

Щедрый дар Цереры

Доктор химических наук

В.К.Иванов,

кандидат химических наук

А.Б.Щербаков,

кандидат биологических наук

Н.М.Жолобак

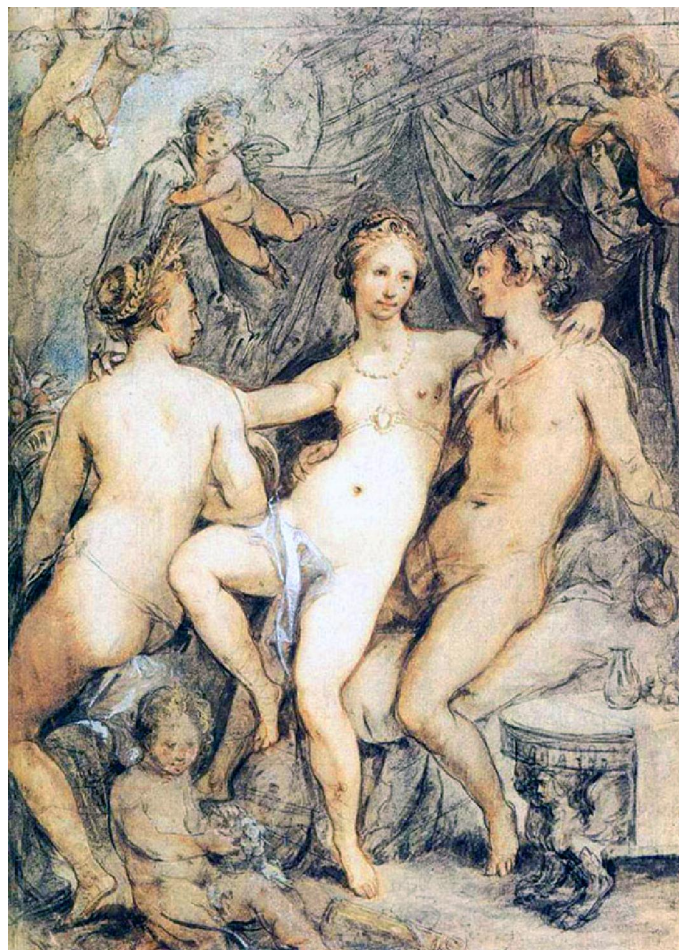
Редкоземельные элементы (РЗЭ) называют «витаминами промышленности» (см. «Химию и жизнь», № 3, 2012) Но они способны выполнять функции витаминов не только в переносном, но и в прямом, биологическом смысле.

Церий — редкоземельный химический элемент семейства лантанидов, названный в честь древнеримской богини Цереры. Он не входит в число биологически значимых элементов, даже «условно необходимых», но между его названием и свойствами есть связь. Церера в пантеоне античных богов была ответственной за урожай и плодородие. А на территориях, богатых соединениями церия, как выяснилось позже, тучнее стада и богаче урожай. Обнаружено, что внесение солей церия в почву, добавление их к кормам значительно повышает урожайность сельскохозяйственных культур и прирост веса животных. Семена растений, предварительно замоченные в растворах солей церия, демонстрируют лучшую всхожесть. В 2003 году в Швейцарии была зарегистрирована кормовая добавка для животных на основе соединений церия (Lanser) — при высокой эффективности этот препарат нетоксичен и не накапливается в органах. На фоне гормонов и антибиотиков, чья репутация может привести к их полному запрету, эти качества особенно привлекательны.

Водорастворимые соли церия (III) в нейтральных и щелочных растворах (а следовательно, и в биологических средах) быстро подвергаются гидролизу с образованием гидроксида церия (III), который, в свою очередь, окисляется кислородом воздуха с образованием гидроксида церия (IV) и переходит в нерастворимый диоксид. Казалось бы, переход в нерастворимое состояние ставит точку на биодоступности элемента. И это действительно было бы так, если бы при этом не образовывались коллоидные системы, состоящие из нанометровых частиц CeO_2 . Именно наночастицы диоксида церия (НДЦ) определили место церия среди биологически активных элементов, благотворно влияющих на живые организмы.

Опять неаккуратность

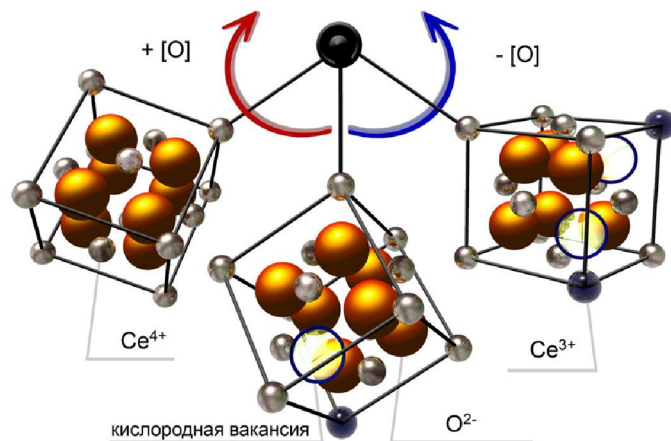
Несколько лет назад в университете Вирджинии (США) профессор Беверли Ржигалински изучала возможность использования наночастиц оксидов металлов в качестве средств доставки биомолекул в ткани живых организмов. На первой стадии исследований в чашки Петри с культурой клеток мозга крысы добавляли коллоидные растворы наночастиц, выдерживали определенное время в инкубаторе и затем регистрировали количество жизнеспособных клеток. Работа была рутинной и не требовала особой квалификации, поэтому значительную ее часть выполняли студенты, не отличающиеся педантизмом. Однажды профессор обнаружила в инкубаторе чашки, которые простояли там несколько месяцев.



*Церера между Венерой и Вакхом
Хендрик Гольциус. 1590 год*

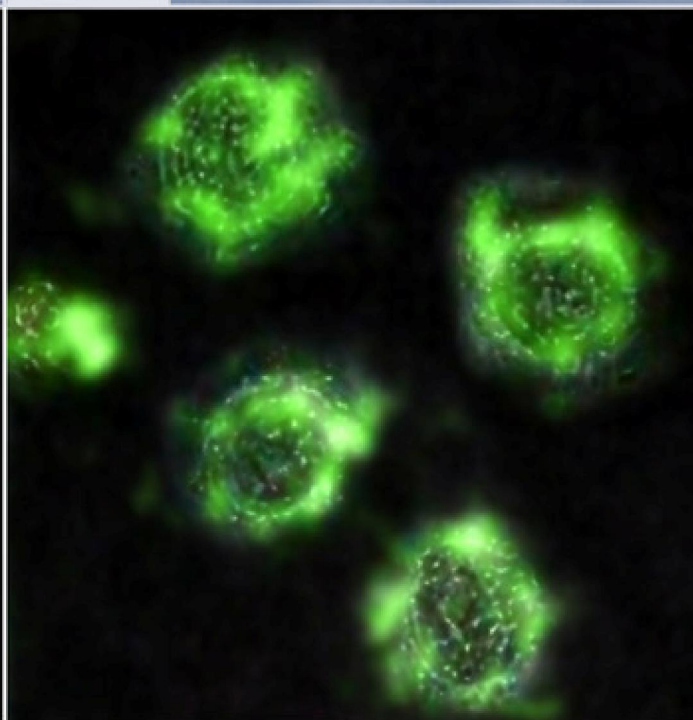
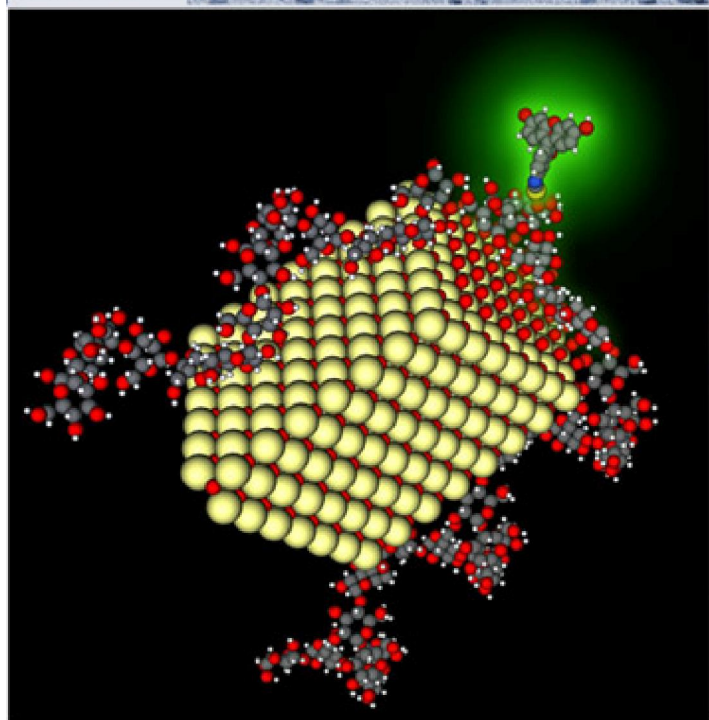
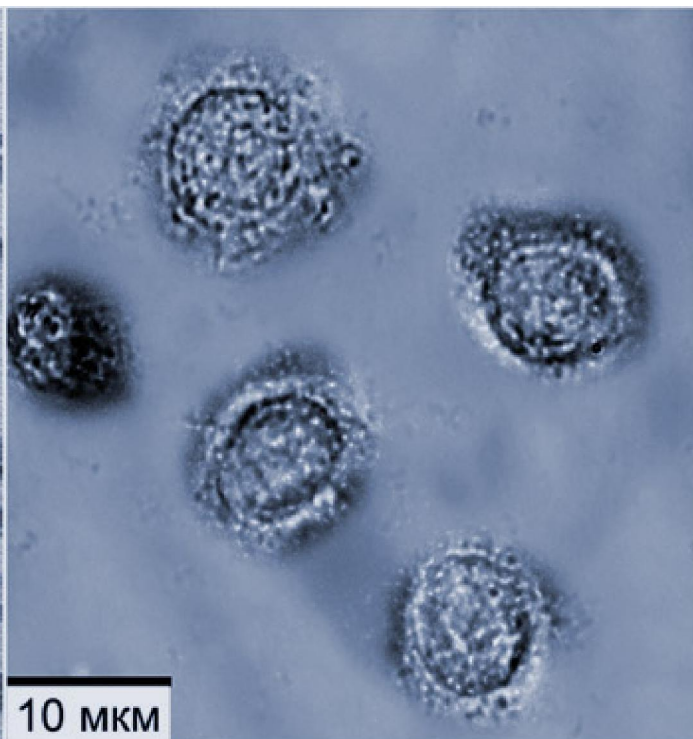
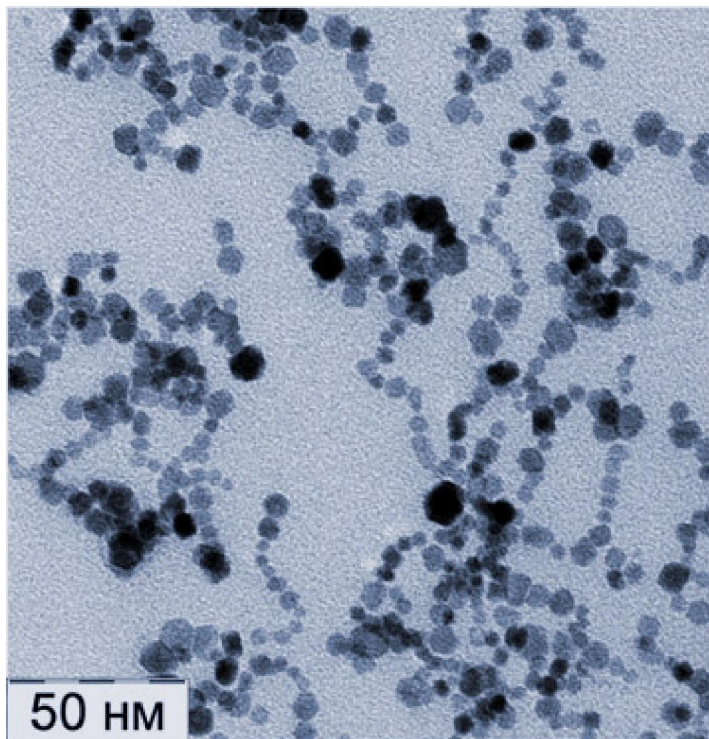
Поскольку средняя продолжительность жизни таких клеток *in vitro* не превышает 26-30 дней, студент был наказан за нецелесообразное использование инкубатора, расход посуды, реактивов и электроэнергии.

Но прежде чем выбросить чашки, профессор заглянула внутрь и обнаружила, что в одной из них клетки выглядели совершенно свежими. Естественно, так долго клетки этой культуры прожить не могли, наверняка что-то перепутали! Но... надо бы разобраться. И выяснилось, что смешанная культура клеток мозга под действием наночастиц диоксида церия (НДЦ) действительно сохраняет жизнеспособность и сигнальные функции в несколько раз дольше контроля.



1

Схема колебательного процесса окисления-восстановления наночастицы диоксида церия (пояснения в тексте)



2

Микрофотография НДЦ, модифицированных ФИТЦ-декстраном (вверху слева). Компьютерная модель частицы SeO_2 размером 2 нм, модифицированной ФИТЦ-декстраном (внизу слева). Культура клеток, обработанных частицами ФИТЦ-декстран-НДЦ при нормальном (вверху справа) и при ультрафиолетовом (внизу справа) освещении.

Студент Дэвид Бейли был реабилитирован и под руководством профессора Ржигалински продолжил исследования биологической активности наночастиц диоксида церия. Они показали, что НДЦ продлевают жизнь не только отдельным клеткам, но и целым организмам. В частности, таким способом удалось добиться увеличения средней и максимальной продолжительности жизни плодовой мушки дрозофилы, при этом «стареющие» мушки сохраняли нормальное поведение,

например, способность ориентироваться в пространстве относительно силы тяжести.

Практически одновременно с Ржигалински изучением необычных свойств НДЦ начинают заниматься в других научных организациях по всему миру. В университете Центральной Флориды (США) золи диоксида церия исследуют группы Судипты Сила и Дж. Мануэля Переца. Оказалось, что биохимическое поведение НДЦ во многом напоминает поведение ферментов — каталазы, пероксидазы и супероксиддисмутазы (СОД), причем способность играть роль этих ферментов проявляется у НДЦ только в определенных условиях. Первый из перечисленных катализирует разложение пероксида водорода на нетоксичные продукты — воду и молекулярный кислород, при этом биологические ткани защищены от разрушения. С другой стороны, пероксидаза катализирует

окисление субстрата с помощью пероксида водорода, и биологические ткани разрушаются. Совокупность этих реакций обеспечивают баланс активных форм кислорода (АФК) и регулирует энергетические процессы в организме. Было обнаружено, что в нейтральных и щелочных системах у НДЦ более выражена каталазоподобная активность, а в кислых — пероксидазная. Например, достаточно небольшого отличия pH у нормальных и раковых клеток, чтобы в присутствии НДЦ первые были защищены от разрушающего действия пероксида водорода, а вторые — нет.

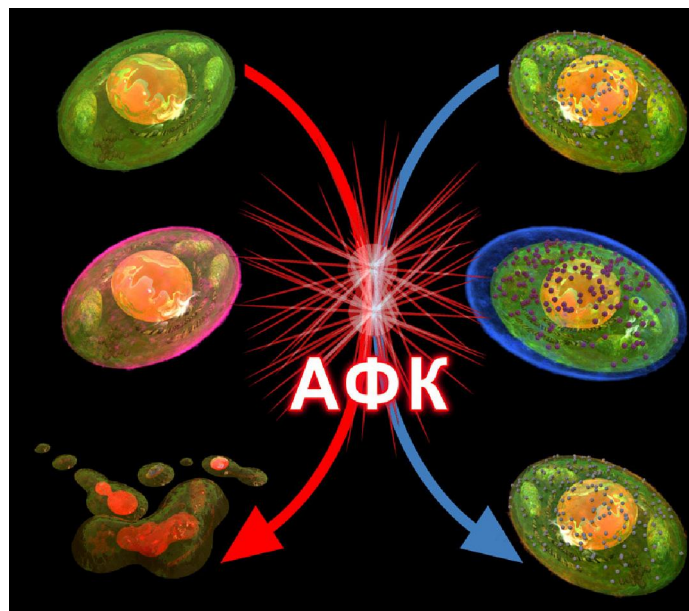
Под влиянием эндогенных и экзогенных факторов в организме образуется супероксидный радикал, который необратимо повреждает белки и трансформируется в высоко-реактивный гидроксильный радикал. Следом запускается целый каскад свободнорадикальных процессов, в том числе перекисное окисление липидов. От действия супероксидных радикалов организм защищает ещё один фермент — СОД. Показано, что, подобно СОД, НДЦ способны инактивировать супероксидный радикал, а также и другие АФК. Благодаря этому НДЦ защищают живые клетки от окислительного стресса, вызванного различными неблагоприятными факторами. Например, НДЦ могут быть перспективными в профилактике и лечении некоторых офтальмологических заболеваний — наночастицы CeO_2 не только защищают сетчатку глаза, но и частично купируют патологические изменения зрения, связанные со старением организма. По совокупности антиоксидантных свойств наночастицы диоксида церия не уступают аскорбиновой кислоте (витамину С) или токоферолу (витамину Е), а по способности ускорять регенерацию — значительно превосходят их.

Особый интерес представляет использование НДЦ в качестве профилактического средства при радиотерапии онкологических заболеваний. Одноразовая предварительная обработка НДЦ нормальных клеток толстой кишки человека обеспечивала защиту эпителия от лучевого повреждения, снижала продукцию АФК и увеличивала экспрессию супероксид дисмутазы-2 (СОД2). Использование НДЦ при культивировании клеток *in vitro* также представляется очень перспективным; в частности, уже запатентован способ стимулирования пролиферации стволовых клеток с помощью НДЦ размером 3–20 нм.

На основании этих свойств диоксида церия уже разрабатываются сенсоры для определения пероксида водорода, лекарственные препараты и перспективные методы терапии рака.

В России и на Украине

В исследованиях, проводимых в ИОНХ им. И.Н.Курнакова (РАН) и в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного (НАН Украины), авторы этой статьи продемонстрировали антиоксидантное действие НДЦ в отношении различных биологически активных соединений — полифенолов, каротиноидов, адреналина. Мы обнаружили, что НДЦ могут инактивировать не только короткоживущие, но и стабильные радикалы. Нанокристаллический диоксид церия защищает клеточные культуры от окислительного стресса при действии пероксида водорода или ультрафиолетового облучения, а значит, на основе CeO_2 можно разрабатывать солнцезащитную косметику нового поколения. Поскольку окислительный стресс развивается не только под действием АФК, но и в качестве реакции клетки на вирусное заражение, мы исследовали влияние НДЦ на противовирусный ответ. Его применение было эффективным как в профилактической, так и в лечебной схеме. Кроме того, НДЦ обладают прямым противовирусным действием: связываются с поверхностью вирусных частиц и мешают им проникнуть в клетку. Аналогичным образом



3
Наночастицы диоксида церия не дают клетке погибнуть от окисления

НДЦ угнетают рост болезнетворных микроорганизмов — золотистого стафилококка, грибов рода *Candida*.

Несмотря на то, что НДЦ препятствуют размножению патогенных микробов, применение их совместно с лактобактериями и другими составляющими нормальной микрофлоры, наоборот, улучшает воздействие последних на иммунную систему человека и животных. Некоторые лактобактерии не содержат СОД: в механизме защиты от супероксид-аниона данные организмы используют неорганические соединения (например, ионы марганца) — при этом сами по себе способны продуцировать большое количество пероксида водорода. Использование НДЦ существенно повышает пробиотические свойства таких лактобактерий, а у животных, получающих с пищей композиции на основе НДЦ и пробиотиков, активируются все исследованные звенья системы синтеза интерферона. Эти результаты открывают перспективы создания и применения церийсодержащих нанокомпозиций, способных активировать системы клеточной и гуморальной иммунной защиты.

Церера у древних символизировала не только урожай и плодородие, но и материнство. И вот удивительная параллель: мы показали, что у самок лабораторных мышей, получающих с пищей наночастицы диоксида церия, в яичниках образуется дополнительное количество фолликулов, повышается жизнеспособность ооцитов. Особенно ярко эти эффекты проявляются у молодых животных, чья способность к воспроизводству снижена. Иными словами, НДЦ повышают вероятность зачатия и материнства.

Художники Средневековья часто изображали Цереру рядом с Ваком — богом виноделия и разгула. Святилища Ваха были под защитой храма Цереры, и в этом проявляется еще одна параллель с современностью. НДЦ имеют гепатопротекторный эффект, то есть защищают печень при поражениях, вызванных всевозможными токсинами (в том числе алкоголем и его производными). Гепатоциты сохраняют не только свою морфологию, но и ферментативную активность. Также продемонстрирован защитный механизм НДЦ против компонентов сигаретного дыма. В частности, предварительная обработка клеток сердечной мышцы (кардиомиоцитов) крыс раствором НДЦ значительно уменьшала окислительный стресс, вызываемый экстрактом табачного дыма, активировала транскрипционный фактор NF-, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла.

Почему? А вот почему

Причина такого необычного поведения НДЦ кроется в уникальных свойствах элемента церия. Это единственный лантанид, у которого имеются две устойчивые степени окисления, при этом более стабилен именно оксид четырехвалентного церия — CeO_2 . В то же время в поверхностном слое НДЦ присутствуют кислородные вакансии, причем с уменьшением размера частиц возрастает их концентрация, увеличиваются расстояние Ce-O и подвижность кислорода в кристаллической решетке CeO_2 . Вследствие этого наночастицы диоксида церия легко вступают в окислительно-восстановительные реакции, причем при уменьшении размеров частиц возрастает их способность выступать в роли антиоксиданта.

В 1951 году Б.П.Белоусов, пытаясь найти неорганический аналог цикла Кребса, открыл явление автоколебательной химической реакции, катализатором которой выступали ионы церия Ce^{+3} . Развитие нанотехнологий и исследования физико-химических свойств НДЦ позволяют рассматривать их как объект для моделирования циклических окислительно-восстановительных процессов, как их активный регуляторный компонент. Согласно существующим сегодня представлениям, способность НДЦ возвращаться в равновесное исходное состояние напоминает поведение маятника.

Схематически процесс представлен на рис. 1. Равновесное состояние наночастицы диоксида церия (посередине) предполагает наличие в кристаллической решетке определенного количества кислородных вакансий; окисление частиц приводит к стехиометрическому диоксиду церия (по стрелке влево), восстановление — еще более увеличивает кислородную нестехиометрию (по стрелке вправо). А способность отдавать или принимать кислород зависит прежде всего от размеров частиц.

Как уже говорилось, наночастицы диоксида церия образуются при гидролизе солей Ce(III) или Ce(IV) . Проблема в том, что при этом получаются сильноагрегированные полидисперсные частицы, нестабильные в растворе, у них низкая биодоступность и непредсказуемая биологическая активность. Для практического применения нужны стабильные во времени водные коллоидные растворы, содержащие неагрегированные монодисперсные частицы, которые имеют размер меньше некоторого критического. С уменьшением размера частиц их биологическая активность возрастает, а вот токсичность, наоборот, снижается.

А теперь — технология!

Стабилизатор, который используется для регулирования размера НДЦ и повышения агрегативной устойчивости золей, сам по себе также должен быть нетоксичным и биологически совместимым. Поэтому создание композиций на основе НДЦ для медико-биологических применений — непростая задача. В наших исследованиях в качестве стабилизатора и матрицы при синтезе НДЦ отлично себя зарекомендовали, например, полигидроксильные соединения (полимеры глюкозы) и многоосновные карбоновые кислоты (лимонная, полиакриловая). Изменяя соотношение концентраций солей церия и стабилизатора, а также условия проведения синтеза, можно менять размер частиц диоксида церия, их морфологию и заряд поверхности. Например, при высокотемпературной обработке золей НДЦ в автоклаве за счет рекристаллизации («Оствальдовского созревания») и ориентированного срачивания частиц их размер увеличивается, и таким способом можно создавать препараты с заданными химико-биологическими характеристиками. Более того, современное оборудование позволяет создавать золи НДЦ, вовсе не содержащие стабилизаторов, — например, в условиях гидротермально-микроволнового синтеза при высоких



ВЕЩИ И ВЕЩЕСТВА

давлениях и температурах мы синтезировали устойчивые золи НДЦ с узким распределением частиц по размерам. К этим не содержащим стабилизатора наночастицам могут быть легко прикреплены другие биологически активные или люминесцентные молекулы. Так, антитела или фолиевая кислота обеспечат адресную доставку НДЦ в требуемые места организма (например, в зону опухолей), а люминесцентные метки позволят визуально определить локализацию частиц в организме.

Например, к молекуле декстрана можно «пришить» флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ), который ярко светится в ультрафиолете. Такое молекулярное соединение стабилизирует НДЦ и позволяет увидеть частицы в клетке (рис. 2). Чтобы молекула ФИТЦ-декстрана не «отвалилась» от частицы во время путешествия по биологическим тканям, ее дополнительно фиксируют глутаровым альдегидом.

Низкая токсичность, высокая биологическая активность и способность к регенерации — вот три составляющие, обеспечивающие перспективу использования НДЦ в биологических системах для регулирования всевозможных дисфункций, которые вызваны действием неблагоприятных внутренних и внешних факторов. Действие защитного механизма представлено на рис. 3. При избытке АФК незащищенная клетка необратимо повреждается и разрушается — например, по механизму окислительного стресса (апоптоза, вызванного окислительным стрессом). В присутствии НДЦ инактивируются АФК, при этом клетка защищена от разрушения.

Итак, наночастицы диоксида церия эффективны везде, где образуются активные формы кислорода и возникает окислительный стресс, являя собой принципиально новый инструмент для воздействия на окислительные процессы в живых организмах. Физико-химические свойства НДЦ позволяют тонко модулировать протекание внутриклеточных реакций, тем самым обеспечивая целый спектр защитных эффектов. Какие еще сюрпризы преподнесет нам щедрый дар Цереры?

Что еще можно прочитать о наночастицах диоксида церия

В.К.Иванов, А.Б.Щербаков, А.В.Усатенко. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия. «Успехи химии», 2009, т. 78, № 9, 924-941.

А.Б.Щербаков, В.К.Иванов, Н.М.Жолобак, О.С.Иванова, Е.Ю.Крысанов, А.Е.Баранчиков, Н.Я.Спивак, Ю.Д.Третьяков. Нанокристаллический диоксид церия — перспективный материал для биомедицинского применения. «Биофизика», 2011, т. 56, № 6, 995-1015.