi.org/10.1016/0014-4835\(84\)90075-7](https://doi.org/10.1016/0014-4835(84)90075-7)
14. *Sies H., Cadenas E.* // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1985. V. 311. № 1152. P. 617.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1985.0168>
15. *Dhall A., Self W.* // Antioxidants. 2018. V. 7. № 8. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/antiox7080097>
16. *Korsvik C., Patil S., Seal S. et al.* // Chem. Commun. 2007. № 10. P. 1056.
<https://doi.org/10.1039/b615134e>
17. *Pirmohamed T., Dowding J.M., Singh S. et al.* // Chem. Commun. (Camb.). 2010. V. 46. № 16. P. 2736.
<https://doi.org/10.1039/b922024k>
18. *Ivanov V.K., Usatenko A.V., Shcherbakov A.B.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2009. V. 54. № 10. P. 1522. [Иванов В.К., Усатенко А.В., Щербаков А.Б. // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54. № 10. С. 1596.]
<https://doi.org/10.1134/S0036023609100039>
19. *Asati A., Santra S., Kaittanis C. et al.* // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2009. V. 48. № 13. P. 2308.
<https://doi.org/10.1002/anie.200805279>
20. *Dowding J.M., Das S., Kumar A. et al.* // ACS Nano. 2013. V. 7. № 6. P. 4855.
<https://doi.org/10.1021/nn305872d>
21. *Tarnuzzer R.W., Colon J., Patil S. et al.* // Nano Lett. 2005. V. 5. № 12. P. 2573.
<https://doi.org/10.1021/nl052024>
22. *Heckert E.G., Karakoti A.S., Seal S. et al.* // Biomaterials. 2008. V. 29. № 18. P. 2705.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.03.014>
23. *Gil D., Rodriguez J., Ward B. et al.* // Bioengineering (Basel). 2017. V. 4. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering4010018>
24. *Lissi E., Salim-Hanna M., Pascual C. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 1995. P. 18. № 2. P. 153.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00117-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00117-3)
25. *Magin D.V., Izmailov D.Yu., Popov I.N. et al.* // Вопр. Мед. Khim. 2000. V. 46. № 4. P. 419. [Магин Д.В., Измайлов Д.Ю., Попов И.Н. и др. // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46. № 4. С. 419.]
26. *Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Iu.* // Biofizika. 2011. V. 56. № 6. P. 1055. [Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081.]
<https://doi.org/10.1134/S0006350911060200>
27. *Alekseev A.V., Proskurnina E.V., Vladimirov Y.A.* // Moscow Univ. Chem. Bull. 2012. V. 67. № 3. P. 127. [Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2012. Т. 53. № 3. С. 187.]
<https://doi.org/10.3103/S0027131412030029>
28. *Lissi E., Pascual C., Del Castillo M.D.* // Free Radic. Res. Commun. 1992. V. 17. № 5. P. 299.
<https://doi.org/10.3109/10715769209079523>
29. *Goldin L.R., Pfeiffer R.M., Li X. et al.* // Blood. 2004. V. 104. № 6. P. 1850.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0341>
30. *Shcherbakov A.B., Teplonogova M.A., Ivanova O.S. et al.* // Mater. Res. Express. 2007. V. 4. № 5. P. 4.
<https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa6e9a>
31. *Shcherbakov A.B., Ivanov V.K., Zholobak N.M. et al.* // Biophysics. 2011. V. 56. № 6. P. 987. [Щербаков А.Б., Иванов В.К., Жолобак Н.М. и др. // Биофизика. 2011. Т. 56. № 6. С. 995.]
<https://doi.org/10.1134/S0006350911060170>
32. *Das S., Dowding J.M., Klump K.E. et al.* // Nanomedicine (Lond.). 2013. V. 8. № 9. P. 1483.
<https://doi.org/10.2217/nnm.13.133>
33. *Kwon H.J., Cha M.Y., Kim D. et al.* // ACS Nano. 2016. V. 10. № 2. P. 2860.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08045>
34. *Pezzini I., Marino A., Del Turco S. et al.* // Nanomedicine (Lond.). 2017. V. 12. № 4. P. 403.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2016-0342>
35. *Hijaz M., Das S., Mert I. et al.* // BMC Cancer. 2016. V. 16. P. 220. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2206-4>
36. *Wong L.L., Pye Q.N., Chen L. et al.* // PloS One. 2015. V. 10. № 3. P. 1.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121977>
37. *Rocca A., Moscato S., Ronca F. et al.* // Nanomedicine. 2015. V. 11. № 7. P. 1725.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.05.001>
38. *Manne N.D.P.K., Arvapalli R., Graffeo V.A. et al.* // Cell. Physiol. Biochem. 2017. V. 42. № 5. P. 1837.
<https://doi.org/10.1159/000479540>

39. *Lee S.S., Song W., Cho M. et al.* // ACS Nano. 2013. V. 7. № 11. P. 9693.
<https://doi.org/10.1021/nn4026806>
40. *Tian Z., Li X., Ma Y. et al.* // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2017. V. 9. № 28. P. 23342.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b04761>
41. *Пушкина Т.А., Токаев Э.С., Попова Т.С. и др.* // Журн. НМП. 2016. № 4. С. 42.
42. *Batinic-Haberle I., Spasojevic I.* // Antioxid. Redox Signal. 2014. V. 20. № 15. P. 2323.
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.5921>
43. *Zhidkova T.V., Proskurnina E.V., Parfenov E.A. et al.* // Anal. Bioanal. Chem. 2011. V. 401. № 1. P. 381.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5070-8>
44. *Celardo I., De Nicola M., Mandoli C. et al.* // ACS Nano. 2011. V. 5. № 6. P. 4537.
<https://doi.org/10.1021/nn200126a>
45. *Batinic-Haberle I., Reboucas J.S., Spasojevic I.* // Antioxid. Redox Signal. 2010. V. 13. № 6. P. 877.
<https://doi.org/10.1089/ars.2009.2876>
46. *Singh S., Dosani T., Karakoti A.S. et al.* // Biomaterials. 2011. V. 32. № 28. P. 6745.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.073>
47. *Singh R., Singh S.* // Colloids Surf. B Biointerfaces. V. 2015. № 132. P. 78.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.005>