МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Н.С. КУРНАКОВА РАН
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ
им. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАН УКРАИНЫ

**А.Б. Щербаков, О.С. Иванова, Н.Я. Спивак,
В.В. Козик, В.К. Иванов**

СИНТЕЗ И БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2016

УДК 546.655.4-31
ББК 24.123
Щ611

Щербаков А.Б., Иванова О.С., Спивак Н.Я., Козик В.В., Иванов В.К. Синтез и биомедицинские применения
Щ611 нанодисперсного диоксида церия. – Томск : Издательский Дом Томского государственного университета, 2016. – 474 с.

ISBN 978-5-94621-508-4

Монография посвящена обобщению результатов исследований в области направленного синтеза, физико-химических свойств и биологической активности нанодисперсного диоксида церия. Систематизированы результаты работ, выполненных с участием авторов монографии, а также критически проанализированы литературные данные, в первую очередь зарубежные. Рассмотрены вопросы формирования и роста наночастиц нанодисперсного диоксида церия, приведены сведения о физико-химических характеристиках, а также токсичности, механизме действия на живые системы и защите живых систем от окислительного стресса и электромагнитного излучения. Основное внимание сфокусировано на результатах биомедицинского применения нанодисперсного диоксида церия, полученных за последние 5–10 лет. Показаны перспективы использования нанодисперсного диоксида церия при терапии всевозможных заболеваний, в том числе онкологических и возрастных, влияние на продолжительность и качество жизни, антибактериальной и антивирусной активности и др.

Для ученых, работающих в области неорганического материаловедения, медицины, биологии и нанобиотехнологии, а также аспирантов и студентов старших курсов.

Монография подготовлена в рамках программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета.

УДК 546.655.4-31
ББК 24.123

Рецензенты:
В.М. Бузник, академик РАН; *А.И. Николаев,* член-кор. РАН

ISBN 978-5-94621-508-4
© Томский государственный университет, 2016
© Щербаков А.Б., Иванова О.С., Спивак Н.Я., Козик В.В. Иванов В.К., 2016

ПРЕДИСЛОВИЕ

Научно-технический прогресс и благосостояние общества определяются его технологическим укладом; основу современного (шестого) технологического уклада составляют нанотехнологии и наноматериалы, разработкой и использованием которых занимаются все страны, претендующие на позиции мировых лидеров. В перечень десятка приоритетных наноматериалов, наряду с фуллеренами и углеродными нанотрубками, эксперты межведомственной программы по корректному управлению химическими препаратами (IOMC) и организации экономической кооперации и развития (OECD) включили нанодисперсный диоксид церия.

Нанодисперсный диоксид церия является перспективным материалом, находящим широкое применение в современных высокотехнологичных отраслях промышленности. В частности, диоксид церия используется в качестве основного компонента полирующих смесей и абразивов, в том числе для химико-механической планаризации кремниевых пластин в микро- и наноэлектронике, в составе защитных покрытий, поглощающих УФ-излучение, антиотражающих покрытий солнечных батарей, в сенсорных устройствах, позволяющих определять малые количества примесей в газовых смесях, защитных антикоррозионных покрытиях металлов и сплавов и др. Диоксид церия, а также твердые растворы и композиты на его основе входят в состав повсеместно используемых автомобильных трехмаршрутных катализаторов, предназначенных для эффективного дожига выхлопных газов автомобилей, применяются в реакциях паровой конверсии угарного газа, парциального и глубокого окисления органических соединений и т.д.

В последние годы у нанодисперсного диоксида церия обнаружены уникальные биохимические свойства, благодаря которым данный материал способен выполнять функции некоторых энзимов – окисдоредуктаз, фосфатаз и пр.; такие неорганические наноматериалы получили название «нанозимы» и активно исследуются с целью медико-биологического применения, в том числе при проведении иммуноферментных диагностических анализов. Низкая токсичность нанодисперсного диоксида церия обеспечивает сравнительную безопасность его

применения *in vivo*, что позволяет рассматривать данный материал как потенциальный лекарственный препарат для терапии ряда заболеваний – прежде всего онкологических и заболеваний, связанных с окислительным стрессом, в том числе возрастных патологий.

По данным Web of Knowledge, количество ежегодно публикуемых экспериментальных работ, посвященных нанодисперсному диоксиду церия, за последние 20 лет увеличилось более чем в 100 раз, что свидетельствует о возрастающем интересе исследователей к этому материалу. Вместе с тем многие свойства, присущие нанокристаллическому диоксиду церия, до сих пор остаются практически не исследованными. Можно констатировать, что дальнейшая разработка наноматериалов на основе CeO_2 и улучшение их функциональных характеристик являются междисциплинарной задачей, требующей участия специалистов в области химии, физики, материаловедения, биологии, медицины.

Особое внимание в данной монографии уделено анализу возможности использования диоксида церия в качестве биологически активного соединения – в соответствующем разделе монографии рассмотрены экспериментальные сведения о его токсичности, механизме действия на живые системы, защите живых систем от окислительного стресса, влиянии на продолжительность и качество жизни, антивирусной активности и др. Монография стала результатом сотрудничества исследователей, работающих в Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова Российской академии наук, Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной академии наук Украины и Томском государственном университете. Изложение материала базируется как на собственных экспериментальных данных авторов, так и на анализе публикаций ключевых научных коллективов, занимающихся исследованиями нанодисперсного диоксида церия.

Авторы выражают глубокую благодарность Н.М. Жолобак за неоценимый вклад в обсуждение совместно полученных и литературных данных.

В.К. Иванов благодарит за финансовую поддержку Российский научный фонд (проект 14-13-01373, «Гибридные структуры на основе бислойных липидных мембран, тетрапиррольных соединений и наночастиц диоксида церия»).

1. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

К настоящему времени создано значительное число методов получения диоксида церия в микро- и наноразмерном состоянии, включая методы синтеза из твердой, жидкой и газовой фаз. Традиционно для синтеза CeO_2 используют твердофазные реакции, в том числе реакции термолиза солей церия при высоких температурах [1] (см., например, табл. 1.1) и механохимического синтеза, в том числе при комнатной температуре (см., например, [2, 3]). К газофазным методам относятся испарение металлического церия в вакууме с последующей конденсацией металла в холодной зоне и окислением его до CeO_2 [4] и газофазный термолиз легколетучих органических соединений церия (химическое осаждение из газовой фазы) [5].

Таблица 1.1

Термическое разложение кислородсодержащих солей церия(III)

Соединение	Дегидратация (эндоэффекты)		Распад промежуточного аддукта		Распад до CeO_2	Литература
	до nH_2O	Т-ра, °С	состав	Т-ра, °С	Т-ра, °С	
$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$	2	200	$mCe_2O_3 \cdot nN_2O_5 \cdot pH_2O$	220	350–450 (эндо-)	[9–11]
$Ce_2(C_2O_4)_3 \cdot 10H_2O$	0.5	170–200			290–360 (экзо-)	[12]
$Ce_2(CO_3)_3 \cdot 8H_2O$ (в токе CO_2)	0	~155	$Ce_2O_4 \cdot 0.5CO_2$	480	480–800	[2]
$CePO_4 \cdot xH_2O$	0	500			> 800 (от 150)	[13, 14]
$Ce_2(SO_4)_3 \cdot 8H_2O$	0	600–650			> 800	[15, 16]
$Ce(ClO_4)_3 \cdot 9H_2O$	0	165–170			260–460 (экзо-)	[17]

Наибольшее распространение получили жидкофазные методы синтеза диоксида церия в водных и неводных средах, в первую очередь непосредственное осаждение гидратированного диоксида церия

из растворов солей церия(III) и (IV) при добавлении растворов сильных оснований (см., например, [6]), синтез в микроэмульсиях и обратных мицеллах, образуемых ПАВ (например, диоктилсульфосукцинатом натрия [7] или олеиламином [8]). К этой же группе относят методы синтеза из расплавов. Очевидными преимуществами растворных методов получения нанодисперсного диоксида церия являются экономичность и отсутствие необходимости использования специализированного дорогостоящего оборудования.

Размеры получаемых наночастиц CeO_2 обычно составляют от 1–2 до 50 нм. Особый практический интерес представляют методы, позволяющие синтезировать диоксид церия с размером частиц менее 5–10 нм, поскольку именно при такой дисперсности начинают проявляться характерные для диоксида церия размерные эффекты. Ниже более подробно рассмотрены основные методики жидкофазного синтеза нанокристаллического диоксида церия, а также твердых растворов и композитов на его основе с контролируемыми размерами и формой частиц.

1.1. Получение нанокристаллического диоксида церия методом быстрого осаждения

К числу наиболее распространенных методов получения ультра- и нанодисперсных порошков диоксида церия в первую очередь относятся методы, основанные на осаждении данного соединения в гидратированной форме из растворов солей церия(III) или (IV) при добавлении сильных оснований (гидроксидов щелочных элементов (ЩЭ) и щелочно-земельных элементов (ЩЗЭ), а также гидроксидов аммония или тетраалкиламмония). Поскольку соли церия(IV) либо малорастворимы, либо склонны к гидролизу уже при низких значениях pH, то, как правило, для синтеза наночастиц диоксида церия из водных растворов используют соли трехвалентного церия. В связи с тем что произведения растворимости гидроксида церия(III) и диоксида церия крайне малы, осаждение протекает в существенно неравновесных условиях.

Исследование процесса формирования диоксида церия при его обратном осаждении из водных и водно-спиртовых растворов нитрата церия(III) было проведено нами в работе [18]. С применением сочетания методов УФ-видимой спектроскопии и калориметрии теплового

потока (калориметрии Кальве) были получены данные о динамике образования диоксида церия в указанных системах. Согласно калориметрическим данным (рис. 1.1), процесс формирования диоксида церия сопровождается значительным экзотермическим эффектом, величина которого (–73,2 кДж/моль CeO_2) практически не зависит от температуры проведения реакции, что свидетельствует о неизменности механизма реакции в исследованном температурном интервале.

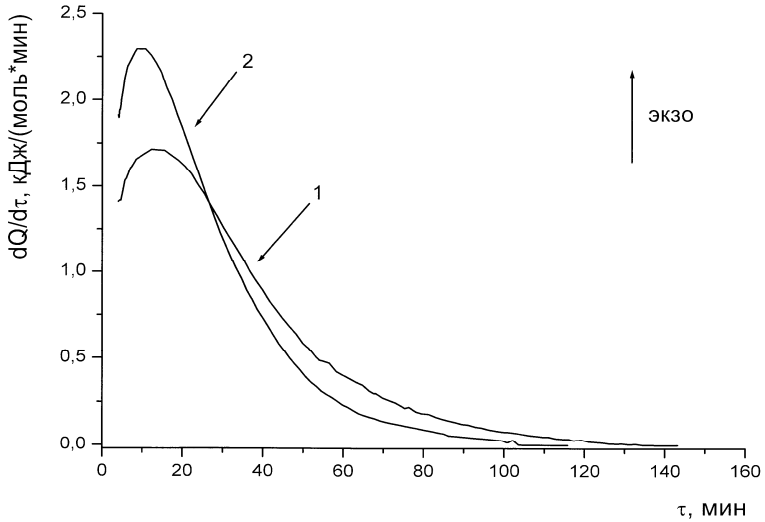


Рис. 1.1. Кривые скорости тепловыделения, полученные в изотермическом режиме при осаждении CeO_2 из 0,08 М водно-изопропанольного (1:3) раствора нитрата церия(III) (*1* – 25°С; *2* – 30°С) [18]

Характер кривых тепловыделения свидетельствует о том, что формирование диоксида церия протекает с самоускорением; таким образом, динамика этого процесса в целом аналогична наблюдаемой при синтезе некоторых оксидов металлов (в том числе оксида цинка, диоксидов циркония и гафния) в гидротермальных и догидротермальных условиях [19–23]. Тот факт, что процесс формирования диоксида церия протекает по механизму автокатализа, т.е. разложение гидроксокомплексов происходит преимущественно на поверхности уже сформировавшихся частиц CeO_2, свидетельствует о том, что размеры

частиц при увеличении продолжительности синтеза будут постепенно увеличиваться. Это предположение подтверждается результатами измерений ширин запрещенной зоны (ШЗЗ) нанокристаллического диоксида церия непосредственно в ходе эксперимента [24].

По данным УФ-видимой спектроскопии, полоса поглощения, характерная для спектров CeO_2 (~400 нм), появляется в спектрах поглощения образовавшихся суспензий непосредственно после смешения исходных реагентов, при этом по мере выдерживания суспензии в маточном растворе наблюдается смещение положения края полосы поглощения. Таким образом, окисление образующегося гидроксида церия(III) до церия(IV) происходит практически мгновенно. В связи с этим можно предположить, что при выдерживании суспензий в маточном растворе происходят постепенная дегидратация остаточных гидроксосоединений Ce(IV) и кристаллизация CeO_2.

По данным рентгенофазового анализа, образцы, получаемые методом быстрого осаждения из водных, водно-этанольных и водно-изопропанольных растворов солей церия(III) и (IV), представляют собой однофазный диоксид церия со структурой флюорита.

Было установлено, что размеры кристаллитов (в соответствии с данными рентгено-фазового анализа (РФА) и ПЭМ) в образцах, синтезируемых из растворов, имеющих одинаковую концентрацию по церию, но характеризующихся различным содержанием спиртов (этанола или изопропанола), совпадают. Варьирование содержания спиртов в реакционных смесях позволяет в значительной степени менять характер агрегации наночастиц диоксида церия, что отражается в существенном изменении удельных поверхностей (в диапазоне 110–220 $м^2/г$) и фрактальных размерностей поверхности (в диапазоне 2,50–2,68) нанопорошков диоксида церия [25].

В результате сравнительных исследований нами было впервые показано, что размеры частиц в нанодисперсных порошках CeO_2, формирующихся при осаждении водным раствором аммиака из растворов солей церия(III) ($CeCl_3 \cdot 7H_2O$, $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$), значительно превышают размеры частиц, осаждаемых из растворов солей церия(IV) ($Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$, $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$) аналогичной концентрации, что, вероятно, обусловлено наличием в первом случае промежуточной стадии образования гидроксида церия(III), имеющего более высокую растворимость в воде и способного рекристаллизоваться из водно-

спиртовых растворов, который затем топотактически трансформируется в диоксид церия.

Ключевым фактором, определяющим размеры наночастиц диоксида церия, синтезируемых методом быстрого осаждения, является концентрация исходных растворов солей церия(III) и церия(IV). В частности, согласно данным, приведенным на рис. 1.2, 1.3, при синтезе диоксида церия из водно-спиртовых растворов нитрата церия(III) уменьшение концентрации последнего от 0,8 до 0,02 М приводит к более чем четырехкратному уменьшению размеров частиц (от 12 до 3 нм).

Следует отметить, что диапазон изменения размеров частиц для нанопорошков, осажденных из солей церия(III) различной концентрации, оказывается существенно более широким по сравнению с нанопорошками, синтезированными из солей церия(IV).

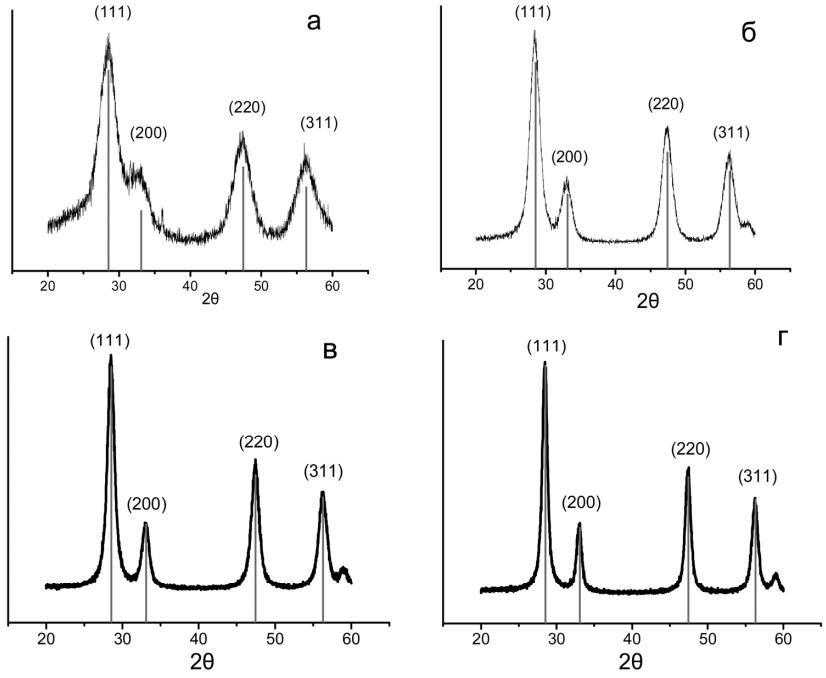
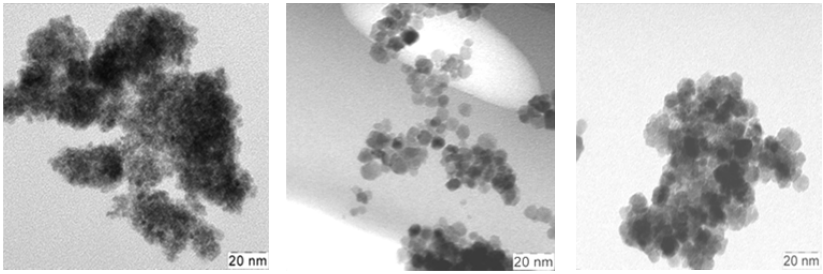


Рис. 1.2. Рентгенограммы образцов, полученных при добавлении раствора $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ в водно-изопропанольной смеси (1:1) к 3 М раствору NH_4OH. Концентрация $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ составляет: *а* – 0,02 М; *б* – 0,08 М; *в* – 0,3 М; *г* – 0,8 М [24]



а *б* *в*

Рис. 1.3. Нанопорошки диоксида церия, полученные осаждением 3 М раствором аммиака из растворов $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ в смеси изопропанол:вода (19:1). Концентрация нитрата церия(III) составляет: *а* – 0,08 М; *б* – 0,3 М; *в* – 0,8 М [24]

Аналогичная тенденция изменения размеров частиц наблюдается и при осаждении CeO_2 из водного раствора $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ [26]. Общий диапазон изменения размера частиц в этом случае достаточно невелик (2,5–3,3 нм), в связи с чем можно констатировать, что значимое изменение микроморфологии CeO_2 происходит только при увеличении концентрации $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ до 0,3–0,8 М. Удельная поверхность нанопорошков CeO_2, полученных из растворов $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ различной концентрации, составляет от 120 до 150 $м^2/г$. По мере повышения температуры реакционных смесей происходит формирование более крупных частиц CeO_2 (рис. 1.4).

По данным термического анализа, при нагревании на воздухе образцов CeO_2, полученных методом быстрого осаждения из водных и водно-спиртовых растворов солей церия(III) с различным соотношением компонентов, кривые потери массы практически совпадают, при этом потеря массы возрастает с уменьшением концентрации исходных растворов и, соответственно, уменьшением размеров частиц диоксида церия в нанопорошках и удельной поверхности последних. Суммарная потеря массы составляет до 15%. По данным термического анализа, совмещенного с масс-спектрометрией отходящих газов, в диапазоне 200–400 °С в масс-спектрах газообразных продуктов термолиза фиксируются ионы с массовыми числами 30 и 46, соответствующие ионизированным молекулам NO и NO_2. Появление этих ионов в масс-спектрах может быть обусловлено присутствием на поверхности диоксида церия хемисорбированных нитрат-ионов и ионов

аммония. Потеря массы при более высоких температурах полностью связана с потерей воды, аналогично тому, как это происходит при дегидратации $ZrO_2 \times H_2O$.

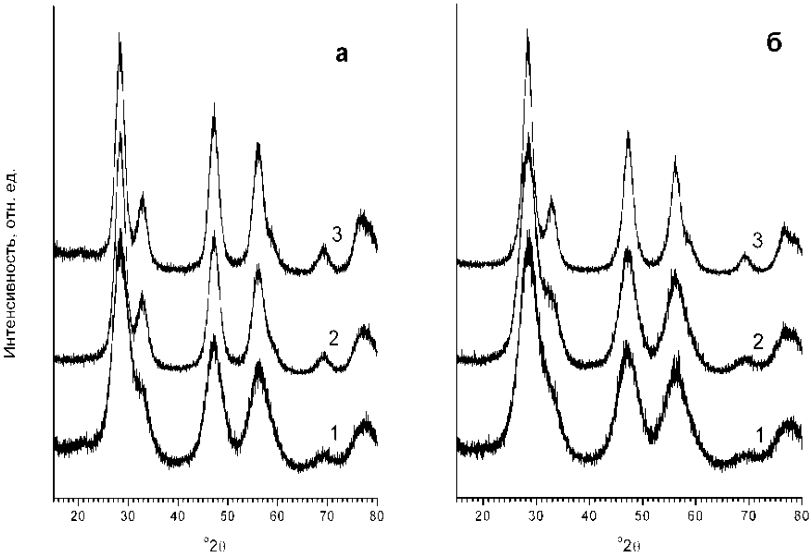


Рис. 1.4. Рентгенограммы диоксида церия, осажденного из растворов гексанитратоцерата(IV) аммония с соотношением вода:изопропанол 1:1 (*а*) и 1:19 (*б*) при комнатной температуре (*1*) и при нагревании до 50°С (*2*) и 80°С (*3*) [24]

Следует отметить, что на физико-химические характеристики нанодисперсного диоксида церия (микроморфология, удельная площадь поверхности, параметр элементарной ячейки), формирующегося при синтезе методом быстрого осаждения, оказывает влияние и способ проведения осаждения (прямое или обратное) [27]. Установлено, что порядок добавления реагентов в реакционную смесь существенным образом сказывается на свойствах получаемого продукта, а также на его поведении при последующем высокотемпературном отжиге. В целом, метод обратного осаждения, т.е. добавления раствора соли церия (нитрата церия(III)) в водный раствор аммиака, позволяет получать частицы существенно меньшего размера, чем при реализации

метода прямого осаждения. Размеры частиц CeO_2 при осаждении из 1 М раствора $Ce(NO_3)_3$ 2 М раствором аммиака, определенные методом рентгенографического анализа при обратном и прямом осаждении, составили ~11 и ~18 нм соответственно.

Закономерным следствием того, что размер частиц CeO_2, получаемого методом обратного осаждения, оказывается меньше, чем в случае прямого осаждения, является большая удельная площадь поверхности такого материала. Действительно, если в первом случае $S_{уд}$ достигает 90 $м^2/г$, то во втором случае она составляет около 30 $м^2/г$. Отметим, что в результате термической обработки при 600°С различия в удельной площади поверхности нивелируются, и она становится равной ~60 $м^2/г$ для обоих образцов.

Наблюдаемые различия для порошков, получаемых прямым и обратным осаждением, обусловлены, вероятно, следующими причинами. Согласно диаграмме Пурбэ, ион Ce^{3+} устойчив в растворе до pH 4–6, при котором начинается формирование $Ce(OH)_3$. Необходимо учитывать, что гидроксид церия(III) обладает заметной растворимостью в воде. При дальнейшем увеличении pH (при значительном избытке осадителя) в системе создаются условия для окисления иона Ce^{3+} и формирования гидратированного диоксида церия. Напротив, при реализации обратного осаждения, когда pH реакционной смеси в ходе всего процесса сохраняется достаточно высоким (10–12), получаемый продукт изначально имеет большую концентрацию ионов Ce^{4+}, чем в случае прямого осаждения. Помимо этого, при обратном осаждении, в связи с крайне низкой растворимостью CeO_2, создаются условия, в которых скорость процессов зародышеобразования значительно превосходит скорость роста частиц, что приводит к получению в данных условиях существенно более высокодисперсных продуктов.

Таким образом, при формировании нанодисперсного диоксида церия осаждением из водных и водно-спиртовых растворов солей церия(III) и церия(IV) изменение состава и концентрации исходных растворов и температуры синтеза позволяет направленно варьировать как размер наночастиц CeO_2, так и характер их агрегации, приводя одновременно к изменениям величин удельной поверхности и фрактальной размерности поверхности нанопорошков диоксида церия. Данный метод можно рассматривать в качестве универсального для получения сильноагрегированных нанопорошков CeO_2 с контролируемой микроморфологией.

1.2. Получение нанокристаллического диоксида церия методами гомогенного осаждения

Удачной альтернативой быстрому осаждению CeO_2 представляется использование реагентов (например, карбамида и гексаметилентетрамина (ГМТА)), способных медленно гидролизоваться в водных растворах с образованием гидроксил-ионов, что позволяет контролировать степень пересыщения и избежать возникновения локальных градиентов концентраций, неизбежных при обычном смешении растворов соли церия и осадителя. Подобный метод дает возможность получать наночастицы диоксида церия (в том числе слабоагрегированные) с заданными размерами в пределах от 6 до 50 нм [27–31].

Синтез CeO_2 в присутствии гексаметилентетрамина

Гексаметилентетрамин ($C_6H_{12}N_4$) синтезируют при взаимодействии аммиака и формальдегида в жидкой фазе:

$$6CH_2O + 4NH_3 \Leftrightarrow C_6H_{12}N_4 + 6H_2O \qquad (1.1)$$

Указанная реакция является обратимой, вследствие чего в водных растворах ГМТА подвергается медленному гидролизу с образованием гидроксида аммония [32]; частичный гидролиз ГМТА происходит также при хранении реагента во влажной атмосфере. Указанное свойство ГМТА находит применение при синтезе дисперсных оксидов и гидратированных оксидов ряда переходных металлов, лантанидов и актинидов, в том числе цинка [33, 34], железа(III) [35, 36], марганца [37], алюминия [38], скандия [39], родия [40], урана [41, 42], циркония [43], а также сложных оксидов, в частности галлата цинка [44]. В ряде работ отмечается, что использование ГМТА вместо традиционных осадителей позволяет получать оксидные нанопорошки с меньшими размерами частиц и большей удельной поверхностью (см., например, [38]). Следует отметить, что количество работ, посвященных разработке методов гомогенного осаждения в присутствии ГМТА, сравнительно невелико даже по сравнению с аналогичными работами, базирующимися на использовании мочевины.

Химические процессы, протекающие при взаимодействии гексаметилентетрамина с растворами солей металлов, обычно описывают в упрощенной форме, используя уравнение (1.1). Тем не менее в действительности формирование оксидов и гидроксосоединений в при-

сутствии ГМТА может включать несколько стадий. В частности, известно, что галогениды и нитраты переходных и редкоземельных металлов при комнатной температуре способны образовывать комплексные соединения с ГМТА. В литературе описаны методики получения, структура и некоторые свойства комплексов $Co(ГМТА)X_2$ (X = Cl, Br, I), $Ni(ГМТА)Cl_2{\times}5H_2O$, $Ni(ГМТА)_2Br_2{\times}5H_2O$, $Mn(ГМТА)Cl_2$, $Mn(ГМТА)_2X_2$ (X = Br, I) [45], $M(ГМТА)_2(H_2O)_6(NO_3)_2{\times}4H_2O$ ($M = Mn^{2+}$, Co^{2+}) [46], $LnBr_3(ГМТА)_2 \times \times nH_2O$ (Ln = La, Nd, Gd, Dy, Er; n = 0–12) [47]. Имеются сведения о том, что комплексы с ГМТА могут образовывать и другие металлы [48]. Следует отметить, что ГМТА потенциально может являться тетрадентатным лигандом, однако на практике он чаще выступает в роли мостиковой группы, нежели в качестве хелатирующего агента. В работе [49] приведены сведения об органических реакциях, идущих с участием ГМТА. Указывается, что ГМТА может образовывать соли с некоторыми органическими и неорганическими кислотами (включая H_2SO_4). Гексаметилентетрамин способен реагировать с азотной кислотой в присутствии уксусной кислоты и нитрата аммония с образованием взрывчатого циклотриметилентринитрамина. Интересной особенностью ГМТА является его способность катализировать синтез мочевины из углекислого газа и аммиака [49]. Отметим, что все указанные реакции формально могут протекать и при синтезе оксидов методом гомогенного осаждения в присутствии ГМТА. Полностью не исследованным остается вопрос возможного взаимодействия конечных твердофазных продуктов с содержащимися в реакционных смесях гексаметилентетрамином и формальдегидом, являющимися достаточно сильными восстановителями. Наконец, указанные соединения могут сорбироваться на поверхности формирующихся наночастиц, оказывая влияние на их последующий рост.

Реакция гидролиза солей церия в присутствии гексаметилентетрамина положена в основу целого ряда методик синтеза нанокристаллического диоксида церия [50–52]. Авторами [51, 52] было показано, что размер наночастиц CeO_2 зависит от продолжительности реакции, причем эта зависимость имеет практически линейный характер. Динамика роста частиц CeO_2 определяется и другими параметрами синтеза, в том числе температурой проведения реакции и мольным соотношением исходных реагентов. Варьирование условий синтеза позволяет в широких пределах изменять не только размеры (от 10 до 50 нм), но и форму наночастиц диоксида церия [24].

При изучении механизма и динамики образования нанокристаллического диоксида церия из водных растворов нитрата церия(III) и гексаметилентетрамина [53] нами было установлено, что формирование диоксида церия при смешении растворов нитрата церия(III) и ГМТА наблюдается уже при комнатной температуре (20°С), однако скорость реакции в этих условиях крайне мала. В разбавленных растворах и в растворах с малым избытком ГМТА образования наночастиц CeO_2 не происходит даже после 24-часовой выдержки растворов при комнатной температуре.

Согласно визуальным наблюдениям, образование твердой фазы при гидролизе нитрата церия(III) в растворе гексаметилентетрамина происходит как при относительно низких (20–40°С), так и при высоких (50–90°С) температурах. Согласно данным РФА, в диапазоне от 20 до 30°С из растворов нитрата церия(III) (0,032 М) и ГМТА (0,075 М) осаждаются преимущественно гидроксокарбонат церия(III) (PDF № 41–13), а также фаза, отсутствующая в базе данных JCPDS. Положению характерных рефлексов этой фазы отвечают межплоскостные расстояния (*d*) 8,46, 6,00, 5,80 и 4,89 Å. При повышении температуры синтеза до 40°С продуктом осаждения является диоксид церия с примесью гидроксокарбоната церия(III) ($Ce(OH)(CO_3)$). При проведении реакции в диапазоне от 50 до 90°С формируется однофазный диоксид церия [54]. Очевидно, что формирование карбонатсодержащих соединений церия(III) происходит благодаря присутствию растворенного углекислого газа.

Для изучения динамики роста наночастиц CeO_2 при температурах 50–90°С были использованы данные УФ-видимой спектроскопии. Было установлено, что с повышением температуры от 50 до 90°С общая продолжительность синтеза диоксида церия уменьшается почти в 10 раз. Следует отметить, что повышение температуры синтеза способствует и более быстрому протеканию агрегации и седиментации частиц. Конечный размер синтезируемых частиц CeO_2 составляет 6–12 нм.

Для подробного изучения влияния параметров синтеза на микроморфологию частиц диоксида церия, синтезируемого методом гомогенного осаждения в присутствии гексаметилентетрамина, нами было проанализировано то, как сказываются концентрация и мольное соотношение реагентов в исходном растворе на характеристики конечного продукта. С учетом того, что скорость реакции при высоких темпера-

турах весьма велика, а при низких температурах продукт синтеза является неоднофазным (смесь гидроксокарбоната церия(III) и CeO_2), в качестве базовой была выбрана температура 60°С. Мольные соотношения нитрата церия(III) и гексаметилентетрамина варьировали в пределах от 1:3 до 1:40.

Было установлено, что увеличение мольного избытка ГМТА оказывает существенное влияние на общую продолжительность синтеза. Так, при 3-кратном избытке ГМТА общая продолжительность синтеза до момента образования осадка составляет 280 мин, при увеличении мольного соотношения исходных реагентов до 1:10, 1:20 и 1:40 продолжительность процесса сокращается до 60, 45 и 20 мин соответственно.

Анализ нанокристаллического диоксида церия, полученного из смеси растворов $[Ce(NO_3)_3]$/[ГМТА] с мольным соотношением исходных реагентов 1:3, 1:10, 1:20 и 1:40, показывает, что по мере увеличения избытка ГМТА размеры частиц уменьшаются от 50–60 до 10–12, 8 и 6 нм соответственно. Данный результат, очевидно, обусловлен тем, что при повышении концентрации ГМТА увеличивается и концентрация продуктов его гидролиза, и, таким образом, степень пересыщения. Как известно, в условиях более высокого пересыщения процессы образования зародышей новой фазы доминируют над процессами роста частиц [55], что и обусловливает малый размер частиц диоксида церия, формирующихся при больших избытках ГМТА.

Нами было впервые показано, что в присутствии малого избытка ГМТА в реакционной смеси при проведении медленного гомогенного гидролиза нитрата церия(III) может происходить формирование пластин диоксида церия субнанометровой толщины [56].

Синтез нанопластин диоксида церия проводили из водного раствора нитрата церия(III) (~0,006 М) и гексаметилентетрамина (~0,02 М) при 60°С в течение 24 ч. По данным РФА и электронной дифракции (ЭД), продуктом синтеза в выбранных условиях является однофазный диоксид церия. Согласно данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМВР) (рис. 1.5) линейные размеры полученных наночастиц диоксида церия составляют 20–80 нм. Методом наклона образцов (до 45^o) было установлено, что частицы CeO_2 представляют собой пластины, толщина которых не превышает 1 нм, что приблизительно соответствует удвоенному параметру кристаллической ячейки

CeO_2 (a = 0,541 нм). Наиболее развитыми являются грани типа (110), а направление роста формально соответствует (111).

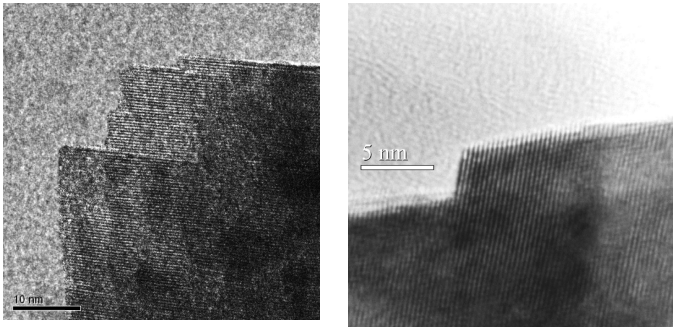


Рис. 1.5. Микрофотографии (ПЭМ, ПЭМВР) нанопластин диоксида церия, полученных методом гомогенного гидролиза нитрата церия(III) в присутствии ГМТА [56]

Анализ микрофотографий свидетельствует о том, что отдельные пластины CeO_2 упаковываются в пакеты и взаимно ориентируются друг относительно друга (в ряде случаев не полностью). По данным ЭД, угол разориентировки нанопластин диоксида церия в пакетах может составлять 0–6°. Очевидно, что взаимная ориентация наночастиц может происходить при высушивании порошка CeO_2 на воздухе вследствие действия капиллярных сил. Вместе с тем анализ микрофотографий индивидуальных частиц показывает, что в отдельных наночастицах наблюдаются протяженные дефекты. Образование таких дефектов возможно только на стадии синтеза CeO_2 в жидкой фазе при сращивании взаимно сориентировавшихся частиц. В свою очередь при полной взаимной ориентации нескольких частиц может происходить их когерентное сращивание.

В качестве примера на рис. 1.5 показана сформированная таким образом наночастица CeO_2 неправильной формы. В целом анализ микрофотографий показывает, что ориентированное присоединение и сращивание наночастиц диоксида церия наблюдается значительно чаще, чем частично или полностью разориентированное присоединение. Можно заключить, что рост нанопластин диоксида церия в присутствии ГМТА преимущественно реализуется по механизму ориентированного присоединения кристаллитов, детально описанно-

му Банфилд и Пенн при исследовании процессов формирования наночастиц диоксида титана в гидротермальных условиях (необходимо отметить, что приоритет в открытии механизма ориентированного присоединения и сращивания кристаллитов, по-видимому, принадлежит Н.П. Юшкину (1969) (так называемая «теория микроблочного роста кристаллов»). Суть данного явления заключается в том, что при столкновении и слипании двух (и более) кристаллических наночастиц в жидкой среде они могут разворачиваться таким образом, что их грани с одинаковыми кристаллографическими индексами располагаются параллельно друг к другу, после чего происходит когерентное сращивание наночастиц с образованием монокристаллических частиц или поликристаллов, разделенных двойниковыми границами или другими планарными дефектами [57].

Гомогенный гидролиз солей церия(IV), в частности $[(NH_4)_2Ce(NO_3)_6]$, в отличие от гидролиза солей церия(III), по данным РФА, приводит к образованию однофазного диоксида церия уже при комнатной температуре, при этом тенденции изменения микроморфологии образцов нанодисперсного диоксида церия при варьировании параметров синтеза остаются в целом аналогичными указанным выше [58]. В частности, при увеличении мольного соотношения Ce/ГМТА от 1:3, 1:10, 1:24 до 1:40 происходит уменьшение среднего размера частиц от 5,0 до 3,6 нм.

При повышении температуры синтеза CeO_2 до 90°C соотношение исходных реагентов оказывает более заметное влияние на размер частиц продукта реакции. Так, при малом избытке ГМТА (1:3) размер частиц CeO_2 составляет ~7 нм. При увеличении избытка ГМТА до 1:10, 1:24 и 1:40 размеры частиц в порошках CeO_2, синтезированных при 90°C, закономерно снижаются до 4,9; 4,9 и 4,2 нм соответственно. Отметим, что размеры частиц CeO_2, осажденных из растворов с мольным соотношением Ce/ГМТА 1:10 и 1:24 при 60 и 90°C практически не различаются и составляют ~5 нм.

Метод гомогенного осаждения в присутствии гексаметилентетрамина может быть использован для получения не только нанокристаллического диоксида церия, но и твердых растворов на его основе [59–61]. В частности, таким методом из водных растворов нитрата церия(III) и хлорида празеодима в присутствии гексаметилентетрамина при 100°C был синтезирован диоксид церия, допированный празеодимом [59]. Получаемые наночастицы имели изотропную форму, при этом с увеличением концен-

трации исходного раствора нитрата церия(III) от 0,005 до 0,02 М средний размер частиц возрастал от 8 до 15 нм.

По аналогичной методике был синтезирован диоксид церия, допированный гадолинием и самарием [61]. Установлено, что мольное соотношение Ce/Gd и Ce/Sm в продуктах синтеза соответствует соотношению катионов в исходных растворах, при этом допирование CeO_2 ионами редкоземельных металлов приводит к получению более высокодисперсных продуктов.

Предложена также модифицированная многостадийная методика синтеза нанокристаллических оксидных порошков, включающая осаждение наночастиц оксидов металлов в присутствии гексаметилентетрамина, пропитку оксидных порошков коллоидными растворами циклотриметилентринитрамина и термическую обработку полученных нанокомпозитов в условиях, обеспечивающих взрывное разложение циклотриметилентринитрамина [62, 63]. Совокупность этих стадий приводит к формированию практически неагрегированных наночастиц. Этот метод представляется перспективным для получения нанокерамики на основе CeO_2.

Нами был выполнен цикл работ [65–66], посвященных получению квазидвойных твердых растворов состава $Ce_{1-x}Me_xO_{2-\delta}$ (Me = La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Er, Yb) методом гомогенного гидролиза. Синтез проводили из смешанных водных растворов, содержащих гексанитратоцерат(IV) аммония, нитрат РЗЭ и ГМТА, при этом мольное соотношение реагентов в конечных растворах составляло Ce : Me : ГМТА = $= (1-x) : x : 10$. Синтез проводили при 90°C в течение 1 ч.

Согласно результатам РФА, все полученные данным методом материалы были однофазными и обладали кристаллической структурой флюорита (пространственная группа $Fm\overline{3}m$). Дифракционные максимумы, отвечающие оксо- и гидроксосоединениям РЗЭ, на дифрактограммах отсутствовали. Следует отметить, что при гидролизе индивидуальных солей РЗЭ (например, нитрата празеодима) в аналогичных условиях образуются соответствующие гидроксиды и гидроксокарбонаты. По мере увеличения номинальной степени допирования от 0 до 20% наблюдалось смещение положения дифракционных максимумов в сторону меньших (для La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd) и больших (Yb) углов соответственно, что свидетельствует о вхождении ионов РЗЭ в кристаллическую решетку диоксида церия. В случае эрбия положение дифракционных максимумов оставалось неизмен-

ным. Этот результат в сочетании с данными [67], характеризующими радиусы ионов РЗЭ в различных координационных окружениях, позволяет предположить, что координационное число ионов РЗЭ в твердых растворах меньше или равно 7.

На рис. 1.6 приведены зависимости параметра кристаллической ячейки $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$ от номинального содержания допирующего агента, определенные при уточнении кристаллической структуры твердых растворов по методу Ритвельда.

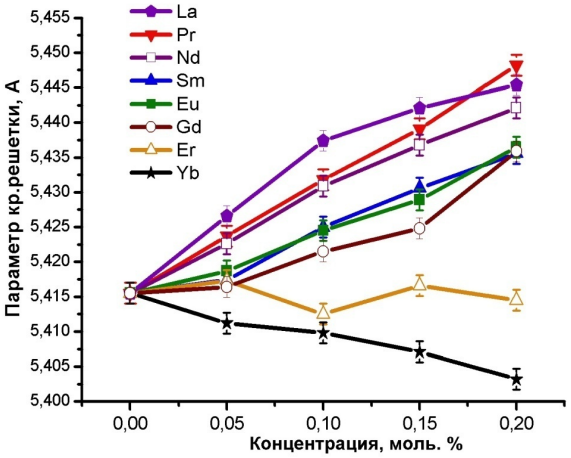


Рис. 1.6. Зависимости параметров элементарных ячеек нанокристаллических твердых растворов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$ от номинального содержания допантов [24]

Видно, что полученные зависимости являются линейными, т.е. соответствуют правилу Вегарда для твердых растворов. Более того, экспериментальные данные для $Ce_{1-x}Nd_xO_{2-\delta}$ и $Ce_{1-x}Pr_xO_{2-\delta}$ удовлетворительно описываются корреляционным уравнением [68], характеризующим влияние уровня допирования на параметры ячеек крупнокристаллических твердых растворов на основе диоксида церия:

$$a = 0{,}5413 + (0{,}0220\Delta r + 0{,}00015)\cdot m,$$

где a – параметр ячейки твердого раствора; Δr – разность ионных радиусов R^{3+} и Ce^{4+}; m – мольная доля допанта.

Согласно результатам рентгеноспектрального микроанализа, в состав образцов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$ входят соответствующие катионы редкоземельных элементов (РЗЭ), причем по мере увеличения концентрации РЗЭ в исходных водных растворах их содержание в твердых растворах также увеличивается. Найденные значения в пределах погрешности измерений соответствуют номинальным. Данные рентгеноспектрального микроанализа надежно подтверждаются результатами анализа образцов твердых растворов методом лазерной масс-спектрометрии.

Согласно данным РФА (рис. 1.7), при увеличении концентрации РЗЭ от 0 до 20 мольных процентов размер частиц уменьшается практически вдвое (от 7 до 4 нм). Можно предположить, что этот эффект обусловлен частичной сегрегацией допантов на поверхности формирующихся кристаллитов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$, приводящей к ограничению их роста. Указанная тенденция уменьшения размеров частиц с увеличением степени допирования подтверждается данными ПЭМ, свидетельствующими также об агрегированности наночастиц.

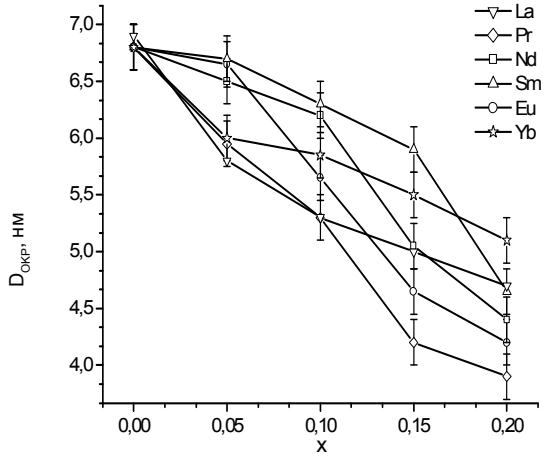
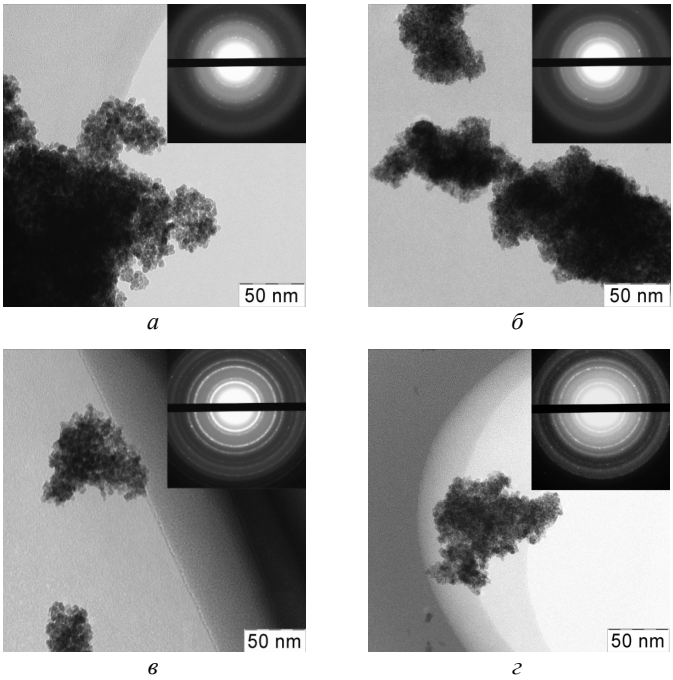


Рис. 1.7. Зависимости размеров частиц твердых растворов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$ от номинального содержания допантов [24]

На рис. 1.8 в качестве примера представлены микрофотографии твердых растворов $Ce_{1-x}Yb_xO_{2-\delta}$ (где $x = 0{,}05$ (*а*) и $x = 0{,}2$ (*б*)),

$Ce_{1-x}Eu_xO_{2-\delta}$ (где x = 0,05 (*в*) и x = 0,2 (*г*)). Видно, что вне зависимости от степени допирования наночастицы твердых растворов не имеют выраженной огранки. Данные электронной дифракции дополнительно свидетельствуют о высокой степени кристалличности твердых растворов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$, получаемых методом гомогенного гидролиза в присутствии ГМТА.



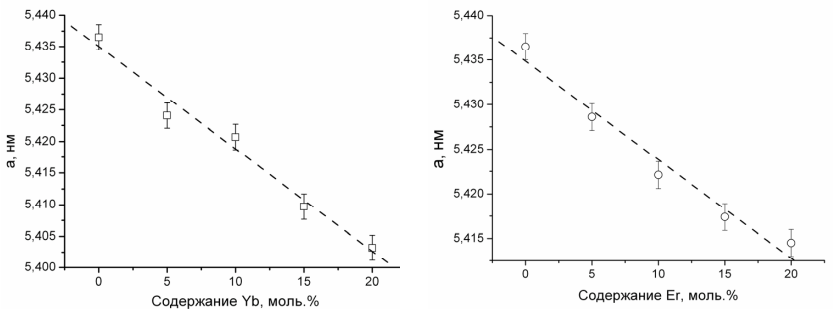
а *б* *в* *г*

Рис. 1.8. Микрофотографии нанокристаллических твердых растворов $Ce_{0,95}Eu_{0,05}O_{2-\delta}$ (*а*), $Ce_{0,8}Eu_{0,2}O_{2-\delta}$ (*б*), $Ce_{0,95}Yb_{0,05}O_{2-\delta}$ (*в*) и $Ce_{0,8}Yb_{0,2}O_{2-\delta}$ (*г*) [24]

Согласно литературным данным, за счет допирования диоксида церия одновременно несколькими РЗЭ (в том числе Nd, Sm, Gd, Dy, Y, Yb, Eu) можно добиться дополнительного увеличения кислородной подвижности. В частности, в работе [69] было показано, что при допировании CeO_2 одновременно иттрием, гадолинием и самарием ($Ce_{1-x}(Sm,Gd)_xO_{2-\delta}$, $Ce_{1-x}(Sm,Gd,Y)_xO_{2-\delta}$) ионная проводимость увеличивается более чем на 30% по сравнению с диоксидом церия, допиро-

ванным только одним РЗЭ. Кроме того, введение дополнительного допанта позволяет уменьшить вклад электронной проводимости в общую проводимость твердых растворов на основе диоксида церия [70, 71]. В связи с этим нами была впервые исследована возможность получения квазитройных твердых растворов на основе диоксида церия гомогенным гидролизом смешанных водных растворов $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ и $R(NO_3)_3 \cdot nH_2O$ (R = Eu, Er, Yb) в присутствии ГМТА.

На рис. 1.9 (*а*, *б*) показаны зависимости параметра элементарной ячейки $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$ (R = Er, Yb) от номинального содержания эрбия и иттербия, определенные при уточнении кристаллической структуры твердых растворов по методу Ритвельда [66].



а *б*

Рис. 1.9. Зависимости параметров элементарных ячеек нанокристаллических твердых растворов $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$ (R = Yb, Er) от номинального содержания допантов [66]

Увеличение содержания второго допанта (Er, Yb) от 0,05 до 0,2 с одновременным эквивалентным уменьшением содержания европия ведет к уменьшению параметра кристаллической решетки, что хорошо согласуется с данными об эффективных радиусах РЗЭ [67] ($r(^{VI}Ce^{4+})$ = 0,87 Å, $r(^{VI}Eu^{3+})$ = 0,947 Å, $r(^{VI}Er^{3+})$ = 0,890 Å, $r(^{VI}Yb^{3+})$ = 0,868 Å). Полученные зависимости являются линейными, т.е. соответствуют правилу Вегарда.

Данные рентгеноспектрального микроанализа подтверждают факт образования твердых растворов $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$. Следует отметить, что найденные концентрации РЗЭ в твердых растворах лишь незначи-

тельно отличаются от номинальных значений, а соотношение катионов (R:Ce) в соответствии с результатами картирования остается постоянным по всему объему образцов.

Анализ уширений дифракционных максимумов (111) и (200) свидетельствует о том, что полученные порошки квазитройных твердых растворов также являются нанокристаллическими. На основании данных рентгенофазового анализа были определены размеры частиц $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$. Видно (табл. 1.2), что при варьировании концентрации второго допанта (Er, Yb) от 0 до 20 мольных процентов размер частиц практически не меняется (~4,5 нм), что подтверждается данными ПЭМ. Данные электронной дифракции свидетельствуют о высокой степени кристалличности твердых растворов $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$.

Таблица 1.2

Размеры частиц и удельная поверхность твердых растворов $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$ (Er, Yb) в зависимости от номинального содержания допантов [66]

Образец	$D_{ОКР}$, нм	$S_{уд}$, $м_2/г$	Образец	$D_{ОКР}$, нм	$S_{уд}$, $м^2/г$
$Ce_{0,8}Eu_{0,05}Er_{0,15}$	5	90	$Ce_{0,8}Eu_{0,05}Yb_{0,15}$	5	90
$Ce_{0,8}Eu_{0,10}Er_{0,10}$	5	130	$Ce_{0,8}Eu_{0,10}Yb_{0,10}$	4	120
$Ce_{0,8}Eu_{0,15}Er_{0,05}$	4	150	$Ce_{0,8}Eu_{0,15}Yb_{0,05}$	4	150

По данным низкотемпературной адсорбции азота, увеличение номинального содержания второго допанта (эрбия, иттербия) в твердом растворе $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$ не приводит к существенным изменениям величин удельной площади поверхности ($S_{уд}$) образцов (см. табл. 1.1), что хорошо согласуется с данными РФА и ТГА.

Сопоставление экспериментальных данных, описывающих характеристики квазидвойных и квазитройных твердых растворов, позволяет сделать вывод о том, что размеры частиц в твердых растворах на основе диоксида церия, синтезируемых методом гомогенного осаждения в присутствии ГМТА, определяются в первую очередь суммарным содержанием допантов.

Необходимо подчеркнуть, что метод синтеза неорганических наноматериалов с использованием ГМТА, наряду с очевидными преимуществами, характеризуется существенным недостатком, связанным с тем, что скорость гидролиза ГМТА даже при 60–100°С достаточно мала, поэтому для получения значимых количеств конечных продуктов требуется значительное время – до 10–100 ч.

В связи с этим нами в работе [72] был предложен новый метод синтеза, основанный на гомогенном осаждении в присутствии ГМТА в условиях гидротермальной (гидротермально-микроволновой) обработки.

Нами было впервые проведено изучение процесса гидролиза ГМТА в гидротермальных условиях с использованием метода калориметрии теплового потока (Кальве) при линейном нагреве со скоростью 0,5°С/мин до 190°С. Согласно полученным данным (рис. 1.10), гидролиз ГМТА, протекающий с образованием формальдегида и аммиака, является эндотермическим процессом, характеризующимся довольно значительным удельным тепловым эффектом.

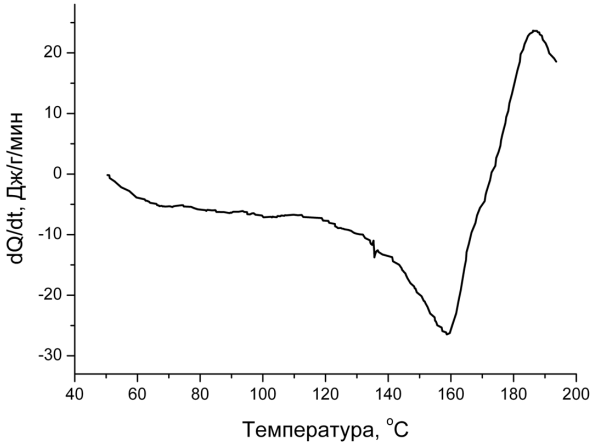


Рис. 1.10. Зависимость скорости тепловыделения от температуры для процесса высокотемпературного гидролиза ГМТА (концентрация в воде 0,0152 М) [72]

Гидролиз ГМТА начинается при ~45–50°С, однако при температурах до 120–125°С скорость гидролиза является сравнительно невысокой, а при 130–140°С она заметно возрастает, достигая максимума при 158°С. В свою очередь, при температуре ~167°С регистрируется начало значительного экзотермического эффекта, который, по нашему мнению, обусловлен окислением формальдегида кислородом, присутствующим в ячейке в газовой фазе и в растворенном виде.

Метод гомогенного гидролиза в присутствии ГМТА в гидротермальных условиях был успешно опробован для получения твердых

растворов состава $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-x/2}$ [72] с использованием в качестве исходных солей гексанитратоцерата аммония и нитрата гадолиния. Оказалось, что однофазные образцы $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-x/2}$ образуются уже при пятиминутной выдержке исходных реакционных смесей при температуре 180°С, при этом размер получаемых частиц составляет 3,0–4,1 нм. При анализе данных о влиянии продолжительности синтеза на выход продукта была установлена интересная особенность. ГТМВ обработка при 180°С в течение 5 мин обеспечивает 68–70%-ный выход продукта (сопоставимого выхода – 65% – при проведении синтеза в открытой ячейке при температуре 90°С удается достичь только при одночасовой выдержке). Однако дальнейшее увеличение продолжительности синтеза приводит не к увеличению, а, напротив, к снижению выхода $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-x/2}$. По нашему мнению, это связано с частичным растворением $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-x/2}$ в гидротермальной среде, содержащей муравьиную кислоту, которая, по-видимому, начинает интенсивно образовываться в гидротермальных условиях при 170–180°С. Предположение о частичном растворении продукта реакции подтверждается данными просвечивающей электронной микроскопии – при увеличении продолжительности выдержки до 60 мин размеры кристаллитов несколько уменьшаются, и они частично теряют огранку.

Таким образом, метод гомогенного осаждения в присутствии ГМТА, а также различные его вариации (в том числе с использованием гидротермальной обработки) являются одними из наиболее перспективных препаративных методов синтеза материалов на основе нанокристаллического диоксида церия, в том числе твердых растворов состава $Ce_{1-x}R_xO_{2-y}$ (R = РЗЭ).

Синтез CeO_2 в присутствии мочевины

Согласно данным [73], соли церия(III) при нагревании в присутствии мочевины гидролизуются с образованием веретенообразных или стержневидных частиц кристаллического оксокарбоната церия(III) $Ce_2O(CO_3)_2 \cdot H_2O$ либо гелеподобных осадков того же состава. Данные [49] находятся в хорошем соответствии с результатами работы [73]: единственным продуктом гидролиза $Ce(NO_3)_3$ в присутствии мочевины при 85°С, в отличие от реакции с участием гексаметилентетрамина, является $Ce_2O(CO_3)_2 \cdot H_2O$. Вместе с тем в работе [74] было показано, что гидролиз солей церия(III) в присутствии мочевины в

гидротермальных условиях (120–180°С) может приводить к образованию двух кристаллических фаз – орторомбического оксокарбоната и гексагонального гидроксокарбоната $Ce(OH)CO_3$ церия(III), при этом состав продуктов синтеза определяется как природой исходной соли церия, так и концентрацией мочевины и температурой гидротермальной обработки. При последующей термической обработке (300–900°С) продуктов синтеза формируется нанокристаллический диоксид церия с контролируемыми размерами частиц в пределах 6–40 нм.

Использование в качестве прекурсоров растворов сульфата церия(IV) и мочевины позволяет в аналогичных условиях синтезировать непосредственно нанокристаллический диоксид церия [27]. По мнению авторов, различия в составе продуктов синтеза обусловлены большей склонностью иона Ce^{4+} к гидролизу по сравнению с Ce^{3+}. Изменение температуры синтеза и содержания мочевины в реакционных смесях позволяет направленно варьировать размер частиц CeO_2 в пределах 10–20 нм. Отмечается, что размеры частиц, полученных методом гомогенного осаждения, в несколько раз превосходят размеры частиц, полученных осаждением гидроксидом аммония с последующей гидротермальной обработкой осадков в аналогичных условиях. Подобный эффект, вероятно, связан с меньшей эффективной концентрацией осадителя и, соответственно, с преимущественным протеканием процессов роста частиц и меньшим вкладом процессов зародышеобразования. Аналогичным образом увеличение концентрации мочевины от 0,2 до 0,8 М приводит к двукратному уменьшению размеров индивидуальных кристаллитов CeO_2 и одновременному двукратному увеличению размеров образованных ими агрегатов [29].

Для дополнительного контроля над формой и размерами частиц гидроксосоединений церия(III) и диоксида церия, получаемых гидролизом в присутствии мочевины, в ряде работ предлагается использовать разнообразные темплаты (структурообразующие реагенты). В частности, авторы [75] вводили в реакционные смеси полиэтиленгликоли (молекулярная масса 1 000 и 20 000), а также бромид цетилтриметиламмония. Варьирование природы темплатов позволяет менять форму частиц $Ce(OH)CO_3$ от эллипсовидной до октаэдрической, крестообразной и т.д. Установлено, что последующий высокотемпературный отжиг приводит к образованию частиц CeO_2, форма которых наследует форму частиц $Ce(OH)CO_3$.

В работе [76] при гидротермальной обработке реакционных смесей, содержащих нитрат церия, мочевину и бромид цетилтриметиламмония, и последующем отжиге твердофазных продуктов синтеза при 500 °С были получены тонкие пластинки CeO_2 ромбической формы. Предложена также методика получения нанопроводов CeO_2 с использованием в качестве темплата пористого анодированного оксида алюминия [77].

Метод гомогенного осаждения в присутствии мочевины успешно применяется для синтеза твердых растворов и композитов на основе CeO_2. Авторы [30] установили, что гидротермальная обработка растворов гексанитратоцерата(IV) аммония, нитрата цирконила и мочевины при 140°С с последующим отжигом твердофазных продуктов при 500–900°С приводит к образованию гомогенных твердых растворов $Ce_{1-x}Zr_xO_2$. Такие твердые растворы могут формироваться и непосредственно в ходе гидротермальной обработки исходных реагентов. В работе [31] продемонстрирована возможность получения нанокристаллического диоксида церия, допированного самарием, при нагревании до 100°С растворов сульфата церия(IV), нитрата самария и мочевины. Установлено, что образование твердых растворов в указанных условиях осуществляется в несколько стадий, включая соосаждение гидроксидов церия и самария с формированием первичных частиц, существенно обогащенных церием и обедненных самарием по отношению к стехиометрическому составу, а также осаждение остаточных количеств самария в форме гидроксида на поверхности первичных частиц и диффузию ионов самария вглубь первичных частиц.

Авторы [78] предложили использовать метод гомогенного осаждения для получения нанокомпозитов CeO_2/CuO – высокоэффективных катализаторов дожига монооксида углерода. Отмечается, что данный метод может быть использован и для синтеза других нанокомпозитов на основе диоксида церия.

1.3. Основные закономерности роста наночастиц диоксида церия в гидротермальных условиях

Гидротермальная обработка – один из наиболее распространенных методов получения микро- и нанодисперсных функциональных оксидных материалов с контролируемой микроморфологией [79]. В общем

случае формирование оксидов металлов в гидротермальных условиях представляет собой многостадийный процесс, при этом механизм, кинетика и температурные интервалы, соответствующие протеканию отдельных стадий, надежно установлены лишь для единичных систем.

Ниже приведены известные на данный момент сведения о закономерностях формирования и роста наночастиц диоксида церия в гидротермальных средах.

Синтез нанокристаллического диоксида церия в условиях «обычной» гидротермальной обработки

В первой работе по изучению гидротермального метода получения высокодисперсных порошков диоксида церия в качестве прекурсора использовали гидратированный диоксид церия $CeO_2 \cdot nH_2O$, осажденный водным раствором аммиака из нитрата церия(III). Гидротермальную обработку $CeO_2 \cdot nH_2O$ проводили при температурах 500, 600 и 700°C в дистиллированной воде, а также в водных растворах KF, LiCl, LiBr, K_2CO_3, $LiNO_3$, Li_2SO_4 и NaOH. Согласно полученным данным, повышение температуры и продолжительности обработки, а также введение в реакционную среду указанных минерализаторов в целом способствует увеличению размеров частиц диоксида церия. В зависимости от условий проведения синтеза размеры наночастиц CeO_2 удавалось варьировать от 30 до 100 нм и более (рис. 1.11) [80, 81].

В работах [82, 83] были впервые выполнены детальные исследования влияния температуры (в интервале 120–200°C) и продолжительности (5–40 ч) гидротермальной обработки на размер частиц нанодисперсного диоксида церия. В качестве исходных реагентов использовали суспензии гидратированного CeO_2, полученные осаждением из растворов нитрата церия(III), сульфата церия(IV) и сульфата аммония–церия(IV) водным аммиаком. Показано, что гидротермальная обработка суспензий с нитратной предысторией при температурах до 180°C не приводит к изменению размера кристаллитов CeO_2 (~2 нм). В случае использования в качестве исходного реагента сульфата церия(IV) наблюдается зависимость размеров частиц (2,5–8,5 нм) от параметров обработки (продолжительность, температура) и концентрации растворов.

В работе [85], где исследовали влияние кислотности среды на динамику роста частиц CeO_2 в гидротермальных условиях (продолжительность процесса 18–240 ч, температура 20–245°C), было установ-

лено, что в нейтральной и слабощелочной средах размеры частиц диоксида церия увеличиваются с относительно невысокой скоростью, тогда как в кислой среде наблюдается быстрый рост кристаллитов (рис. 1.12). Отмечается, что снижение pH среды позволяет существенно уменьшить агрегированность наночастиц CeO_2.

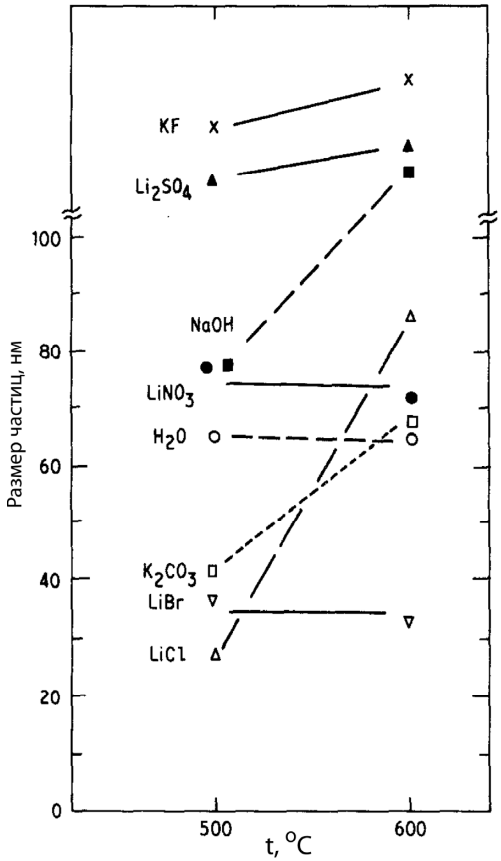


Рис. 1.11. Влияние минерализаторов на размер частиц CeO_2 в гидротермальных условиях (100 МПа, 24 ч). Концентрации минерализаторов: KF – 8 мас.%, LiCl – 15 мас.%, LiBr – 10 мас.%, K_2CO_3 – 10 мас.%, $LiNO_3$ – 10 мас.%, Li_2SO_4 – 10 мас.%, NaOH – 30 мас.% [81]

Приведенные в [85] данные в целом хорошо согласуются с результатами работы [86], согласно которым гидротермальная обработка

суспензий гидратированного диоксида церия при 250°С в течение 6–24 ч не приводит к значимому росту наночастиц CeO_2 (5–6 нм). Было установлено, что в процессе гидротермальной обработки происходит увеличение параметра решетки CeO_2 (однако причины данного явления в работе не рассматриваются).

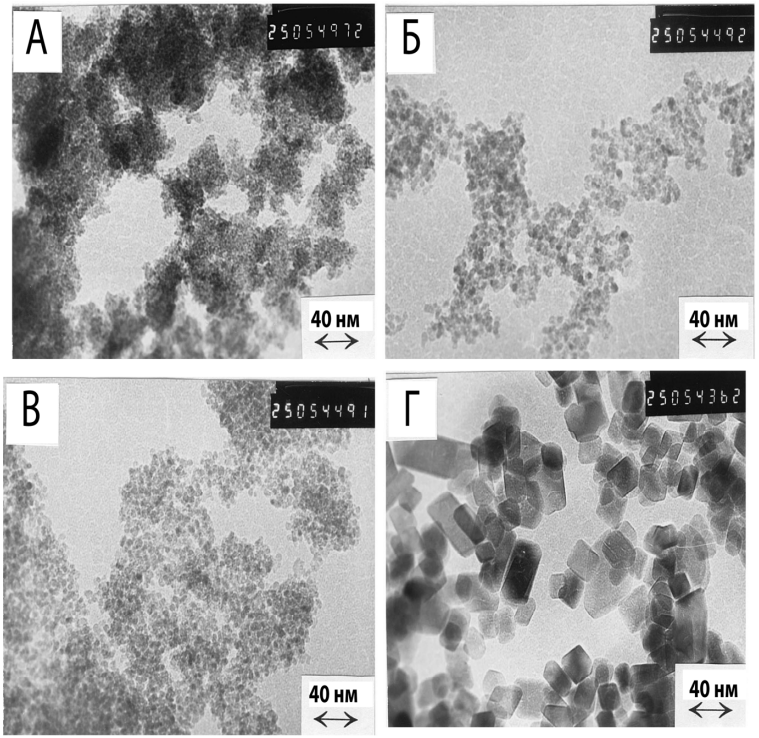


Рис. 1.12. Микрофотографии исходного порошка CeO_2 (*А*), а также порошков после гидротермальной обработки при 245°С (18 ч) в нейтральной – pH 7 (*Б*), щелочной – pH 12 (*В*) и кислой – pH 2 (*Г*) средах [85]

Напротив, по данным [87], параметр ячейки CeO_2 в ходе гидротермального синтеза остается неизменным и не зависит ни от температуры, ни от продолжительности обработки. Авторы [87] отмечают также тот факт, что в случае синтеза в открытых ячейках (с обратным холодильником) образуются более крупнокристаллические и менее

стехиометричные по кислороду образцы по сравнению с продуктами синтеза, получаемыми в автоклаве.

Синтез нанокристаллического диоксида церия в условиях гидротермально-микроволновой обработки

Метод синтеза неорганических материалов при микроволновом воздействии получает все большее распространение благодаря ряду уникальных особенностей микроволнового синтеза, включая высокую скорость и однородность нагрева, а также существованию нетермических эффектов, в основе которых лежит многократное увеличение эффективных коэффициентов диффузии ионов [88, 89]. В ряде случаев микроволновое воздействие на реакционную систему сочетают с другими физическими факторами воздействия, например с лазерным облучением. К числу подобных комбинированных методов синтеза относится и гидротермально-микроволновая обработка.

Имеющиеся в настоящее время сведения об особенностях получения нанокристаллического диоксида церия в таких условиях достаточно фрагментарны. В первой опубликованной работе о гидротермально-микроволновом синтезе CeO_2 (2005 г.) [90] в качестве исходных реагентов использовали гексанитрато-церат(IV) аммония и гидроксид натрия, которые выдерживали в бытовой микроволновой печи в течение 20 мин. (Данные о размерах и других отличительных особенностях синтезированных наночастиц в работе не приведены.)

В работе [91] детально исследовали влияние условий гидротермально-микроволнового воздействия (концентрация исходных реагентов [Ce] = 0,1–2,5 М, [NaOH] = 1–10 М, продолжительность обработки 5–240 мин) на микроморфологию нанопорошков диоксида церия, синтезированных из аналогичных прекурсоров (рис. 1.13). Показано, что при варьировании параметров синтеза размер частиц и удельная площадь поверхности продуктов изменяются от 4,0 до 5,8 нм и от 143 до 207 $м^2/г$ соответственно. К сожалению, сопоставление характеристик полученных образцов с характеристиками аналогичных образцов, синтезированных обычным гидротермальным методом, проведено не было. Отсутствие подобной информации не позволяет с уверенностью судить о наличии или отсутствии специфических эффектов, связанных с действием микроволнового излучения на реакционные смеси.

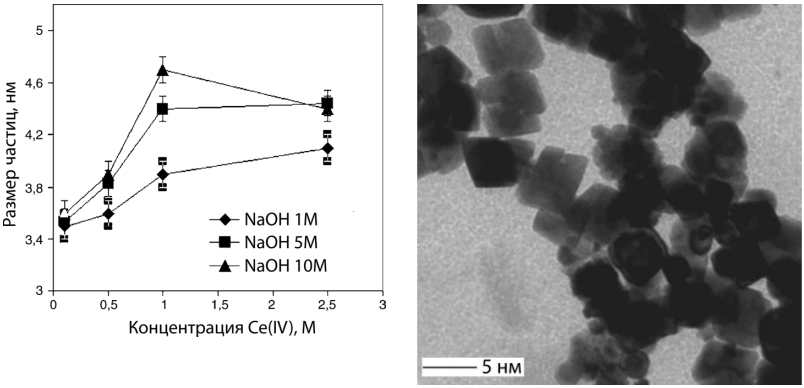


Рис. 1.13. Размер частиц CeO_2, получаемого гидротермально-микроволновым методом, в зависимости от концентраций компонентов в реакционной смеси. Условия обработки – 5 мин, 13,4 атм (~194°C). Микрофотография образца диоксида церия, полученного при $C_{Ce(IV)}$ = 1 М, C_{NaOH} = 1 М [91]

В работе [92] гидротермально-микроволновой синтез CeO_2 проводили при фиксированной температуре (160°C), варьируя осадители (NaOH, NH_4OH, мочевина, этилендиамин, формамид), которые добавляли перед обработкой к растворам солей церия. Во всех случаях единственным продуктом синтеза был диоксид церия с размером частиц от 2,6 до 8,6 нм. Использование медленно гидролизующихся реагентов (мочевина, этилендиамин и формамид) приводит к формированию более крупных частиц CeO_2. Дополнительное влияние на микроморфологию оказывает концентрация реагентов. В частности, уменьшение концентрации осадителя способствует формированию более крупных частиц. При увеличении продолжительности синтеза также образуются более крупнокристаллические продукты. По данным работы [92], использование микроволнового нагрева в несколько раз сокращает продолжительность синтеза, однако отсутствие информации о методике проведения контрольных экспериментов не позволяет судить о правомерности подобного вывода.

Детальное изучение закономерностей роста наночастиц диоксида церия в условиях гидротермальной и гидротермально-микроволновой обработки было впервые проведено нами в работах [93, 94]. Было установлено, что динамика гидротермального роста наночастиц CeO_2 крайне чувствительна к предыстории их получения и слабо зависит от

их начального размера. Так, гидротермально-микроволновая обработка свежеосажденных суспензий CeO_2 с размером частиц 4–5 нм при 120–210°С в течение 3 ч приводит к их росту до 10–12 нм; напротив, обработка в аналогичных условиях предварительно высушенных и редиспергированных в воде образцов с аналогичной химической предысторией практически не сказывается на их размерах ($D_{ОКР}$ = 5–6 нм). Существенно различающаяся динамика роста наблюдается и для наночастиц CeO_2, синтезированных из различных прекурсоров (рис. 1.14). Учитывая крайне низкую растворимость CeO_2 в воде, можно констатировать, что рост частиц CeO_2 в гидротермальных условиях происходит преимущественно не по механизму растворения – кристаллизации, а вследствие ориентированного присоединения и последующего сращивания кристаллитов.

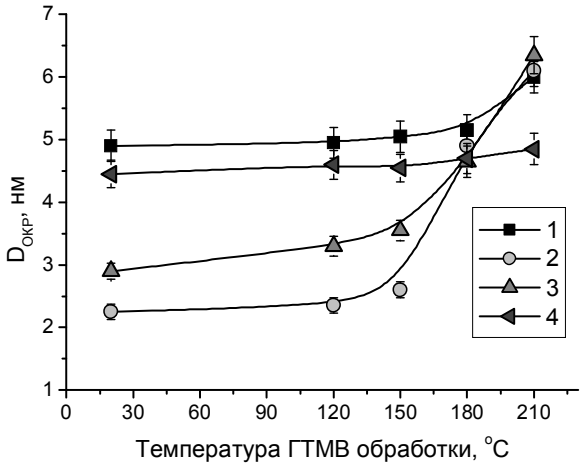
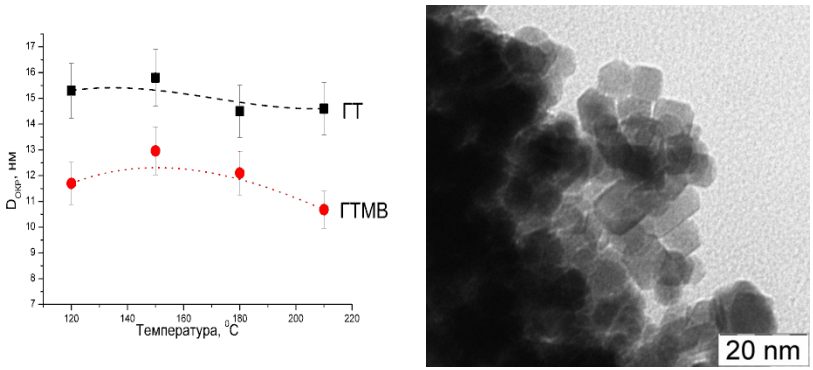


Рис. 1.14. Зависимости размеров ОКР CeO_2 от температуры ГТМВ обработки суспензий нанокристаллического диоксида церия, синтезированных осаждением из 0,08 М растворов $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (*1*), $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (*2*), $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ (*3*), $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ (*4*) [24]

Нами были впервые выполнены сравнительные исследования закономерностей роста наночастиц диоксида церия в гидротермальных и гидротермально-микроволновых условиях. По данным рентгенофазового анализа, все порошки, полученные в результате гидротермальных и гидротермально-микроволновых синтезов свежеосажденных

нейтральных суспензий диоксида церия, являются однофазными. Размеры частиц, подвергшихся гидротермальной и гидротермально-микроволновой обработке, в 2–3 раза превышают размеры частиц в исходных суспензиях диоксида церия.

Результаты экспериментов по гидротермальной и гидротермально-микроволновой обработке суспензий при 120, 150, 180 и 210°С в течение 3 ч показаны на рис. 1.15. Видно, что повышение температуры гидротермальной (гидротермально-микроволновой) обработки свежеосажденных суспензий диоксида церия не приводит к существенному изменению размеров частиц. Размеры кристаллитов CeO_2, полученных в условиях гидротермальной обработки, составляют 15–16 нм, кристаллитов CeO_2, полученных в условиях гидротермально-микроволновой обработки, – 10–13 нм. Таким образом, размеры ОКР для образцов различных серий значимо различаются: размеры частиц CeO_2, полученных в условиях гидротермально-микроволновой обработки, существенно меньше аналогичных величин для гидротермальных образцов. Указанный вывод подтверждается также данными ПЭМ. Отметим, что варьирование продолжительности синтеза также практически не сказывается на размерах частиц CeO_2. Неизменность размеров частиц при варьировании продолжительности синтеза дополнительно свидетельствует о малой растворимости нанодисперсного CeO_2 в гидротермальных средах.



а *б*

Рис. 1.15. Размеры кристаллитов в нанопорошках CeO_2, синтезированных в гидротермальных (ГТ) и гидротермально-микроволновых условиях (продолжительность обработки 3 ч) (*а*); микрофотография образца CeO_2, синтезированного ГТМВ обработкой при 210°С в течение 3 ч (*б*) [24]

Сравнительное изучение распределения частиц по размерам (по данным ПЭМ, со статистической обработкой для 200–300 частиц) для образцов диоксида церия, полученных в условиях гидротермальной и гидротермально-микроволновой обработки, показало, что использование микроволнового излучения приводит к образованию частиц с более узким распределением по размерам. На характер распределения по размерам влияют также температура и продолжительность обработки.

Следует отметить, что величины эффективных коэффициентов диффузии в микроволновом поле обычно существенно возрастают; таким образом, если бы рост наночастиц CeO_2 в гидротермальных условиях происходил по механизму растворения–кристаллизации, то размеры частиц, получаемых в условиях микроволнового воздействия, должны были превосходить размеры частиц в контрольных синтезах. Тем не менее в действительности имеет место обратная зависимость. Таким образом, на основании приведенных нами данных можно высказать гипотезу о том, что рост частиц диоксида церия в гидротермальных средах также происходит по механизму ориентированного присоединения.

С использованием метода малоуглового рассеяния нейтронов были получены первые прямые экспериментальные подтверждения высказанной выше гипотезы [94].

Для получения исходного образца нанодисперсного диоксида церия раствор нитрата церия(III) (0,08 М) в смеси вода:изопропанол (1:1) при интенсивном перемешивании быстро добавляли в водный раствор аммиака (3 М), взятый в пятикратном мольном избытке, выдерживали в течение 3 ч при комнатной температуре. Гидротермально-микроволновую обработку суспензий диоксида церия в дистиллированной воде проводили в течение 3 ч при 120, 150, 180 и 210°С, а также в течение 15 мин при 120 и 210°С. Обработку данных малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) проводили по стандартной методике, для преобразования кривых МУРН в функции распределения по размерам использовали программу SANSFIT [95, 96].

Согласно данным РФА, гидротермально-микроволновая обработка суспензий предварительно высушенных (60°С) нанопорошков CeO_2 с нитратной предысторией при 120–180°С не приводит к увеличению размеров ОКР ($D_{ОКР} \approx 5$ нм). Незначительное увеличение $D_{ОКР}$ (до 6 нм) наблюдается лишь при повышении температуры и про-

должительности обработки до 210°С и 3 ч соответственно (табл. 1.3). Данные низкотемпературной адсорбции азота свидетельствуют о том, что величина удельной поверхности нанопорошков диоксида церия практически не зависит от условий ГТМВ обработки и составляет 130–150 $м^2/г$.

Таблица 1.3

Размеры ОКР для образцов CeO_2, синтезированных гидротермально-микроволновым методом [94]

Обозначение образца	Температура и продолжительность ГТМВ обработки	D_{111}, нм	D_{200}, нм
Ce-1 (исходный образец)	–	5,0	4,8
Ce-120-15	120°C, 15 мин	5,0	4,9
Ce-120-180	120°C, 180 мин	5,0	4,9
Ce-150-180	150°C, 180 мин	5,1	5,0
Ce-180-180	180°C, 180 мин	5,2	5,1
Ce-210-15	210°C, 15 мин	5,2	5,0
Ce-210-180	210°C, 180 мин	6,1	5,9

На рис. 1.16 в двойном логарифмическом масштабе представлены экспериментальные зависимости сечения малоуглового рассеяния нейтронов $d\Sigma(q)/d\Omega$ для исходного образца CeO_2, а также образцов, подвергнутых гидротермально-микроволновой обработке при 210 °С в течение 15 мин и 3 ч.

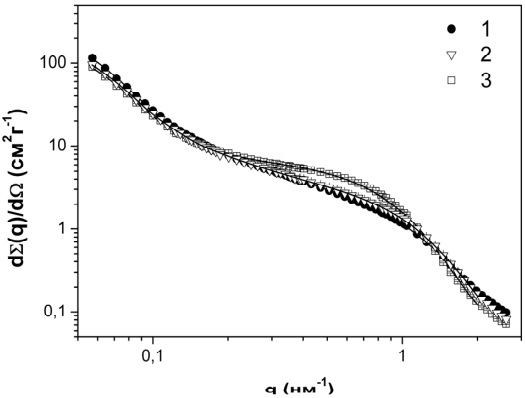


Рис. 1.16. Зависимости сечения $d\Sigma(q)/d\Omega$ МУРН образцами Ce-1 (*1*), Ce-210-15 (*2*) и Ce-10-180 (*3*) от переданного импульса q [94]

Из анализа кривых МУРН можно восстановить функцию распределения по размерам $D_V(R)$ рассеивающих неоднородностей (частиц). Для оценки функции $D_V(R)$ нами было использовано косвенное Фурье-преобразование [95, 96], которое отличается меньшей чувствительностью к обрыву при малых радиусах, имеющему место в реальных системах. Полученные функции распределения по размерам частиц $D_V(R)$ для образцов, синтезированных при различных температурах и продолжительностях ГТМВ обработки, представлены на рис. 1.17. Из приведенных данных следует, что для всех исследованных образцов диоксида церия характерно бимодальное распределение наночастиц по размерам, при этом положение второго максимума примерно соответствует удвоенному значению размера частиц для первого максимума на кривых распределения.

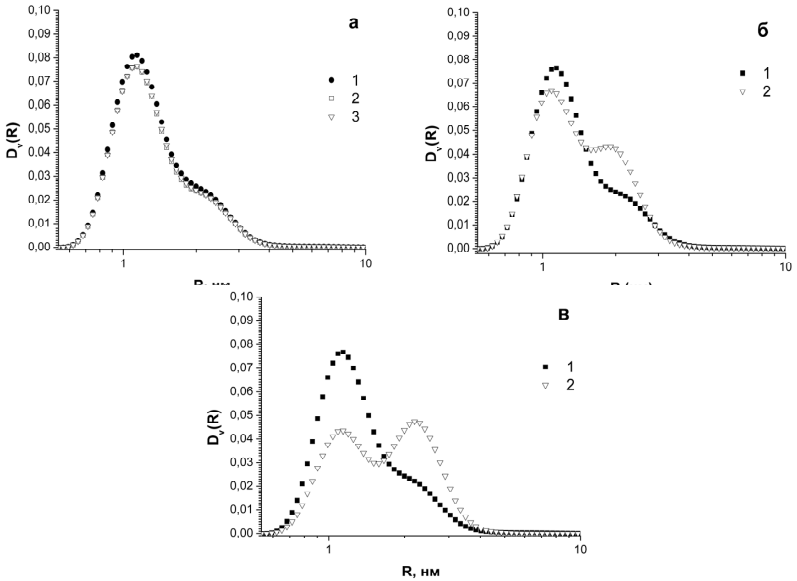


Рис. 1.17. Функции распределения по размерам частиц *DV(R)* для образцов, синтезированных при различных температурах и продолжительностях ГТМВ обработки (*а* – образцы Се-1 (*1*), Се-120-15 (*2*) и Се-120-180 (*3*); *б* – образцы Се-120-15 (*1*) и Се-210-15 (*2*); *в* – образцы Се-120-180 (*1*) и Се-210-180 (*2*)) [94]

Следует отметить, что гидротермально-микроволновая обработка исходного образца диоксида церия при 120°С в течение 15 мин и 3 ч

не приводит к значимому изменению распределения частиц по размерам (рис. 1.17, *а*). В свою очередь 15-минутная обработка при 210°С ведет к увеличению объемной доли более крупных частиц с одновременным уменьшением доли мелких частиц, соответствующих первому максимуму на кривой распределения (рис. 1.17, *б*). Наконец, увеличение продолжительности ГТМВ обработки при этой температуре до 3 ч способствует еще более ярко выраженному уменьшению высоты первого максимума и соответствующему увеличению высоты второго максимума на кривой распределения.

Указанные изменения микроморфологии порошков CeO_2 при увеличении температуры и продолжительности гидротермальной обработки не могут быть объяснены в рамках модели оствальдова созревания (и, в частности, механизма растворения – кристаллизации). Действительно, при росте частиц по этому механизму должно происходить постепенное смещение максимума на кривой распределения в область бóльших размеров, чего в данном случае не наблюдается. Вместе с тем характер изменения кривых распределения частиц по размерам хорошо согласуется с моделью роста частиц по механизму ориентированного присоединения. Об этом, в частности, могут свидетельствовать а) неизменность положения первого максимума на кривых распределения, б) особенности взаимного расположения первого и второго максимумов на кривых распределения (удвоение размеров частиц) и в) изменение относительного вклада первого и второго максимумов при увеличении температуры и продолжительности ГТМВ синтеза.

Данные МУРН дополнительно подтверждаются результатами анализа микрофотографий образцов диоксида церия. Так, по данным ПЭМ, частицы CeO_2 способны взаимно ориентироваться друг относительно друга с образованием плоскопараллельных границ и срастаться, образуя вытянутые частицы неправильной формы. Отметим, что образование анизотропных частиц диоксида церия по механизму растворения – кристаллизации невозможно, поскольку данное соединение кристаллизуется в кубической сингонии.

Гидротермальный синтез одномерных наноструктур диоксида церия

Формирование анизотропных наночастиц, в частности при синтезе методами «мягкой» химии, свойственно веществам, характеризую-

щимся анизотропией кристаллической структуры, например ZnO и CdSe. Напротив, для веществ, имеющих высокосимметричную (в том числе кубическую) кристаллическую структуру, синтез одномерных (1D) наноструктур обычно проводят с использованием ПАВ либо в пористых твердофазных матрицах [77]. Тем не менее в последние годы был предложен ряд методик гидро- и сольвотермального получения наностержней диоксида церия как в присутствии структурообразующих реагентов, так и в их отсутствие [97]. Общим для всех методик является то, что синтез одномерных структур CeO_2 проводится в щелочных и сильнощелочных средах. Можно предположить, что это условие является критическим для образования наностержней диоксида церия.

Механизм роста 1D наноструктур CeO_2 в гидро- и сольвотермальных условиях достоверно не установлен. Существуют три основные модели формирования наностержней диоксида церия:

1) топотактическое наследование структуры твердофазных прекурсоров;

2) рост частиц по механизму растворения – кристаллизации (оствальдово созревание);

3) ориентированное присоединение изотропных кристаллитов с образованием анизотропных наноструктур.

В работах [98–101] предложен оригинальный двухстадийный метод синтеза наностержней CeO_2 с контролируемым размером частиц, включающий стадию осаждения при выбранной температуре (70 и 90°C) с последующей выдержкой полученной суспензии при низких температурах. Осадок, выделяющийся в первые минуты после смешения растворов, представляет собой смесь кристаллических фаз диоксида церия и гидроксида церия(III); частицы преимущественно имеют форму стержней, характерную для $Ce(OH)_3$. При старении реакционной смеси при 0°C дифракционные максимумы, характерные для $Ce(OH)_3$, исчезают лишь при увеличении продолжительности синтеза до 20 ч. По данным просвечивающей электронной микроскопии, формирующиеся при этом частицы CeO_2 также имеют форму стержней диаметром 8–10 нм и длиной более 200 нм и состоят из множества более мелких частиц. По мнению авторов, наностержни CeO_2 наследуют форму исходных наностержней $Ce(OH)_3$ по топотактическому механизму.

Гипотеза о формировании одномерных наноструктур CeO_2 вследствие наследования структуры прекурсоров находит подтверждение в работе [102], в которой получали наностержни $Ce(OH)_3$ (диаметр 15–25 нм и длина в несколько сотен нанометров) при гидротермальной обработке суспензий, формирующихся при смешении водных растворов $Ce_2(SO_4)_3$ и NaOH. При выдерживании образцов на воздухе фиксировали постепенное окисление $Ce(OH)_3$ с образованием CeO_2, при этом продукт сохранял форму наностержней. Предложена также оригинальная методика получения нанотрубок CeO_2, основанная на обработке частично окисленных наностержней $Ce(OH)_3$ пероксидом водорода (рис. 1.18) [102].

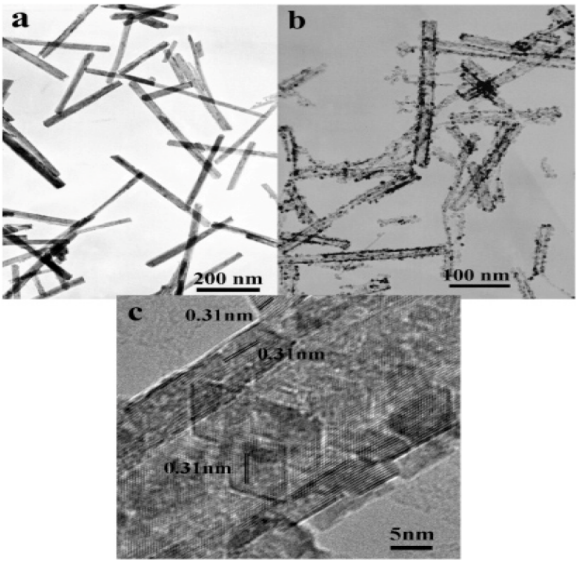


Рис. 1.18. Просвечивающая электронная микроскопия одномерных частиц $Ce(OH)_3$ (*a*) и полученных из них наночастиц CeO_2 (*b, c*) [102]

Согласно результатам экспериментов [98–103], наследование микроструктуры может быть одним из ключевых (хотя, вероятно, не единственным) факторов, определяющих форму наночастиц CeO_2.

Существенно менее обоснованной представляется гипотеза об образовании одномерных наноструктур CeO_2 исключительно вследствие роста частиц CeO_2 по механизму растворения – кристаллизации. Так, авто-

ры [104] считают, что формирование различных по форме и размерам частиц (наностержней при умеренных температурах и изотропных частиц при более высоких температурах) полностью определяется зависимостью растворимости CeO_2 от температуры: в том случае, если температура синтеза относительно невелика, концентрация растворенного диоксида церия будет мала и рост частиц будет происходить только вдоль определенных кристаллографических направлений. Согласно другой точке зрения [105, 106], определяющую роль в формировании анизотропных частиц CeO_2 по механизму растворения – кристаллизации играют анионы, сорбирующиеся на поверхности наночастиц и препятствующие росту вдоль определенных кристаллографических направлений.

Еще один возможный механизм образования одномерных наноструктур диоксида церия основан на явлении ориентированного сращивания кристаллитов [107–110]. В работе [111] было установлено, что коллоидные частицы диоксида церия, полученные при обработке смеси растворов нитрата церия(III) и алкиламинов (либо гидроксида калия) в этаноле в гидротермальных условиях (180°C, 24 ч), при слипании способны взаимно ориентироваться по отношению друг к другу с образованием цепочечных агрегатов. При введении в реакционную смесь поливинилпирролидона ориентированность частиц заметно возрастает и отдельные частицы срастаются в монокристаллические «нанопроволоки» (рис. 1.19).

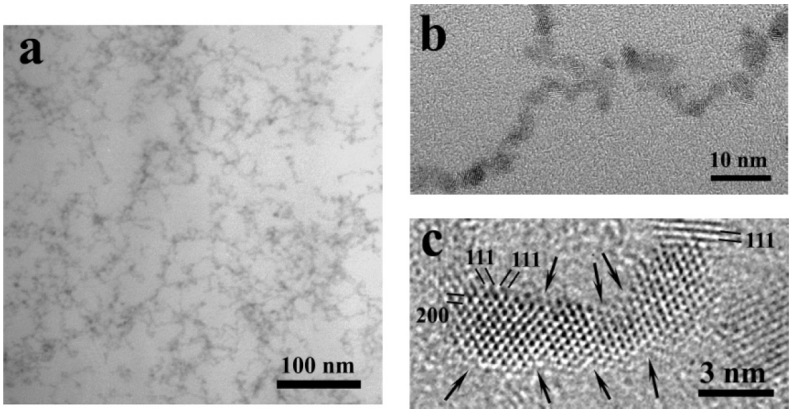


Рис. 1.19. Микрофотографии образцов диоксида церия, полученных в присутствии поливинилпирролидона при 180°C в течение 24 ч [110]

Первые экспериментальные результаты, подтверждающие механизм ориентированного присоединения в отсутствие структурообразующих реагентов в сильнощелочных средах [111], показали, что при гидротермальной обработке суспензий, образующихся при смешении водных растворов $Ce(NO_3)_3$ и NaOH, нагретых до кипения, формируются монокристаллические наностержни диоксида церия, которые растут вдоль направлений (211) и (110). Серия дополнительных экспериментов позволила установить, что промежуточной стадией образования наностержней является ориентированное сращивание изотропных наночастиц CeO_2. Сформировавшиеся агрегаты неправильной формы при последующей гидротермальной обработке подвергаются рекристаллизации. Вероятная схема процесса показана на рис. 1.20.

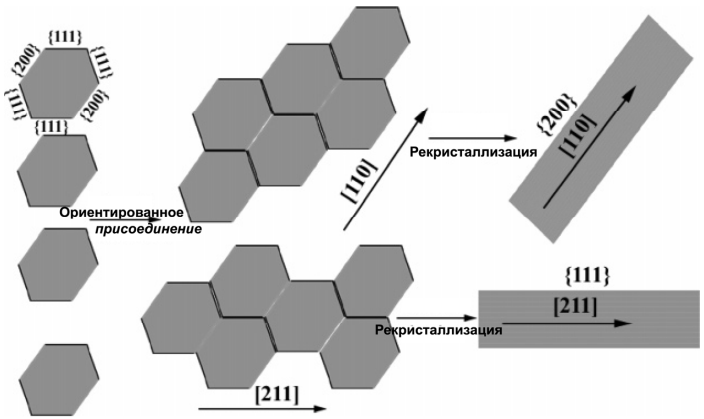
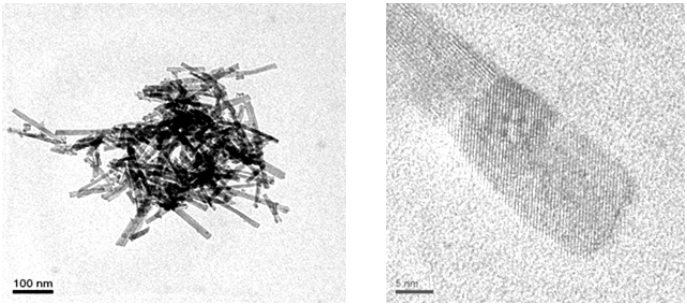


Рис. 1.20. Предполагаемая схема формирования наностержней диоксида церия по механизму ориентированного присоединения изотропных кристаллитов и последующего оствальдова созревания [111]

Анализ данных просвечивающей электронной микроскопии серии образцов, полученных нами в условиях гидротермальной и гидротермально-микроволновой обработки в щелочных средах, позволяет сделать вывод о том, что в выбранных условиях (120–230 °С, 2–10 ч) образуются как анизотропные, так и изотропные частицы диоксида церия. Согласно данным ПЭМ, размеры и анизотропия наночастиц в существенной степени зависят от условий обработки. В частности,

образцы диоксида церия, полученные при температуре 120°С и различной продолжительности (2–10 ч) гидротермально-микроволновой обработки, состоят преимущественно из анизотропных частиц. При повышении температуры синтеза до 150°С микроморфология образцов существенно не меняется, однако увеличение продолжительности обработки при этой температуре до 6 ч приводит к формированию частиц кубической формы, а также небольшого количества нанотрубок и наностержней.

Аналогичные результаты наблюдаются и при дальнейшем повышении температуры до 180°С. Синтез при 230°С ведет к образованию крупных полидисперных наностержней диаметром до 50–60 нм, а также более мелких изотропных частиц. Совокупность приведенных данных позволяет констатировать, что оптимальный температурный диапазон гидротермального синтеза наностержней составляет 120–150°С, а продолжительность синтеза может ограничиваться 3–6 ч. Микрофотографии получаемого в таких условиях продукта представлены на рис. 1.21.



а *б*

Рис. 1.21. Микрофотографии ПЭМ (*а*) и ПЭМВР (*б*) образца диоксида церия, полученного в гидротермально-микроволновых условиях при 120°С в течение 6 ч (C_{NaOH} = 5 М)

Согласно данным РФА, повышение температуры и продолжительности гидротермальной обработки приводит к заметному увеличению размеров ОКР диоксида церия как при гидротермальной, так и при гидротермально-микроволновой обработке (рис. 1.22). Из полученных данных следует, что величины ОКР с повышением температуры ГТМВ обработки возрастают вдоль всех трех указанных кристалло-

графических направлений, что в целом свидетельствует против гипотезы о росте наностержней CeO_2 по механизму растворения – кристаллизации.

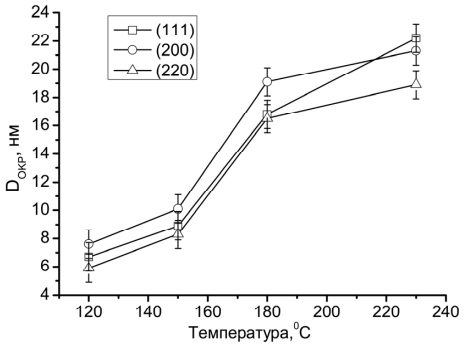


Рис. 1.22. Зависимость величин $D_{ОКР}$ CeO_2 от температуры гидротермально-микроволновой обработки в течение 3 ч в щелочных средах

Более того, определенные на основании данных РГА коэффициенты анизотропии ($K=D_{ОКР(111)}/D_{ОКР(220)}$) для всех образцов, синтезированных в щелочных средах, практически не зависят ни от температуры, ни от продолжительности синтеза и варьируют лишь в небольших пределах (0,9–1,2). Таким образом, наиболее вероятным представляется формирование наностержней по механизму ориентированного присоединения. Действительно, при изучении образцов диоксида церия, полученных в условиях гидротермально-микроволновой обработки, методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения было обнаружено, что некоторые из образовавшихся наностержней CeO_2 являются составными. Вместе с тем целый ряд наностержней не имеет блочной структуры. Образование таких наностержней можно объяснить в рамках гипотезы о том, что частицы CeO_2 наследуют форму частиц гидроксида церия(III) в результате топотактической реакции окисления и дегидратации последнего. Очевидно, что при подобном механизме образования наностержней их размеры будут определяться размерами наностержней $Ce(OH)_3$, а последние, в свою очередь, будут зависеть от растворимости $Ce(OH)_3$ в гидротермальной среде. Для подтверждения данного предположения нами были проведены дополнительные эксперименты по гидротер-

мально-микроволновой обработке суспензий с увеличенной концентрацией NaOH. По данным ПЭМ, в результате такого изменения условий синтеза наблюдается образование преимущественно наностержней, диаметр которых составляет ~20 нм, с крайне незначительной примесью изотропных частиц CeO_2.

Таким образом, совокупность данных ПЭМ, ПЭМВР и РГА позволяет утверждать, что в щелочных средах анизотропные наночастицы CeO_2 образуются по смешанному механизму, включающему стадию растворения – кристаллизации (об этом, в частности, свидетельствует зависимость размера и формы частиц от концентрации щелочи) и стадию ориентированного присоединения сформировавшихся изотропных и анизотропных частиц CeO_2.

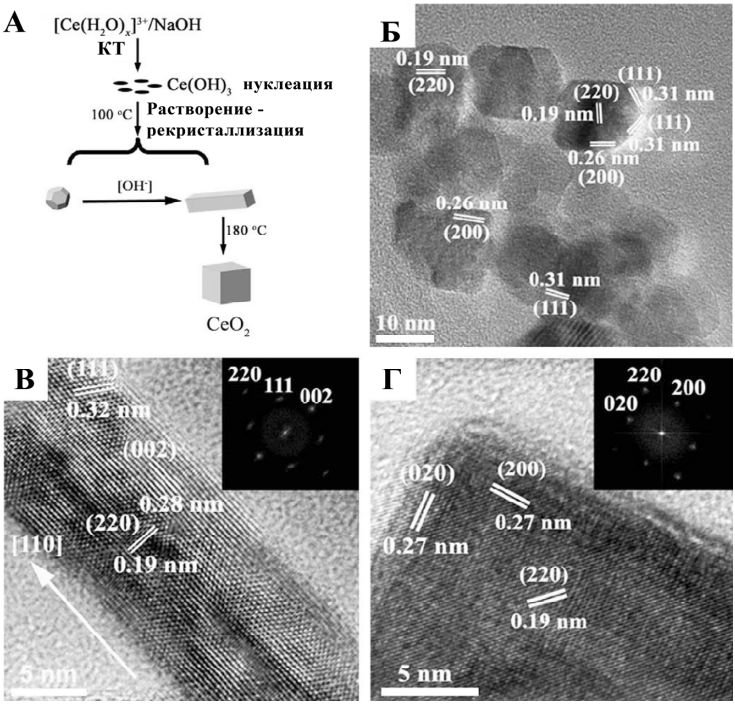


Рис. 1.23. Механизм роста наночастицы CeO_2 при низких температурах (*А*). Микрофотографии высокого разрешения: полиэдрические наночастицы (*Б*); наностержни (*В*); нанокубы (*Г*) [103]

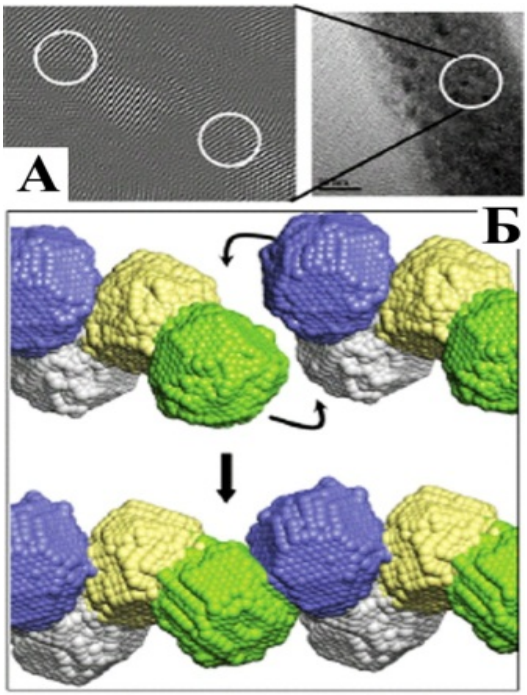


Рис. 1.24. Структура цепи / наностержня, образованного нанокристаллами CeO_2. Сверху: через 300 пс компьютерного моделирования; стрелками показана траектория движения зелёной и голубой частиц при соединении; внизу: конфигурация соединения через 1500 пс с начала компьютерного моделирования [112]

Как показано в ряде работ, образование одномерных структур диоксида церия возможно не только в гидротермальных условиях, но и в условиях низких температур – при сращивании наночастиц CeO_2 при комнатной температуре [103] (см. рис. 1.23) или в каналах водяного льда [112]. В процессе замораживания разбавленных водных золей диоксида церия некоторые наночастицы захватываются микро- и нанометровыми пустотами льда и объединяются за счет ориентированного присоединения. В течение длительной экспозиции (2–3 недели) формируются сверхдлинные поликристаллические наностержни диоксида церия (длиной приблизительно 3–3,5 мм и диаметром приблизительно 30 нм). Компьютерная модель, предложенная авторами

[112], иллюстрирует силы притяжения, действующие между соседними аморфными наночастицами (см. рис. 1.24).

1.4. Особенности высокотемпературного роста наночастиц диоксида церия

Совокупность приведенных в разд. 1.4 экспериментальных данных свидетельствует о том, что рост наночастиц CeO_2 в гидротермальных условиях происходит преимущественно по механизму ориентированного присоединения и сращивания кристаллитов. Не меньший теоретический и практический интерес представляет определение закономерностей и механизма роста наночастиц диоксида церия при высокотемпературных отжигах, поскольку функциональные материалы на основе CeO_2 (в первую очередь – катализаторы, сенсоры, твердые электролиты) нередко эксплуатируются при достаточно высоких температурах (>500°C).

В связи с этим в работе [113] нами было предпринято изучение закономерностей изменения размеров частиц в нанодисперсных порошках диоксида церия с различной химической предысторией при нагревании в диапазоне температур от 200 до 700°C и определение преимущественного механизма роста частиц CeO_2.

Для изучения закономерностей роста наночастиц диоксида церия при термической обработке образцы, полученные методами быстрого и гомогенного гидролиза, отжигали на воздухе при температурах 200, 300, 400, 500, 600 и 700°C в течение 2 ч (табл. 1.4). Ряд образцов был подвергнут дополнительному отжигу при этих же температурах в течение 4, 6 и 8 ч. Нагревание образцов до температур изотермической выдержки проводили со скоростью 5 град./мин.

Данные РФА образцов, подвергнутых отжигу в различных условиях, свидетельствуют о том, что отжиг образцов, полученных методом быстрого гидролиза, в течение 2 ч при 200–700°C приводит к закономерному росту размеров областей когерентного рассеяния от 3–4 до 22–24 нм (в отдельных случаях до 30 нм и более). Аналогичное поведение характерно и для порошков CeO_2, синтезированных гидролизом в присутствии мочевины, однако в этом случае конечные размеры ОКР составляют 19–20 нм (рис. 1.25). Отметим, что различная скорость роста наночастиц диоксида церия различного исходного размера при высокотемпературной обработке наблюдалась впоследствии и авторами [27] при изучении образцов CeO_2, полученных методами прямого и обратного осаждения.

Таблица 1.4

Условия синтеза и обозначения образцов диоксида церия [24]

Условное обозначение образца	Условия синтеза	Температура отжига, °С	Продолжительность отжига, ч
Ce-1-1	Быстрое осаждение водным раствором аммиака из водно-спиртового (1:1) раствора $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ (0,08 М)	200, 300, 400, 500, 600, 700	2, 4, 6, 8
Ce-1-2	Быстрое осаждение водным раствором аммиака из водно-спиртового (1:3) раствора $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ (0,08 М)	200, 300, 400, 500, 600, 700	2
Ce-1-3	Быстрое осаждение водным раствором аммиака из водно-спиртового (1:19) раствора $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ (0,08 М)	200, 300, 400, 500, 600, 700	2
Ce-1-4	Быстрое осаждение водным раствором аммиака из водного раствора $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ (0,08 М)	200, 300, 400, 500, 600, 700	2
Ce-1-5	Быстрое осаждение водным раствором аммиака из водного раствора $Ce(NO_3)_3 \times 6H_2O$ (0,08 М) с последующим сублимационным обезвоживанием	200, 300, 400, 500, 600, 700	2
Ce-2-1	Гомогенный микроволновой гидролиз $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ (0,05 М) в присутствии мочевины	400, 500	2
Ce-2-2	Гомогенный микроволновой гидролиз $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ (0,15 М) в присутствии мочевины	300, 400, 500, 700	2, 4, 6, 8
Ce-2-3	Гомогенный микроволновой гидролиз $(NH_4)_2[Ce(NO_3)_6]$ (0,4 М) в присутствии мочевины	300, 400, 500, 700	2

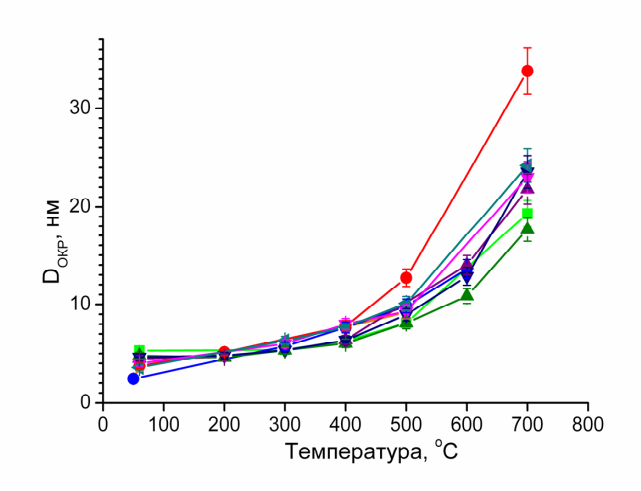


Рис. 1.25. Зависимости размеров ОКР CeO_2 от температуры отжига для образцов, синтезированных с применением различных методов быстрого и гомогенного осаждения [24]

Анализ зависимостей размеров кристаллитов в образцах диоксида церия с различной химической предысторией от продолжительности отжига в изотермических условиях показывает, что в выбранном температурном интервале (до 700°C) размеры частиц CeO_2 в пределах погрешности измерений не зависят от длительности отжига (рис. 1.26).

Наблюдаемое постоянство размеров областей когерентного рассеяния при фиксированных температурах в существенной степени отличается от диффузионного роста частиц в соответствии с классическим параболическим законом $D^2 - D_0^2 = k\tau$, движущей силой которого является избыточная поверхностная энергия, определяемая размером частиц.

Можно предположить, что неизменность размеров частиц диоксида церия при увеличении продолжительности обработки и их рост при увеличении температуры отжига обусловлены тем, что в данном случае реализуется пороговый механизм припекания кристаллитов, в целом аналогичный описанному в [114] для спекания крупнокристаллических материалов. Образовавшиеся в результате синтезов нанокристаллиты CeO_2 агрегируют с образованием спектра высоко- и малоугловых границ. Наличие различных стопоров (дефектов поверхно-

сти, контактов с другими частицами и т.д.) препятствует свободному перемещению кристаллитов относительно друг друга; при каждом повышении температуры происходит быстрое пороговое преодоление стопоров, при этом доля взаимно сориентировавшихся частиц при каждой температуре определяется как стартовым состоянием порошков, так и подведенной при нагревании энергией.

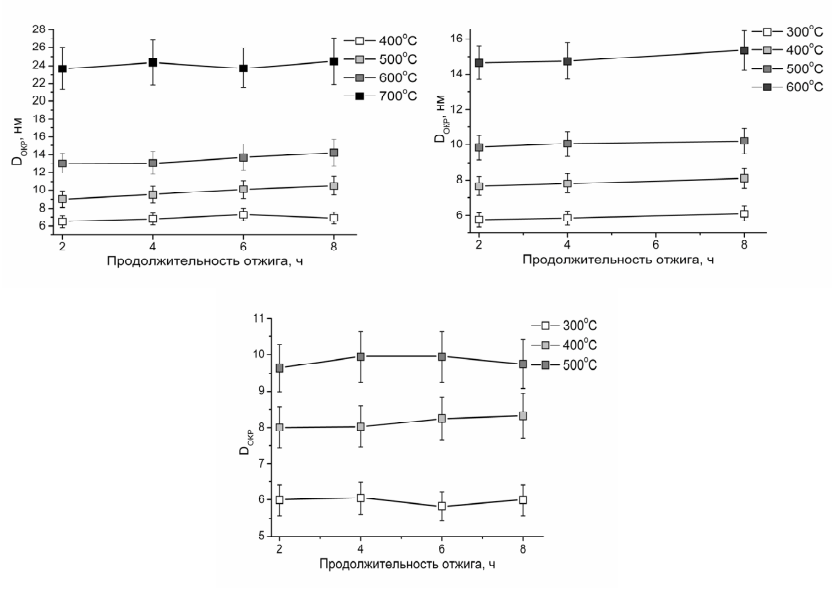


Рис. 1.26. Зависимости размеров ОКР CeO_2 от продолжительности для образцов, синтезированных с применением различных методов быстрого и гомогенного осаждения [24]

Можно приближенно считать, что при низких температурах происходит разворот частиц с наименьшей взаимной разориентацией; при повышении температуры начинается взаимное перемещение более разориентированных кристаллитов и т.д. Последующее слияние сориентированных частиц в одну более крупную частицу происходит за счет процессов поверхностной диффузии.

Как было указано выше, варьирование методик синтеза нанокристаллического диоксида церия приводит к получению образцов с одинаковыми размерами частиц, но различными величинами удель-

ной поверхности. Можно предположить, что поведение таких образцов в ходе высокотемпературного отжига будет различаться. Для проверки этого предположения были проведены изотермические отжиги образцов, полученных быстрым осаждением из водно-изопропанольных растворов нитрата церия(III) с различным содержанием спирта (1:1 и 1:3). Полученные зависимости $S_{уд}$ от температуры отжига показаны на рис. 1.27.

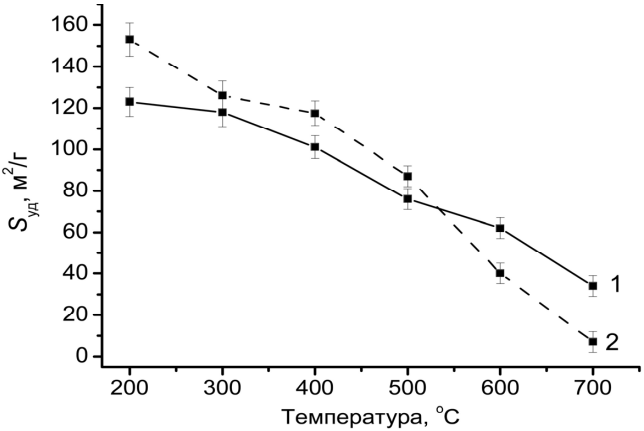


Рис. 1.27. Зависимости удельной поверхности образцов с различной предысторией от температуры изотермического отжига (*1* – Ce-1-2; *2* – Ce-1-1)

Как видно из рис. 1.27, повышение температуры отжига приводит к постепенному уменьшению удельной поверхности обоих образцов, причем характер зависимости $S_{уд}(T)$ в существенной степени определяется предысторией образцов. С учетом того, что размер частиц в исходных образцах был практически одинаковым, можно сделать вывод о том, что динамика роста в значительной степени определяется характером агрегации наночастиц.

Согласно данным низкотемпературной адсорбции азота, образец Ce-1-1 содержит существенно бóльшее количество малых пор, что свидетельствует о большем вкладе малоугловых границ между частицами CeO_2 в общую пористость образца. Анализ данных низкотемпературной адсорбции азота по методу Неймарка–Киселева показал, что этот образец характеризуется бóльшим значением фрактальной размерности поверхности в диапазоне от 0,2 до 3,5 нм (2,66 и 2,57 – для

образцов Ce-1-1 и Ce-1-2 соответственно). Это, в свою очередь, также свидетельствует о большем вкладе пор малого размера, возникающих в результате малоугловых контактов частиц, в общую пористость образца.

Из приведенной на рис. 1.28 зависимости дифференциального объема пор для образца Ce-1-2 от температуры отжига следует, что в ходе термической обработки в первую очередь наблюдается исчезновение относительно мелких пор диаметром менее 0,25 нм, тогда как положение и высота второго максимума на кривой распределения пор по размерам меняются в существенно меньшей степени. Таким образом, высокотемпературный отжиг в первую очередь приводит к постепенному исчезновению малоугловых границ между частицами CeO_2, что хорошо согласуется с описанной выше моделью роста частиц.

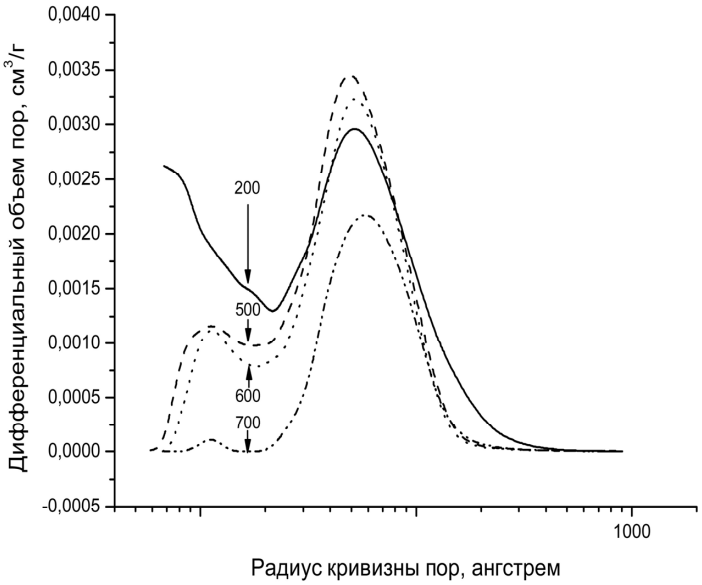
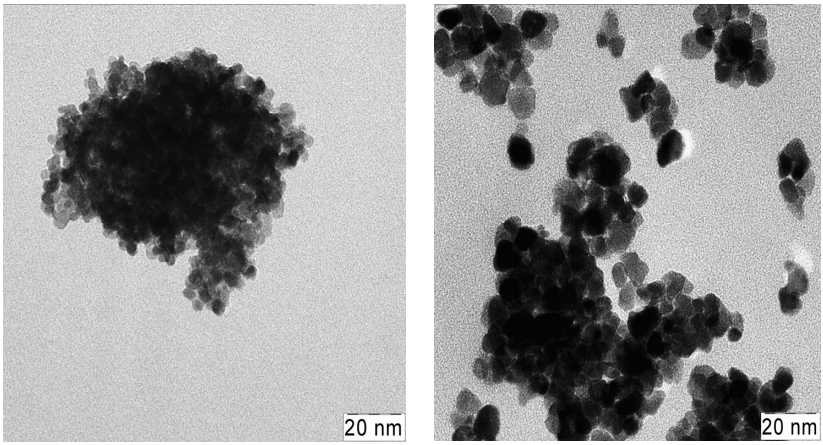


Рис. 1.28. Зависимости дифференциального объема пор для образца Ce-1-2 от температуры отжига (значения температур (°C) указаны на графике) [24]

Согласно данным электронной микроскопии отжиг образцов Ce-1-1, Ce-1-2, Ce-1-3 при температурах до 400°C не приводит к значимому увеличению размеров наночастиц. В результате отжига при 500–700°C наблюдается увеличение средних размеров частиц, хорошо

коррелирующее с зависимостями размера частиц от температуры отжига, полученными методом РФА. Отметим, что исходным образцам и образцам, отожженным при сравнительно низких (до 400°С) температурах, присуще узкое распределение частиц по размерам; в свою очередь, образцы, отожженные при 500–700°С, являются полидисперсными. Сопоставление микрофотографий исходных и отожженных образцов свидетельствует о том, что даже при наиболее высоких температурах отжига в образцах сохраняются частицы, размер которых совпадает или незначительно превосходит размеры частиц в исходных порошках CeO_2 (~4 нм) (рис. 1.29).



1 *2*

Рис. 1.29. Микрофотографии образцов, синтезированных из водно-изопропанольных (1:1) растворов нитрата церия(III) и отожженных при 400°С (*1*) и 600°С (*2*)

Первые прямые данные о механизме высокотемпературного роста наночастиц диоксида церия были получены нами с использованием метода малоуглового рассеяния нейтронов [113].

На рис. 1.30 в двойных логарифмических координатах представлены зависимости сечения рассеяния $d\Sigma(q)/d\Omega$ для образцов CeO_2, полученных в результате отжига образца Ce-1-1 при температурах 60–700°С.

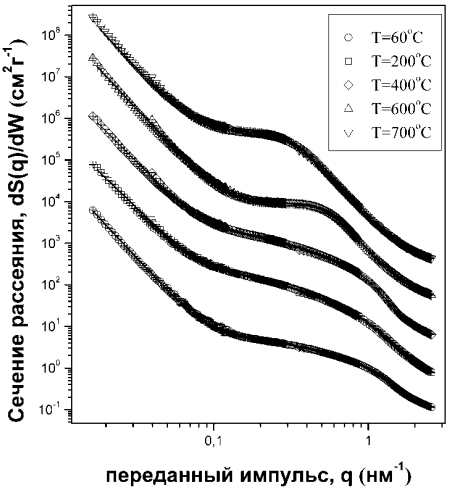


Рис. 1.30. Зависимости сечения $d\Sigma(q)/d\Omega$ МУРН образцами CeO_2, отожженными при различных температурах, от переданного импульса q. Для наглядности кривые умножены на 10 (T = 200°C), 100 (T = 400°C), 1000 (T = 600°C), 10000 (T = 700°C). Сплошные линии – аппроксимация, соответствующая реконструированным распределениям рассеивающих частиц по размерам

Из анализа кривых МУРН (см. рис. 1.30) можно восстановить функцию распределения по размерам рассеивающих неоднородностей (частиц) $D_V(R)$. Полученные функции распределения по размерам частиц $D_V(R)$ для образцов, отожженных при различных температурах, представлены на рис. 1.31. О хорошем соответствии результатов проведенного анализа экспериментальным данным свидетельствуют восстановленные из кривых рассеяния распределения $D_V(R)$ (рис. 1.31).

Согласно приведенным данным, исходный образец характеризуется достаточно узким мономодальным распределением частиц по размерам. Отжиг при 200°C приводит к появлению «плеча» на кривой распределения частиц по размерам, что, очевидно, обусловлено топотактической дегидратацией остаточных гидроксосоединений церия, ведущей к соответствующему увеличению размеров частиц CeO_2. Разложение гидроксосоединений практически полностью завершается при 400°C, после чего распределение частиц по размерам вновь становится мономодальным, а положение максимума на кривой распре-

деления частиц по размерам смещается, по сравнению с исходным образцом, в область бóльших значений на ~0,6 нм. Дальнейшая термическая обработка при более высоких (600, 700°С) температурах, при которых рост частиц надежно фиксируется как РФА, так и ПЭМ, приводит к возникновению бимодального распределения частиц по размерам. При этом положение первого максимума на кривой распределения остается практически неизменным, однако доля соответствующих частиц убывает. В свою очередь, второй максимум при увеличении температуры смещается в область бóльших размеров и становится более размытым.

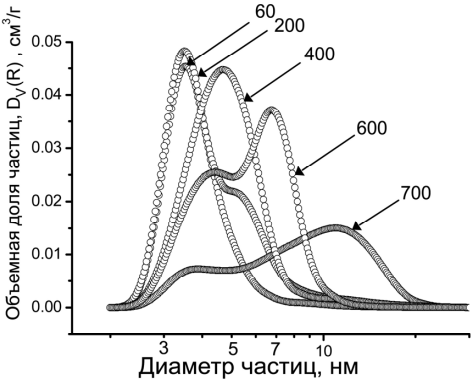


Рис. 1.31. Распределения частиц по размерам для образца Ce-1-1, отожженного при различных температурах (значения температур (°С) указаны на графике)

Данные МУРН надежно свидетельствуют о том, что рост частиц CeO_2 происходит не посредством перекристаллизации, а вследствие их последовательного сращивания. Действительно, наличие первого максимума на кривых распределения по размерам для образцов, отожженных при 600 и 700°С, показывает, что малые частицы, размер которых соответствует размеру частиц в исходных образцах, сохраняются даже при высокотемпературном отжиге CeO_2, а их доля постепенно убывает. Заметим, что рекристаллизация частиц по механизму Оствальда должна была приводить к смещению и размыванию основного (первого) максимума на кривой распределения частиц по размерам, чего в данном случае не наблюдается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что процессами роста наночастиц диоксида церия можно управлять за счет изменения характера их агрегации. В частности, увеличение разориентированности кристаллитов в нанопорошках CeO_2 может способствовать увеличению термической стабильности последних. Для проверки этой гипотезы нами было впервые проведено исследование влияния высокотемпературных отжигов на кристаллическую структуру и микроморфологию нанопорошков диоксида церия, синтезированных криохимическим методом [115].

Согласно данным РФА, продуктом синтеза как при сублимационном обезвоживании, так и при высушивании на воздухе осадков, образующихся при смешении водных растворов нитрата церия(III) и аммиака, является однофазный диоксид церия. Размеры ОКР и величины удельной поверхности для обоих образцов (криохимического и контрольного) совпадают (4,7±0,5 нм и 152±10 $м^2/г$ соответственно).

Как следует из данных, представленных на рис. 1.32, поведение образцов криохимической и контрольной серии при высокотемпературном отжиге различается.

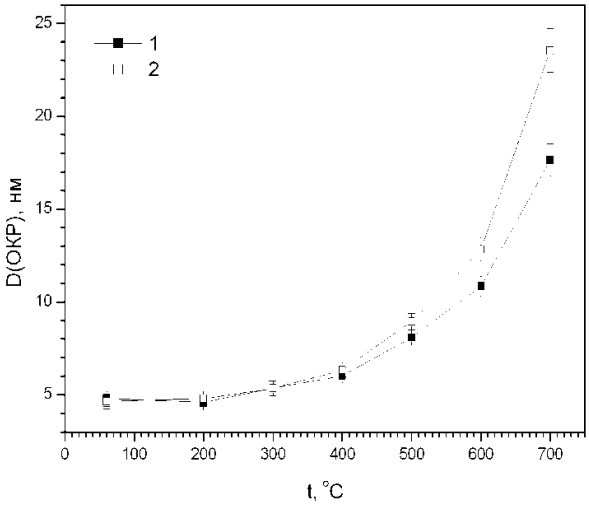


Рис. 1.32. Зависимости размеров ОКР CeO_2 от температуры отжига для образцов, полученных криохимическим методом (*1*), и контрольных образцов (*2*) [148]

Повышение температуры отжига в обоих случаях приводит к монотонному увеличению размеров частиц до 18–24 нм, однако в диапазоне температур 500–700°С, отвечающем наиболее значимому росту наночастиц диоксида церия, размеры частиц CeO_2 в порошках с криохимической предысторией оказываются существенно меньше размеров частиц в контрольной серии (рис. 1.32). Аналогичная тенденция наблюдается и по данным низкотемпературной адсорбции азота (рис. 1.33): во всем указанном температурном диапазоне величины удельной поверхности для образцов криохимической серии превосходят аналогичные величины для образцов контрольной серии (при 700°С – более чем в два раза).

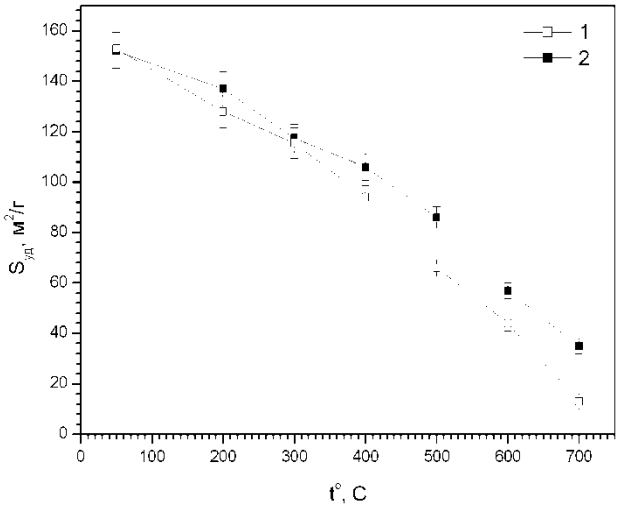
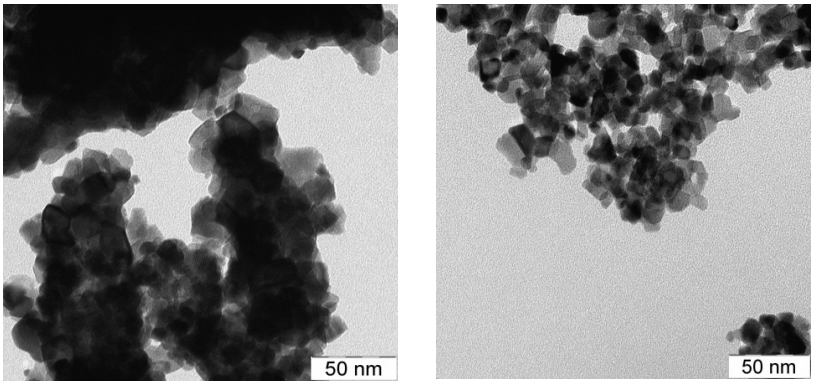


Рис. 1.33. Изменение удельной поверхности
контрольных образцов (*1*) и образцов, полученных криохимическим методом (*2*),
при высокотемпературном отжиге [115]

Полученные результаты противоречат механизму рекристаллизации по Оствальду, согласно которому рост частиц обусловлен различиями в радиусах кривизны поверхности частиц. Тем не менее такое поведение системы хорошо согласуется с моделью роста частиц по механизму ориентированного присоединения; действительно, в рамках этой модели сращивание частиц в случае их значительной разори-

ентации может быть затруднено даже при высоких температурах. При обычном высушивании на воздухе влажных порошков диоксида церия постепенное удаление воды из межкристаллитных пор приводит к тому, что силы капиллярного давления стягивают кристаллиты. Напротив, при быстром замораживании водных суспензий CeO_2 в жидкий азот с последующим сублимационным удалением воды действие капиллярных сил незначительно и кристаллиты остаются более разориентированными, что, очевидно, препятствует их росту и соответствующему уменьшению удельной поверхности в ходе последующего высокотемпературного отжига.

Указанный эффект наглядно иллюстрируется данными ПЭМ (рис. 1.34): как следует из приведенных микрофотографий, образец контрольной серии, отожженный при 700°С, состоит из достаточно крупных частиц, образующих компактные агрегаты, характеризующиеся малой пористостью, в то время как отжиг образца с криохимической предысторией при той же температуре приводит к образованию более мелких частиц, объединенных в ажурные агрегаты.



а *б*

Рис. 1.34. Микрофотографии образцов диоксида церия, полученных в результате отжига при 700°С в течение 2 ч (*а* – контрольный образец; *б* – образец с криохимической предысторией) [115]

Дополнительным подтверждением высказанной выше гипотезы о механизме роста наночастиц CeO_2 служит тот факт, что даже при наиболее высоких температурах в составе агрегатов сохраняются частицы, размер которых совпадает или незначительно превосходит размеры частиц в исходных порошках CeO_2 (см. рис. 1.34).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что рост частиц в нанопорошках диоксида церия при высокотемпературном отжиге в существенной степени определяется их предысторией. Показано, что применение криохимической обработки способствует формированию нанопорошков CeO_2, характеризующихся повышенной термической стабильностью.

1.5. Коллоидные растворы нанокристаллического диоксида церия

Для дозированного применения препаратов на основе диоксида церия обычно необходимы агрегативно-устойчивые золи CeO_2, в связи с чем возрастает потребность в разработке методов их синтеза. Как правило, для повышения растворимости и устойчивости коллоидных растворов наночастиц CeO_2 используют различные добавки или покрытия. Так, наночастицы CeO_2, покрытые оболочкой полианилина, получали в работе [116] непосредственным окислением анилина диоксидом церия; поверхность наночастиц при этом содержала преимущественно Ce^{3+}. Авторы работы [117] получали наночастицы диоксида церия сонохимическим методом, используя в качестве стабилизатора гидроксид тетраалкиламмония. Тем не менее наночастицы диоксида церия, стабилизированные полианилином или четвертичными аммониевыми соединениями, в целом представляют лишь теоретический интерес из-за высокой токсичности используемых стабилизаторов.

В работах [7, 118, 119] коллоидные частицы диоксида церия CeO_2 синтезировали в обратных микроэмульсиях. В работах [7, 118] использовали систему «гептан / водный раствор $CeCl_3$ или $Ce(NO_3)_3$», стабилизированную АОТ (бис[2-этилгексил]сульфосукцинат натрия), DDAB (дидодецилдиметиламмоний бромид) или смесью DDAB + Brij35 (неионогенное ПАВ). В качестве среды для получения диоксида церия использовали также мицеллярные растворы DTAB (бромид *n*-додецилтриметиламмония) и везикулярные DDAB-системы. В результате были получены практически неагломерированные наноразмерные кристаллиты (6–13 нм) CeO_2, тогда как в отсутствие ПАВ образовывались кристаллиты размером 21 нм. Авторы [119] получали CeO_2 смешением двух эмульсий в керосине, одна из которых содержала водный раствор прекурсора (нитрата церия), вторая – водный

раствор гидроксида натрия. Синтезируемые частицы диоксида церия обладали почти сферической формой, при этом их размер (10–20 нм) определялся концентрацией растворов реагентов. В патенте [120] объединены окислительно-восстановительный и мицеллярный способы получения коллоидных частиц диоксида церия. В неполярном растворителе (толуоле) растворяли АОТ и при интенсивном перемешивании (гомогенизации) вводили водный раствор нитрата церия (III). В объеме толуола при этом образуются мицеллы, представляющие собой микрокапли водного раствора соли церия, стабилизированные поверхностно-активными веществами (ПАВ).

Использование фосфоновых кислот для стабилизации золей диоксида церия, полученных гидролизом нитрата церия(IV) при температуре 70°С, описано также в работе [121] (рис. 1.35).

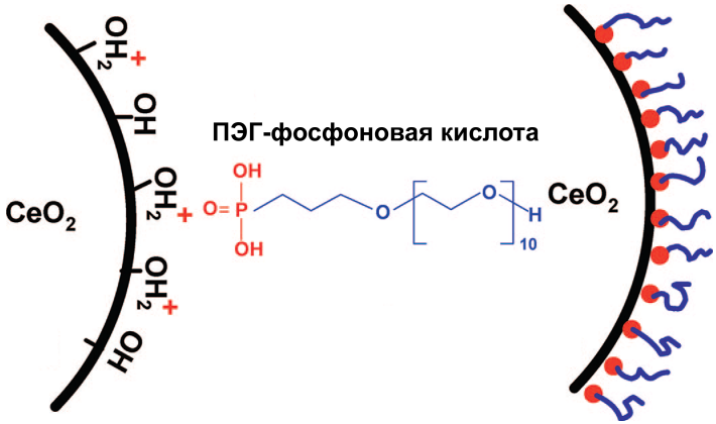


Рис. 1.35. Схема образования наночастиц диоксида церия, стабилизированных ПЭГ-фосфоновой кислотой [121]

Подобная функционализация наночастиц способствует расширению диапазона стабильности исходного золя (имеющего сильнокислую реакцию) до pH 9 и не приводит к существенному изменению их размеров. Авторы отмечают, что полученные ими стабилизированные золи после криохимической сушки могут быть полностью редиспергированы в воде или органических растворителях, сохраняя при этом высокое светопоглощение в УФ-диапазоне.

Стабильность водных золей неорганических материалов определяется в том числе и зарядом поверхности наночастиц или их

ζ-потенциалом. Авторами [122] было проведено изучение зависимостей ζ-потенциала наночастиц CeO_2, полученных методом быстрого осаждения аммиаком из нитрата церия(III), от продолжительности их выдержки в водном растворе и концентрации наночастиц. Эксперимент проводили по следующей схеме. Предварительно синтезированный и очищенный CeO_2 подвергали длительной обработке в водном растворе с заданным значением pH (3–13), после чего тщательно промывали до нейтральной реакции маточного раствора и измеряли значение ζ-потенциала. Оказалось, что как для исходного диоксида церия, так и для диоксида церия, обработанного в растворах с различным pH, с течением времени происходило уменьшение ζ-потенциала (рис. 1.36). Исходные наночастицы, а также наночастицы, предварительно выдержанные в растворах с низким значением pH (до pH 9), изначально характеризовались положительным значением ζ-потенциала, однако по прошествии примерно месяца (авторы проводили повторные измерения через 40 дней после начала эксперимента) соответствующее значение становилось отрицательным. Аналогичное изменение ζ-потенциала наблюдалось также при уменьшении концентрации наночастиц в воде, а также при повышении температуры водной дисперсии. Таким образом, положительное значение ζ-потенциала наночастиц является неустойчивым, однако, как отмечают авторы [122], оно наиболее предпочтительно для получения нанокристаллического диоксида церия, модифицированного белками.

Для целого ряда практических применений нанокристаллического CeO_2 требуются стабильные золи в неполярных растворителях. В связи с этим нами [123] была предложена методика получения маслорастворимых изотропных наночастиц CeO_2 заданного размера (в диапазоне 2–8 нм), основанная на высокотемпературном (320°C) сольволизе нитрата церия(III) в присутствии олеиламина. Для направленного изменения размеров формирующихся наночастиц нами было предложено вводить в реакционные смеси дифениловый эфир и олеиновую кислоту. Отметим, что по данным гравиметрического анализа синтезированные коллоидные растворы характеризуются высоким содержанием коллоидных частиц – массовая концентрация CeO_2 в растворе для различных образцов составила от 40 до 100 г/л. Согласно данным электронной дифракции полученные в результате синтеза образцы во всех случаях представляют собой однофазный диоксид церия со структурой флюорита.

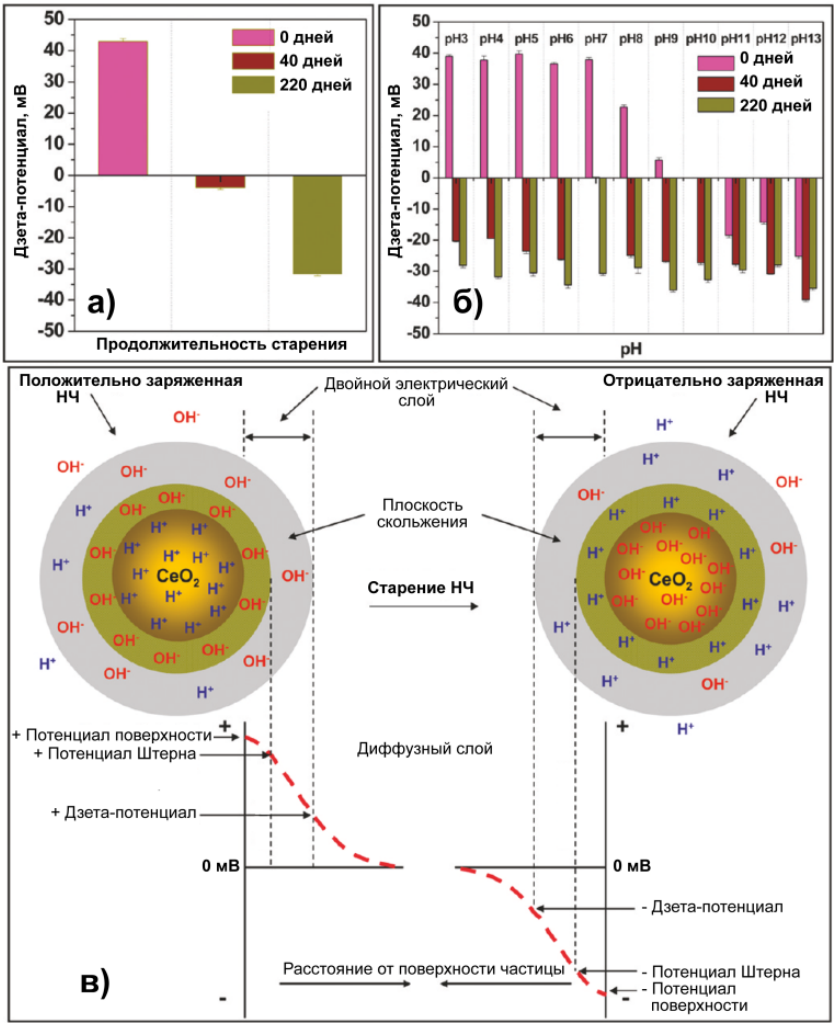
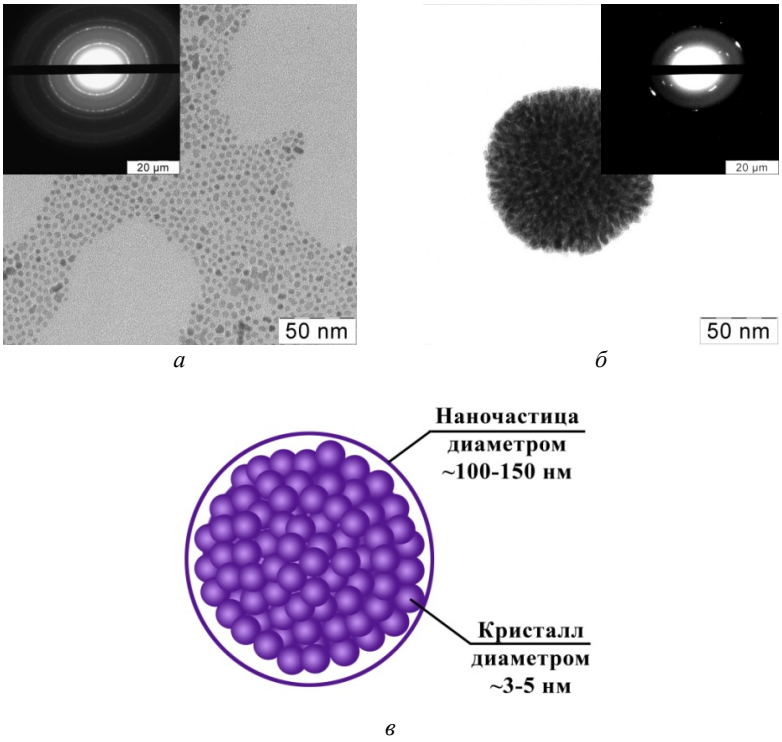


Рис. 1.36. ζ-потенциал свежеосажденных наночастиц CeO_2 (*а*) и наночастиц CeO_2, выдержанных в растворах с заданным значением pH при комнатной температуре (*б*). CeO_2 непосредственно после выдержки в кислой, нейтральной и слабощелочной средах характеризуется положительным значением ζ-потенциала, а в сильнощелочной – отрицательным. При контакте с водой с течением времени происходит изменение значения ζ-потенциала за счет замены протонов, сорбированных на поверхности, на ОН-группы (*в*) [122]

По данным ПЭМ (см. рис. 1.37, *а*), наночастицы CeO_2, синтезированные с использованием олеиламина без добавления дифенилового эфира или олеиновой кислоты, практически не агрегированы и в большинстве случаев являются изотропными. Вместе с тем отдельные частицы CeO_2 имеют неправильную форму; очевидно, что образование таких частиц непосредственно при термолизе соединений церия термодинамически невыгодно.



а *б* *в*

Рис. 1.37. Микрофотографии наночастиц диоксида церия, синтезированных без добавления дифенилового эфира и олеиновой кислоты при 320°C в течение 1 (*а*) и 6 (*б*) ч; *в* – схематическая диаграмма, иллюстрирующая микроструктуру частицы *б*

Можно предположить, что анизотропные частицы CeO_2 в неполярных средах также образуются путем ориентированного присоединения и последующего сращивания индивидуальных кристаллитов.

Данное предположение подтверждается исследованиями морфологии частиц, формирующихся в результате синтезов диоксида церия по описанной методике при значительном (до 6 ч) увеличении длительности изотермической выдержки (рис. 1.37, *б*). Эти частицы представляют собой сферические агрегаты размером от 50 до 200 нм, состоящие из первичных кристаллитов (3–8 нм). Каждый из таких агрегатов характеризуется точечной картиной электронной дифракции при полном отсутствии кольцевой дифракции, что однозначно свидетельствует о наличии взаимной ориентации составляющих агрегаты кристаллитов.

Исследования образцов коллоидных растворов диоксида церия, синтезированных с использованием олеиновой кислоты (10–50%), показали, что в результате синтеза происходит формирование сильно анизотропных наностержней диаметром 0,5–2 нм и длиной до 200 нм. При этом увеличение содержания олеиновой кислоты приводит к монотонному увеличению средней длины стержней от 33 нм (10% олеиновой кислоты) до 53 нм (20% олеиновой кислоты) при незначительном изменении их диаметров. В свою очередь добавление дифенилового эфира в реакционные смеси приводит к формированию изотропных частиц, при этом содержание сросшихся частиц значительно снижается по сравнению с синтезом в чистом олеиламине.

На рис. 1.38 приведены распределения по размерам частиц CeO_2, синтезированных в смеси олеиламина и дифенилового эфира (0–50%). Можно видеть, что при увеличении содержания дифенилового эфира в реакционных смесях от 0 до 20% наблюдается значительное снижение средних размеров частиц, вероятно, обусловленное действием дифенилового эфира как поверхностно-активного вещества. Было установлено, что выдержка таких коллоидных растворов даже в течение 6 мес. не приводит к значительному снижению ШЗЗ CeO_2, которое могло бы свидетельствовать о росте наночастиц. При этом предварительное разбавление коллоидных растворов позволяет добиться дополнительного снижения скорости агрегации частиц.

В результате когерентного сращивания можно получить наночастицы диоксида церия с невыгодным с термодинамической точки зрения габитусом, в том числе наночастицы с отверстиями, выступами и пр. (см. рис. 1.39 [24, 124]).

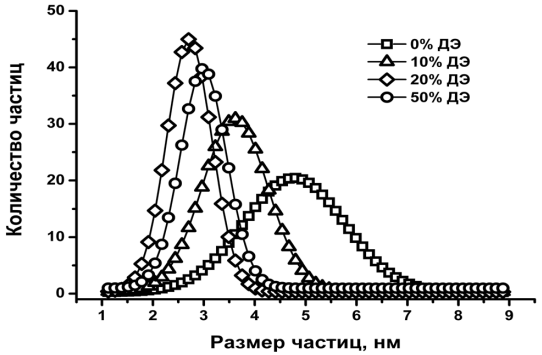


Рис. 1.38. Рассчитанные из данных ПЭМ распределения по размерам частиц CeO_2, синтезированных из растворов, содержащих олеиламин и дифениловый эфир (ДЭ) (0–50%)

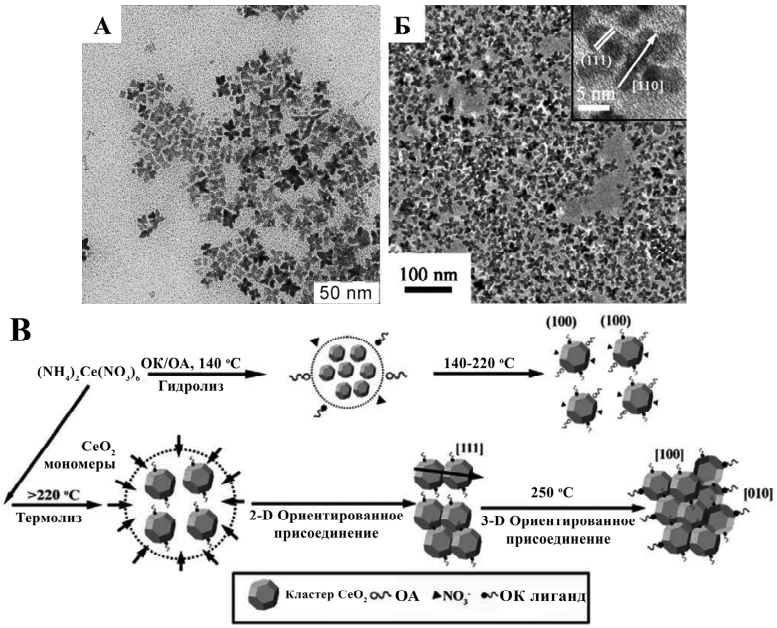


Рис. 1.39. Микрофотографии наночастиц CeO_2 звездообразной морфологии, полученных в результате когерентного сращивания в работах [24] (*А*) и [124] (*Б*). *В* – схематическая иллюстрация роста таких частиц в присутствии лигандов – олеиламина (ОА) и олеиновой кислоты (ОК) [124]

Авторами [125] был предложен схожий метод получения золей диоксида церия с регулируемым размером частиц в октадец-1-ене, включающий нагрев ацетилацетоната или нитрата церия(III) в октадец-1-ене в присутствии олеиламина при температурах 230–315°C. Для контроля размера и ширины распределения по размерам наночастиц CeO_2 в реакционную смесь вводили гексадекан-1,2-диол, октадециламин и воду. Подобная стабилизация наночастиц диоксида церия амфифильными полимерами и олеиновой кислотой делает возможным их практически количественный перенос в водную среду и получение агрегативно устойчивых водных золей.

Интересной альтернативой описанному выше методу получения органозолей нанокристаллических твердых растворов на основе диоксида церия является предложенный авторами [126] полиольный метод, основанный на проведении осаждения в присутствии щелочи в среде кипящих гликолей (например, этиленгликоля, пропиленгликоля, диэтиленгликоля и т.д.).

С применением комплекса взаимодополняющих физико-химических методов нами [127] было установлено, что формирование однофазных твердых растворов на основе диоксида церия, допированного РЗЭ, происходит непосредственно в ходе сольвотермального синтеза в среде пропиленгликоля. Дальнейшие исследования позволили определить влияние основных параметров синтеза на распределение частиц гадолинийсодержащих твердых растворов на основе диоксида церия по размерам.

Было установлено, что увеличение продолжительности сольвотермальной обработки от 1 до 2 и 4 ч никак не сказывается на размерах наночастиц (1,5–2 нм). Это позволяет сделать вывод о том, что в выбранных условиях рекристаллизация по Оствальду или рост по механизму ориентированного присоединения кристаллитов не происходит. Введение дополнительных поверхностно-активных веществ в различных концентрациях (до 1 г/мл) также не сказывается на размерах частиц.

Значительного уменьшения размера наночастиц гадолинийсодержащих твердых растворов удается достичь при замене растворителя на диэтиленгликоль, характеризующийся более высокой температурой кипения по сравнению с пропиленгликолем (244 и 187,4°C соответственно) и обеспечивающий возможность повышения температуры синтеза до 170–175°C. Полученные таким образом золи могут

быть очищены от примесей исходных реагентов и продуктов реакции путем ультрацентрифугирования с последующей промывкой и ультразвуковым редиспергированием осадка в гликоле или воде. Подобные очищенные золи допированного диоксида церия могут быть использованы в биомедицинских приложениях, в частности в качестве антиоксидантных препаратов.

Основные методы получения наночастиц диоксида церия «снизу вверх» в растворе из молекул или ионов прекурсоров представлены на рис. 1.40 [128].

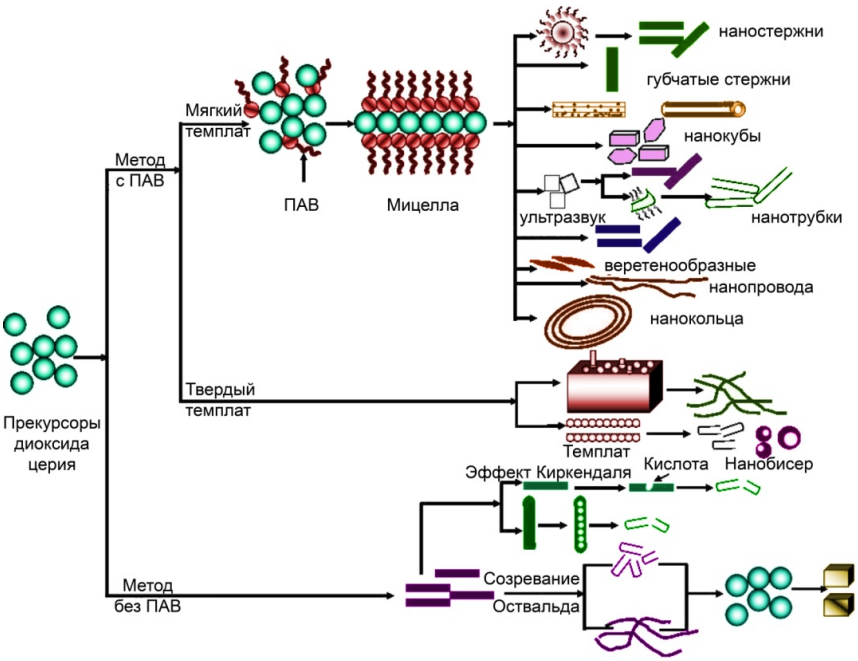


Рис. 1.40. Схема основных путей получения наноструктур диоксида церия различной морфологии [128]

Основным методом получения коллоидных растворов диоксида церия методом «сверху вниз» (из более крупных церийсодержащих материалов) является лазерная десорбция вещества, или абляция. Принципиальная схема установки лазерной абляции показана на рис. 1.41. Лазерный луч фокусируется на церийсодержащей мишени

(металлический Ce или его оксид), находящейся под слоем водного или органического растворителя; при этом с поверхности отрываются атомы (молекулы) вещества, которые в объеме растворителя формируют кластеры и наночастицы.

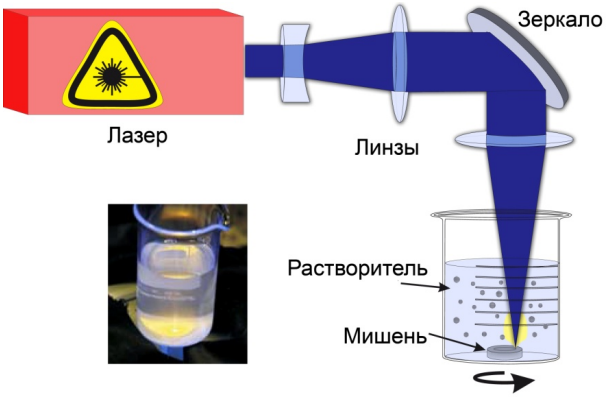


Рис. 1.41. Принципиальная схема установки лазерной абляции [129]

Так, в работе [130] наночастицы диоксида церия размером 3,6 нм получали путем лазерного разрушения субмикронных частиц CeO_2 в водном растворе поливинилпирролидона (ПВП, МВ ~60 000) (рис. 1.42). В процессе обработки лазером (длина волны 1 064 нм) происходит не только уменьшение размера частиц, но также частичное восстановление ионов Ce^{4+} до Ce^{3+}, что приводит к увеличению ширины запрещённой зоны частиц.

В работе [131] коллоидные растворы диоксида церия готовили путём лазерной абляции металлического церия пульсирующим наносекундным лазером с длиной волны 1064, 532 и 308 нм, а также фемтосекундным лазером с длиной волны 780 нм. Частицы CeO_2 легко формировались при облучении наносекундным лазером церия в чистой воде, в то время как фемтосекундный лазер приводил к образованию наночастиц оксидов церия с низкой степенью окисления. Эффективность формирования коллоидных частиц наносекундным лазером видимого и инфракрасного диапазонов была выше, чем для наносекундного ультрафиолетового и фемтосекундного лазеров (рис. 1.43).

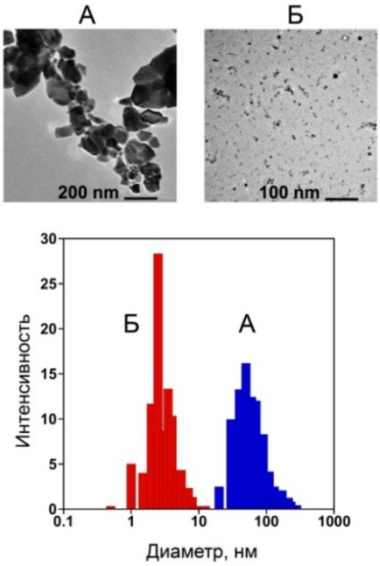


Рис. 1.42. Микрофотография (вверху) и распределение по размеру (внизу) частиц диоксида церия до (*А*) и после (*Б*) лазерной абляции в водном растворе в присутствии ПВП [130]

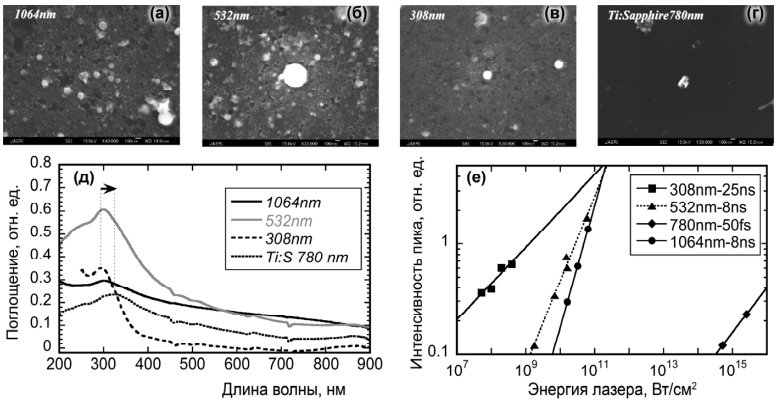
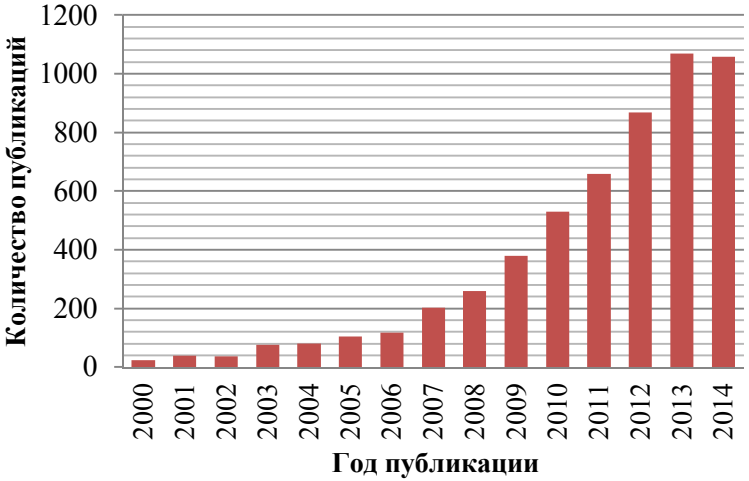


Рис. 1.43. Микрофотографии (*а–г*) и спектры поглощения (*д*) наночастиц диоксида церия, полученные лазерной абляцией металлического церия в водном растворе с использованием лазера с разной длиной волны; зависимость интенсивности пика в максимуме поглощения золя НДЦ от энергии лазера с разной длиной волны излучения [131] (*е*)

Существенными недостатками метода лазерной абляции (как и других методов синтеза наночастиц «сверху вниз», путем разрушения макроскопических объектов) является полидисперсность и неоднородность получаемых золей.

1.6. Золи нанодисперсного диоксида церия для биомедицинского применения

Начиная с пионерских исследований биологической активности коллоидных растворов диоксида церия количество публикаций по методам их синтеза возрастает; поиск в Google Scholar по ключевым словам *biomedical cerium dioxide nanoparticles synthesis* дает около семи тысяч научных публикаций (по состоянию на 01.10.2014 г.).



В работе [132] поставлен актуальный вопрос синтеза водорастворимых биосовместимых наночастиц диоксида церия. Авторы работы [133] для этих целей использовали лецитин, не обладающий цитотоксическими свойствами, при этом полученные наночастицы CeO_2 размером 3,5 нм были устойчивы в буферном растворе тринатрийцитрата. Метод получения редиспергируемых в воде наночастиц диоксида церия, основанный на взаимодействии нитрата церия(III) и этилендиамина при комнатной температуре, был предложен авторами [134].

Непосредственно в ходе взаимодействия указанных соединений происходило формирование практически монодисперсных наночастиц CeO_2 с размером 2,5±0,2 нм (по данным ПЭМВР) и гидродинамическим диаметром 4,8 нм. Дополнительная обработка получаемого золя в этилендиамине при температуре 180°С приводила к увеличению размеров частиц диоксида церия до 8 нм, при этом получаемый продукт уже не мог быть редиспергирован в воде. Обработка исходного золя при той же температуре в смеси вода / этилендиамин приводила к получению полидисперсных порошков CeO_2, в которых размер частиц составлял от 8 до 80 нм.

В качестве стабилизатора водных коллоидных растворов CeO_2 использовали также биологически совместимый полимер – декстран [135]. Полученные при этом наночастицы состояли из ядра диоксида церия диаметром 4 нм, окруженного оболочкой декстрана, и имели общий размер ~10 нм. Аналогичным образом поли- и моносахариды (декстран и глюкоза) были использованы в работе [136] для получения агрегативно устойчивых водных золей диоксида церия с размером частиц 3–17 нм как в кислой (окисление Ce^{3+} пероксидом водорода), так и в щелочной средах (окисление Ce^{3+} кислородом воздуха).

В работе [137] в качестве стабилизатора был использован альбумин куриного яйца. К сожалению, характеристики получаемого при этом геля, включающего наночастицы CeO_2, изменяются при хранении и данный продукт не представляет практического интереса. В работе [138] для стабилизации наночастиц диоксида церия применяли нетоксичный поливинилпирролидон (ПВП). Размер частиц CeO_2 зависел от молекулярной массы вводимого при синтезе полимера; к достоинству данного метода можно отнести то, что систему ПВП-CeO_2 можно сконцентрировать упариванием и редиспергировать. Следует отметить, что ПВП сорбируется на поверхности частиц диоксида церия неспецифически и не обеспечивает достаточного снижения свободной энергии поверхности для образования наночастиц малого размера. Полученный золь крупных наночастиц размером 50–120 нм малопригоден для биомедицинского применения; по мнению авторов, система может представлять интерес скорее для получения фотонных кристаллов. Использование ПВП в качестве стабилизатора и алкиламина в качестве со-стабилизатора и основания позволяет существенно снизить размер частиц, получаемых алкотермальным способом (рис. 1.44 [110, 139]).

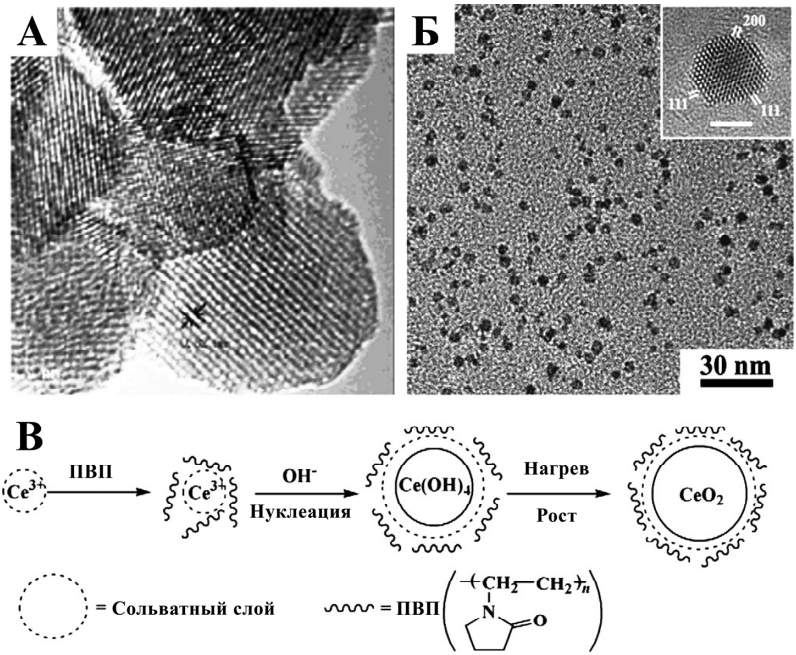


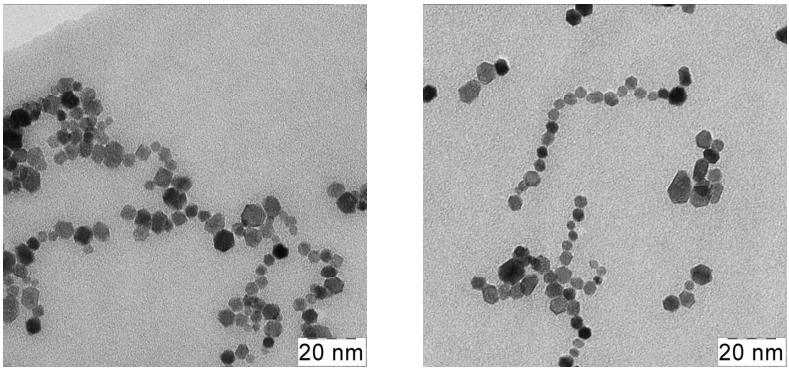
Рис. 1.44. Микрофотографии образцов диоксида церия, полученных алкотермальным методом с использованием: *А* – KOH или NaOH в качестве основания [135], *Б* – алкиламина в качестве основания в поливинилпирролидона в качестве стабилизатора [110]. *В* – алкотермальный механизм синтеза нанокристаллического CeO_2 размером 2–4 нм [110]

Для использования наночастиц диоксида церия в биомедицинских целях требуется разработка методов не только их стабилизации, но и адресной доставки к поврежденным органам (а также, желательно, и визуализации), что ставит задачу их дополнительной функционализации. Первые работы в этой области были выполнены группой исследователей под руководством С. Сила, предложивших [140] метод синтеза функциональных наночастиц диоксида церия, основанный на последовательной модификации поверхности частиц CeO_2 эпихлоргидрином и карбоксибензолсульфонамидом, блокирующим активность фермента hCAII (карбоангидразы), ведущего к развитию глаукомы. В той же работе наряду с ингибитором карбоангидразы к поверхности наночастицы был привит флуорофор (карбоксифлуоресце-

ин), что позволило проследить за поведением наночастиц CeO_2 *in vitro* и *in vivo*.

Нами был предложен оригинальный метод получения слабоагрегированных наночастиц диоксида церия, основанный на сочетании анионитной и гидротермально-микроволновой обработки, пригодный и для получения стабильных водных золей нанокристаллического диоксида церия [141, 142]. С целью обеспечения агрегативной устойчивости анионитная обработка проводится до значений pH ~9,8–9,9, благодаря чему в конечном коллоидном растворе присутствует небольшое количество нитрат-ионов, стабилизирующих наночастицы диоксида церия. Полученные таким образом золи характеризуются долговременной стабильностью (до полутора лет и более).

Анализ микрофотографий золей CeO_2, подвергшихся гидротермально-микроволновой обработке, свидетельствует о том, что в результате синтеза образуются хорошо закристаллизованные частицы, имеющие преимущественно гексагональную форму (рис. 1.45, табл. 1.5). В ряде случаев частицы взаимно ориентируются друг относительно друга, образуя линейные цепочечные агрегаты, однако степень агрегированности частиц в золях очень мала по сравнению с образцами CeO_2, получаемыми осаждением сильными основаниями из растворов солей церия.



а *б*

Рис. 1.45. Микрофотографии образцов An-130-30 (*а*) и An-190-180 (*б*) [142]

Таблица 1.5

Условия синтеза и физико-химические характеристики золей CeO_2, полученных гидротермально-микроволновым методом [142]

Обозначение образца	Температура ГТМВ обработки, °С	Продолжительность ГТМВ обработки, мин	$E_{ШЗЗ}$, эВ	Средний размер частиц (ПЭМ), нм
An-130-30	130	30	3,71±0,03	5,8
An-130-180	130	180	3,72±0,03	5,4
An-150-30	150	30	3,69±0,03	5,6
An-150-180	150	180	3,71±0,03	6,0
An-170-30	170	30	3,71±0,03	5,5
An-170-180	170	180	3,72±0,03	5,9
An-190-30	190	30	3,70±0,03	5,5
An-190-120	190	120	3,70±0,03	5,8
An-190-180	190	180	3,72±0,03	5,9

На рис. 1.46 представлены распределения частиц по размерам для золей CeO_2, синтезированных гидротермально-микроволновым методом.

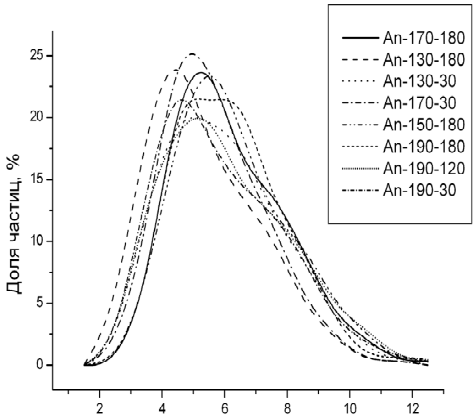


Рис. 1.46. Распределение частиц по размерам в золях CeO_2, полученных гидротермально-микроволновой обработкой при различных температурах (обозначения образцов даны на рисунке) [142]

Как следует из приведенных данных (рис. 1.46), для всех образцов характерно унимодальное логнормальное распределение. Более того,

распределение частиц по размерам в золях (в отличие от нанопорошков, полученных аналогичным комбинированным методом) остается практически неизменным как при повышении температуры, так и при увеличении продолжительности гидротермально-микроволнового синтеза. Неизменность размеров частиц CeO_2 при гидротермальной обработке золей (в особенности в условиях микроволнового воздействия, существенно увеличивающего эффективные коэффициенты диффузии ионов) в сочетании с крайне низкой растворимостью CeO_2 в воде дополнительно свидетельствует о том, что рост частиц CeO_2 в гидротермальных средах протекает не по механизму растворения – кристаллизации, а в соответствии с механизмом ориентированного присоединения кристаллитов.

Очевидно, что возможность ориентированного присоединения и последующего сращивания кристаллитов в значительной степени определяется состоянием поверхности частиц и наличием контактов между ними. Сильноагрегированные частицы в суспензиях, осажденных при высоких значениях pH, более склонны к последующему росту по механизму ориентированного присоединения по сравнению с практически неагрегированными частицами в золях, стабилизированными находящимися на их поверхности противоионами.

Малая степень агрегированности частиц в золях подтверждается их анализом методом динамического светорассеяния (рис. 1.47). Из представленных данных видно, что средний размер агрегатов CeO_2 относительно невелик и составляет около 35 нм. Следует отметить, что размер агрегатов, равно как и размер составляющих их индивидуальных частиц, практически не зависит от температуры и продолжительности гидротермально-микроволновой обработки.

Неизменность размеров частиц CeO_2 в золях при обработке в гидротермальных условиях свидетельствует об их перспективности для биомедицинских приложений, поскольку такие золи могут быть стерилизованы автоклавированием и не меняют при этом своих характеристик. Вместе с тем значительным недостатком синтезированных образцов является то, что при повышении pH среды до 6,1 (соответствует точке нулевого заряда поверхности CeO_2) их седиментационная устойчивость нарушается, тогда как для практического применения зачастую требуются золи, устойчивые не только в кислых, но и нейтральных и слабощелочных средах. Для решения этой задачи нами было предложено вводить в золи в качестве стабилизаторов цитрат

натрия (аммония), аденозинтрифосфат натрия, фолиевую кислоту. Выбор данных стабилизаторов обусловлен особенностями поведения наночастиц диоксида церия при ингибировании активных форм кислорода (АФК) в клетках. С точки зрения биохимии, при использовании в качестве стабилизаторов цитрат-иона и аденозинтрифосфата следует ожидать дополнительной тропности модифицированных наночастиц CeO_2 к митохондриям и увеличения их концентрации именно в этих органеллах. В свою очередь стабилизация золей фолиевой кислотой перспективна с точки зрения адресной доставки наночастиц диоксида церия в опухолевые клетки, у которых гиперэкспрессированы фолатные рецепторы.

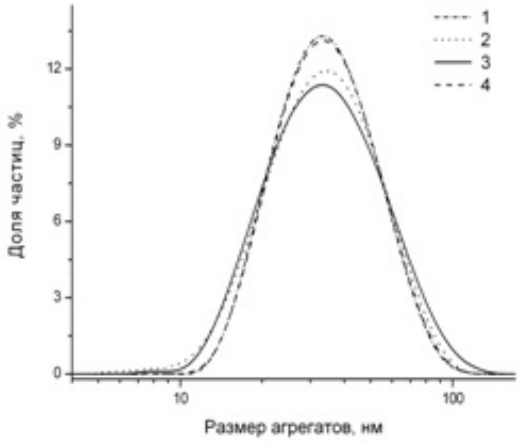


Рис. 1.47. Распределение частиц по размерам в золях CeO_2, полученных гидротермально-микроволновой обработкой при различных температурах (обозначения образцов даны на рисунке) [142]

Стабилизация золей CeO_2 цитратом аммония приводит к образованию прозрачных коллоидных растворов, стабильных при pH > 5,0. К достоинствам данного способа стабилизации следует отнести возможность дополнительной очистки золей от водорастворимых соединений и возможность концентрирования золей вплоть до получения порошкообразного, растворимого в щелочных средах продукта. Предложенный способ особенно актуален для удаления из коллоидных растворов остаточных нитрат-ионов, которые *in vivo* могут пере-

ходить в нитрит-ионы, вызывающие метгемоглобинемию, или метаболизироваться в канцерогенные нитрозосоединения.

Введение в золи фолиевой кислоты (точнее, ее натриевой соли) позволяет стабилизировать коллоидные растворы лишь при строго определенном соотношении концентраций диоксида церия и фолиевой кислоты (~1:10–1:100). О прочности связи фолиевой кислоты с поверхностью свидетельствует величина теплоты адсорбции – 80 кДж/моль.

В свою очередь введение в систему АТФ позволяет получать золи CeO_2, устойчивые во всем диапазоне pH [142]. Стабилизация золей аденозинтрифосфатом не влияет на характеристики наночастиц диоксида церия; в частности, ширина запрещенной зоны для золя An-190-30 составляет 3,70 эВ, для золя An-190-30-АТФ – 3,74 эВ. К недостаткам данной методики следует отнести необходимость хранения стабилизированных золей при низких температурах и высоких значениях pH. Впрочем, при использовании данной системы *in vivo* температура и pH золей могут быть адаптированы к условиям опыта.

Отметим, что водорастворимые соли церия активно взаимодействуют с нуклеозидфосфатами, что приводит к разрушению последних. Так, соединения Ce(IV) ускоряют гидролиз нуклеозидфосфатов [143], а реакция АТФ с хлоридом церия(III) приводит к образованию нерастворимого фосфата церия(III) и используется для определения, например, активности АТФазы [144, 145]. При взаимодействии аденозинтрифосфата с наночастицами CeO_2 наблюдается иная картина – молекула АТФ в нативном виде хемосорбируется на поверхности наночастиц и выступает в качестве стабилизатора.

Наночастицы диоксида церия, полученные сочетанием анионитной и гидротермально-микроволновой обработки, можно визуализировать в биологической системе, используя люминесцентную метку.

Например, с помощью глутарового альдегида на поверхности частиц закрепить молекулы декстрана, функционализированные люминесцентным флуоресцеин-изотиоцианатом (ФИТЦ). Молекулярное соединение ФИТЦ-декстрана стабилизирует НДЦ и позволяет увидеть частицы в клетке (рис. 1.48).

Метод, основанный на сочетании анионитной и гидротермально-микроволновой обработки, может быть использован для получения твердых растворов на основе диоксида церия, в частности состава $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ [147]. Как известно, ион Gd^{3+} имеет 7 неспаренных элек-

тронов (^{8}S7/2) и обладает исключительно высоким магнитным моментом (7,94 μ_B), что позволяет использовать гадолинийсодержащие соединения в качестве контрастирующих агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ).

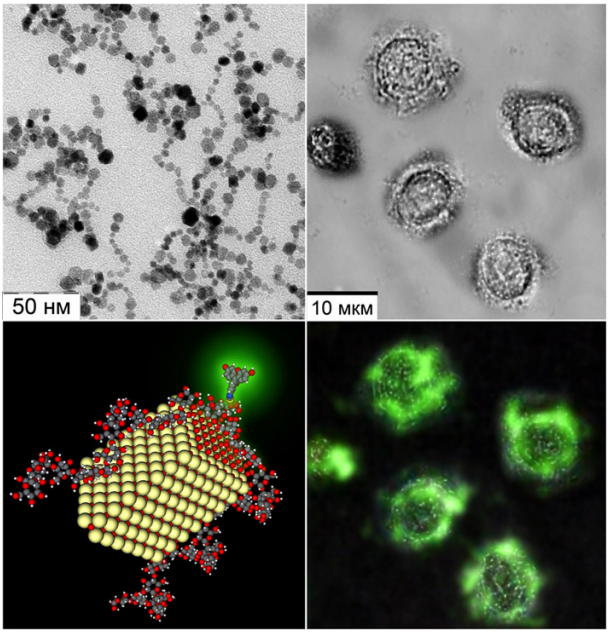


Рис. 1.48. Микрофотография наночастиц диоксида церия, модифицированных ФИТЦ-декстраном (вверху слева). Компьютерная модель частицы CeO_2, модифицированной ФИТЦ-декстраном (внизу слева). Культура клеток, обработанных частицами ФИТЦ-декстран-НДЦ при нормальном (вверху справа) и при ультрафиолетовом (внизу справа) освещении [146]

Нанокристаллический оксид гадолиния является одним из наиболее перспективных контрастирующих агентов для МРТ, поскольку он характеризуется более высоким значением констант продольной релаксации по сравнению с хелатными комплексами Gd^{3+}. Следует отметить, что в форме малорастворимого оксида гадолиний существенно менее токсичен, чем гадолиний в ионной форме [148, 149]. Таким образом, по нашему мнению, допирование диоксида церия ионами Gd^{3+} позволит не только повысить его кислородную нестехиометрию

и, следовательно, увеличить антиоксидантную активность, но и обеспечит возможность визуализации распределения наночастиц $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ в организме. Более того, токсичность гадолиния *in vivo* для такого материала должна быть минимальной.

На рис. 1.49 приведена зависимость параметра кристаллической ячейки образцов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ от номинального содержания гадолиния, определенная при уточнении кристаллической структуры твердых растворов по методу Ритвельда. Видно, что полученная зависимость является линейной, т.е. соответствует правилу Вегарда для твердых растворов (см. также табл. 1.5). Этот результат является прямым доказательством вхождения ионов гадолиния в кристаллическую решетку диоксида церия при синтезе гидротермально-микроволновым методом.

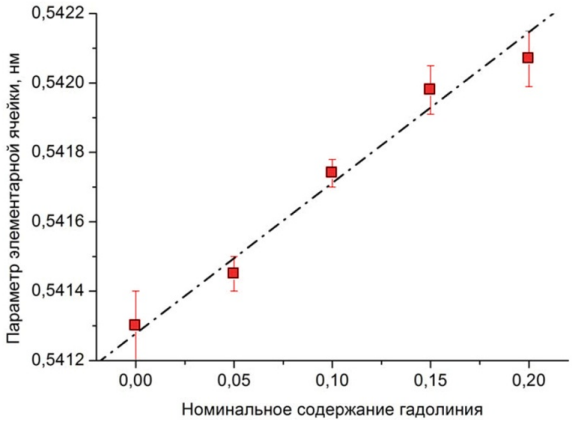


Рис. 1.49. Зависимость параметра элементарной ячейки твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ от номинального содержания гадолиния [147]

Анализ уширений дифракционных максимумов (111) и (200) свидетельствует о том, что полученные при центрифугировании золей порошки действительно являются нанокристаллическими. На основании данных рентгенофазового анализа были рассчитаны размеры частиц твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ (см. табл. 1.6). Видно, что при увеличении концентрации гадолиния от 0 до 20 мольных процентов размер частиц уменьшается (от 9 до 5 нм). Данные ПЭМ (рис. 1.50) и электронной дифракции свидетельствуют также о том, что в резуль-

тате синтеза образуются хорошо закристаллизованные частицы, имеющие преимущественно гексагональную форму.

Таблица 1.6

Результаты анализа золей нанокристаллического диоксида церия и твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$

Номинальное значение x	Значение x по данным РСМА	Параметр кристаллической ячейки, нм	Размер частиц по данным РФА, нм	Средний размер частиц по данным ПЭМ, нм	Положение первого максимума в распределении частиц по размерам, по данным ДСР, нм	Ширина запрещенной зоны, эВ
0	0	0,5413(1)	9±1	5,0	35	3,7
0,05	0,06±0,01	0,54144(5)	9±1	5,2	23	3,7
0,10	0,12±0,02	0,54174(4)	8±1	3,4	14	3,6
0,15	0,17±0,02	0,54198(6)	5±0,5	3,3	11	3,5
0,20	0,22±0,02	0,54205(7)	5±0,5	3,5	21	3,6

Можно констатировать, что гидротермальная обработка золей, формирующихся в результате анионитной обработки смешанных растворов нитратов Ce(III) и Gd(III), приводит к образованию твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$. Этот вывод хорошо согласуется с данными работы [150], авторы которой синтезировали твердые растворы аналогичного состава в результате гидротермальной обработки водных суспензий соосажденных гидроксидов церия и гадолиния. Вместе с тем размеры наночастиц, получаемых в соответствии с предложенной нами методикой, оказываются на порядок меньшими по сравнению с размерами частиц, синтезируемых по методу [150] (5–10 и 40–70 нм соответственно).

Малая степень агрегированности частиц в золях диоксида церия, допированного гадолинием, подтверждается их анализом методом ДСР. На соответствующих зависимостях присутствует основной максимум при 10 нм, а также несколько существенно менее интенсивных максимумов в области 40–100 нм, соответствующих агрегатам наночастиц. В свою очередь средний размер агрегатов в золях индивидуального диоксида церия составляет около 35 нм. Можно констатировать, что как индивидуальные частицы $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$, так и их агрегаты

имеют достаточно малые размеры и в связи с этим могут применяться в биомедицинских приложениях, характерных для индивидуального нанокристаллического диоксида церия.

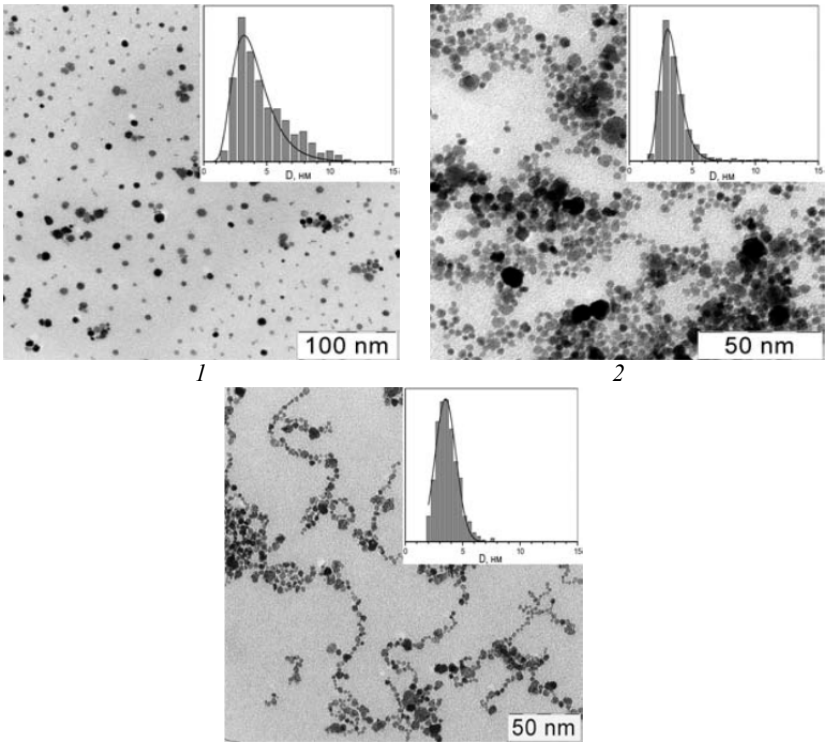


Рис. 1.50. Микрофотографии образцов $CeO_{2-\delta}$ (*1*), $Ce_{0,9}Gd_{0,1}O_{2-\delta}$ (*2*), $Ce_{0,8}Gd_{0,2}O_{2-\delta}$ (*3*). На врезках показаны рассчитанные на основании данных ПЭМ распределения частиц по размерам [147]

Вместе с тем необходимо учитывать, что золи диоксида церия, допированного гадолинием, обладают существенно меньшей долговременной агрегативной устойчивостью по сравнению с золями индивидуального диоксида церия (заметное помутнение золей, свидетельствующее об образовании крупных агрегатов, наблюдается при хранении в течение 1 нед.). Для повышения стабильности золей

$Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ по аналогии с золями $CeO_{2-\delta}$ можно использовать нетоксичные органические соединения, например цитрат [151] или аденозинтрифосфат натрия [142]. Стабилизаторы, имеющие повышенную тропность к зоне ангиогенеза (например, фолиевая кислота [152]), могут специфически усиливать сигнал МРТ злокачественных новообразований, а маркеры – визуализировать доставку частиц к эндотелиальным опухолевым клеткам.

Многие из разработанных методов получения золей диоксида церия для биомедицинского применения защищены патентами [120, 153–164]. Например, Google Patent Search сообщает, что ключевым словам *biomedical cerium dioxide nanoparticles synthesis* соответствует более 500 патентов (по состоянию на 01.10.2014). Большинство из них основаны на синтезе из водных и неводных растворов соединений церия при относительно низких температурах. Согласно патентам [163, 164], нестабилизированные частицы диоксида церия, пригодные для коньюгации с биологически-активными веществами, получают прямым гидролизом солей церия аммиаком с последующим высушиванием или кальцинацией и редиспегрированием в воде. В соответствии с патентом США [164], синтез НДЦ осуществляют по следующей схеме. При перемешивании в раствор нитрата церия (376,5 $см^3$, содержащий 1,37 моль/л $Ce(NO_3)_4$ и 0,02 моль/л $Ce(NO_3)_3$) добавляют 1123 $см^3$ 0,8 N раствора гидроксида аммония со скоростью 100 $см^3$/ч. Средний гидродинамический диаметр частиц в полученном коллоидном растворе составляет порядка 6,4 нм. Водную коллоидную дисперсию нагревают 24 ч при 100°С в термошкафу, после чего желтый осадок отфильтровывают и высушивают на воздухе при комнатной температуре. 45,3 г готового продукта ресуспендируют в 200 $см^3$ дистилированной воды, при этом образуется прозрачный золь, содержащий 172 г/л (1 М) соединений Ce(IV) в пересчете на CeO_2, с pH ≈ 1. Размер частиц в растворе составляет порядка 4,7 нм. Отмечается, что получаемый золь устойчив при хранении как минимум на протяжении одного года при pH не более 3. При повышении pH до нейтрального золь также теряет стабильность. В патенте [165] многократной очисткой, диализом и редиспергированием наночастиц диоксида церия с гидротермальной предысторией получали высококонцентрированный (до 600 г/л) золь со средним диаметром частиц 50 нм, стабилизированный азотной кислотой. В патенте США [166] в золь, полученный согласно схеме [164], предлагается вводить полиоксиалкеновый по-

лимер (4–10 оксиэтильных групп) с концевыми фосфонатными группами. Такая модификация поверхности наночастиц позволяет расширить диапазон стабильности золя до pH 10. Данный продукт выгодно отличается от стабилизированного уксусной или лимонной кислотами. К сожалению, в последующих работах показано, что адсорбция фосфатных групп на поверхности НДЦ необратимо инактивирует способность диоксида церия участвовать в редокс-процессах и ограничивает возможности его практического использования. Согласно патенту [157], для стабилизации коллоидных растворов наночастиц диоксида церия (размер ~2 нм, pH=2, концентрация 200 г/л) используют ацетилацетон, салициловую кислоту, Rhodiastab 50® (C_6H_5-CO-CH_2-CO-C_6H_5), что позволяет получать золь, устойчивый при нейтральных и слабощелочных значениях pH. В качестве исходного материала предлагается использовать коллоидную дисперсию CeO_2, полученную в соответствии с патентом [158].

В патенте [120] объединены окислительно-восстановительный и мицеллярный способы получения коллоидных частиц диоксида церия. Схема реализации такого процесса показана на 1.51. В неполярном растворителе (толуоле) (*1*) растворяли АОТ (*2*) и при интенсивном перемешивании (гомогенизации) вводили водный раствор нитрата церия(III) (*3*). В объеме толуола при этом образуются мицеллы (*4*), представляющие собой микрокапли водного раствора соли церия (*5*), стабилизированные ПАВ (*6*). Следует отметить, что эти стадии мицеллярного процесса получения наночастиц используются во всех методиках, отличия заключаются лишь в способах дальнейшего стимулирования образования частиц CeO_2 в объеме мицелл (*7*). Обычно это достигается за счет повышения pH, нагревания, воздействия ультразвука и т.п.; авторы работы [120] для воздействия на мицеллярную систему использовали пероксид водорода (*8*), что приводило к окислению $Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+}$, нуклеации (*9*) и росту (*10*) наночастиц. Полученный стабильный раствор монодисперсных наночастиц диоксида церия может быть подвергнут пиролизу с целью получения нанопорошков CeO_2, использован «как есть» или переведен в водную фазу заменой растворителя. К сожалению, и в данном случае использовались токсичные стабилизаторы.

В обзоре, основанном преимущественно на американских патентах US8431506, EP1920832, WO2012036786, US20120070500, US20130251756, US7686976, US8066874, US8252087, US8349764,

US8435602, US8568538, US20090302275, US20110124488, US20130195927 и US20130273659, авторы [167] исследуют тенденции синтеза наночастиц диоксида церия с оригинальными редокс-свойствами. Сравнительный анализ известных способов получения композиций, содержащих наночастицы диоксида церия, позволяет сделать следующие выводы:

1. Как правило, все известные способы включают две стадии: на первой получают нестабилизированные частицы НДЦ, на второй – повторно редиспергируют частицы в растворе стабилизатора.

2. Большинство известных водных растворов НДЦ нестабильны, особенно при повышении pH до pH = 6 и более (т.е. до биологически релевантных значений).

3. В качестве стабилизатора зачастую используют токсичные химические соединения; получаемые при этом растворы невозможно использовать в биологических системах.

4. Отсутствует адекватный и простой способ очистки коллоидного раствора НДЦ от примесей, в том числе непрореагировавших исходных соединений и побочных продуктов реакции.

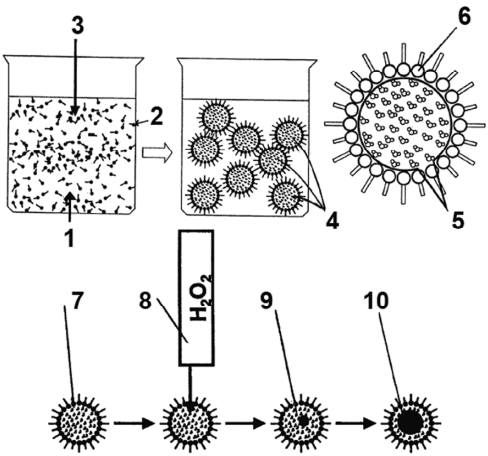


Рис. 1.51. Образование наночастиц диоксида церия в обратных мицеллах при окислении Ce(III) [120]

Большинство из перечисленных проблем успешно решены нами в работах [151, 163, 164] и в патенте [164] (рис. 1.52). Указанная техни-

ческая задача и технический результат были достигнуты благодаря применению в качестве стабилизатора поликарбоксилатов в сочетании с оригинальной методикой синтеза и очистки образовавшегося золя. В качестве поликарбоксилатов можно использовать низкомолекулярную полиакриловую или лимонную кислоту, или их водорастворимые соли (щелочных металлов или аммония). При этом поликарбоксилаты выполняют функции регулятора размера (темплата) наночастиц диоксида церия в момент образования и стабилизатора и редиспергирующего агента при очистке системы от примесей. Для стабилизации системы в случае использования полиакриловой кислоты полимер должен содержать не менее 5 карбоксилатных групп на одну наночастицу, лучше не менее 10–20 групп, что соответствует 0,5 массовых частей на 1 массовую долю диоксида церия, предпочтительным является соотношение не менее 1:1÷2:1.

В соответствии с заявленным способом водный раствор соли церия и поликарбоксилата подщелачивают гидроксидом аммония и поддерживают водородный показатель выше значения pH гидролиза соли церия и ниже pH солеобразования поликарбоксилата. Размер наночастиц диоксида церия является определяющим для его потребительских (каталитических, антиоксидантных) свойств; с уменьшением размера частиц их активность повышается. Минимальный размер частиц НДЦ, получаемых в соответствии с другими методиками, – более 3 нм. При соблюдении оптимальных параметров процесса, описанного в нашем патенте [165], можно получить ультрамалые наночастицы диоксида церия размером в пределах ~1 нм. Отметим, что методики получения коллоидных водных растворов CeO_2 с частицами столь малого размера до настоящего времени не были описаны в литературе. Композицию, содержащую наночастицы и стабилизатор, очищают от непрореагировавших прекурсоров или побочных продуктов реакции; механизм очистки основан на способности наночастиц диоксида церия, покрытых полиакрилатом, коагулировать при снижении pH раствора ниже точки солеобразования полиакрилата (pH<5). После отмывания декантацией или центрифугированием осадок опять переводят в раствор путем повышения pH.

Полученный золь термически стабилен до 210°C [163] и может выдержать стерилизацию автоклавированием без потери функциональных и агрегативных свойств. При этом акриловые концевые группы могут быть использованы для последующей целенаправлен-

ной функционализации наночастиц. Формирующиеся наночастицы CeO_2 стабильны в воде и буферных растворах в широком диапазоне значений pH, а также в физиологических жидкостях. Принципиально важным является факт, что монослой полиакрилата не препятствует доступу АФК (в том числе свободных радикалов) к поверхности наночастиц.

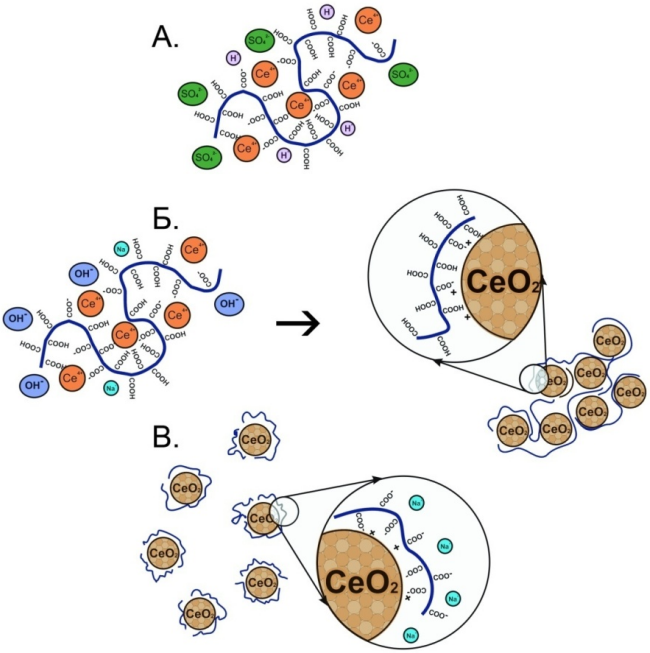


Рис. 1.52. Схема получения и стабилизации наночастиц диоксида церия [165]

Золи диоксида церия, стабилизированные низкомолекулярной (средняя молекулярная масса – 8000 г/моль) полиакриловой кислотой, получали следующим образом. К 50 мл 0,1 М раствора сульфата церия(IV) в 0,1 N серной кислоте добавляли 10 мл 2%-ного водного раствора ПАК. При непрерывном перемешивании в систему по каплям добавляли 3 М водный раствор аммиака до pH>11. Полученный раствор кипятили 40–45 мин, вводили 2 мл 50%-ного пероксида водорода

и продолжали кипячение в течение еще 3–4 ч. После термообработки раствор охлаждали и подкисляли 0,01 N серной кислотой до pH = 4,5. Выпавший осадок отделяли декантацией, промывали водой и растворяли в 50 мл водного раствора аммиака (pH = 8).

На первой стадии описанного выше синтеза (при смешении растворов соли церия и ПАК) образуется неустойчивый комплекс Ce(IV)–ПАК. При подщелачивании раствора до pH, превышающего pH гидролиза комплекса, происходят образование и рост зародышей диоксида церия. На данной стадии ПАК выступает в роли темплата для наночастиц, а также препятствует их агрегации и ограничивает рост. При подкислении раствора ниже pK_a полиакриловой кислоты наночастицы в оболочке недиссоциированной ПАК выпадают из раствора и тем самым могут быть очищены от побочных продуктов реакции. При последующем повышении pH системы до значений, превышающих pH диссоциации ПАК, осадок пептизируется, в результате чего образуется прозрачный коллоидный раствор наночастиц диоксида церия. Разработанная схема выгодно отличается от описанной авторами [166], поскольку включает использование ПАК не только на стадии стабилизации золя, но и в процессе образования и роста наночастиц; предложенный нами процесс гораздо технологичнее и позволяет получать наночастицы меньшего размера (1–2 нм против 10 нм).

Золи диоксида церия, стабилизированные лимонной кислотой, получали следующим образом. В 10 мл воды растворяли 1 г лимонной кислоты и 2,0 г сульфата церия(IV); объем раствора доводили до 50 мл. При непрерывном перемешивании в полученный раствор по каплям добавляли 3 М водный раствор аммиака до pH>11. Систему кипятили с обратным холодильником в течение 12 ч, периодически корректируя pH, после чего вводили 2 мл 50%-ного пероксида водорода и продолжали кипячение в течение еще 8 ч. Полученный золь охлаждали и подкисляли до pH~3,5 0,01 М раствором серной кислоты. Наночастицы диоксида церия отделяли декантацией и промывали до отрицательной реакции на сульфат-ионы. Затем осадок растворяли в 50 мл раствора аммиака при pH=8.

При смешении растворов соли церия и лимонной кислоты, как и в случае ПАК, образуется промежуточное комплексное соединение [168]. При подщелачивании раствора и кипячении комплекс разрушается с образованием золя диоксида церия. Полученный золь также можно дополнительно очистить от побочных продуктов реакции пу-

тем подкисления ниже pK_a лимонной кислоты, отделения осадка CeO_2 и его последующей пептизации за счет повышения pH среды.

Согласно результатам ПЭМ и ЭД, золи, формирующиеся в результате синтеза по обеим описанным выше методикам, состоят из наночастиц CeO_2. Размеры частиц в золях, стабилизированных лимонной кислотой, составляют 1–2 нм, в золях, синтезированных в присутствии полиакриловой кислоты, – 2–3 нм. Предположительно практически двукратное отличие в размерах образующихся наночастиц связано со свойствами промежуточных комплексных соединений: церий(IV) образует с лимонной кислотой [168] моноядерный комплекс, тогда как при взаимодействии с ПАК образуется биядерное соединение [169], т.е. в процессе формирования наночастиц, стабилизированных ПАК, изначально участвует двукратное количество атомов церия.

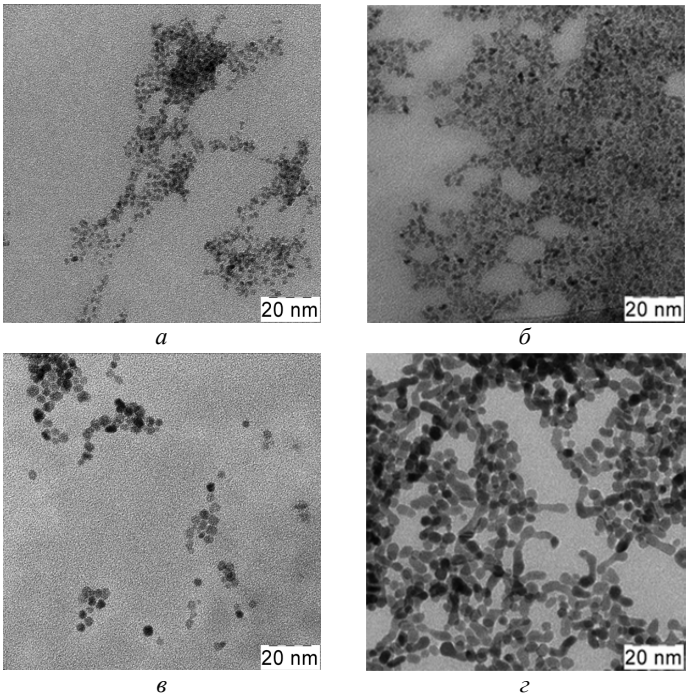
Отметим, что методики получения коллоидных водных растворов CeO_2 с частицами столь малого размера ранее не были описаны в литературе.

Гидротермально-микроволновая обработка золей, стабилизированных полиакриловой кислотой, во всем исследованном температурно-временном диапазоне не приводит к седиментации наночастиц CeO_2. Тем не менее при повышении температуры обработки до 210°C золи приобретают черную окраску. С учетом того, что полиакриловая кислота и ее соли в этих условиях сами по себе стабильны [170], такое изменение окраски золей, очевидно, обусловлено тем, что диоксид церия выступает в роли катализатора процесса термолиза полиакриловой кислоты.

По данным электронной микроскопии, размеры частиц диоксида церия, подвергшихся гидротермально-микроволновой обработке, остаются неизменными (см., например, рис. 1.53, *а*). Гидротермально-микроволновая обработка золей CeO_2, стабилизированных лимонной кислотой, приводит к росту наночастиц, при этом размер частиц увеличивается как при увеличении температуры, так и при увеличении продолжительности обработки (рис. 1.53, *б–г*). Следует подчеркнуть, что наночастицы, формирующиеся при относительно высоких температурах (в особенности при 210°C), имеют неправильную форму.

Согласно данным УФ-видимой спектроскопии, рост температуры обработки приводит к постепенному уменьшению интенсивности рассеяния света и одновременному смещению края полосы поглоще-

ния CeO_2 в длинноволновую область, что также свидетельствует об увеличении размеров наночастиц. К сожалению, значительное рассеяние света на наночастицах CeO_2 и их агрегатах не позволяет корректно определить $E_{ШЗ}$ и средние размеры частиц в цитратных золях. Отметим лишь, что ширина запрещенной зоны для образца, синтезированного при 210°С в течение 3 ч, составляет 3,37 эВ, что соответствует частицам диаметром 3,4 нм.



а *б* *в* *г*

Рис. 1.53. Микрофотографии наночастиц CeO_2 в полиакрилатном золе, обработанном при 180°С в течение 15 мин (*а*), и цитратных золях, обработанных при 180°С в течение 15 мин (*б*), 210°С в течение 15 мин (*в*) и 180°С в течение 3 ч (*г*) [150]

Можно констатировать, что рост частиц CeO_2 в водных золях также происходит по механизму ориентированного присоединения кристаллитов. Действительно, неизменность размеров частиц в полиак-

рилатных золях свидетельствует о чрезвычайно низкой растворимости диоксида церия и одновременно о том, что полидентатные молекулы полиакриловой кислоты надежно изолируют наночастицы друг от друга, препятствуя их сращиванию. В свою очередь цитрат-ионы легко десорбируются с поверхности частиц CeO_2, благодаря чему последние могут контактировать с образованием агрегатов. Такие агрегаты далее рекристаллизуются с образованием монокристаллических частиц неправильной формы (см., например, рис. 1.53, *г*). Отметим, что формирование подобных частиц по механизму растворения–кристаллизации невозможно из термодинамических соображений.

В процессе исследований *in vitro* было показано, что золи НДЦ, полученные в соответствии с патентом [165], обладают низкой токсичностью по отношению к клеткам теплокровных [164] и высокой антиоксидантной активностью.

Одними из наиболее значимых природных водорастворимых антиоксидантов являются биофлавоноиды (антоцианы, кверцетин, рутин, катехины, танины и т.д.). Известно, что флавоноиды легко окисляются кислородом воздуха, особенно активно окисление происходит в нейтральной и слабощелочной среде через стадию образования пероксил-радикала; введение пероксида водорода повышает скорость разложения полифенолов за счет радикального окисления и разрушения гетероциклов. В наших исследованиях показано, что золи НДЦ, полученные в соответствии с патентом [165], способны эффективно защищать антоцианы от разрушения под действием пероксида водорода в нейтральных и щелочных растворах, т.е. являются более сильными антиоксидантами [171].

Синтез золей НДЦ по методике, предложенной в патенте [165], позволяет получить частицы с отрицательным дзета-потенциалом. При использовании в качестве стабилизатора полисахаридов – амилозы, мальтодекстрина ДЕ16, β-циклодектрина и декстрана (*Leuconostoc spp*), нами получены частицы НДЦ с дзета-потенциалом, близким к нулю. Наиболее перспективным нетоксичным неионным стабилизатором НДЦ оказался мальтодекстрин – глюкан, имеющий в цепи 2–20 структурных элементов, соединенных α-(1→4) гликозидными связями (например, амилоза или мальтодекстрин) (рис. 1.54, слева). Это связано с тем, что, с одной стороны, моносахариды не способны обеспечить необходимой стабильности золей, а с другой – высокомолекулярные полисахариды образуют вязкие растворы, затрудняющие

получение концентрированных золей наночастиц и дальнейшие манипуляции с ними. Кроме того, полисахариды с высокой степенью полимеризации вследствие ограниченной подвижности остова могут испытывать стерические затруднения при стабилизации наночастиц CeO_2, в связи с этим для достижения приемлемой устойчивости золей необходимо использовать высокие концентрации полисахаридов.

Вторичная структура макромолекул α-(1→4) глюканов представляет собой спираль, каждое кольцо которой содержит 6 молекул глюкозы (рис. 1.54, справа).

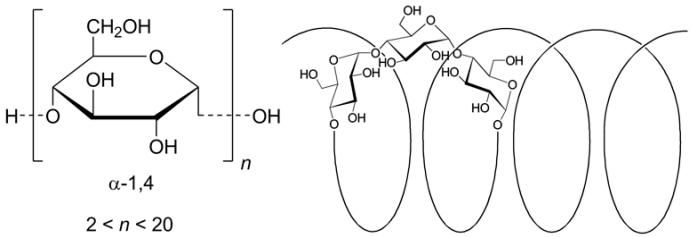


Рис. 1.54. Строение α-(1→4) глюкана и его вторичная структура

Предположительная структура комплекса Ce(III) и амилозы показана на рис. 1.55. Макромолекула имеет такое пространственное расположение гидроксильных групп, при котором комплекс с ионом церия наиболее устойчив с наружной стороны спирали, а не внутри полости (на рис. 1.55 слева вверху расположение витков показано серыми кругами). Данное предположение подтверждается окрашиванием хелатного комплекса ионом I_3^-. В слабощелочных средах лиганды не препятствуют гидролизу и окислению Ce(III), при этом последовательно образуются гидроксид и оксид Ce(IV). Варьируя соотношение концентраций церия и углевода, можно регулировать скорость образования и размеры частиц диоксида церия. При избытке полисахарида (рис. 1.55, *А*) все гидроксильные группы церия связаны с глюкозой, и формирование наночастицы начинается только после стадии окисления. Частицы, образующиеся в этом случае, имеют ультрамалые размеры (1–4 нм), и золь отличается высокой устойчивостью. При недостатке полисахарида (рис. 1.55, *Б*) образование наночастиц начинается еще до стадии окисления трехвалентного церия. При этом сначала образуются частицы гидроксида Ce(III), которые и определяют размеры формирующихся из них наночастиц CeO_2. Полученные золи отли-

чаются более крупным размером частиц и менее стабильны. Таким образом, изменяя соотношение углевода и церия, можно регулировать размер образующихся частиц нанокристаллического диоксида церия в широких пределах.

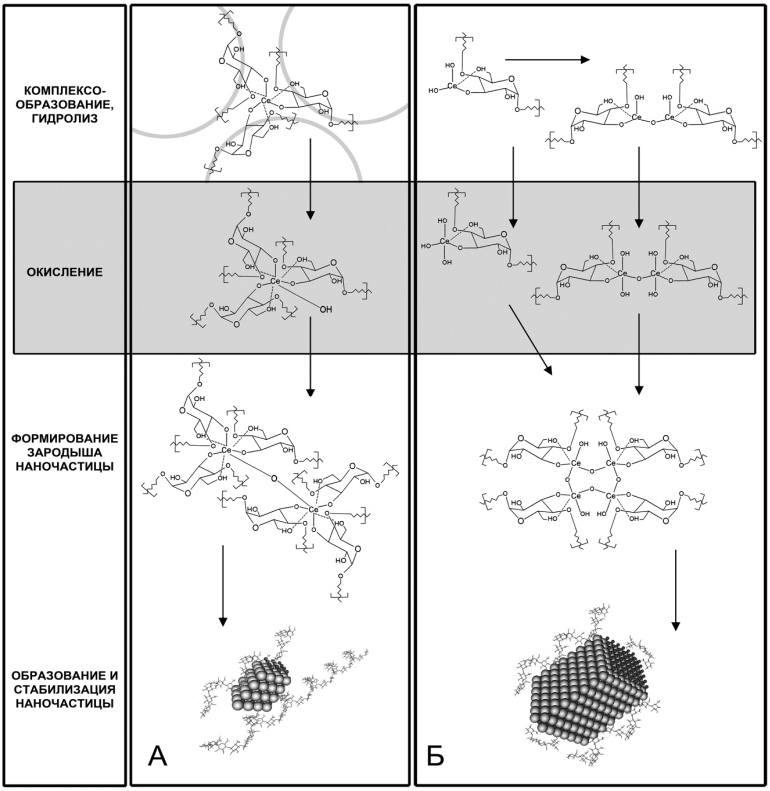


Рис. 1.55. Предполагаемая схема взаимодействия Ce(III) с α-(1→4) глюканом при комплексообразовании, в процессе гидролиза, окисления, формирования и роста CeO_2 при избытке (*А*) и недостатке (*Б*) углевода [173]. Пояснения см. в тексте

Полисахариды нерастворимы во многих органических растворителях, например в низкомолекулярных спиртах, в которых, напротив, легко растворяются соли церия(III), щелочи и побочные продукты

реакции гидролиза солей церия. Таким образом, после формирования золя CeO_2, стабилизированного мальтодекстрином, наночастицы можно осадить из раствора вместе с полисахаридом и очистить многократной промывкой в спирте или ацетоне.

Применение глюканов в качестве стабилизаторов и темплатов при синтезе НДЦ впервые позволило целенаправленно регулировать размеры частиц диоксида церия в биологически-допустимых золях и, соответственно, соотношение их про- и антиоксидантных свойств. Впервые диоксид церия получен в виде сухого композита – стерильного редиспергируемого порошка, стабильного при хранении и удобного для биомедицинского применения. С целью визуализации частиц в биологических системах к молекуле полисахарида прививали флуорофор. Для этого пептизировали НДЦ в диметилсульфоксиде, затем (согласно протоколу Sigma-Aldrich) проводили функционализацию флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТС), вновь очищали НДЦ переосаждением в спирте, сушили и хранили в виде порошка. Результаты исследований нами оформлены в виде патента, на соответствующую заявку получено положительное решение [172]. Данная методика заключается в добавлении аммиака к водному раствору нитрата церия(III) в присутствии мальтодекстрина в условиях контролируемой кислотности среды и последующей очистки материала методом последовательного редиспергирования.

Согласно указанному патенту [172], синтез золей НДЦ с регулируемым размером частиц, стабилизированных глюканами, проводят путем нейтрализации водного раствора соли церия и полисахарида, взятых в соответствующих пропорциях, аммиаком до значения водородного показателя pH = 7÷8. Систему выдерживают в течение 1÷4 ч, к полученному коллоидному раствору наночастиц гидроксосоединений церия добавляют водный раствор аммиака и повышают pH до 11÷12, после чего выдерживают в течение 1÷10 ч до образования коллоидного раствора диоксида церия, затем добавляют избыток спирта или кетона и доводят до кипения, образовавшийся осадок неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, отделяют декантацией или фильтрованием, промывают 1÷4 раза спиртом или кетоном и высушивают при температуре 50÷80°C до постоянного веса, при этом редиспергирование полученного порошка неагрегированных наночастиц диоксида церия, покрытого стабилизирующей оболочкой, в полярном растворителе (например, воде) при-

водит к образованию агрегативно-устойчивого золя. Изменение соотношения церий:глюкоза (в составе глюкана) от 1:4 до 1:1 позволяет изменять размер образовавшихся наночастиц от 2 до 7 нм соответственно (а их гидродинамический диаметр – в пределах 6÷10 нм).

Компьютерное моделирование частицы размером 2 нм, стабилизированной α-(1→4) глюканом, содержащим соответствующее количество глюкозных звеньев, показывает, что в зависимости от ориентации молекулы стабилизатора размер частицы при адсорбции увеличивается на 2–6 нм (рис. 1.56). Ориентация молекулы полисахарида на поверхности частицы определяется стерическими факторами и зависит, прежде всего, от соотношения концентраций стабилизатора и церия в исходном растворе. При недостатке полисахарида его молекулы адсорбируются планарно, при избытке – вертикально. Результаты расчета хорошо согласуются с полученными экспериментальными данными. Таким образом, меняя количество стабилизатора, можно целенаправленно управлять размером частиц.

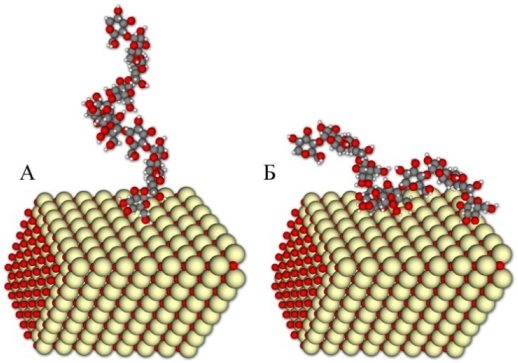


Рис. 1.56. Компьютерная модель наночастицы CeO_2, стабилизированной молекулой α-(1→4) глюкана (n = 12) при различной ориентации адсорбата: *А* – вертикальная ориентация; *Б* – планарная ориентация

Следует особо отметить, что осадок наночастиц CeO_2, модифицированных мальтодекстрином, можно высушить при умеренных температурах, причем получаемый таким образом порошкообразный продукт выдерживает длительное хранение и при диспергировании в воде образует стабильный прозрачный золь (рис. 1.57).



Рис. 1.57. Порошкообразный диоксид церия, стабилизированный мальтодекстрином, и восстановленный из него золь (см. пояснения в тексте)

При этом полимерный стабилизатор не мешает частицам диоксида церия участвовать в редокс-процессах с АФК и выполнять ферментативные функции (каталазные, супероксиддиспутазные). Так, в процессе реакции Фентона в живых системах образуется высокореактивный и токсичный гидроксильный радикал, который окисляет органические молекулы – в том числе разрушает элементы клетки и обесцвечивает красители. В работе [173] нами показано, что золи НДЦ, полученные в соответствии с заявкой [172], способны защищать краситель метиловый фиолетовый от гидроксильного радикала в условиях реакции Фентона, причем с уменьшением размера частиц диоксида церия степень защиты возрастала. Другая распространенная форма АФК – пероксид водорода – разрушает живые клетки по механизму окситоза (апоптоза, вызванного окислительным стрессом). Нами показано, что НДЦ, стабилизированный мальтодекстраном, успешно защищает клетку от H_2O_2, при этом зависимость защитного действия от размера частиц сохраняется – с уменьшением кристаллитов степень защиты увеличивается [173].

Было также показано, что аналогичная методика синтеза пригодна и для получения водных золей твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-x/2}$. Анализ соответствующих твердофазных образцов методом рентгеновской дифракции свидетельствует об их однофазности и отсутствии примесей гидроксосоединений гадолиния. Факт образования твердых растворов подтверждается и данными рамановской спектроскопии: в спектрах комбинационного рассеяния, помимо основного пика с мак-

симумом в области 460–464 $см^{-1}$, соответствующего симметричным колебаниям Ce-O8, наблюдается также уширенный пик в области 560 $см^{-1}$, обусловленный образованием кислородных вакансий в диоксиде церия при допировании элементами другой валентности (в том числе гадолинием). По данным РСМА, мольное соотношение церия и гадолиния в твердых растворах в пределах погрешности соответствует мольному соотношению этих элементов в исходных реакционных смесях. Анализ данных ПЭМ свидетельствует о том, что средний размер частиц $Ce_{0,8}Gd_{0,2}O_{1,9}$, синтезированных в соответствии с описанной выше методикой, составляет 2,5 нм, что хорошо согласуется с данными РФА.

Литература

1. *Adachi G., Imanaka N.* The binary rare earth oxides // Chem. Rev. 1998. Vol. 98. P. 1479–1514.

2. *Li F., Yu X., Pan H. et al.* Syntheses of MO_2 (M = Si, Ce, Sn) nanoparticles by solid-state reactions at ambient temperature // Solid State Sci. 2000. Vol. 2. P. 767–772.

3. *Yu X., Li F., Ye X. et al.* Synthesis of cerium(IV) oxide ultrafine particles by solid-state reactions // J. Am. Ceram. Soc. 2000. Vol. 83. P. 964–966.

4. *Tschöpe A., Ying J.Y.* Synthesis of nanostructured catalytic materials using a modified magnetron sputtering technique // Nanostr. Mater. 1994. Vol. 4. P. 617–619.

5. *Bai W., Choy K.L., Stelzer N.H.J., Scoonman J.* Thermophoresis-assisted vapour phase synthesis of CeO_2 and $Ce_xY_{1-x}O_{2-\delta}$ nanoparticles // Solid State Ionics. 1999. Vol. 116. P. 225–228.

6. *Djuricic B., Pickering S.* Nanostructured cerium oxide: preparation and properties of weakly-agglomerated powders // J. Europ. Ceram. Soc. 1999. Vol. 19. P. 1925–1934.

7. *Bumajdad A., Zaki M.I., Eastoe J., Pasupulety L.* Microemulsion-based synthesis of CeO_2 powders with high surface area and high-temperature stabilities // Langmuir. 2004. Vol. 20. P. 11223–11233.

8. *Liu Y.L., He S.T., Uehara M., Maeda H.* Wet chemical preparation of well-dispersed colloidal cerium oxide nanocrystals // Chem. Lett. 2007. Vol. 36. P. 764–765.

9. Соединения редкоземельных элементов. Карбонаты, оксалаты, нитраты, титанаты. Сер. Химия редких элементов / под ред. В.П. Орловского и Н.Н. Чудиновой. М. : Наука, 1984. С. 148, 88, 17.

10. *Данилова И.Г., Славинская Е.М., Зайковский В.И. и др.* Влияние способа приготовления CeO_2 на его свойства // Кинетика и катализ. 2010. Т. 51, № 1. С. 152–158.

11. *Колько В.П., Мороз Э.М., Кривенцов В.В. и др.* Структурное исследование высокодисперсных диоксидов церия // Изв. РАН. Сер. физ. 2007. Т. 71, № 5. С. 718–721.

12. *Fuller M.J., Pinkstone J.* Thermal analysis of the oxalate hexahydrates and decahydrates of yttrium and the lanthanide elements // J. Less-Common Metals. 1980. Vol. 70, № 2. P. 127–142.

13. Соединения редкоземельных элементов. Силикаты, германаты, фосфаты, арсенаты, ванадаты. Сер. Химия редких элементов / под ред. В.П. Орловского и Н.Н. Чудиновой. М. : Наука, 1983. С. 86.

14. *Ульянов А.И., Казакова Т.И.* Синтез и изучение свойств среднего и основного цероортофосфатов // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1963. № 3. С. 393–401.

15. Химия и технология редких и рассеянных элементов / под ред. К.А. Большакова. М. : Высшая школа, 1976. Ч. II. С. 57.

16. Химическая энциклопедия. М. : Большая российская энциклопедия, 1998. Т. 5. С. 352.

17. *Скогарева Л.С., Бабаева В.П., Росоловский В.Я.* Безводный перхлорат церия(III) и перхлоратоцераты (III) цезия // Журн. неорган. химии. 1986. Т. 31, № 4. С. 880–884.

18. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Шариков Ф.Ю., Третьяков Ю.Д.* Формирование нанокристаллического диоксида церия из водно-спиртовых растворов нитрата церия(III) // Докл. Акад. наук. 2006. Т. 411, № 4. С. 485–487.

19. *Шариков Ф.Ю., Мескин П.Е., Иванов В.К. и др.* Исследование процесса гидротермального синтеза нанодисперсного диоксида циркония методом калориметрии теплового потока // Докл. Акад. наук. 2005. Т. 403, № 5. С. 181–184.

20. *Шариков Ф.Ю., Шапорев А.С., Иванов В.К. и др*. Формирование высокодисперсных порошков ZnO в гидротермальных условиях // Журн. неорган. химии. 2005. Т. 50, № 12. С. 1947–1953.

21. *Шариков Ф.Ю., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д.* Исследование процесса формирования ультрадисперсных порошков ZnO в гидротермальных условиях методом калориметрии Кальве // Докл. Акад. наук. 2006. Т. 410, № 6. С. 771–774.

22. *Шариков Ф.Ю., Иванов В.К., Шариков Ю.В. и др.* Механизм и кинетика формирования диоксида титана в гидротермальных условиях // Журн. неорган. химии. 2006. Т. 51, № 12. С. 1957–1962.

23. *Meskin P.E., Sharikov F.Yu., Ivanov V.K. et al.* Rapid formation of nanocrystalline HfO_2 powders from amorphous hafnium hydroxide under ultrasonically assisted hydrothermal treatment // Mater. Chem. Phys. 2007. Vol. 104, № 2–3. P. 439–443.

24. *Иванов В.К.* Функциональные наноматериалы на основе диоксида церия и элементов подгруппы титана: синтез, исследование структуры и размерных эффектов : дис. … д-ра хим. наук. М. : ИОНХ РАН, 2011. 292 с.

25. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Копица Г.П. и др.* Фрактальная структура нанодисперсных порошков диоксида церия // Неорган. матер. 2008. Т. 44, № 3. С. 324–330.

26. *Иванов В.К., Баранчиков А.Е., Третьяков Ю.Д.* Получение нанокристаллического диоксида церия с контролируемым размером частиц и кислородной нестехиометрией // Химическая технология. 2010. Т. 10, № 3. С. 139–144.

27. *Morris V., Fleming P.G., Holmes J.D., Morris M.A.* Comparison of the preparation of cerium oxide nanocrystallites by forward (base to acid) and reverse (acid to base) precipitation // Chem. Eng. Sci. 2013. Vol. 91. P. 102–110.

28. *Hirano M., Kato E.* Hydrothermal synthesis of nanocrystalline cerium(IV) oxide powders // J. Am. Ceram. Soc. 1999. Vol. 82. P. 786–788.

29. *Hirano M., Inagaki M.J.* Preparation of monodispersed cerium(IV) oxide particles by thermal hydrolysis: influence of the presence of urea and Gd doping on their morphology and growth // J. Mater. Chem. 2000. Vol. 10. P. 473–477.

30. *Si R., Zhang Y.W., Li S.J. et al.* Urea-based hydrothermally derived homogeneous nanostructured $Ce_{1-x}Zr_xO_2$ (x=0–0,8) solid solutions: A strong correlation between oxygen storage capacity and lattice strain // J. Phys. Chem. B. 2004. Vol. 108. P. 12481–12488.

31. *Cheng M.Y., Hwang D.H., Sheu H.S., Hwang B.J.* Formation of $Ce_{0,8}Sm_{0,2}O_{1,9}$ nanoparticles by urea-based low-temperature hydrothermal process // J. Power Sources. 2008. Vol. 175. P. 137–144.

32. *Dreyfors J.M., Jones S.B., Sayed Y.* Hexamethylenetetramine: a review // Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 1989. Vol. 50. P. 579–585.

33. *Ismail A.A., El-Midany A., Abdel-Aal E.A., El-Shall H.* Application of statistical design to optimize the preparation of ZnO nanoparticles via hydrothermal technique // Mat. Lett. 2005. Vol. 59. P. 1924–1928.

34. *Greene L.E., Yuhas B.D., Law M. et al.* Solution-grown zinc oxide nanowires // Inorg. Chem. 2006. Vol. 45. P. 7535–7543.

35. *Saric A., Nomura K., Popovic S. et al.* Effects of urotropin on the chemical and microstructural properties of Fe-oxide powders prepared by the hydrolysis of aqueous $FeCl_3$ solutions // Mat. Chem. Phys. 1998. Vol. 52. P. 214–220.

36. *Saric A., Music S., Nomura K., Popovic S.* Microstructural properties of Fe-oxide powders obtained by precipitation from $FeCl_3$ solutions // Mat. Sci. Eng. B. 1998. Vol. 56. P. 43–52.

37. *Pike J., Hanson J., Zhang L., Chan S.-W.* Synthesis and redox behavior of nanocrystalline hausmannite (Mn_3O_4) // Chem. Mater. 2007. Vol. 19. P. 5609–5616.

38. *Wang J., Wang Y., Qiao M. et al.* A novel sol–gel synthetic route to alumina nanofibers via aluminum nitrate and hexamethylenetetramine // Mater. Lett. 2007. Vol. 61. P. 5074–5077.

39. *Li J.G., Ikegami T., Mori T., Yajima Y.* Sc_2O_3 nanopowders via hydroxyl precipitation – effects of sulfate ions on powder properties // J. Am. Ceram. Soc. 2004. Vol. 87. P. 1008–1013.

40. *Saric A., Popovic S., Music S.* Formation of crystalline phases by thermal treatment of amorphous rhodium hydrous oxide // Mater. Lett. 2002. Vol. 55. P. 145–151.

41. *Wenli G., Tongxiang L., Xingyu Z. et al.* A study of function mechanism of hexamethyl tetra-amine in gelation process of uranium // Rare Metals. 2006. Vol. 25. P. 343–346.

42. *Kumar N., Bamankar Y.R., Pillai K.T. et al.* Effect of feed solution composition and heat treatment conditions on the morphology of uranium oxide microspheres prepared by sol–gel process // J. Nucl. Mater. 2006. Vol. 359. P. 80–92.

43. *Shi J.Y., Verweij H.* Synthesis and purification of oxide nanoparticle dispersions by modified emulsion precipitation // Langmuir. 2005. Vol. 21. P. 5570–5575.

44. *Hirano M., Okumura S., Hasegawa Y., Inagaki M*. Direct precipitation of spinel type oxide $ZnGa_2O_4$ from aqueous solutions at low temperature below 90 degrees C // Int. J. Inorg. Mater. 2001. Vol. 3. P. 797–801.

45. *Allan J.R., Brown D.H., Lappin M.* Transition metal halide complexes of hexamethylenetetramine // J. Inorg. Nucl. Chem. 1970. Vol. 32. P. 2287–2292.

46. *Chopra D., Dagur P., Prakash A.S. et al*. Synthesis and crystal structure of $M(hmt)_2(H_2O)_6(NO_3)_2\times4H_2O$ complexes, where M = Mn^{2+}, Co^{2+} // J. Cryst. Growth. 2005. Vol. 275. P. e2049–e2053.

47. *Zalewicz M.* The synthesis and thermal decomposition of complex salts of lanthanide bromides with hexamethylenetetramine // Thermochim. Acta. 1990. Vol. 171. P. 131–146.

48. *Grassino S.L., Hume D.N.* Complexation of transition metal ions by hexamethylenetetramine in aqueous solution // J. Inorg. Nucl. Chem. 1970. Vol. 32. P. 3112–3113.

49. *Blazevic N., Kolbah D., Belin B. et al.* Hexamethylenetetramine, a versatile reagent in organic synthesis // Synthesis. 1979. № 03. P. 161–176.

50. *Chen P.L., Chen I.W.* Reactive cerium(IV) oxide powders by the homogeneous precipitation method // J. Am. Ceram. Soc. 1993. Vol. 76. P. 1577–1583.

51. *Zhang F., Jin Q., Chan S.W.* Ceria nanoparticles: Size, size distribution, and shape // J. Appl. Phys. 2004. Vol. 95. P. 4319–4326.

52. *Zhang F., Chan S.W., Spanier J.E. et al.* Cerium oxide nanoparticles: Size-selective formation and structure analysis // Appl. Phys. Lett. 2002. Vol. 80. P. 127–129.

53. *Полежаева О.С., Ярошинская Н.В., Иванов В.К.* Синтез нанодисперсного диоксида церия с контролируемым размером частиц и шириной запрещенной зоны // Журн. неорган. химии. 2007. Т. 52, № 8. С. 1266–1271.

54. *Полежаева О.С., Ярошинская Н.В., Иванов В.К.* Механизм образования нанокристаллического диоксида церия из водных растворов нитрата церия(III) и гекса-метилентетрамина // Неорган. матер. 2008. Т. 44, № 1. С. 57–63.

55. *Кнотько А.В., Пресняков И.А., Третьяков Ю.Д.* Химия твердого тела. М. : Академия, 2006. 304 с.

56. *Иванов В.К., Полежаева О.С.* Синтез ультратонких нанопластин диоксида церия // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54, № 10. С. 1602–1604.

57. *Федоров П.П., Иванов В.К.* Кооперативный механизм образования кристаллов путем агрегации и сращивания наночастиц // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 437, № 4. С. 468–471.

58. *Иванов В.К., Козик В.В., Шапорев А.С. и др.* Синтез нанопорошков CeO_2 и ZnO с контролируемым размером частиц методом гомогенного гидролиза в присутствии гексаметилентетрамина // Химия в интересах устойчивого развития. 2011. Т. 19. С. 249–257.

59. *Markmann J., Tschöpe A., Birringer R.* Low temperature processing of dense nanocrystalline yttrium-doped cerium oxide ceramics // Acta Mater. 2002. Vol. 50. P. 1434–1440.

60. *Rojas T.C., Ocana M.* Uniform nanoparticles of Pr(III)/Ceria solid solutions prepared by homogeneous precipitation // Scripta Mater. 2002. Vol. 46. P. 655–660.

61. *Li J.G., Wang Y., Ikegami T. et al*. Reactive 10 mol% RE_2O_3 (RE = Gd and Sm) doped CeO_2 nanopowders: Synthesis, characterization, and low-temperature sintering into dense ceramics // Mat. Sci. Eng. B. 2005. Vol. 121. P. 54–59.

62. *Vasylkiv O., Sakka Y., Skorokhod V.V.* Nano-blast synthesis of nano-size CeO_2–Gd_2O_3 powders // J. Am. Ceram. Soc. 2006. Vol. 89. P. 1822–1826.

63. *Vasylkiv O., Sakka Y., Skorokhod V.V.* Nano-explosion synthesis of multi-component ceramic nano-composites // J. Europ. Ceram. Soc. 2007. Vol. 27. P. 585–592.

64. *Полежаева О.С., Иванов В.К., Долгополова Е.А. и др.* Синтез нанокристаллических твердых растворов $Ce_{1-x}R_xO_{2-\delta}$ (R = Nd, Eu) методом гомогенного гидролиза // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 433, № 2. С. 196–198.

65. *Полежаева О.С., Долгополова Е.А., Баранчиков А.Е. и др.* Синтез нанокристаллических твердых растворов на основе диоксида церия, допированного РЗЭ // Конденсир. среды и межфазные границы. 2010. Т. 12, № 2. С. 154–159.

66. *Иванова О.С., Долгополова Е.А., Баранчиков А.Е. и др.* Получение нанокристаллических твердых растворов $Ce_{0,8}Eu_yR_{0,2-y}O_{2-\delta}$ (R = Yb, Er) методом гомогенного гидролиза // Журн. неорган. химии. 2011. Т. 56, № 11. С. 1770–1774.

67. *Shannon R.D.* Revised effective ionic-radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // Acta Cryst. 1976. A32. P. 751–767.

68. *Kim D.J.* Lattice parameters, ionic conductivities, and solubility limits in fluorite-structure MO_2 oxide [M = Hf^{4+}, Zr^{4+}, Ce^{4+}, Th^{4+}, $U4^+$] solid solutions // J. Am. Ceram. Soc. 1989. Vol. 72. P. 1415–1421.

69. *Boskovic S., Zec S., Brankovic G. et al.* Preparation, sintering and electrical properties of nano-grained multidoped ceria // Ceram. Int. 2010. Vol. 36. P. 121–127.

70. *Stojmenovic M., Boskovic S., Zec S. et al.* Characterization of nanometric multi-doped ceria powders // J. All. Comp. 2010. Vol. 507. P. 279–285.

71. *Tadoroko S.K., Muccillo E.N.* Effect of Y and Dy co-doping on electrical conductivity of ceria ceramics // J. Europ. Ceram. Soc. 2007. Vol. 27. P. 4261–4264.

72. *Долгополова Е.А., Иванова О.С., Иванов В.К. и др.* Гидротермально-микроволновой синтез нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием, в присутствии гексаметилентетрамина // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57, № 10. С. 1387–1391.

73. *Matijevic E., Hsu W.P.* Preparation and properties of monodispersed colloidal particles of lanthanide compounds. 1. Gadolinium, europium, terbium, samarium and cerium(III) // J. Coll. Int. Sci. 1987. Vol. 118. P. 506–522.

74. *Hirano M., Kato E.* Hydrothermal synthesis of two types of cerium carbonate particles // J. Mat. Sci. Lett. 1999. Vol. 18. P. 403–405.

75. *Wang S., Gu F., Li C., Cao H.* Shape-controlled synthesis of $CeOHCO_3$ and CeO_2 microstructures // J. Cryst. Growth. 2007. Vol. 307. P. 386–394.

76. *Zhang D., Huang L., Zhang J., Shi L.* Facile synthesis of ceria rhombic microplates // J. Mater. Sci. 2008. Vol. 43. P. 5647–5650.

77. *Wu G.S., Xie T., Yuan X.Y. et al.* An improved sol-gel template synthetic route to large-scale CeO2 nanowires // Mat. Res. Bull. 2004. Vol. 39. P. 1023–1028.

78. *Jobbagy M., Marino F., Schonbrod B. et al.* Synthesis of Copper-Promoted CeO_2 Catalysts // Chem. Mater. 2006. Vol. 18. P. 1945−1950.

79. *Byrappa K., Yoshimura M.* Handbook of Hydrothermal Technology. A Technology for Crystal Growth and Materials Processing. New York, USA : William Andrew Publishing, 2000. 870 p.

80. *Аникеев В.И.* Гидротермальный синтез нано- и микрочастиц оксидов металлов в сверхкритической воде // Журн. физ. химии. 2011. Т. 85, № 3. С. 440–445.

81. *Tani E., Yoshimura M., Somiya S.* Crystallization and crystal growth of CeO_2 under hydrothermal conditions // J. Mat. Sci. Lett. 1982. Vol. 1. P. 461–462.

82. *Hirano M., Kato E.* Hydrothermal synthesis of cerium(IV) oxide // J. Am. Ceram. Soc. 1996. Vol. 79. P. 777–780.

83. *Hirano M., Kato E.* The hydrothermal synthesis of ultrafine cerium(IV) oxide powders // J. Mat. Sci. Lett. 1996. Vol. 15. P. 1249–1250.

84. *Lakhwani S., Rahaman M.N.* Hydrothermal coarsening of CeO_2 particles // J. Mat. Res. 1999. Vol. 14. P. 1455–1461.

85. *Wu N.C., Shi E.W., Zheng Y.Q., Li W.J.* Effect of pH of medium on hydrothermal synthesis of nanocrystalline cerium(IV) oxide powders // J. Am. Ceram. Soc. 2002. Vol. 85. P. 2462–2468.

86. *Tok A.I.Y., Boey F.Y.C., Dong Z., Sun X.L.* Hydrothermal synthesis of CeO_2 nanoparticles // J. Mat. Proc. Tech. 2007. Vol. 190. P. 217–222.

87. *Malta L.F.B., Caffarena V.R., Medeiros M.E., Ogasawara T.* TA of non-stoichiometric ceria obtained via hydrothermal synthesis // J. Therm. Anal. Calorim. 2004. Vol. 75. P. 901–910.

88. Microwave-Enhanced Chemistry / Eds H.M. Kingston, S.J. Haswell. Washington : ACS, 1997. 748 p.

89. *Ванецев А.С., Третьяков Ю.Д.* Микроволновой синтез индивидуальных многокомпонентных оксидов // Успехи химии. 2007. Т. 76. С. 435–453.

90. *Yang H., Huang C., Tang A. et al.* Microwave-assisted synthesis of ceria nanoparticles // Mat. Res. Bull. 2005. Vol. 40. P. 1690–1695.

91. *Bonamartini A., Bondioli F., Ferrari A.M., Manfredini T.* Synthesis and characterization of nanosized ceria powders by microwave-hydrothermal method // Mater. Research Bull. 2006. Vol. 41. P. 38–44.

92. *Gao F., Lu Q., Komarneni S.* Fast synthesis of cerium oxide nanoparticles and nanorods // J. Nanosci. Nanotech. 2006. Vol. 6. P. 3812–3819.

93. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Гиль Д.О. и др.* Гидротермально-микроволновой синтез нанокристаллического диоксида церия // Докл. Акад. наук. 2009. Т. 426, № 5. С. 632–634.

94. *Иванов В.К., Копица Г.П., Баранчиков А.Е. и др.* О механизме роста наночастиц диоксида церия в гидротермальных средах // Журн. неорган. химии. 2009. № 12. С. 1939–1943.

95. *Biemann P., Haese-Seiller M., Staron P.* User-friendly software for SANS data reduction // Physica B. 2000. Vol. 276–278. P. 156–157.

96. *Свергун Д.И., Фейгин Л.А.* Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М. : Наука, 1986. 279 с.

97. *Kim N.W., Maeng H.J., Lee D.K., Yu H.* Facile Fabrication of a Cerium Oxide Nanorod // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2014. Vol. 14, № 11. P. 8834–8838.

98. *Chen H.I., Chang H.Y.* Synthesis and characterization of nanocrystalline cerium oxide powders by two-stage non-isothermal precipitation // Solid State Comm. 2005. Vol. 133. P. 593–598.

99. *Chen H.I., Chang H.Y.* Synthesis of nanocrystalline cerium oxide particles by the precipitation method // Ceram. Int. 2005. Vol. 31. P. 795–802.

100. *Chang H.Y., Chen H.I.* Morphological evolution for CeO_2 nanoparticles synthesized by precipitation technique // J. Cryst. Growth. 2005. Vol. 283. P. 457–468.

101. *Han W.Q., Wu L., Zhu Y.* Formation and oxidation state of CeO_{2-x} nanotubes // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127. P. 12814–12815.

102. *Zhou K., Yang Z., Yang S.* Highly reducible CeO_2 nanotubes // Chem. Mater. 2007. Vol. 19. P. 1215–1217.

103. *Mai H.X., Sun L.D., Zhang Y.W. et al*. Shape-selective synthesis and oxygen storage behavior of ceria nanopolyhedra, nanorods, and nanocubes // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109. P. 24380–24385.

104. *Yang Z., Zhou K., Liu X. et al*. Single-crystalline ceria nanocubes: size-controlled synthesis, characterization and redox property // Nanotechnology. 2007. Vol. 18. P. 185606-1–185606-4.

105. *Higashine Y., Fujihara S.* Facile synthesis of single-crystalline CeO_2 nanorods from aqueous $CeCl_3$ solutions // J. Ceram. Soc. Jap. 2007. Vol. 115. P. 916–919.

106. *Huang P.X., Wu F., Zhu B.L. et al*. CeO_2 nanorods and gold nanocrystals supported on CeO_2 nanorods as catalyst // J. Phys. Chem. B. 2005. Vol. 109. P. 19169–19174.

107. *Penn R.L., Banfield J.F.* Morphology development and crystal growth in nanocrystalline aggregates under hydrothermal conditions: Insights from titania // Geochim. Cosmochim. Acta. 1999. Vol. 63. P. 1549–1557.

108. *Penn R.L., Banfield J.F.* Oriented attachment and growth, twinning, polytypism, and formation of metastable phases: Insights from nanocrystalline TiO_2 // Am. Mineral. 1998. Vol. 83. P. 1077–1082.

109. *Penn R.L., Banfield J.F.* Imperfect oriented attachment: Dislocation generation in defect-free nanocrystals // Science. 1998. Vol. 281. P. 969–971.

110. *Si R., Zhang Y.W., You L.P., Yan C.H.* Self-organized monolayer of nanosized ceria colloids stabilized by poly(vinylpyrrolidone) // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110. P. 5994–6000.

111. *Du N., Zhang H., Chen B. et al*. Ligand-free self-assembly of ceria nanocrystals into nanorods by oriented attachment at low temperature // J. Phys. Chem. C. 2007. Vol. 111. P. 12677–12680.

112. *Karakoti A.S., Kuchibhatla S.V., Baer D.R., Thevuthasan S., Sayle D.C., Seal S.* Self-Assembly of Cerium Oxide Nanostructures in Ice Molds // Small. 2008. № 4(8). P. 1210–1216.

113. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Копица Г.П. и др*. Особенности высокотемпературного роста наночастиц диоксида церия // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54, № 11. С. 1767–1775.

114. *Гегузин Я.Е.* Физика спекания. 2-е изд., перераб. и доп. М. : Наука, 1984. 312 с.

115. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Баранчиков А.Е., Щербаков А.Б.* Термическая стабильность нанокристаллического диоксида церия, полученного криохимическим методом // Неорган. матер. 2010. Т. 46, № 1. С. 49–53.

116. *Chuang F.Y., Yang S.M.* Cerium dioxide/polyaniline core-shell nanocomposites // J. Colloid Interface Sci. 2008. Vol. 320. P. 194–201.

117. *Yin L., Wang Y., Pang G. et al*. Sonochemical synthesis of cerium oxide nanoparticles – Effect of additives and quantum size effect // J. Coll. Int. Sci. 2002. Vol. 246. P. 78–84.

118. *Gupta S., Brouwer P., Bandyopadhyay S. et al*. TEM/AFM investigation of size and surface properties of nanocrystalline ceria // J. Nanosci. Nanotechnol. 2005. Vol. 5. P. 1101–1107.

119. *Lee J.S., Choi S.Ch.* Synthesis of nano-sized ceria powders by two-emulsion method using sodium hydroxide // Mat. Lett. 2005. Vol. 59. P. 395–398.

120. *Seal S., Petersen E.L., Deshpande S. et al*. Патент США № 7419516. Опубл. 02.09.2008.

121. *Qi L., Sehgal A., Castaing J.-C. et al.* Cousin. Redispersible hybrid nanopowders: cerium oxide nanoparticle complexes with phosphonated-PEG oligomers // ACS Nano. 2008. Vol. 2. P. 879–888.

122. *Vincent A., Inerbaev T.M., Babu S. et al.* Tuning Hydrated Nanoceria Surfaces: Experimental/Theoretical Investigations of Ion Exchange and Implications in Organic and Inorganic Interactions // Langmuir. 2010. Vol. 26. P. 7188–7198.

123. *Иванов В.К., Шапорев А.С., Гиль Д.О. и др.* Синтез коллоидных растворов нанокристаллического диоксида церия в неполярных растворителях // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 430, № 3. С. 334–336.

124. *Zhou H.P., Zhang Y.W., Mai H.X., Sun X., Liu Q., Song W.G., Yan C.H.* Spontaneous organization of uniform CeO_2 nanoflowers by 3D oriented attachment in hot surfactant solutions monitored with an in situ electrical conductance technique. // Chemistry-A European Journal. 2008. № 14(11). P. 3380–3390.

125. *Lee S.S., Zhu H., Contreras E.Q. et al.* High temperature decomposition of cerium precursors to form ceria nanocrystal libraries for biological applications // Chem. Mater. 2012. Vol. 24. P. 424–432.

126. *Wang S., Chen S., Navrotsky A. et al.* Modified polyol-mediated synthesis and consolidation of Gd-doped ceria nanoparticles // Solid State Ionics. 2010. Vol. 181. P. 372–378.

127. *Иванова О.С., Гасымова Г.А., Щербаков А.Б. и др.* Полиольный синтез нанокристаллического диоксида церия, допированного неодимом, европием, гадолинием и иттербием // Докл. Акад. наук. 2012. Т. 443, № 3. С. 317–320.

128. *Lin K. S., Chowdhury S.* Synthesis, characterization, and application of 1-D cerium oxide nanomaterials: a review // International journal of molecular sciences. 2010. Vol. 11, № 9. P. 3226–3251.

129. *Ledoux G., Amans, D. Dujardin, C. Masenelli-Varlot K.* Facile and rapid synthesis of highly luminescent nanoparticles via pulsed laser ablation in liquid // Nanotechnology. 2009. № 20(44). P. 445–605.

130. *Takeda Y., Mafuné F.* Formation of wide bandgap cerium oxide nanoparticles by laser ablation in aqueous solution // Chemical Physics Letters. 2014. Vol. 599. P. 110–115.

131. *Ohba H., Saeki M., Nishimura A., Yokoyama, A.* Preparation of cerium compound nanoparticles by laser ablation in liquid phase // 8th Symposium on advanced photon research. JAEA-KPSI, 2008. P.73–76

132. *Karakoti A.S., Monteiro-Riviere N.A., Aggarwal R. et al.* Nanoceria as antioxidant: Synthesis and biomedical applications // JOM. 2008. Vol. 60. P. 33–37.

133. *Tsai Y.Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al.* Constantinidis I., Sigmund W. Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // Nanomed. 2007. Vol. 2. P. 325–332.

134. *Kar S., Patel C., Santra S.* Direct room temperature synthesis of valence state engineered ultra-small ceria nanoparticles: investigation on the role of ethylenediamine as a capping agent // J. Phys. Chem. C. 2009. Vol. 113. P. 4862–4867.

135. *Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis C.* Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // Small. 2008. Vol. 4. P. 552–556.

136. *Karakoti A.S., Kuchibhatla S.V.N.T., Babu K.S., Seal S.* Direct synthesis of nanoceria in aqueous polyhydroxyl solutions // J. Phys. Chem. C. 2007. Vol. 111. P. 17232–17240.

137. *Maensiri S., Masingboon Ch., Laokul P. et al.* Egg white synthesis and photoluminescence of platelike clusters of CeO_2 nanoparticles // Cryst. Growth. Design. 2007. Vol. 7. P. 950–955.

138. *Izu N., Matsubara I., Itoh T. et al.* Controlled synthesis of monodispersed cerium oxide nanoparticle sols applicable to preparing ordered self-assemblies // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2008. Vol. 81. P. 761–766.

139. *Zhang Y.W., Si R., Liao C.S., Yan C.H., Xiao C.X., Kou Y.* Facile alcohothermal synthesis, size-dependent ultraviolet absorption, and enhanced CO conversion activity of ceria nanocrystals // J. Phys. Chem. B. 2003. № 107(37). P. 10159–10167.

140. *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. Vol. 111. P. 8437–8442.

141. *Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К. и др.* Одностадийный синтез коллоидных растворов диоксида церия для биомедицинского применения // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 437, № 5. С. 638–641.

142. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Щербаков А.Б. и др.* Гидротермально-микроволновой синтез стабильных золей нанокристаллического диоксида церия для биомедицинских применений // Журн. неорган. химии. 2010. Т. 55, № 1. С. 3–8.

143. *Sumaoka J., Miyama S., Komiyama M.* Enormous acceleration by cerium(IV) for the hydrolysis of nucleoside 3',5'-cyclic monophosphates at pH 7 // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1994. P. 1755–1756.

144. *Baller J.F., Poelstra K., Hardonk M.J., Bakker W.W.* A modified cerium-based histochemical method for detection of experimentally-induced atpase impairment in glomeruli of the rat-kidney // J. Histochem. Cytochem. 1993. Vol. 41. P. 1105–1109.

145. *Jian L.C., Li J.H., Li P.H., Chen T.H.* An electron microscopic-cytochemical localization of plasma membrane Ca^{2+}-ATPase activity in poplar apical bud cells during the induction of dormancy by short-day photoperiods // Cell Research. 2000. Vol. 10. P. 103–114.

146. *Иванов В.К., Щербаков А.Б., Жолобак Н.М.* Щедрый дар Цереры // Химия и жизнь. 2012. № 5. С. 14–17.

147. *Гасымова Г.А., Иванова О.С., Баранчиков А.Е. и др.* Синтез водных золей нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием // Наносистемы: физика, химия, математика. 2011. Т. 2, № 3. С. 113–120.

148. *Louis C., Bazzi R., Marquette C.A. et al.* Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling // Chem. Mater. 2005. Vol. 17. P. 1673–1682.

149. *Bridot J., Faure A., Laurent S. et al.* Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for *in vivo* imaging // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. P. 5076–5084.

150. *Dikmen S., Shuk P., Greenblatt M., Gocmez H.* Hydrothermal synthesis and properties of $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$ solid solutions // Solid State Sci. 2002. Vol. 4. P. 585–590.

151. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Шапорев А.С. и др.* Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журн. неорган. химии. 2010. Т. 55, № 3. С. 368–373.

152. *Иванов В.К., Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Полежаева О.С.* Необычные свойства диоксида церия // Природа. 2011. Т. 3. С. 47–57.

153. *Le Loarer J.I. et al.* Патент США № 5891412. Опубл. 06.04.1999.

154. *Chane-Ching J.Y.* Патент США № 5344588. Опубл. 06.09.1994.

155. *Chane-Ching J.Y., Chopin T.* Патент США № 5733361. Опубл. 31.03.1998.

156. *Baker J.M. et al.* Патент США № 7381251. Опубл. 06.03.2008.

157. *Cabane B., Nabavi M.* Патент США № 6033677. Опубл. 03.07.2000.

158. *Seal S et al.* Патент США № 7419516. Опубл. 02.09.2008.

159. *Yadav T.* Патент США № 7229600. Опубл. 12.06.2007.

160. *Sarkas H.W., Piepenbrink Jonathan J.* Патент США № 6669823. Опубл. 30.12.2003.

161. *Chan S.W.* Патент США № 7141227. Опубл. 28.11.2006.

162. *Gradeff P.S. et al.* Патент США № 4886624. Опубл. 12.12.1989.

163. *Жолобак Н.М., Щербаков А.Б., Иванов В.К. и др.* Цитотоксичность водных золей наночастиц CeO_2, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // Биологические системы. 2010. Т. 2, вып. 1. С. 3–6.

164. *Жолобак Н.М., Олевинская З.М., Спивак Н.Я. и др.* Антивирусное действие наночастиц оксида церия, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // Журн. микробиол. 2010. Т. 72, № 3. С. 42–47.

165. *Усатенко О.В., Щербаков О.Б., Иванов В.К.* Заявка України на винахід № a200810411, пріоритет: 15.08.2008.

166. *Sehgal A., Lalatonne Y., Berret J.-F., Morvan M.* Precipitation-redispersion of cerium oxide nanoparticles with poly(acrylic acid): Toward stable dispersions // Langmuir. 2005. Vol. 21. P. 9359–9364.

167. *Qing Rui, Wolfgang Sigmund*. Redox Behavior of Ceria Nanoparticles. *Recent Patents on Materials Science* 2014. 7(1). P. 37–49.

168. *Воскресенская О.О., Скорик Н.А.* Кинетика реакции сульфата церия(IV) с цитратом и термодинамика образования промежуточных комплексов // Журн. физ. химии. 2009. Т. 83. С. 1079–1084.

169. *Roma-Luciow R., Sarraf L., Morcellet M.* Concentration effects during the formation of poly (acrylic acid)-metal complexes in aqueous solutions // Polymer Bull. 2000. Vol. 45. P. 411–418.

170. *Hetper J., Balcerowiak W., Beres J.* Thermal-decomposition of metal polyacrylates // J. Therm. Analysis and Calorim. 1981. Vol. 20. P. 345–350.

171. *Иванов В.К., Усатенко А.В., Щербаков А.Б.* Исследование антиоксидантной активности нанокристаллического диоксида церия по отношению к антоцианам // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54, № 10. С. 1596–1601.

172. *Щербаков А.Б., Иванов В.К., Жолобак Н.М. и др.* Способ получения покрытого стабилизирующей оболочкой нанокристаллического диоксида церия. Заявка на патент РФ № 2012112921 от 04.04.2012.

173. *Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К. и др.* Синтез и антиоксидантная активность биосовместимых водных золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57, № 11. С. 1499–1507.

2. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Одним из основных параметров, характеризующих способность вещества формировать устойчивые коллоидные (нанодисперсные) гетерофазные системы, является его растворимость. Растворимость зависит от фактора межмолекулярного взаимодействия вещества (ψ-фактора); максимальная растворимость наблюдается при совпадении ψ-фактора вещества и растворителя [1]. Значение ψ-фактора диоксида церия ($\psi_{CeO_2} \cong 0{,}42$) существенно отличается от значения для воды ($\psi_{H_2O} = 0{,}241$), поэтому CeO_2 в воде практически не растворяется (рис. 2.1).

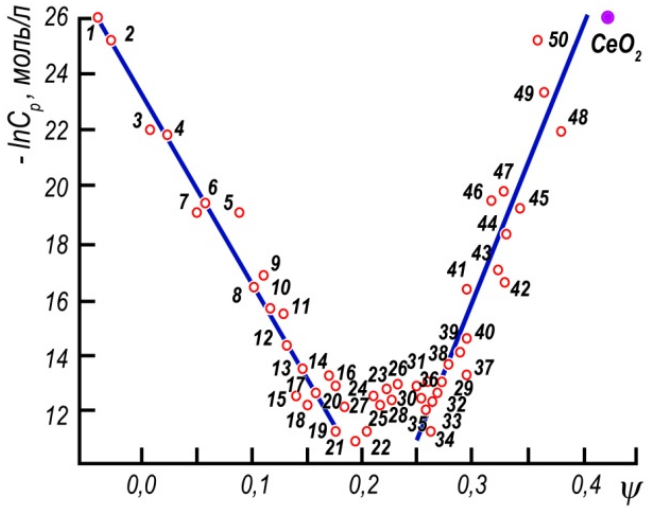


Рис. 2.1. Зависимость растворимости неорганических соединений от их ψ-фактора: *1* – $Fe(CO)_5$; *2* – Cu_2I_2; *3* – CBr_4; *4* – $Ni(CO)_4$; *5* – $HgBr_2$; *6* – CS_2; *7* – AsI_3; *8* – Br_2; *9* – OsO_4; *10* – RuO_3; *11* – $HgCl_2$; *12* – $AuCl_3$; *13* – CdI_2; *14* – $CdBr_2$; *15* – $FeCl_3$; *16* – $SnCl_2$; *17* – KSCN; *18* – CaI_2; *19* – $ZnBr_2$; *20* – NH_4Cl; *21* – SbF_3; *22* – $ZnCl_2$; *23* – $CdCl_2$; *24* – $CaBr_2$; *25* – RbI; *26* – KBr; *27* – $CuCl_2$; *28* – KI; *29* – $MgCl_2$; *30* – $MnCl_2$; *31* – RbBr; *32* – $CaCl_2$; *33* – RbCl; *34* – CsCl; *35* – $SrCl_2$; *36* – $NiCl_2$; *37* – KCl; *38* – Na_2S; *39* – $BaCl_2$; *40* – $CoCl_2$; *41* – LiI; *43* – AlF_3; *44* – B_2O_3; *45* – BaO; *46* – BaF_2; *47* – MgO; *48* – MgF_2; *49* – CaF_2; *50* – ZnS [1].
На рисунке отдельно показано значение для диоксида церия

Крупнокристаллический диоксид церия относится к практически не растворимым материалам (k_{sp} = $1{,}0 \cdot 10^{-54}$ [2]), вместе с тем с уменьшением размера частиц его растворимость возрастает; в общем случае растворимость вещества (C_S) связана с радиусом составляющих его частиц соотношением Оствальда-Фрейндлиха:

$$C_S = C_\infty e^{\frac{2\gamma M}{RT\rho r}} \text{ или } C_S = C_\infty e^{\frac{\alpha}{r}},$$

где C_S – растворимость частицы радиуса r, г/л; C_∞ – растворимость частицы бесконечного радиуса, г/л; γ – поверхностное натяжение на границе наночастицы и растворителя (межфазное натяжение), Дж/м^2; M – молекулярная масса вещества, г/моль; R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К); T – абсолютная температура, К; ρ – плотность вещества, г/м^3; r – радиус частицы, м; α – капиллярная длина, м.

Согласно данным [3], расчетная энергия поверхности безводного и гидратированного диоксида церия составляет 1,16 ± 0,14 и 0,86 ± 0,01 Дж/м^2 соответственно (удельная поверхностная энергия нанокристаллического диоксида церия лежит в диапазоне 2,9 ÷ 3,7 Дж/м^2 [4]). Значения энтальпии для гидратированной и безводной поверхностей CeO_2 на границе НДЦ – вода очень близки между собой и составляют 0,84 ± 0,14 и 0,78 ± 0,14 Дж/м^2 соответственно [3]. Для диоксида церия ρ = 7,215 г/см^3 = $7{,}215 \cdot 10^6$ г/м^3; $C_\infty = 5{,}23 \cdot 10^{-12}$ моль/л = $9 \cdot 10^{-10}$ г/л [2].

Таким образом, зависимость растворимости наночастиц CeO_2 от их размера можно выразить как

$$C_S = 9 \cdot 10^{-10} e^{\frac{1.6 \cdot 10^{-8}}{r}}.$$

На рис. 2.2 видно, что растворимость частиц CeO_2 размером менее 16 нм в воде резко возрастает; данный эффект определяет не только возможность оствальдовской перекристаллизации при формировании наночастиц (см. гл. 1), но также оказывает влияние и на другие свойства нанодисперсного диоксида церия – в том числе биологические (например, клиренс).

С уменьшением размеров частиц параметры элементарных ячеек многих веществ (например, золота) уменьшаются вследствие увеличения поверхностного натяжения. Тем не менее в ряде недавних публикаций было показано, что для некоторых оксидных соединений (включая CeO_2) эта тенденция меняется на противоположную: пара-

метр элементарной ячейки с уменьшением размеров частиц увеличивается.

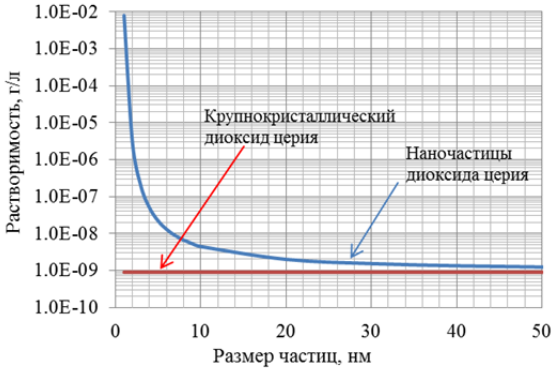


Рис. 2.2. Расчетная зависимость растворимости диоксида церия в воде от размера частиц

Соответствующие данные были впервые получены при исследовании практически монодисперсных частиц диоксида церия с размерами 6,7, 3,8 и 2,1 нм, выделенных из сильнокислых золей, стабилизированных анионными ПАВ [5, 6]. Измерения размеров частиц и определение параметров решетки проводили методом просвечивающей электронной микроскопии. На рис. 2.3 приведена полученная в [5] зависимость значений параметра элементарной ячейки от размера частиц CeO_2. По мнению авторов [5], наблюдаемый характер изменения размера ячейки обусловлен постепенным уменьшением эффективной степени окисления церия вследствие удаления части атомов кислорода, находящихся на поверхности частиц, из соответствующих кристаллографических позиций с образованием кислородных вакансий. Проведенные авторами [5–7] расчеты показывают, что критический размер частиц, при котором должен наблюдаться полный переход $Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+}$, составляет 1,9 нм (табл. 2.1). Предлагаемая модель частичного восстановления церия включает протонирование поверхностных атомов кислорода с последующим удалением воды и образованием кислородных вакансий.

Результаты компьютерного моделирования, проведенного авторами [8], свидетельствуют о том, что для веществ с ионным типом связи

(в том числе для оксидов) изменения значений параметра элементарной ячейки при переходе в наносостояние обусловлены изменениями формальной степени окисления атомов. При этом уменьшение формальной степени окисления неизбежно приводит к увеличению значения параметра ячейки вследствие уменьшения электростатических сил, тогда как увеличение формальной степени окисления в зависимости от структуры соединений может приводить как к уменьшению, так и к увеличению параметра ячейки.

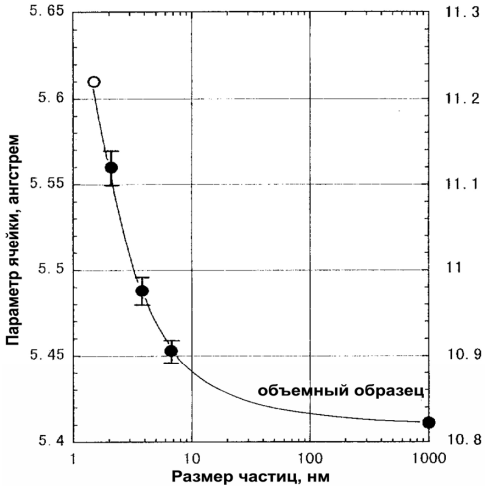


Рис. 2.3. Зависимость значений параметра элементарной ячейки от размера частиц CeO_2 для нанокристаллических и крупнокристаллического образцов [5]

Таблица 2.1

Размеры и состав наночастиц CeO_2 [6]

Размер частиц, нм	Доля атомов церия в приповерхностном слое, % (расчетные данные)	$Ce^{3+}/(Ce^{3+} + Ce^{4+})$, % (экспериментальные данные)	Номинальный состав
7,0	27	21	$CeO_{1,894}$
4,6	43	38	$CeO_{1,810}$
2,6	75	74	$CeO_{1,630}$
1,9	100	–	–

В работах [9–11] были получены дополнительные экспериментальные подтверждения эффекта увеличения параметра ячейки диоксида церия при уменьшении размеров частиц. В частности, авторы [10] провели анализ наночастиц CeO_2 (3–20 нм), полученных газофазным методом. Было установлено, что значения параметра ячейки в зависимости от размера частиц варьируют в пределах 0,541–0,561 нм; таким образом, диапазон изменения значений параметра ячейки несколько превосходит указанный в работах [5–7]. По мнению авторов [10], подобное расхождение обусловливается более неравновесными условиями получения наночастиц CeO_2. Методом спектроскопии потерь энергии электронов было установлено, что кислородная нестехиометрия наночастиц увеличивается от центра к периметру; таким образом, наночастицы диоксида церия в действительности представляют собой наноструктуры типа «ядро в оболочке», при этом в относительно крупных частицах ядро представляет собой близкий к стехиометричному диоксид церия, а поверхность близка по составу Ce_2O_3. Проведенные авторами [10] измерения показали, что толщина поверхностного слоя различна для частиц CeO_2 разного размера (рис. 2.4), и с уменьшением размера частиц доля Ce_2O_3 резко возрастает. Эффективная степень окисления церия равна +3 уже для частиц диаметром 3 нм (1,9 нм – по оценкам [5]).

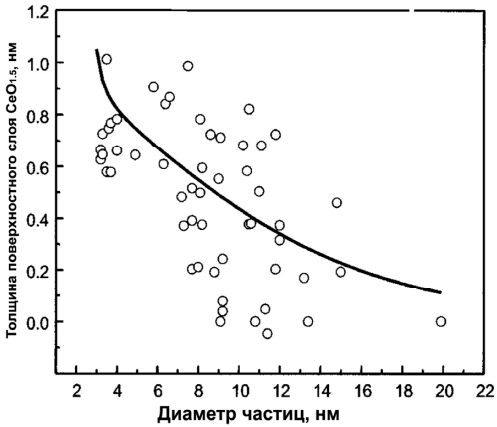


Рис. 2.4. Толщина поверхностного слоя Ce_2O_3 для частиц CeO_2 различного размера (в предположении о том, что ионы Ce^{3+} локализованы только вблизи поверхности) [10]

По данным [9], для частиц CeO_2 размером 6,1–80 нм, полученных гомогенным осаждением из нитрата церия(III) в присутствии гексаметилентетрамина, значение параметра элементарной ячейки изменяется от 0,543 до 0,541 нм (рис. 2.5). Отметим, что как сами значения, так и диапазон их изменений существенно меньше, чем в упомянутых выше работах Цунекавы.

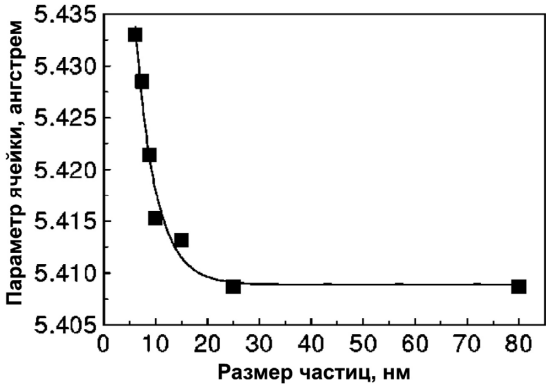


Рис. 2.5. Зависимость значений параметра элементарной ячейки CeO_2 от размера наночастиц [9]

Результаты измерений значений параметра ячейки для сильноагрегированных частиц CeO_2, синтезированных методами «мягкой химии» в присутствии пероксида водорода, демонстрируют ту же тенденцию, однако диапазон значений составляет 0,542–0,560 нм [11], что хорошо коррелирует с данными [12]. По мнению авторов [8], увеличение параметра ячейки обусловлено частичным восстановлением ионов Ce^{4+} на поверхности частиц под действием пероксида водорода (см. также рис. 2.6).

Определенные в [11] значения концентраций Ce^{3+} в наночастицах CeO_2 различного размера представлены в табл. 2.2.

В работах [13, 14] дано сопоставление результатов, полученных различными авторами [5, 9, 10]. Сводная зависимость значений параметра кристаллической решетки CeO_2, построенная на основании приведенных в этих работах данных, показана на рис. 2.7. Приведенные данные наглядно иллюстрируют указанное выше несоответствие между результатами, полученными разными авторами.

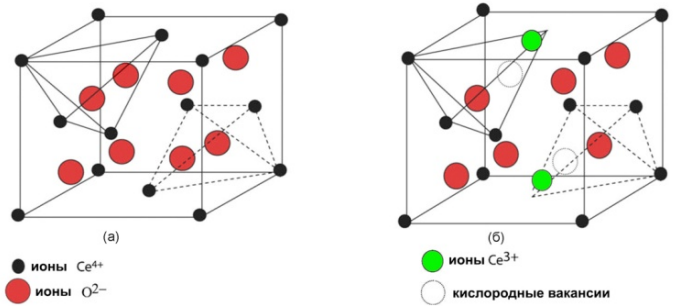


Рис. 2.6. Кристаллическая структура стехиометрического крупнокристаллического (*а*) и нестехиометрического нанокристаллического (*б*) диоксида церия [11]

Таблица 2.2

Содержание Ce^{3+} в наночастицах CeO_2 различного размера [11]

Размер частиц, нм	3	6	30
Содержание Ce^{3+}, %	44	29	17

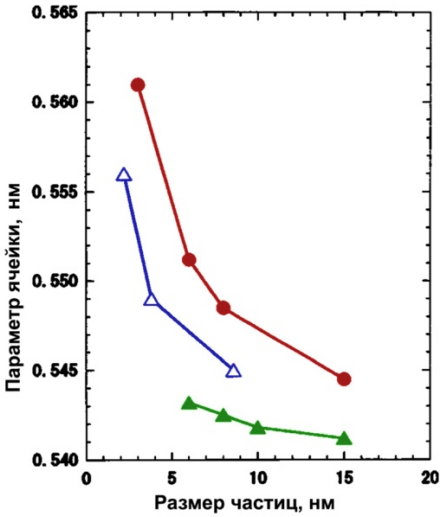


Рис. 2.7. Сводная зависимость значений параметра элементарной ячейки от размера частиц CeO_2 [13]: ● – данные из работы [10]; △ – данные из работ [5, 14]; ▲ – данные из работы [9]

Согласно данным [13, 14], причина таких различий может быть обусловлена разной формой наночастиц CeO_2: зависимости с бóльшим наклоном наблюдаются для частиц сферической или эллипсовидной формы, тогда как более пологая зависимость характерна для частиц с октаэдрической огранкой. С учетом того, что кислородная нестехиометрия диоксида церия напрямую коррелирует с его каталитической активностью, авторы [13] утверждают, что для каталитических приложений желательно использовать нанопорошки CeO_2, состоящие из частиц, не имеющих ярко выраженной огранки. В работах [15, 16] нами был проведен анализ значительного массива экспериментальных данных для образцов диоксида церия, полученных с использованием методов гомогенного и быстрого осаждения, гидротермального и гидротермально-микроволнового синтеза, термической обработки порошков диоксида церия с различной химической предысторией. Размер частиц для проанализированных образцов диоксида церия варьировал в диапазоне от 2,0 до 40–50 нм, что впервые дало возможность провести детальные исследования влияния размерного фактора на параметр элементарной ячейки и кислородную нестехиометрию CeO_2.

На рис. 2.8 приведена общая зависимость параметра ячейки a от размеров частиц CeO_2 для всех полученных образцов, выявленная нами на основании данных рентгеновской дифракции по методу Ритвельда.

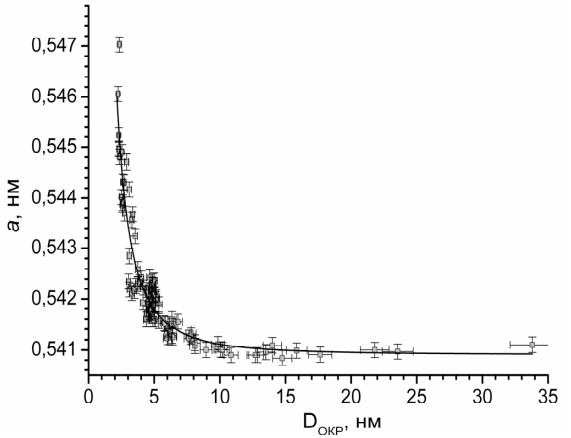


Рис. 2.8. Зависимость параметра элементарной ячейки от размера частиц нанокристаллического диоксида церия [16]

Можно констатировать, что все полученные экспериментальные точки лежат на одной кривой (рис. 2.8), при этом значения параметра *a* варьируют от 0,5410 до 0,5453 нм. Зависимость изменения параметра элементарной ячейки ($\triangle a$) от размера частиц (D) хорошо описывается степенной зависимостью

$$\triangle a \text{ (нм)} = 0{,}025 \cdot D^{-2{,}1}.$$

Таким образом, определенный нами диапазон изменения значений параметра элементарной ячейки CeO_2 оказывается существенно меньше приведенных в работах [5, 7, 8, 10, 13], однако хорошо согласуется с данными [9]. Значение показателя степени в приведенном выше уравнении заметно превосходит аналогичные значения, указанные авторами [11, 13]. Следует особо отметить, что значения параметра элементарной ячейки, определенные для образцов CeO_2, характеризующихся схожими размерами частиц, однако полученных с применением разных синтетических методов, практически совпадают; иными словами, варьирование условий получения нанокристаллического диоксида церия при синтезе методами «мягкой химии» не сказывается на его кислородной нестехиометрии, и единственным параметром, ее определяющим, остается размер частиц CeO_2.

С учетом высказанного авторами [5] предположения о том, что в наносостоянии оксид церия(III) может существовать в виде кубической модификации С-типа с параметром кристаллической ячейки, равным ~0,561 нм, а фазы CeO_2 и Ce_2O_3 имеют неограниченную взаимную растворимость, состав синтезированных наночастиц CeO_2 можно определить в соответствии с законом Вегарда. В частности, для наиболее высокодисперсных образцов (D = 2,3–2,7 нм) состав должен соответствовать формулам $CeO_{1,89} \div CeO_{1,92}$. Аналогичные оценки, выполненные с использованием эмпирического уравнения Кима [17,18] для диоксида церия, допированного трехвалентными катионами (в нашем случае – Ce^{3+}):

$$a \text{ (нм)} = 0{,}5413 + 0{,}04612x,$$

дают для этих же образцов схожий диапазон составов ($CeO_{1,91}$–$CeO_{1,93}$). Независимая оценка содержания Ce^{3+} и Ce^{4+} в указанных образцах, произведенная методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), свидетельствует о том, что их состав отвечает формуле $CeO_{1,85}$–$CeO_{1,89}$. Несколько заниженное содержание кисло-

рода по результатам РФЭС, вероятно, обусловливается частичным восстановлением образцов непосредственно в ходе измерений.

Зависимость параметра ячейки *a* от размеров частиц позволяет определить критический размер, при котором все ионы церия в диоксиде церия формально должны становиться трехзарядными. При подстановке в указанное уравнение значения параметра ячейки для кубической модификации Ce_2O_3 C-типа [5] критический размер составляет ~1,1 нм. В свою очередь, по данным авторов [10], образующийся при уменьшении размеров частиц CeO_2 сесквиоксид церия имеет структуру флюорита с двумя разупорядоченными кислородными вакансиями на одну элементарную ячейку, параметр которой составляет ~0,556 нм. Аналогичные расчеты критического размера частиц с использованием этого значения дают величину $a \approx 1{,}3$ нм. Правильность полученных нами оценок критического размера частиц дополнительно подтверждается тем, что указанные значения приблизительно соответствуют удвоенному параметру ячейки CeO_2, т.е. для полного восстановления Ce(IV) до Ce(III) требуется, чтобы все элементарные ячейки CeO_2 располагались на поверхности.

Интересно, что в некоторых работах указывается, что с уменьшением размера наночастиц параметр элементарной ячейки не увеличивается, а уменьшается [19, 20]. Например, уменьшение параметра элементарной ячейки наблюдали для диоксида церия, получаемого методом обратного осаждения из водного раствора нитрата церия(III) (рис. 2.9).

Авторами [19] было также показано, что важным фактором, определяющим значение параметра элементарной ячейки нанодисперсного диоксида церия, осаждаемого из растворов, является отношение концентраций ионов Ce^{3+} и гидроксил-анионов в исходной реакционной смеси. В то же время для любого отношения $[Ce^{3+}]/[OH^-]$ на зависимости параметра *a* от размера частиц наблюдался минимум в районе 15 нм, т.е. уменьшение размера частиц до ~15 нм приводит к сжатию кристаллической решетки, а дальнейшее уменьшение – к ее расширению. Подобный вид зависимости авторы [19] объясняют наличием двух конкурирующих эффектов – расширением кристаллической решетки за счет наличия ионов Ce^{3+}, ионный радиус которого больше ионного радиуса Ce^{4+} (или за счет напряжений, связанных с наличием дефектов структуры), а также сжатием решетки за счет действия сил поверхностного натяжения (рис. 2.10).

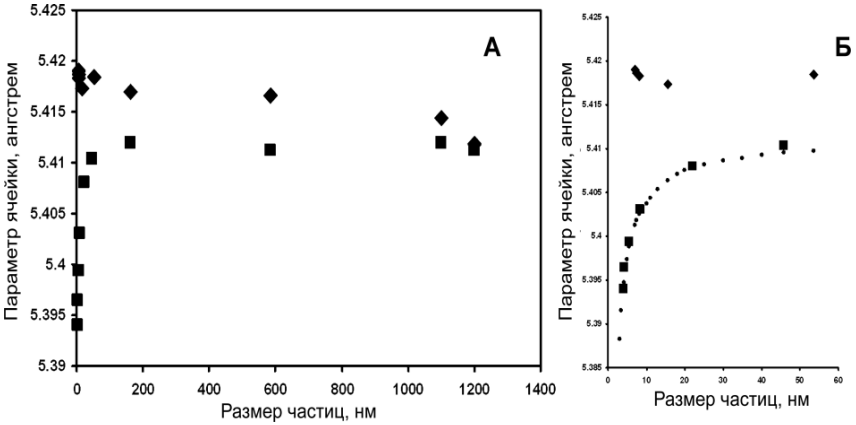


Рис. 2.9. Зависимость параметра элементарной ячейки диоксида церия, полученного методом осаждения в микроэмульсии (◆) и методом быстрого осаждения (■), от размера его частиц. Точками (•) на рис. 2.8, *Б* показаны расчетные данные, полученные с учетом отношения площади поверхности частицы к ее объему [19]

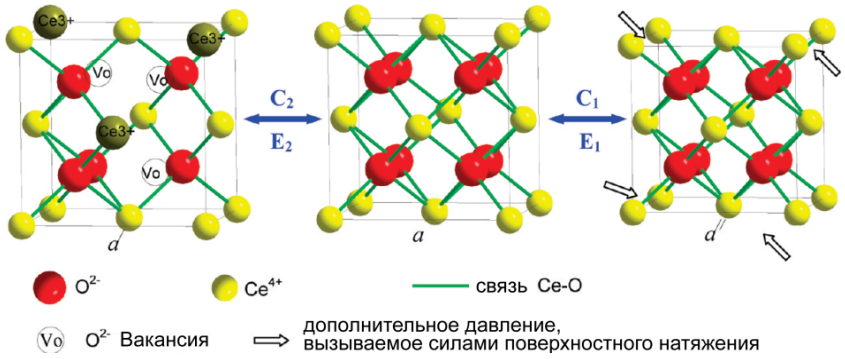


Рис. 2.10. Схема деформации кристаллической решетки диоксида церия. «С» соответствует сжатию решетки, «Е» – расширению. Подстрочный индекс «1» указывает, что деформация решетки вызвана действием сил поверхностного натяжения, «2» – наличием анионных вакансий.
Параметр ячейки уменьшается в ряду $a' > a > a''$ [19]

Основные типы возможных дефектов структуры в кристаллической решетке диоксида церия представлены на рис. 2.11.

На основании анализа литературных, а также собственных экспериментальных данных авторами [19] было отмечено, что условия определения параметра измерений для определения параметров элементарной ячейки могут существенно влиять на получаемые результаты. В частности, при измерениях, проводимых в вакууме (просвечивающая электронная микроскопия / электронная дифракция), изменение параметра *a* может достигать 2,5–7%, тогда как при измерениях методом рентгеновской дифракции на воздухе аналогичная величина существенно меньше.

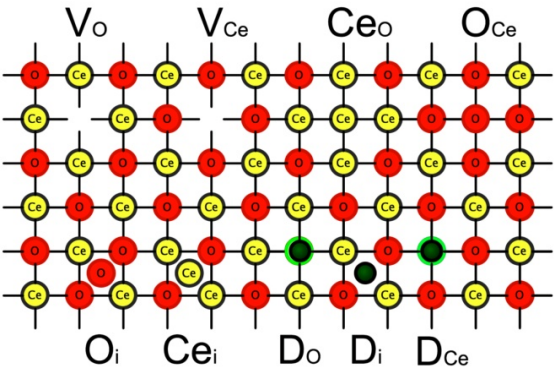


Рис. 2.11. Основные дефекты кристаллической решетки диоксида церия. V_O – кислородная вакансия; V_{Ce} – вакансия церия; Ce_O – церий в позиции кислорода; O_{Ce} – кислород в позиции церия; O_i – кислород в междоузлии; Ce_i – церий в междоузлии; D_O – допант (примесь) в позиции кислорода; D_i – допант в междоузлии; D_{Ce} – допант в позиции церия [21]

Следует отметить, что накопленный к настоящему времени объем экспериментальных данных о структуре нанодисперсного CeO_2 относительно невелик, поэтому действительные причины различий (если таковые действительно существуют) в значениях параметра решетки для наночастиц CeO_2 одинакового размера, синтезированных различными методами, пока неизвестны; в частности, можно предположить, что кислородная нестехиометрия поверхностных слоев наночастиц CeO_2 может в существенной степени зависеть от природы молекул и ионов, адсорбированных на их поверхности. Кроме того, дополнительное увеличение кислородной нестехиометрии теоретически мо-

жет возникать вследствие синтеза наночастиц диоксида церия в сильно неравновесных условиях. К подобному результату, например, может привести высокотемпературный синтез CeO_2 в атмосфере с малым парциальным содержанием кислорода с последующей быстрой закалкой (см., например, зависимости значений параметра ячейки нанокристаллического диоксида церия от температуры в атмосфере $4\%O_2/N_2$ и $8\%CO/N_2$ [22], рис. 2.12).

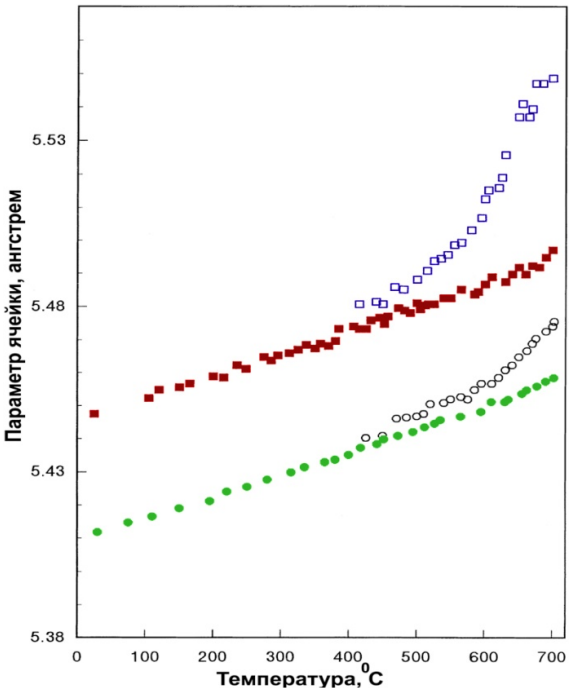


Рис. 2.12. Зависимости значений параметра ячейки нанокристаллического диоксида церия от температуры при нагревании в атмосфере 4% O_2/N_2 (●) и охлаждении 8% CO/N_2 (○); ■, □ – аналогичные зависимости для твердого раствора $(CeO_2)_{0,8}(LaO_{1,5})_{0,2}$ [22]

Выдвинутая авторами [5] гипотеза о зависимости кислородной нестехиометрии от размера частиц нанокристаллического диоксида церия находит подтверждение при анализе данных спектроскопии комбинационного рассеяния (рамановской спектроскопии). В работах [13,

24] было впервые продемонстрировано, что с уменьшением размеров частиц CeO_2 наблюдаются систематические изменения в рамановских спектрах, в частности изменение положения и ширины пика, соответствующего трижды вырожденной активной моде F_{2g} (464 $см^{-1}$). Полученная в [23, 24] экспериментальная зависимость полуширины указанной линии от обратного размера частиц показана на рис. 2.13.

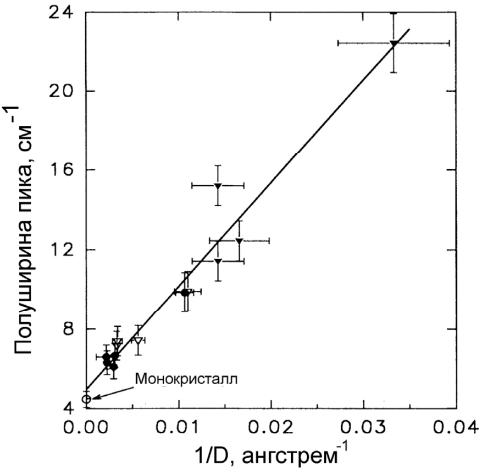


Рис. 2.13. Зависимость полуширины рамановского пика при 465 $см^{-1}$ от обратного размера частиц [24]

Авторы [25, 26] отмечают, что рамановская мода при 464 $см^{-1}$, соответствующая симметричным колебаниям Ce–O8, должна быть исключительно чувствительна к любым нарушениям симметрии кислородной подрешетки, в том числе к изменениям кислородной стехиометрии диоксида церия, вызываемым термической обработкой и/или обусловленным размерными эффектами. Данный вывод находит подтверждение при анализе рамановских спектров образцов диоксида церия, допированных РЗЭ: наблюдаемые сдвиги в положении линий в первую очередь зависят от концентрации кислородных вакансий, которая, в свою очередь, определяется содержанием допанта [27].

Проведенный в работах [25, 27] анализ рамановских спектров тонкопленочных образцов диоксида церия с различным размером частиц (4–300 нм) показал, что основными эффектами, сопровождающими

уменьшение размеров кристаллитов, являются уширение пика при 464 $см^{-1}$ и одновременное увеличение его асимметричности (рис. 2.14), вызванное уменьшением времени жизни фононов, характерным для нанокристаллических материалов [24].

Было повторно продемонстрировано, что полуширина пика линейно зависит от обратного размера частиц (рис. 2.15); следует отметить, что аналогичные зависимости были получены ранее и для других нанокристаллических материалов, включая Si, Ge, GaAs и др.

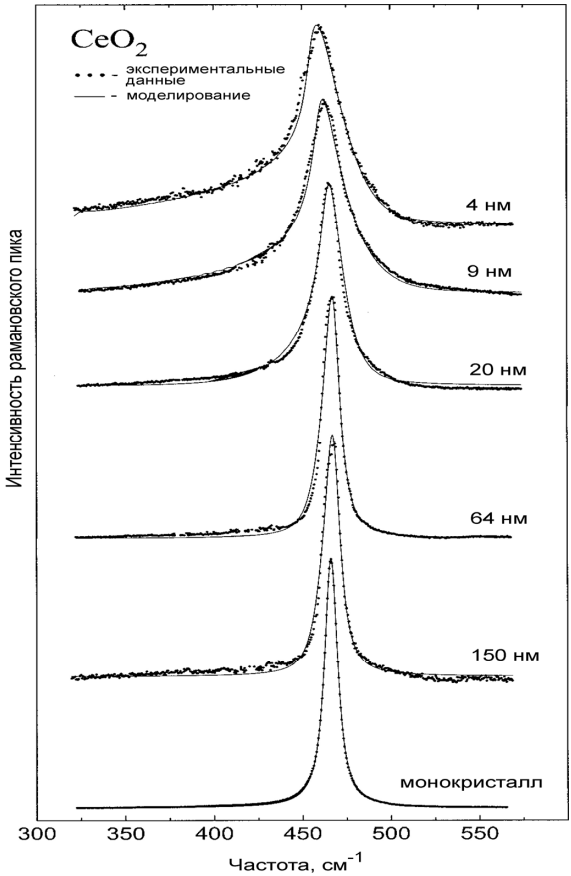


Рис. 2.14. Рамановские спектры монокристаллического и нанокристаллических образцов CeO_2 [26]

Для описания структуры нанокристаллического диоксида церия в работах [25, 26] было предложено использовать пространственно-корреляционную модель. Вводимый при этом параметр корреляционной длины соответствовал среднему размеру области, в которой сохраняется пространственная однородность материала. При концентрации кислородных вакансий, равной 10^{21} $см^{-3}$, практически в каждой элементарной ячейке диоксида церия присутствуют дефекты, и корреляционная длина соответствует расстоянию кислород–кислород в ячейке, равному для диоксида церия 2,71 Å. Для монокристаллов с очень малой нестехиометрией корреляционная длина стремится к бесконечности. Установлено, что данная модель позволяет удовлетворительно описать форму рамановских пиков CeO_2, при этом рассчитанные на основании корреляционных длин значения концентраций кислородных вакансий (10^{17}–10^{20} $см^{-3}$) в наночастицах разного размера хорошо совпадают с аналогичными значениями, полученными методами кулонометрического титрования и измерения электропроводности.

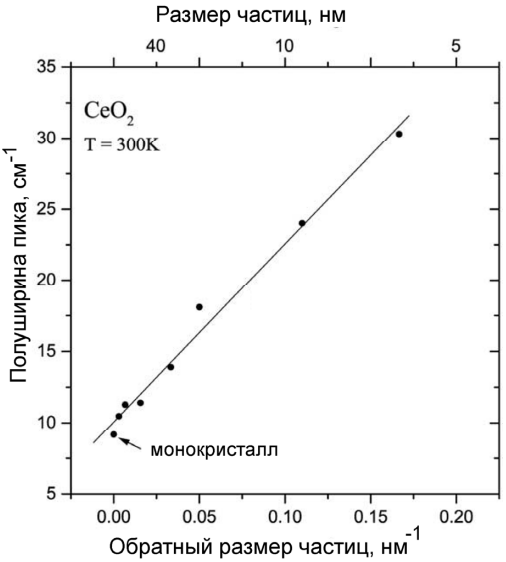


Рис. 2.15. Зависимость полуширины пика от обратного размера частиц диоксида церия [25]

Авторы [28] показали, что сдвиг рамановского пика в область меньших энергий (рис. 2.16) определяется увеличением параметра кристаллической ячейки диоксида церия при уменьшении размеров частиц. В свою очередь увеличение ширины пика определяется наличием негомогенных напряжений решетки. Показано, что отжиг наночастиц CeO_2 при высоких температурах приводит к необратимым изменениям в положении рамановского пика (рис. 2.17), что, по мнению авторов [28], обусловлено релаксацией напряжений и/или окислением нестехиометрического диоксида церия.

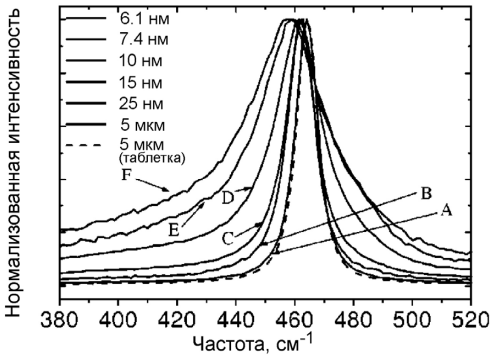


Рис. 2.16. Изменения в положении, ширине и форме рамановского пика при 464 $см^{-1}$ при изменении размеров частиц диоксида церия [28]

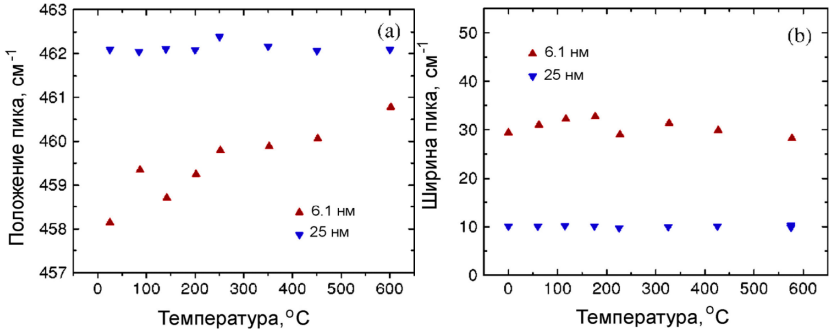


Рис. 2.17. Изменения в положении (*a*) и ширине (*b*) рамановского пика после высокотемпературного отжига для двух нанокристаллических образцов CeO_2 с различным размером частиц [28]

В работе [29] было проведено сопоставление данных порошковой дифракции, спектроскопии комбинационного рассеяния и низкотемпературной адсорбции азота для серии образцов CeO_2, синтезированных золь-гель методом. Было показано, что коэффициенты в уравнении, описывающем зависимость ширины рамановского пика (Γ) от обратного размера кристаллитов ($1/D$), зависят от химической предыстории материала:

$$\Gamma(\text{см}^{-1}) = 5 + 51{,}8/D\ (\text{нм})\ [30],$$
$$\Gamma(\text{см}^{-1}) = 10 + 124{,}7/D\ (\text{нм})\ [31],$$
$$\Gamma(\text{см}^{-1}) = 5{,}48 + 98{,}4/D\ (\text{нм})\ [32].$$

Согласно данным РФЭС [29, 33–35], помимо ионов Ce^{4+} (электронная конфигурация $4f^0$), диоксид церия действительно может содержать ионы церия в промежуточной, более низкой, степени окисления ($4f^n$, $n \approx 0{,}5$). Например, в работе [36] содержание ионов Ce^{3+} для наночастиц CeO_2 размером 2,5 и 8 нм было оценено как 49 и 37% соответственно. Вместе с тем в работах [37, 38] было экспериментально показано, что частичное восстановление церия может происходить непосредственно в рабочей камере спектрометра в ходе измерений при облучении образцов диоксида церия рентгеновским излучением в глубоком вакууме (табл. 2.3), что необходимо учитывать при интерпретации результатов рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии.

Таблица 2.3

Энергии связи для образцов CeO_2 и Ce_2O_3, подвергавшихся воздействию рентгеновских лучей (Al K_α, $h\nu$ = 1486,6 эВ) в глубоком вакууме (5×10^{-10} мм рт. ст.) в течение различных промежутков времени [33]

Образец	Продолжительность облучения, мин	Ce $3d_{5/2}$	Ce $3d_{3/2}$
CeO_2	15	882,1 888,4 898,1	900,6 907,1 916,5
	45	882,1 888,5 898,2 885,2	900,6 907,2 916,5 903,8
	300	882,1 888,6 898,2 885,3	900,7 907,1 916,5 903,9
Ce_2O_3	15	880,9 885,3	899,7 903,8

Авторы [37, 38] полагают, что указанный эффект может быть обусловлен локальным разогревом образцов в процессе измерений. Сведения о возможности частичного восстановления диоксида церия при регистрации спектров РФЭС подтверждаются данными, приведенными в работе [39]. По мнению авторов, восстановление может происходить только в том случае, если поверхность анализируемых образцов гидроксилирована. Следует отметить, что указанная гипотеза была оспорена в работе [40], авторы которой считают, что измерения в работе [39] были проведены некорректно.

Авторы [41] отмечают, что значимого восстановления диоксида церия в глубоком вакууме при кратковременной (10 мин) съемке спектров РФЭС не наблюдается вплоть до 600°С, тогда как в атмосфере водорода (10^{-2} Па) восстановление образцов начинается при температурах выше 300°С. В свою очередь в работе [42] было установлено, что при повышении давления водорода до 100 кПа частичное восстановление диоксида церия может происходить даже при комнатной температуре. Согласно данным [43], восстановление диоксида церия в атмосфере водорода происходит в две стадии, при этом при нагревании диоксида церия вплоть до 650°С восстанавливается только *один* поверхностный слой ионов церия. Проведенные в [44] исследования процессов окисления предварительно частично восстановленного диоксида церия показали, что даже после выдержки в атмосфере кислорода на поверхности образцов CeO_2 присутствуют ионы Ce^{3+}.

В работе [45] было показано, что динамика процессов восстановления диоксида церия в процессе регистрации рентгеновских фотоэлектронных спектров может определяться не только такими факторами, как энергия облучения и состав атмосферы в камере спектрометра, но и дисперсностью анализируемых образцов (рис. 2.18).

В частности, исследуя образцы диоксида церия с размерами частиц 2,2 и 35 нм, авторы [45] установили, что высокодисперсные образцы подвергаются более глубокому восстановлению, при этом скорость восстановления также существенно возрастает (см. рис. 2.18).

Анализ кислородной нестехиометрии наночастиц CeO_2 различного размера методом РФЭС был впервые проведен авторами [46]. Деконволюция рентгеновских фотоэлектронных спектров (рис. 2.19) наглядно доказывает увеличение относительного содержания Ce^{3+} в более дисперсных образцах.

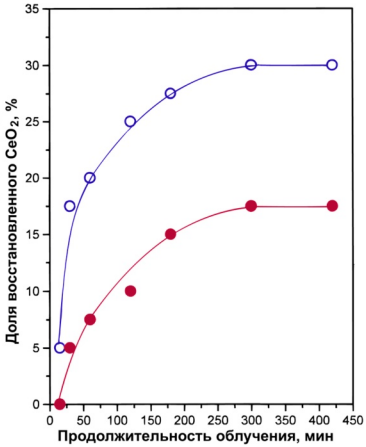


Рис. 2.18. Доля CeO_2, подвергшегося восстановлению в ходе регистрации рентгеновских фотоэлектронных спектров (○ – образец CeO_2, синтезированный при 200°C; ● – образец CeO_2, синтезированный при 750°C) [45]

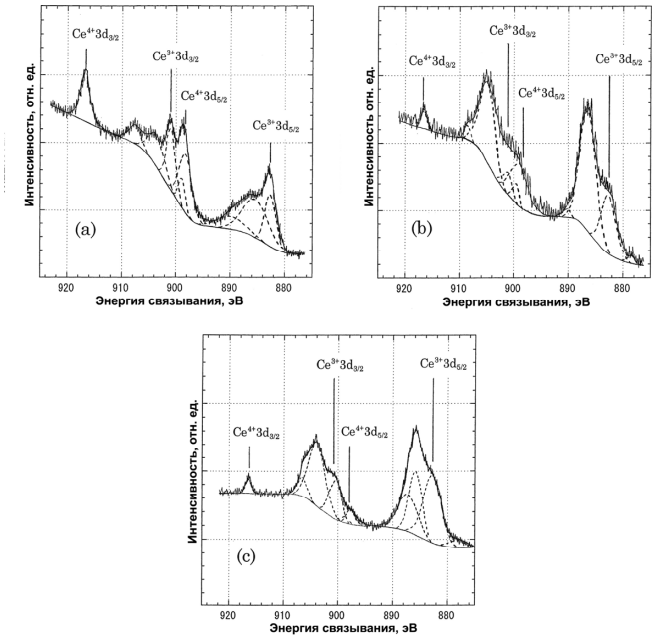


Рис. 2.19. Разложение на составляющие спектров Ce 3d для монодисперсных образцов CeO_2 различного размера: *a* – 3,8 нм; *b* – 3,0 нм; *c* – 2,2 нм [46]

Авторы [46] отмечают, что полученные данные удовлетворительно коррелируют с результатами определения кислородной нестехиометрии наночастиц CeO_2 по данным электронной дифракции.

Используя электронную томографию, комбинированную со спектроскопией потерь энергии электронов, авторы [47] составили карту валентности ионов церия в нанокристаллах CeO_{2-x} в трех измерениях. Результаты исследований позволили изобразить восстановленную оболочку на поверхности наночастицы на различных гранях кристалла; грани {111} демонстрируют незначительное восстановление церия, тогда как на гранях {001} вероятность восстановления церия гораздо выше (рис. 2.20).

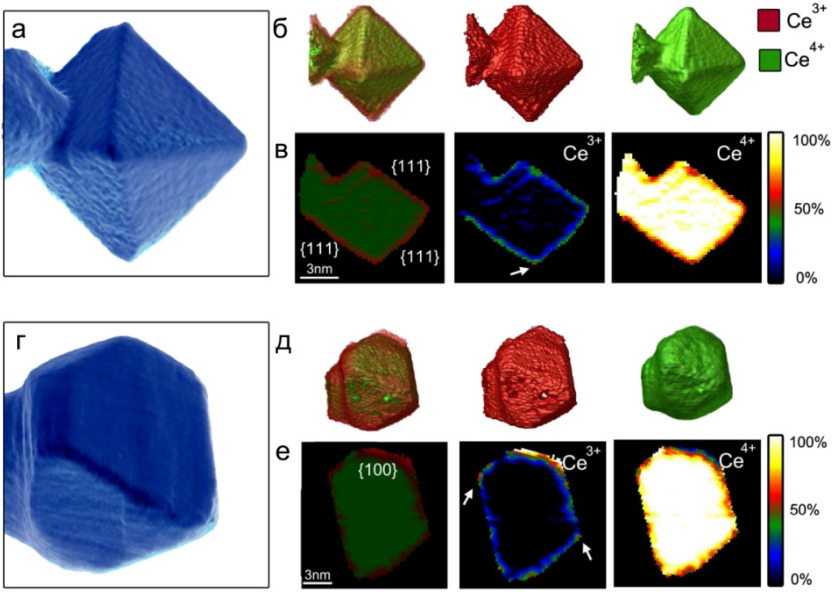


Рис. 2.20. Трехмерная визуализация валентности ионов церия в кристалле CeO_2: *а*, *г* – HAADF-STEM реконструкция почти идеальной и усеченной октаэдрической наночастицы диоксида церия; *б*, *д* – соответствующая трехмерная визуализация и послойная трехмерная реконструкция валентности ионов церия, демонстрирующая более толстый слой ионов Ce^{3+} и присутствие большего количества кислородных вакансий на грани {001}; *в*, *е* – срезы через соответствующие зоны Ce^{3+} и Ce^{4+}, демонстрирующие количественное распределение восстановленных ионов Ce [47]

В работе [48] было показано, что при определении содержания Ce^{3+} в нанокристаллических образцах CeO_2 РФЭС дает существенно завышенные результаты, что связано с восстановлением поверхностного слоя диоксида церия в условиях глубокого вакуума под действием рентгеновского излучения даже при минимальной продолжительности анализа. Чтобы преодолеть это ограничение, авторы [48] предложили рассматривать наночастицы CeO_2, состоящие из ядра, кислородная нестехиометрия которого в существенной степени определяется размерным фактором, и оболочки, которая в ходе измерений восстанавливается до оксида церия(III). Полученные в рамках этой модели результаты приведены в табл. 2.4.

Таблица 2.4

Концентрации Ce^{3+} в образцах CeO_2 различной дисперсности [48]

Размер частиц, нм	Концентрация Ce^{3+} в поверхностном слое, %	Толщина поверхностного слоя, Å	Концентрация Ce^{3+} в объеме частицы, %
6	25,2	2,2	10,6
10	22,3	1,9	5,6
5000	11,6	0,9	0,0054

Следует отметить, что даже в рамках указанного подхода концентрация Ce^{3+}, найденная методом РФЭС, заметно превосходит определенную независимыми методами. Помимо этого, необходимо учитывать, что содержание Ce^{3+} в анализируемых образцах может зависеть не только от размеров частиц, но и от условий их получения. Так, в работе [49] методом РФЭС установлено, что образцы нанокристаллического диоксида церия, полученные отжигом при 250°С, менее нестехиометричны по сравнению с аналогичными образцами, отожженными при 650°С, несмотря на то что размер последних (12 нм) существенно превосходит размер первых (9 нм). Аналогичные результаты были получены авторами [50] при сравнительном анализе микро- и нанокристаллического образцов CeO_2, полученных из различных источников.

Гипотеза о кислородной нестехиометрии нанодисперсного диоксида церия в последние годы подвергается обоснованной критике. В частности, в работе [51] не было получено доказательство скольнибудь заметной устойчивости анионных вакансий для ультрамалых частиц диоксида церия, хотя авторы отмечают, что такие дефекты

могут существовать при достаточно высоких температурах или в восстановительной атмосфере. Также обоснованной критике подвергается модель Цунекавы [52].

Анализ образцов CeO_2 различной дисперсности, проведенный методом рентгеновской дифракции в работе [53], показал, что для нанокристаллического диоксида церия с размером частиц 7 нм характерна неполная занятость позиций кислорода (0,968), которая обусловлена не наличием в структуре кислородных вакансий (и, соответственно, частичного восстановления Ce^{4+} до Ce^{3+}), а смещением ионов кислорода из регулярных позиций и искажением анионной подрешетки. Об отсутствии ионов Ce^{3+} в структуре (вернее, о том, что их содержание не превышает 1%), в частности, свидетельствовали результаты магнитных измерений.

Аналогичные данные о вероятном отсутствии кислородных вакансий в структуре наночастиц CeO_2 были получены в работе [54] на основании детального изучения методом рентгеновской спектроскопии поглощения (при комнатной температуре и нормальном давлении) образцов диоксида церия с характеристическим размером частиц в диапазоне от 2 до 10 нм, полученных с использованием микроэмульсий, а также в результате сольвотермальной и гидротермальной обработки или отжига при температурах до 500°C. Было показано, что с уменьшением размера частиц диоксида церия происходит увеличение параметра элементарной ячейки (на ~0,3% для частиц размером 2 нм), при этом указанная зависимость удовлетворительно совпадает с моделью [55], объясняющей расширение кристаллической решетки в наночастицах CeO_2 действием отрицательного давления Маделунга. Кроме того, с уменьшением размера частиц возрастает структурное разупорядочение кислородной подрешетки (по-видимому, вблизи поверхности наночастиц), о чем свидетельствует рост значений соответствующих псевдофакторов Дебая–Валлера. Такое структурное разупорядочение может приводить к увеличению подвижности ионов кислорода.

Отметим, что аналогичное изменение значений псевдофакторов Дебая–Валлера было обнаружено и авторами данной монографии в рамках работы, проводимой в настоящее время совместно с петербургским Институтом ядерной физики им. Б.П. Константинова. В связи с тем что существует сильная корреляция между факторами Дебая–Валлера и заселённостью кристаллографических позиций,

нами было проведено нейтронографическое исследование образцов CeO_2 с различным размером частиц (5–20 нм) при температуре 2,5 К. Было обнаружено, что значения факторов Дебая–Валлера даже при ультранизкой температуре отличны от нуля и тем выше, чем меньше размер частиц. Это, по-видимому, связано со значительным вкладом так называемого статического фактора Дебая–Валлера, связанного не с динамическим (как в случае теплового движения), а статическим смещением атомов из своих равновесных позиций, что свидетельствует, как правило, о существенном разупорядочении структуры. Вместе с тем попытки варьирования заселённости при описании экспериментальных данных методом Ритвельда не дали результатов как при комнатной, так и при ультранизкой температуре, из чего следует, что даже если изменение заселённости позиций кислорода при уменьшении размера частиц и существует, то оно весьма незначительно, и отклонение содержания кислорода от номинального значения (CeO_2) не превышает 0,01.

Результаты анализа образцов методом XANES также не показали заметной зависимости содержания ионов Ce^{3+} в диоксиде церия от размеров его частиц [54]. Более того, следовые количества ионов Ce^{3+} (даже для частиц размером 2 нм их содержание не превышало 5%) были обнаружены только в образцах, полученных с использованием солей трехвалентного церия. В образцах, полученных из соединений Ce(IV), признаков присутствия ионов Ce^{3+} обнаружено не было. Аналогично выводам работы [55] авторы [51] также делают вывод о возможности частичного восстановления Ce^{4+} до Ce^{3+} в результате обработки CeO_2 в восстановительной атмосфере (в том числе в вакууме), электронным пучком или мощным рентгеновским излучением.

В работе [56] нами впервые выполнено прямое химическое определение содержания трёхвалентного церия в наночастицах CeO_2 разного размера, полученных различными методами. Были исследованы порошкообразные образцы диоксида церия и водные золи. Порошкообразные пробы CeO_2 синтезировали из солей церия(III) и церия(IV) различными методами и прокаливали при разных температурах. Золи CeO_2 были получены с использованием стабилизаторов – мальтодекстрина, полиакриловой и лимонной кислот. Размеры частиц CeO_2 были установлены методами динамического светорассеяния (золи) и просвечивающей электронной микроскопии (порошки).

Синтез образцов **первой серии** проводили следующим образом. Образец I-1, характеризующийся наименьшим размером частиц, синтезировали осаждением из водно-изопропанольного (1:1) раствора гексанитратоцерата(IV) аммония (0.08 М) водным раствором аммиака (3 М), взятым в 200-кратном мольном избытке. Сформировавшийся осадок трижды промывали изопропанолом, центрифугировали и сушили при 60°С в течение 2 ч. Для получения более крупнодисперсных образцов синтез проводили по аналогичной методике, используя в качестве исходного раствор нитрата церия(III) аналогичной концентрации, с последующим 2-часовым отжигом образовавшегося диоксида церия при 400, 600 или 800°С (образцы I-2, I-3 и I-4 соответственно) [57]. Основные сведения о микроморфологии полученных образцов приведены в табл. 2.5.

Таблица 2.5

Основные характеристики образцов нанодисперсного диоксида церия I серии [56]

Образец	Размер частиц CeO_2 по данным РФА, нм	Параметр элементарной ячейки, нм	Удельная площадь поверхности, $м^2/г$
I-01	2,8	0,5440	170
I-02	7	0,5413	120
I-03	13	5,4101	40
I-04	68	5,4109	1

Образцы **второй серии** были получены осаждением CeO_2 из водно-изопропанольных растворов, содержащих одновременно нитрат церия(III) и гексанитратоцерат(IV) аммония, взятые в различных соотношениях. Суммарная концентрация смешанного раствора по церию составляла 0,08 М. Было синтезировано 5 образцов CeO_2 (II-01, II-10, II-11, II-13 и II-31), различающихся соотношением Ce^{3+} и Ce^{4+} в исходных растворах (например, индекс 13 в названии образца соответствует соотношению Ce(III): Ce(IV) = 1:3 и т.д.). Основные сведения о микроморфологии образцов приведены в табл. 2.6.

Третья серия включала образцы четырех водных золей, различающихся размерами частиц CeO_2, концентрацией, наличием стабилизаторов, которые, специфически адсорбируясь на поверхности наночастиц CeO_2, препятствуют агрегации и коагуляции золей. Золи III-1, III-2 и III-3 были получены и очищены по методике [58]. Золь III-4 был получен по методике [59] за исключением того, что концентрация церия составляла 0,04 М. Перед проведением исследований золи

выдерживали более 4 недель при нормальных условиях. Основные характеристики образцов приведены в табл. 2.7.

Таблица 2.6

Основные характеристики образцов нанодисперсного диоксида церия II серии [56]

Образец	Размер частиц CeO_2 по данным РФА, нм	Параметр элементарной ячейки, нм	Удельная площадь поверхности, $м^2/г$
II-10	3,0	0,5427	160
II-31	2,9	0,5430	170
II-11	2,9	0,5433	190
II-13	2,8	0,5436	170
II-01	2,8	0,5438	180

Таблица 2.7

Основные характеристики образцов золей нанодисперсного диоксида церия [56]

Образец золя	Концентрация CeO_2	Стабилизатор, химическая предыстория	Размер частиц по данным электронной микроскопии, нм
III-1	0,03 М	Полиакрилат, pH = 8.3	2–3
III-2	0,1 М CeO_2	Цитрат, получен из сульфата Ce(IV), pH = 9	2–3
III-3	0,1 М CeO_2	Цитрат, получен из хлорида Ce(III), pH = 8	1–2
III-4	0,04 М CeO_2	Нитрат, pH = 1,5	Агломераты 20 нм, содержащие частицы 3–5 нм

Редиспергируемые порошки нанодисперсного CeO_2 (**четвертая серия**) были получены по методике, описанной в работе [60] и основанной на использовании в качестве стабилизатора мальтодекстрина (МД). По данным динамического светорассеяния гидродинамический диаметр частиц варьируется в пределах 6–10 нм. Для анализа было выбрано 4 образца, представляющие собой порошкообразные продукты, полученные высушиванием соответствующих водных золей. Изучаемые образцы отличались размерами частиц, окраской, мольным соотношением церия и глюкозы (в составе мальтодекстрина) в исходных растворах (табл. 2.8).

Все исследуемые образцы (золи и порошки I–IV серий) переводили в истинные растворы с помощью фосфорной кислоты, что необходимо для реализации предложенных методик определения разновалентных форм церия. Результаты исследований образцов диоксида церия серий I, III и IV представлены в табл. 2.9–2.11. Результаты анализа образцов второй серии показали, что в них весь церий находится в форме Ce(IV)

Таблица 2.8

Порошкообразные редиспергируемые образцы нанодисперсного диоксида церия, стабилизированного мальтодекстрином [56]

Образец	Соотношение церия и глюкозы (в составе мальтодекстрина) в исходных растворах	Размер частиц по данным динамического светорассеяния, нм
IV-1	1:4	6
IV-2	1:3	7
IV-3	1:2.2	8
IV-4	1:1.1	10

Таблица 2.9

Результаты определения различных форм церия в порошкообразных образцах CeO_2, % масс. [56]

Образец	Размер частиц, нм	Ce(III)	Ce(IV)	$Ce_{общ}$	$Ce(III)/Ce_{общ}$, %
I-1	2–3	1,79±0,24	70,8±2,0	*	2,46
I-2	5	1,25±0,21	78,1±2,0	*	1,57
I-3	10	1,42±0,22	77,6±1,9	*	1,80
I-4	20	1,60±0,23	72,6±2,0	*	2,16

* Измерения не проводили.

Таблица 2.10

Результаты определения разновалентных форм церия в золях CeO_2, мг/мл [56]

Образец	Размер частиц, нм	Ce(III)	Ce(IV)		$Ce(III)/Ce_{общ}$, %
III-1	2–3	*	3,52±0,10	3,57±0,13	–
III-2	2–3	*	11,76±0,11	12,21±0,10	–
III-3	1–2	2,63±0,09	12,71±0,11	15,20±0,10	17,14
III-4	3–5	0,86±0,04	5,59±0,45	6,69±0,16	14,6

* Измерения не проводили.

Установлено, что с течением времени соотношение форм церия в растворах IV серии изменяется – содержание Ce(IV) уменьшается (табл. 2.11).

Таблица 2.11

Результаты определения разновалентных форм церия в образцах нанодисперсного диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином [56]

Продолжительность выдержки	Найдено, %					
	IV-1			IV-2		
	Ce(III)	Ce(IV)	$Ce(III)/Ce_{общ}$, %	Ce(III)	Ce(IV)	$Ce(III)/Ce_{общ}$, %
0 мин	1,04	13,77	7,02	н/о	20,66	0,0
10 мин	3,06	12,28	19,95	н/о	19,93	0,0
1 ч	3,08	11,85	20,63	1,10	18,52	5,61
3ч	3,46	11,80	22,67	3,09	18,04	14,65
5ч	4,32	11,67	27,14	3,44	17,92	16,12
Продолжительность выдержки	IV-3			IV-4		
	Ce(III)	Ce(IV)	$Ce(III)/Ce_{общ}$, %	Ce(III)	Ce(IV)	$Ce(III)/Ce_{общ}$, %
0 мин	н/о	23,21	0,0	н/о	47,16	0,0
10 мин	н/о	22,55	0,0	н/о	46,91	0,0
1 ч	0,40	20,93	1,88	н/о	41,03	0,0
3 ч	5,89	19,72	23,04	н/о	38,66	0,0
5 ч	4,54	20,23	18,33	н/о	36,87	0,0
2 суток	7,04	17,64	28,57	5,48	33,17	14,20

Н/о – не обнаружено.

На основании полученных результатов анализов нами было показано преимущественное содержание церия (IV) во всех изученных образцах CeO_2. Лишь в некоторых порошкообразных пробах CeO_2 обнаружены незначительные количества (на уровне от 0,6 до 2,2 % масс.) церия (III). В исследованном размерном диапазоне (1÷20 нм) содержание трёхвалентного церия не зависело от размера частиц CeO_2. Увеличение концентрации трехвалентного церия наблюдается в золях CeO_2, которые содержат органические стабилизаторы (цитрат, полисахариды) или изначально имеют низкий pH. В первом случае стабилизаторы могут препятствовать полному окислению трехвалентного церия в прекурсоре (цитрат) или даже высту-

пать в роли восстанавливающих реагентов (глюканы). Во втором случае, согласно диаграмме Пурбе церия, полному окислению прекурсора (даже в присутствии пероксида водорода) препятствует кислая среда золя [61].

Увеличение дисперсности диоксида церия непосредственно сказывается на электронных свойствах этого материала. Так, авторы [62] впервые выполнили сравнительный анализ спектров поглощения коллоидных частиц CeO_2 размером 2,6 и 4,1 нм, полученных синтезом в обратных мицеллах. Было установлено, что с уменьшением размеров частиц наблюдается увеличение ширины запрещенной зоны для непрямого перехода от 2,73 до 2,87 эВ, для прямого перехода – от 3,38 до 3,44 эВ (рис. 2.21, 2.22).

Сопоставление полученных результатов с близкими по значениям величинами, найденными ранее при исследовании тонких пленок CeO_2, позволило авторам [62] сделать вывод о том, что изменение ширины запрещенной зоны не связано с квантоворазмерными эффектами. Тем не менее данный вывод представляется не вполне корректным в связи с тем, что сопоставление проводилось с нанокристаллическими пленками, а не с объемными образцами.

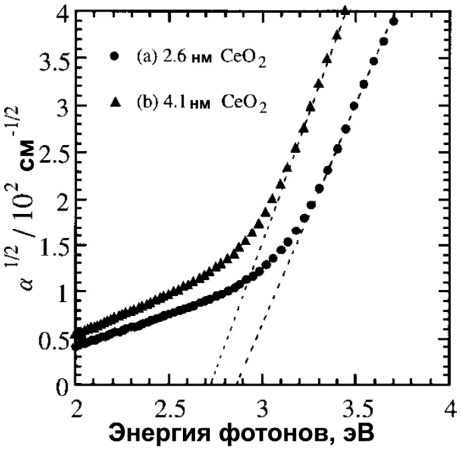


Рис. 2.21. Определение ширин запрещенной зоны наночастиц диоксида церия различного размера для непрямого перехода [62]

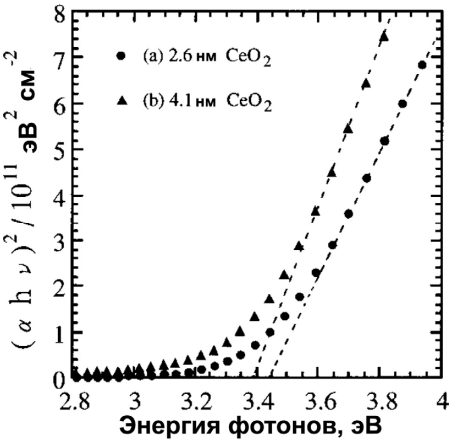


Рис. 2.22. Определение ширин запрещенной зоны наночастиц диоксида церия различного размера для прямого перехода [62]

В работе [63] были определены величины $E_{ШЗ}$ для коллоидных растворов наночастиц диоксида церия со средними размерами 3,2±0,5, 2,7±0,4 и 2,2±0,3 нм. Показано, что с уменьшением размеров частиц ширина запрещенной зоны для прямого перехода увеличивается от 3,60 до 3,90 и 4,12 эВ соответственно. Найденные величины $E_{ШЗ}$ существенно превосходят указанные в [62]; одной из вероятных причин такого расхождения может служить чрезвычайно высокая погрешность определения ширины запрещенной зоны при линеаризации данных УФ-видимой спектроскопии (рис. 2.23).

По мнению авторов [63], наблюдаемое изменение $E_{ШЗ}$ обусловлено тем, что с уменьшением размеров частиц CeO_2 происходит увеличение их нестехиометрии; действительно, при частичном восстановлении Ce^{4+} до Ce^{3+} увеличивается разница в энергиях между орбиталями *2p* O и *4f* Ce, что, соответственно, приводит к гипсохромному сдвигу полосы поглощения CeO_2.

Авторами [64] при исследовании тонких пленок нанокристаллического диоксида церия получены дополнительные подтверждения того, что с уменьшением размеров частиц происходит увеличение ширины запрещенной зоны как для прямого, так и непрямого переходов (рис. 2.24). Отметим, что приведенные в работе [64] данные противо-

положны результатам [65], согласно которым ширина запрещенной зоны с уменьшением размеров частиц уменьшается.

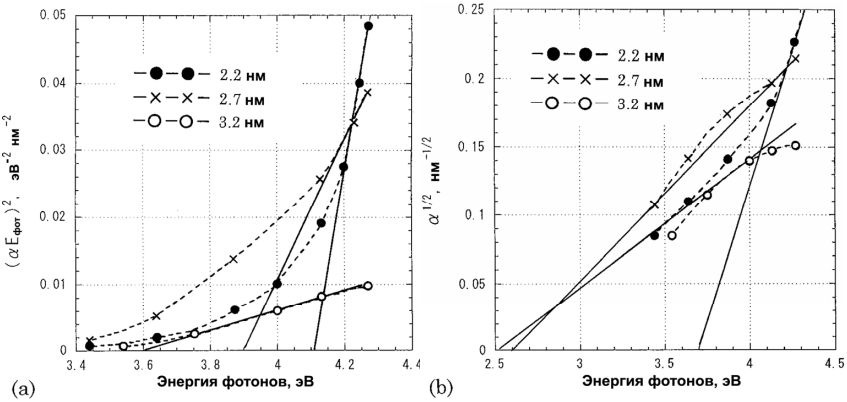


Рис. 2.23. Определение ширины запрещенной зоны наночастиц диоксида церия различного размера для прямого (*a*) и непрямого (*b)* переходов [63]

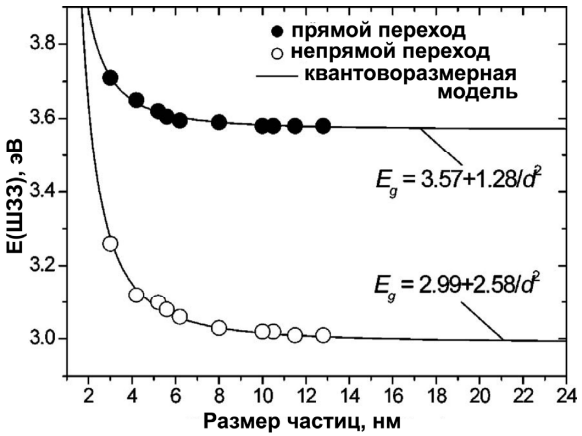


Рис. 2.24. Зависимости ширины запрещенной зоны от размеров частиц CeO_2 (● – прямой переход; ○ – непрямой переход) [64]

Подобные данные приводятся и в ряде других работ. Авторы [65] полагают, что для диоксида церия нехарактерны квантоворазмерные

эффекты, а наблюдаемый «красный сдвиг» полосы поглощения обусловлен частичным восстановлением поверхности наночастиц. Таким образом, имеющиеся экспериментальные данные о влиянии кислородной нестехиометрии на полупроводниковые свойства диоксида церия противоречат друг другу.

Авторами [66] было предложено полуэмпирическое уравнение, количественно описывающее зависимость ширины запрещенной зоны CeO_2 для прямого перехода от размера частиц:

$$E_g = E_{bulk} + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2R^2}\left[\frac{1}{m_e} + \frac{1}{m_h}\right] - \frac{1.8e^2}{\varepsilon R},$$

где E_{bulk} – ширина запрещенной зоны для крупнокристаллического диоксида церия; E_g – измеряемая ширина запрещенной зоны наночастиц CeO_2; $\hbar$ – вторая постоянная Планка; R – радиус наночастиц; m_e, m_h – эффективные массы электрона и дырки соответственно; ε – относительная диэлектрическая постоянная диоксида церия, равная 24,5. Было показано, что размеры частиц CeO_2 в золях, определенные в соответствии с данным уравнением, хорошо согласуются с результатами непосредственных измерений методом ПЭМ. Авторы отмечают, что данные УФ-видимой спектроскопии могут использоваться для контроля за процессами роста частиц CeO_2 непосредственно в ходе синтеза.

Результаты исследований, проведенных авторами [67], подтверждают зависимость ширины запрещенной зоны CeO_2 от размера наночастиц. Следует отметить, что зафиксированные в работе [67] величины $E_{ШЗ}$ (3,45 и 3,68 эВ для наночастиц диаметром 3,6 и 3,3 нм) заметно превосходят аналогичные значения для близких по размеру частиц CeO_2, приведенные в [62]. Анализ УФ-видимых спектров поглощения [67] позволяет предположить, что ширина запрещенной зоны наночастиц CeO_2 определяется не только их размером, но и условиями проведения синтеза, которые могут дополнительно сказываться на величине кислородной нестехиометрии конечных продуктов.

Указанное предположение подтверждается данными [68], полученными для нанокристаллических образцов CeO_2, синтезированных сольвотермальным методом. Было установлено, что ширина запре-

щенной зоны для наночастиц оказывается в целом существенно меньше ширины запрещенной зоны для объемных образцов CeO_2; тем не менее при изменении размеров наночастиц величина $E_{ШЗ}$ остается практически неизменной (табл. 2.12, 2.13). Было показано, что при синтезе CeO_2 из солей церия(IV) формируются образцы с меньшей шириной запрещенной зоны по сравнению с образцами, синтезированными из солей церия(III); иными словами, осаждение из растворов солей церия(IV) приводит к образованию более стехиометричных по кислороду образцов диоксида церия. Каких-либо объяснений указанному феномену и отсутствию зависимости $E_{ШЗ}$ от размера частиц авторы [68] не приводят.

Таблица 2.12

Ширины запрещенной зоны для наночастиц CeO_2 различного размера, синтезированных сольвотермальным методом из нитрата церия(III) [66]

Размер частиц, нм	2,6	3,0	3,7	4,6	6,9
$E_{ШЗ}$, эВ (прямой переход)	3,42	3,43	3,44	3,42	3,38
$E_{ШЗ}$, эВ (непрямой переход)	2,73	2,76	2,74	2,70	2,56

Таблица 2.13

Ширины запрещенной зоны для наночастиц CeO_2 различного размера, синтезированных сольвотермальным методом из гексанитратоцерата(IV) аммония [66]

Размер частиц, нм	2,9	3,6	4,7	6,9
$E_{ШЗ}$, эВ (прямой переход)	3,30	3,32	3,33	3,28
$E_{ШЗ}$, эВ (непрямой переход)	2,34	2,48	2,49	2,31

В свою очередь, согласно общепринятому мнению, именно присущая нанодисперсному диоксиду церия кислородная нестехиометрия (как будет показано ниже) отвечает за его уникальную биологическую активность.

Литература

1. *Куприн В.П., Щербаков А.Б.* Адсорбция органических соединений на твердой поверхности. К. : Наукова думка, 1996. 160 с.

2. *Pan C., Zhang D., Shi L., Fang J.* Template-Free Synthesis, Controlled Conversion, and CO Oxidation Properties of CeO_2 Nanorods, Nanotubes, Nanowires, and Nanocubes // European Journal of Inorganic Chemistry. 2008. Vol. 2008 (15). P. 2429–2436.

3. *Hayun S., Shvareva T.Y., Navrotsky A.* Nanoceria – energetics of surfaces, interfaces and water adsorption // Journal of the American Ceramic Society. 2011. Vol. 94(11). P. 3992–3999.

4. *Zhou X.D., Huebner W., Anderson H.U.* Room-temperature homogeneous nucleation synthesis and thermal stability of nanometer single crystal CeO_2 // Applied Physics Letters. 2002. Vol. 80(20). P. 3814–3816.

5. *Tsunekawa S., Sivamohan R., Ito S. et al.* Structural study on monosize CeO_{2-x} nano-particles // Nanostruct. Mater. 1999. Vol. 11. P. 141–147.

6. *Tsunekawa S., Sivamohan R., Ohsuga T. et al.* Ultraviolet absorption spectra of CeO_2 nano-particles // Mater. Sci. Forum. 1999. Vol. 315–317. P. 439–445.

7. *Tsunekawa S., Sahara R., Kawazoe Y., Ishikawa K.* Lattice relaxation of monosize CeO_{2-x} nanocrystalline particles // Appl. Surf. Sci. 1999. Vol. 152. P. 53–56.

8. *Tsunekawa S., Ishikawa K., Li Z.Q. et al.* Origin of anomalous lattice expansion in oxide nanoparticles // Phys. Rev. Lett. 2000. Vol. 85. P. 3440–3443.

9. *Zhang F., Chan S. W., Spanier J.E. et al.* Cerium oxide nanoparticles: Size-selective formation and structure analysis // Appl. Phys. Lett. 2002. Vol. 80. P. 127–129.

10. *Wu L.J., Wiesmann H.J., Moodenbaugh A.R. et al.* Oxidation state and lattice expansion of CeO_{2-x} nanoparticles as a function of particle size // Phys. Rev. B. 2004. Vol. 69. P. 125415-1.

11. *Deshpande S., Patil S., Kuchibhatla S.V.N.T., Seal S.* Size dependency variation in lattice parameter and valency states in nanocrystalline cerium oxide // Appl. Phys. 2005. Vol. 87. P. 133113.

12. *Chen P.L., Chen I.W.* Reactive cerium(IV) oxide powders by the homogeneous precipitation method // J. Am. Ceram. Soc. 1993. Vol. 76. P. 1577–1583.

13. *Tsunekawa S., Ito S., Kawazoe Y.* Surface structures of cerium oxide nanocrystalline particles from the size dependence of the lattice parameters // Appl. Phys. Lett. 2004. Vol. 85. P. 3845–3847.

14. *Tsunekawa S., Wang J.T., Kawazoe Y.* Lattice constants and electron gap energies of nano- and subnano-sized cerium oxides from the experiments and first-principles calculations // J. Alloys Comp. 2006. Vol. 408–412. P. 1145–1148.

15. *Иванов В.К., Баранчиков А.Е., Полежаева О.С. и др.* Кислородная нестехиометрия нанокристаллического диоксида церия // Журн. неорган. химии. 2010. Т. 55, № 3. С. 364–367.

16. *Baranchikov A.E., Polezhaeva O.S., Ivanov V.K., Tretyakov Yu.D.* Lattice expansion and oxygen non-stoichiometry of nanocrystalline ceria // CrystEngComm. 2010. Vol. 12. P. 3531–3533.

17. *Kim D.J.* Lattice parameters, ionic conductivities, and solubility limits in fluorite-structure MO_2 oxide [M = Hf^{4+}, Zr^{4+}, Ce^{4+}, Th^{4+}, U^{4+}] solid solutions // J. Am. Ceram. Soc. 1989. Vol. 72. P. 1415–1421.

18. *Zec S., Boskovic S., Kalurerovic B. et al.* Chemical reduction of nanocrystalline CeO_2 // Ceram. Int. 2009. Vol. 35. P. 195–198.

19. *Chen L., Fleming P., Morris V. et al.* Size-related lattice parameter changes and surface defects in ceria nanocrystals // J. Phys. Chem. C. 2010. Vol. 114. P. 12909–12919.

20. *Morris V.N., Farrell R.A., Sexton A.M., Morris M.A.* Lattice constant dependence on particle size for ceria prepared from a citrate sol-gel // J. Phys.: Conf. Ser. 2006. Vol. 26. P. 119–122.

21. *Slusser P.K.* Transition Metal Doped Cerium Oxide for Spintronics Applications. Diss. University of Utah. 2009. 103 p.

22. *Ozawa M., Loong C.K.* In situ X-ray and neutron powder diffraction studies of redox behavior in CeO_2-containing oxide catalysts // Catal. Today. 1999. Vol. 50. P. 329–342.

23. *Graham G.W., Weber W.H., Peters C.R., Usmen R.* Empirical-method for determining CeO_2 – particle size in catalysts by raman-spectroscopy // J. Catalysis. 1991. Vol. 130. P. 310–313.

24. *Weber W.H., Hass K.C., McBride J.R.* Raman-study of CeO_2 – 2nd-order scattering, lattice-dynamics, and particle-size effects // Phys. Rev. B. 1993. Vol. 48. P. 178–185.

25. *Kosacki I., Suzuki T., Anderson H.U., Colomban P.* Raman scattering and lattice defects in nanocrystalline CeO_2 thin films // Solid State Ionics. 2002. Vol. 149. P. 99–105.

26. *Kosacki I., Petrovsky V., Anderson H.U.* Raman spectroscopy of nanocrystalline ceria and zirconia thin films // J. Am. Ceram. Soc. 2002. Vol. 85. P. 2646–2650.

27. *McBride J.R., Hass K.C., Poindexter B.D., Weber W.H.* Raman and X-ray studies of $Ce_{1-x}Re_xO_{2-y}$, where Re = La, Pr, Nd, Eu, Gd, and Tb // J. Appl. Phys. 1994. Vol. 76. P. 2435–2441.

28. *Spanier J.E., Robinson R.D., Zhang F. et al.* Size-dependent properties of CeO_{2-y} nanoparticles as studied by Raman scattering // Phys. Rev. B. 2001. Vol. 64. P. 245407.

29. *Saitzek S., Blach J.F., Villain S., Gavarri J.R.* Nanostructured ceria: a comparative study from X-ray diffraction, Raman spectroscopy and BET specific surface measurements // Phys. Stat. Sol. 2008. Vol. 205. P. 1534–1539.

30. *Vasylkiv O., Sakka Y., Skorokhod V.V.* Nano-blast synthesis of nano-size CeO_2–Gd_2O_3 powders // J. Am. Ceram. Soc. 2006. Vol. 89. P. 1822–1826.

31. *Vasylkiv O., Sakka Y., Skorokhod V.V.* Nano-explosion synthesis of multi-component ceramic nano-composites // J. Europ. Ceram. Soc. 2007. Vol. 27. P. 585–592.

32. *Li J.G., Wang Y., Ikegami T. et al.* Reactive 10 mol% RE_2O_3 (RE = Gd and Sm) doped CeO_2 nanopowders: Synthesis, characterization, and low-temperature sintering into dense ceramics // Mat. Sci. Eng. B. 2005. Vol. 121. P. 54–59.

33. *Fujimori A.* 4f-level and core-level photoemission satellites in cerium compounds // Phys. Rev. B. 1983. Vol. 27. P. 3992–4001.

34. *Fujimori A.* Mixed-valent ground-state of CeO_2 // Phys. Rev. B. 1983. Vol. 28. P. 2281–2283.

35. *Fujimori A.* Correlation-effects in the electronic-structure and photoemission spectra of mixed-valence cerium compounds // Phys. Rev. B. 1983. Vol. 28. P. 4489–4499.

36. *Kar S., Patel C., Santra S.* Direct room temperature synthesis of valence state engineered ultra-small ceria nanoparticles: Investigation on the role of ethylenediamine as a capping agent // J. Phys. Chem. C. 2009. Vol. 113. P. 4862–4867.

37. *Paparazzo E.* XPS studies of damage induced by X-ray-irradiation on CeO_2 surfaces // Surf. Sci. Lett. 1990. Vol. 234. P. L253–L258.

38. *Paparazzo E., Ingo G.M., Zachetti N.* X-ray-induced reduction effects at CeO_2 surfaces – an *x*-ray photoelectron-spectroscopy study // J. Vac. Sci. Technol. A. 1991. Vol. 9. P. 1416–1420.

39. *Rama Rao M.V., Shripathi T.* Photoelectron spectroscopic study of X-ray induced reduction of CeO_2 // J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 1997. Vol. 87. P. 121–126.

40. *Paparazzo E., Ingo G.M.* On the X-ray induced chemical reduction of CeO_2 as seen with X-ray photoemission spectroscopy // J. Electron. Spectrosc. Relat. Phenom. 1998. Vol. 95. P. 301–304.

41. *Pfau A., Schierbaum K.D.* The electronic-structure of stoichiometric and reduced CeO_2 surfaces – an XPS, UPS and HREELS study // Surf. Sci. 1994. Vol. 321. P. 71–80.

42. *Romeo M., Bak K., Le Normand F., Hilaire L.* XPS study of the reduction of cerium dioxide // Surf. Interface Anal. 1993. Vol. 20. P. 508–512.

43. *Holgado J.P., Alvarez R., Munuera G.* Study of CeO_2 XPS spectra by factor analysis: reduction of CeO_2 // Appl. Surf. Sci. 2000. Vol. 161. P. 301–315.

44. *Holgado J.P., Munuera G., Espinos J.P., Gonzalez-Elipe A.R.* XPS study of oxidation processes of CeO_x defective layers // Appl. Surf. Sci. 2000. Vol. 158. P. 164–171.

45. *Park P.W., Ledford J.S.* Effect of crystallinity on the photoreduction of cerium oxide: A study of CeO_2 and Ce/Al_2O_3 catalysts // Langmuir. 1996. Vol. 12. P. 1794–1799.

46. *Tsunekawa S., Fukuda T., Kasuya A.* X-ray photoelectron spectroscopy of monodisperse CeO_{2-x} nanoparticles // Surf. Sci. 2000. Vol. 457. P. L437–L440.

47. *Goris B., Turner S., Bals S., Van Tendeloo G.* Three dimensional valency mapping in ceria nanocrystals // ACS Nano.Just Accepted Manuscript. DOI: 10.1021/nn5047053. Publication Date (Web): October 6, 2014.

48. *Zhang F., Wang P., Koberstein J. et al.* Cerium oxidation state in ceria nanoparticles studied with X-ray photoelectron spectroscopy and absorption near edge spectroscopy // Surf. Sci. 2004. Vol. 563. P. 72–82.

49. *Natile M.M., Boccaletti G., Glisenti A.* Properties and reactivity of nanostructured CeO_2 powders: Comparison among two synthesis procedures // Chem. Mater. 2005. Vol. 17. P. 6272–6286.

50. *Qiu L., Liu F., Zhao L. et al.* Comparative XPS study of surface reduction for nanocrystalline and microcrystalline ceria powder // Appl. Surf. Sci. 2006. Vol. 252. P. 4931–4935.

51. *Morris V., Fleming P., Conroy M. et al*. The formation of surface stable anion vacancy states at CeO_2 ultra-small crystallite dimensions // Chem. Phys. Lett. 2012. Vol. 536. P. 109–112.

52. *Sokolov A.E., Baranchikov A.E., Gil D.O., Ivanov V.K., Kopitsa G.P., Petrunin A.A., Fomin E.V.* On the size effect in nanocrystalline cerium dioxide: Is the Tsunekawa model correct // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. 2014. Vol. 8(5). P. 997–1001.

53. *Колько В.П., Мороз Э.М., Кривенцов В.В., Зюзин Д.А.* Структурное исследование высокодисперсных диоксидов церия // Изв. РАН. Сер. физ. 2007. Т. 71, № 5. С. 718–721.

54. *Paun C., Safonova O.V., Szlachetko J. et al.* Polyhedral CeO_2 nanoparticles: size-dependent geometrical and electronic structure // J. Phys. Chem. C. 2012. Vol. 116. P. 7312−7317.

55. *Perebeinos V., Chan S.-W., Zhang F.* 'Madelung model' prediction for dependence of lattice parameter on nanocrystal size // Solid State Commun. 2002. Vol. 123. P. 295–297.

56. *Stoianov O.O., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Stoyanova I.V., Chivireva N.A., Antonovich V.P.* Determination of cerium (III) and cerium (IV) in nanodisperse ceria by chemical methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 59(2). P. 15–23.

57. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Копица Г.П., Федоров П.П., Pranzas K., Рунов В.В.* Особенности высокотемпературного роста наночастиц диоксида церия // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54, № 11. С. 1767–1775.

58. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Шапорев А.С., Баранчиков А.Е., Щербаков А.Б., Усатенко А.В.* Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журн. неорган. химии. 2010. Т. 55, № 3. С. 368–373.

59. *Kuchibhatla SVNT, Karakoti A.S., Baer D.R., Samudrala S., Engelhard M.H., Amonette J.E., Thevuthasan S., Seal S.* Influence of aging on the properties of cerium oxide nanoparticles – Implications to quantum confinement effect. // J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces. 2012. Vol. 116, № 26. P. 14108–14114.

60. *Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К., Иванова О.С., Марчевский А.В., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д.* Синтез и антиоксидантная активность биосовместимых водных золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57, № 11. С. 1499–1507.

61. *Yu P., Hayes S.A., O'Keefe T.J., O'Keefe M., Stoffer J.O.* The phase stability of cerium species in aqueous systems: II. the Ce(III/IV)-H_2O-H_2O_2/O_2 systems. Equilibrium considerations and Pourbaix diagram calculations // J. Electrochem. Soc. 2006. Vol. 153, is. 1. P. C74–C79.

62. *Masui T., Fujiwara K., Machida K., Adachi G.* Characterization of Cerium(IV) oxide ultrafine particles prepared using reversed micelles // Chem. Mater. 1997. Vol. 9. P. 2197–2204.

63. *Tsunekawa S., Fukuda T., Kasuya A.* Blue shift in ultraviolet absorption spectra of monodisperse CeO_{2-x} nanoparticles // J. Appl. Phys. 2000. Vol. 87. P. 1318–1321.

64. *Nie J.C., Hua Z.Y., Dou R.F., Tu Q.T.* Quantum confinement effect in high quality nanostructured CeO_2 thin films // J. Appl. Phys. 2008. Vol. 103. P. 054308-1.

65. *Patsalas P., Logothetidis S., Sygellou L., Kennou S.* Structure-dependent electronic properties of nanocrystalline cerium oxide films // Phys. Rev. B. 2003. Vol. 68. P. 035104-1.

66. *Zhang F., Jin Q., Chan S.W.* Ceria nanoparticles: Size, size distribution, and shape // J. Appl. Phys. 2004. Vol. 95. P. 4319–4326.

67. *Yin L., Wang Y., Pang G. et al.* Sonochemical synthesis of cerium oxide nanoparticles – Effect of additives and quantum size effect // J. Coll. Int. Sci. 2002. Vol. 246. P. 78–84.

68. *Zhang Y.W., Si R., Liao C.S. et al.* Facile alcohothermal synthesis, size-dependent ultraviolet absorption, and enhanced CO conversion activity of ceria nanocrystals // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107. P. 10159–10167.

3. ТОКСИЧНОСТЬ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

3.1. Накопление в организме и токсичность солей церия

До недавнего времени исследования в области анализа токсичности тяжелых металлов распространялись в основном на достаточно ограниченный круг элементов, включая кадмий, ртуть, свинец, хром, никель, ванадий и олово. В последние 10–20 лет, в связи с активной разработкой и внедрением новых функциональных материалов, резко возросла и потребность в токсикологическом анализе соединений редких и рассеянных элементов, в частности редкоземельных элементов (РЗЭ), находящих широкое применение в составе керамики (в том числе сверхпроводящей) и специальных сплавов.

Как правило, токсичность наноматериалов, содержащих тяжелые металлы, коррелирует с токсичностью соответствующих ионов. Тем не менее далее будет показано, что данные о токсичности РЗЭ, в частности токсичности солей церия(III) и церия(IV), не могут быть напрямую использованы для оценки воздействия на организм нанодисперсного диоксида церия – в первую очередь, в силу низкой растворимости последнего. Вместе с тем, по нашему мнению, сведения о воздействии соединений церия на организм имеют определенное значение в контексте данной книги, поскольку они демонстрируют негативные эффекты, которые могут возникать при частичном растворении диоксида церия в биологических жидкостях, а также определяют некоторые возможные механизмы взаимодействия наночастиц диоксида церия с живыми системами.

Токсичность водорастворимых соединений Ce(IV) связывают, прежде всего, с высоким редокс-потенциалом ионов четырёхвалентного церия и способностью окислять биологические молекулы. Так, стандартный электродный потенциал пары Ce^{4+}/Ce^{3+} (+1.72 В) гораздо выше, чем потенциал окисления большинства органических соединений (например, для ростовой питательной среды DMEM это значение лежит в диапазоне от –0,38 В до +0,34 В [1]). Вследствие столь высокой окислительной способности введение в корм дрозофилам

сульфата Ce(IV) в концентрациях >6,91 мкг/г корма приводило к значительному уменьшению популяции и гибели насекомых по механизму окислительного стресса [2].

Механизм воздействия соединений Ce(III) на организм не вполне ясен. В работе [3] отмечается, что биологическая активность солей церия в отдельных случаях может быть обусловлена близостью ионных радиусов Ce^{3+} и Ca^{2+} (1,01 Å и 1,00 Å, соответственно) [4], в связи с чем ионы церия способны частично замещать ионы кальция в целом ряде биомолекул. Отметим, что в силу указанного сходства в природе церий всегда является сопутствующим элементом по отношению к кальцию (например, в апатите). В биологии подобное сходство находит свое отражение в склонности церия к вхождению в костную матрицу [5], а также способности церия индуцировать кальцификацию мягких тканей. Церий способен замещать кальций в целом ряде биомолекул; вместе с тем биологическое действие церия, равно как и других лантаноидов, может отклоняться от обычной монотонной зависимости доза – отклик. Интересно, что, по данным [6], ионы церия способны связываться в лизосомах с образованием нанодисперсных частиц фосфата церия. Авторы [7, 8] установили, что ионы РЗЭ в физиологических условиях способны вызывать ускоренный гидролиз нуклеозидфосфатов и фосфатидилинозитола, выступая тем самым в роли ферментов; это также может являться одной из причин токсичности соединений РЗЭ.

В целом, согласно литературным данным, водорастворимые соединения церия(III) менее токсичны, чем соли Ce(IV). В то же время известно [9], что хлорид церия(III) может катализировать разложение пероксида водорода по механизму реакции Фентона с образованием супероксид-радикала. Аналогичным образом при внутрибрюшинном введении нитрата церия(III) мышам наблюдались процессы перекисного окисления липидов [10].

В обзоре [11] проанализированы существующие данные (полученные на лабораторных животных) о способах поступления в организм, токсическом действии и динамике выведения из организма соединений РЗЭ, в том числе и церия. *При ингаляции и внутритрахеальном введении* солей церия (например, $CeCl_3$) накопление церия происходит в альвеолярных и тканевых макрофагах, а также в стенках альвеол [6]. По прошествии времени соединения церия обнаруживаются также в скелете и печени [12, 13]. Отметим, что в исследованиях, по-

священных профессиональным патологиям, было также установлено, что пылеобразные соединения церия могут вызывать пневмокониоз, бронхит, пневмонит и грануломатоз. *При внутривенном введении* скорость выведения РЗЭ из организма определяется преимущественно стабильностью соответствующих соединений в крови. В частности, период полувыведения хлорида церия(III) может достигать нескольких лет [14], тогда как цитратные комплексы РЗЭ выводятся из организма за несколько часов [15].

При внутрибрюшинном введении хлорида или цитрата церия(III) накопление церия наблюдается в основном в печени и скелете [12]. В случае *перорального введения* существенная часть солей церия усваивается в кишечнике и затем выводится с желчью [16]. Накопление РЗЭ при пероральном введении наблюдается в скелете, зубах и мягких тканях, включая легкие, печень и почки [17]. *Поступление солей РЗЭ через кожу* весьма незначительно, однако при наличии порезов или ран соли церия могут проникать в организм [18]. При подкожном введении цитрата церия соединения церия накапливаются в скелете, печени и селезенке [19, 20]. *При внутримышечном введении* $CeCl_3$ накопление церия наблюдается в печени [21]. Следует отметить, что введение в организм комплексонатов металлов (например, диэтилентриаминпентаацетатов кальция или цинка) способствует быстрому выведению церия из организма и может быть использовано для соответствующей детоксикации [22].

3.2. Общие сведения о факторах, определяющих токсичность наноматериалов

Широкое применение наноматериалов в современной промышленности в значительной степени сдерживается отсутствием достоверных и полных сведений об их воздействии на живые организмы и окружающую среду.

На сегодняшний день установлено, что наночастицы (НЧ) способны оказывать негативное воздействие на органы и ткани, в том числе на клеточном и субклеточном уровне, вследствие присущих им необычных физико-химических свойств, включая малые размеры, большую удельную поверхность, высокую реакционную способность, особенности электронного строения, высокую растворимость, способность к агрегации и, в отдельных случаях, специфическую фор-

му [23, 24]. Токсичность наночастиц может в значительной степени определяться такими их характеристиками, как элементный состав, заряд, степень кристалличности и присутствие тех или иных лигандов на поверхности. Помимо этого, токсичность наноматериалов, как и токсичность любых химических соединений, зависит от дозировки, способа введения и продолжительности воздействия.

Следует особо отметить, что токсичность наноматериалов может быть обусловлена как токсичностью входящих в их состав элементов (этим, в частности, объясняется токсичность квантовых точек CdS/CdSe), так и специфическим воздействием на живые системы самих наночастиц. Если в первом случае токсичность наноматериалов можно прогнозировать на основании уже имеющегося значительного массива экспериментальных данных, в первую очередь сведений о токсичности водорастворимых солей металлов (например, содержащихся в базах данных Национального института здоровья США), то во втором, очевидно, требуются дополнительные ресурсо- и времяемкие исследования.

С учетом значительных затрат на проведение комплексных исследований токсичности, на сегодняшний день в наибольшей степени изучено воздействие на живые системы нескольких классов наноматериалов, включая металлические наночастицы [25, 26], углеродные материалы [27, 28], халькогенидные наночастицы (квантовые точки) [29, 30] и оксидные материалы [31, 32]. К числу оксидных наноматериалов, получивших на сегодняшний день наибольшее распространение, следует отнести материалы на основе диоксида кремния (носители катализаторов, сорбенты, молекулярные сита, фильтры), оксидов железа (магнито-резонансная томография, гипертермия), диоксида титана (фотокатализаторы, пигменты, косметика, в том числе солнцезащитная) и оксида цинка (кожные присыпки, солнцезащитная косметика). В последнее время также значительно возросло производство наноматериалов на основе диоксида церия, используемых в качестве абразивов (в том числе в микроэлектронной промышленности), катализаторов (в том числе на автотранспорте) и носителей катализаторов.

Различают три способа проникновения наночастиц в клетку (рис. 3.1) [33]. Основным является механизм поглощения клеткой внешних объектов из межклеточного пространства путём образования мембранных везикул (эндоцитоз). Для гидрофильных частиц или частиц, имеющих одинаковый с мембраной заряд поверхности (обычно

отрицательный), это единственно возможный путь проникновения в клетку. Эндоцитоз наблюдается преимущественно у эукариот, лишенных клеточной стенки. Мелкие лиофильные частицы или частицы, имеющие противоположный с мембраной заряд, способны проникать в клетку напрямую через клеточную мембрану. Обычно этот процесс начинается с адсорбции на поверхности клетки, проходит через стадию встраивания частицы в бимолекулярный липидный слой и заканчивается диффузией внутрь клетки. Третий транспортный путь через клеточную мембрану – это ионные каналы. Как правило, проникновение частиц через каналы зависит от многих факторов, основные из которых – это заряд и размер наночастицы. Ограничения на размер частицы накладываются диаметром ионного канала (обычно <1 нм).

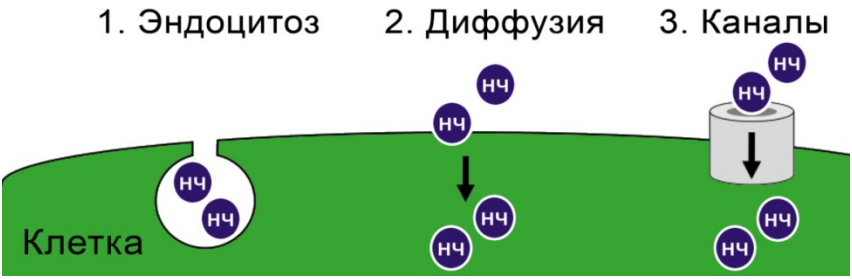


Рис. 3.1. Способы проникновения наночастиц в клетку [33]

Основные факторы, определяющие токсичность наночастиц, рассмотрены достаточно подробно в [24] (рис. 3.2). Наиболее важным фактором является способность наночастиц индуцировать окислительный стресс, т.е. генерировать активные формы кислорода [34]. Изменение окислительно-восстановительного баланса способно приводить к нарушению жизнедеятельности и, в конечном итоге, к гибели клеток. В последние годы было установлено, что окислительный стресс способны вызывать наночастицы серебра, золота, железа, оксидов цинка, никеля, железа, меди, титана и кремния, а также наночастицы ферритов, гидроксиапатита и других соединений сложного состава [34–45]. Следует отметить, что, согласно модели, предложенной в работе [46], оксидные наночастицы могут индуцировать окислительный стресс в том случае, если край зоны проводимости этих

частиц расположен в диапазоне от –4,12 до –4,84 эВ от уровня вакуума, поскольку именно этот диапазон соответствует стандартным потенциалам основных окислительно-восстановительных реакций, протекающих в биологических системах.



Рис. 3.2. Возможные механизмы взаимодействия наноматериалов с биологическими объектами. Примеры иллюстрируют влияние химического состава, электронной структуры, поверхностных соединений (например, металлсодержащих), лигандов (активных или пассивных), растворимости (включая вклад поверхностных соединений и лигандов), взаимодействия с другими факторами окружающей среды (например, УФ-активация) [24]

Токсичность наночастиц обычно анализируют, используя ряд стандартизованных методик, включающих исследования *in vitro* и *in vivo*. Исследования *in vitro* на культурах клеток имеют целый ряд преимуществ, включая высокую скорость и относительно низкую стоимость анализа. Вместе с тем исследования *in vitro* не могут полностью заменить исследований *in vivo* вследствие возможного взаимодей-

ствия наночастиц с химическими реагентами, применяемыми при работе с клеточными культурами, специфического отклика клеток на введение тех или иных наночастиц и т.д.

Взаимодействие наночастиц с биологическими жидкостями, клетками и тканями следует анализировать с учетом возможных путей проникновения наночастиц в живые организмы, а также их последующего селективного накопления в тех или иных органах. В частности, наночастицы могут поступать в организм через желудочно-кишечный тракт [47], легкие [48], а также вводиться внутривенно. Интересно, что наночастицы (в том числе ZnO и TiO_2, содержащиеся в солнцезащитной косметике) могут проникать в организм и через кожу, несмотря на то что эпидермис выполняет функцию защитного барьера.

Пути поступления наночастиц в организм, их преимущественное накопление в различных органах, метаболизм, токсичность и выведение из организма в значительной степени определяются физико-химическими свойствами наночастиц и их взаимодействием с окружающей средой. С уменьшением размеров частиц увеличивается их удельная поверхность, вследствие чего возрастает доля атомов, находящихся на поверхности частиц и характеризующихся большей реакционной способностью. В работе Обердорстера и др. [49] было наглядно показано, что наночастицы с большей удельной поверхностью обладают значительно более высокой биологической активностью, причем биоактивность определяется именно величиной удельной поверхности, а не массой наночастицы. По мере уменьшения размеров наночастиц обычно наблюдается тенденция к росту токсичности наноматериалов даже в том случае, если соответствующий материал в объемном состоянии является сравнительно безопасным для живых организмов. Такая тенденция, в частности, описана для наночастиц золота, диоксидов кремния и титана. Не менее важную роль играет и состояние поверхности наночастиц. Изменение состава лигандной оболочки позволяет целенаправленно снижать токсичность наночастиц; в частности, нанесение полисахаридной оболочки на наночастицы различного состава позволяет существенно уменьшить их токсичность и добиться большей стабильности соответствующих коллоидных растворов [50]. Аналогичным образом токсичность наночастиц в значительной мере зависит от их зета-потенциала, однако в данном случае количественную взаимосвязь еще предстоит установить.

3.3. Сравнительный анализ токсичности нанокристаллического диоксида церия

В силу значительного числа факторов, определяющих биологическую активность наночастиц, в современных исследованиях зачастую применяется подход, основанный на сравнительном анализе токсичности различных наночастиц с использованием одного и того же набора тестов, проводимых *in vitro*. Подобный способ позволяет (с определенными допущениями и ограничениями) установить факторы, определяющие специфическую токсичность тех или иных наноматериалов, и оценить возможность их использования в биомедицинских приложениях. В настоящем разделе рассмотрены известные на сегодняшний день данные о результатах испытаний токсичности нанодисперсного диоксида церия в сравнении с другими наноматериалами.

В работе [51] были выполнены сравнительные исследования токсичности 24 образцов различных коммерческих наноматериалов (включая медь и ее оксиды, диоксид титана, оксид цинка, серебро, кобальт, никель и оксид никеля, диоксид циркония, в том числе стабилизированный иттрием, нержавеющую сталь, оксид алюминия, диоксид олова, карбид вольфрама и диоксид церия), основанные на использовании двух клеточных линий: A549 и THP-1. Анализ токсичности проводили через 3 и 24 ч с момента внесения наночастиц с применением двух красителей – MTT (3-(4,5-диметилтиазолил 2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый) и нейтрального красного (3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназин гидрохлорид). Используемые наночастицы согласно спецификациям компании-производителя характеризовались одинаковыми (или схожими) размерами.

Было установлено, что вне зависимости от вида наноматериала анализ с использованием красителя MTT обеспечивал большую воспроизводимость измерений. Увеличение продолжительности контакта клеток с наноматериалами всех видов приводило к увеличению доли погибших клеток, аналогичным образом влияло и увеличение дозы. Наибольшую токсичность проявляли медь- и цинксодержащие наноматериалы, наименьшую – оксид алюминия, карбид вольфрама и диоксид церия (см. табл. 3.1).

Таблица 3.1

Результаты определения жизнеспособности клеток THP-1 (моноциты) после инкубации в течение 24 ч в присутствии наночастиц по данным МТТ-анализа, выполненного в различных лабораториях [51]

Состав наночастиц	Лаборатория	TC50, мг/мл	TC75, мг/мл	TC25, мг/мл
Медь	B	1,65 (1,52–1,8)	1,04	2,62
	C	6,46 (1,48–28,31)	3,84	10,9
Медь (коммерческий источник)	A	6,59 (3,68–11,81)	2,06	21,09
	C	5,29 (2,03–13,81)	0,96	29,11
Оксид меди (I)	A	1 1,53 (7,48–17,7)	4,13	32,16
	C	3,42 (2,41–4,86)	1,58	7,41
Оксид меди (II)	A	31,07 (27,54–35)	21,21	45,51
	B	3,89 (3,31–4,57)	1,55	9,74
Оксид меди (II, коммерческий источник)	B	3 (2,93–3,01)	2,88	3,13
	C	7,3 (6,05–8,81)	4,28	12,46
Смешанный оксид меди – цинка	B	10,63 (7,87–14,3)	5,65	20
	C	13,65 (9,97–18,6)	9,13	20,4
Оксид цинка стехиометрический	A	1,66 (1,38-2)	1,19	2,33
	B	4,05 (3,35–4,89)	2,95	5,54
Смешанный оксид цинка – титана (50:50)	A	1 1,4 (8,54–15,23)	8,1	16,04
	C	12,8 (12,43–13,07)	1 1,9	13,77
Диоксид титана стехиометрический	B	432 (103,2–1809)	255,77	729,66
	C	НД		
Диоксид титана нестехиометрический	A	845,2 (233,7–3056)	343,46	2079,9
	C	369,2 (141,2–965,4)	165,67	822,76
Серебро	A	19,33 (13,8–27,09)	11,33	32,97
	B	НД		
Серебро (коммерческий препарат)	A	1408 (379,2–5231)	162,02	>3300
	C	55,6 (14,98–206,3)	20,74	149,06
Кобальт	A	НТ		
	C	НТ		
Кобальт (коммерческий препарат)	A	69,6 (31,85–152,1)	43,07	112,47
	B	1,42 (0,48–4,17)	0,19	10,47
Никель	B	79,46 (33,33–189,4)	21,39	295,15
	C	НТ		

Окончание табл. 3.1

Состав наночастиц	Лаборатория	TC50, мг/мл	TC75, мг/мл	TC25, мг/мл
Оксид никеля	B	23,31 (17,14–31,69)	6,44	84,42
	C	1613 (694,6–3745)	628,18	>3300
Диоксид циркония	A	570,6 (170,2–1913)	22,84	>3300
	C	171,9 (87,95–336,1)	60,07	491,87
Оксид циркония, допированный иттрием	B	107,9 (30,5–381,9)	49,45	235,44
	C	НД		
Нержавеющая сталь	B	62,42 (33,99–114,6)	23,32	167,05
	C	НТ		
Оксид алюминия	A	866 (291,9–2569)	48,08	>3300
	B	82,19 (10,28–67,4)	13,54	498,9
Оксид цинка	A	174,1 (40,48–748,3)	4	>3300
	B	3,39 (1,79–6,44)	1,08	10,66
Оксид вольфрама	A	НТ		
	B	НТ		
Диоксид церия	A	1058 (374,8–2984)	311,25	>3300
	B	НТ		

Примечание. НТ – нетоксично; НД – нет данных.

Авторы [51] указывают, что результаты анализов токсичности оказались воспроизводимыми только для наиболее токсичных наноматериалов, тогда как в остальных случаях величины цитотоксичной концентрации (TC50), определенные в различных лабораториях, могли различаться на два порядка, несмотря на строгое соблюдение выработанного протокола испытаний. Этот результат наглядно свидетельствует о том, что методики тестирования токсичности наноматериалов далеки от совершенства. В числе возможных причин подобных различий можно указать отсутствие должного предварительного физико-химического исследования тестируемых наноматериалов (в цитируемой работе, в частности, анализировались только величина удельной поверхности, размер и форма частиц, при этом приводимые в цитируемой статье величины удельной поверхности и размеров частиц наноматериалов (в том числе CeO_2) взаимно не согласуются).

Указанные вопросы были в значительной степени учтены в работе [52], посвященной сравнительному токсикологическому исследованию 23 синтетических наноматериалов с использованием 10 клеточных культур и трех различных видов тестов. Авторы [52] отмеча-

ют, что до настоящего времени не установлено, какие именно специфические свойства наноматериалов отвечают за их токсичность; более того, в силу возможного взаимодействия наноматериалов с реагентами (в первую очередь красителями), используемыми в исследованиях *in vitro*, выводы о токсичности / нетоксичности отдельных видов наноматериалов могут оказаться ложными [53–55]. Приведенные в [52] экспериментальные результаты полностью подтверждают этот тезис: стандартные методы, разработанные для анализа токсичности молекулярных соединений, применительно к наноматериалам могут давать в значительной степени искаженные результаты. Сравнительный анализ токсичности CeO_2 с применением адаптированных методов позволил установить, что целый ряд образцов диоксида церия (равно как и других наноматериалов) обладает способностью генерировать АФК, и, вследствие этого, они являются цитотоксичными. Вместе с тем было показано, что у некоторых образцов диоксида церия, практически идентичных образцам первой группы в отношении размеров частиц, зета-потенциала и т.д., прооксидантные свойства полностью отсутствуют. Подобное разногласие авторы склонны объяснять различиями в состоянии поверхности наночастиц диоксида церия с различной химической предысторией. По нашему мнению, подобные различия действительно могут играть ключевую роль: перед проведением биологических исследований авторы обрабатывали нанопорошки диоксида церия азотной кислотой, что, безусловно, могло приводить к частичному восстановлению Ce(IV) до Ce(III) на поверхности наночастиц и адсорбции значительного количества нитрат-ионов.

Авторы [56] провели сравнительный анализ токсичности наночастиц оксидов железа и церия со средним размером частиц около 7 нм, синтезированных с применением методов «мягкой химии» и дополнительно стабилизированных лимонной либо полиакриловой (M_w = 2 000 г/моль) кислотами. Исследования токсичности были выполнены на культуре мышиных фибробластов NIH/3T3 с использованием МТТ-теста в диапазоне концентраций наночастиц от 10 мкМ до 10–50 мМ при 24-часовой экспозиции. Полученные результаты показаны на рис. 3.3. Как следует из представленных данных, жизнеспособность клеток в присутствии наночастиц железа, а также в присутствии наночастиц диоксида церия, стабилизированных полиакриловой кислотой, остается неизменной (в пределах погрешности измере-

ний) во всем изученном диапазоне концентраций. В свою очередь, нестабилизированные наночастицы CeO_2, а также наночастицы CeO_2, стабилизированные цитратом, не влияют на жизнеспособность клеток вплоть до крайне высоких концентраций (1 г/л), однако дальнейшее увеличение концентрации CeO_2 может приводить к гибели клеток.

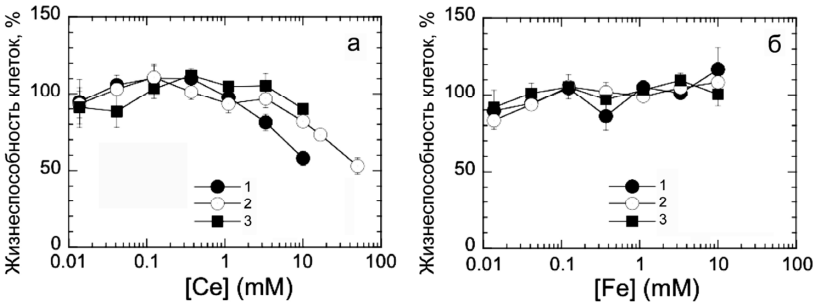


Рис. 3.3. Результаты МТТ-анализа токсичности наночастиц оксидов церия (*а*) и железа (*б*): *1* – наночастицы без стабилизатора; *2* – наночастицы, стабилизированные цитратом; *3* – наночастицы, стабилизированные полиакрилатом [56]

В работе [57] было выполнено сравнение механизмов токсического действия оксидов цинка, титана и церия с учетом их растворимости и способности индуцировать окислительный стресс. Наночастицы CeO_2, TiO_2 и ZnO размером 8, 11 и 13 нм, соответственно, синтезировали методом пиролиза аэрозолей при температурах до 2300°С. Анализ токсичности проводили с использованием культур клеток RAW 264.7 (клеточная линия фагоцитов) и BEAS-2B (эпителиальные клетки бронхов человека). Было установлено, что препараты диоксида церия и титана, в отличие от оксида цинка, не являются токсичными для обеих клеточных культур. При этом токсичность частиц ZnO прежде всего связана с их растворимостью, т.е. с токсичностью иона Zn^{2+}. Введение наночастиц оксида цинка в культуры индуцировало образование активных форм кислорода (H_2O_2 и O_2^-). Наночастицы диоксида титана и церия в условиях эксперимента были практически нерастворимы и токсичности не проявляли, однако между их биологическим поведением наблюдалась существенная разница. Если наночастицы TiO_2 выступали в роли просто инертного материала, то для

наночастиц CeO_2 была установлена способность защищать клетки от экзогенных активных форм кислорода.

Вопрос сравнительного анализа свойств наноматериалов различного состава с использованием микро- и макроорганизмов был поднят в работе [58]. Для изучения токсичности нанодисперсных оксидов церия, титана и железа авторами [58] были использованы три метода: метод проращивания семян растений (анализ фитотоксичности), метод оценки жизнеспособности дафний (*Daphnia magna*) и биолюминесцентный метод (Microtox®), основанный на тушении люминесценции бактерий *Vibrio fischeri* в присутствии токсичных соединений. Было показано, что CeO_2, в отличие от TiO_2 и Fe_2O_3, практически полностью подавляет проращивание семян всех культур, использованных для тестирования (*Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Spinacia oleracea*); вместе с тем, по мнению авторов [58], тесты на проращивание семян характеризуются принципиально низкой воспроизводимостью и поэтому непригодны для анализа токсичности наноматериалов. В пользу этого вывода говорит и отсутствие зависимости токсического отклика от дозы CeO_2. Тест с использованием *Daphnia magna* показал, что токсичность CeO_2 и TiO_2 практически сопоставима, тогда как нанодисперсный оксид железа вызывает массовую гибель дафний. Наконец, биолюминесцентный тест свидетельствует о крайне высокой токсичности CeO_2 (уже при минимальной концентрации CeO_2 (0,064 мг/мл) наблюдалось 80%-ное тушение люминесценции) и низкой токсичности TiO_2 и Fe_2O_3.

На основании анализа полученных данных авторы делают вывод о том, что биолюминесцентный тест наиболее пригоден для сравнительного анализа токсичности наноматериалов. Вместе с тем этот вывод явно недостаточно обоснован, поскольку, в частности, не указан возможный механизм токсического действия наночастиц на бактерии *Vibrio fischeri*. Исследованные золи отличались использованными стабилизаторами и от прекурсоров дополнительно не отмывались. Если для оксидов железа и титана в качестве стабилизатора использовали тетраметиламин (основание), то стабилизатором и прекурсором при получении наночастиц диоксида церия выступал гексаметилентетрамин. Это соединение в водном растворе медленно гидролизуется с выделением высокотоксичного формальдегида, который сам по себе является сильным биоцидом. Концентрация формальдегида в свежеприготовленном растворе гексаметилентетрамина («кон-

троль стабилизатора») и в золе диоксида церия после гидролиза гексаметилентетрамина может отличаться на несколько порядков.

Таким образом, токсичность любого нанодисперсного материала, в том числе и CeO_2, определяется не только его химическим составом, как это характерно для молекулярных соединений, но и целым рядом других факторов. Например, для золей следует принимать во внимание также факторы, связанные с токсичностью остаточных примесей прекурсоров и используемых стабилизаторов.

3.4. Факторы, влияющие на токсичность нанодисперсного диоксида церия

Сводный обзор результатов исследований токсичности образцов диоксида церия, полученных разными авторами, представлен в табл. 3.2. Анализ литературных данных позволяет выделить несколько основных факторов, определяющих токсичность нанодисперсного CeO_2.

3.4.1. Размерные эффекты

Как правило, с уменьшением размера частиц их токсичность возрастает; это относится даже к химически-инертным материалам и благородным металлам (графит, золото, платина и т.п.). Однако для наночастиц диоксида церия литературные данные о зависимости токсичности от размера частиц весьма противоречивы. Одни авторы утверждают, что с уменьшением размера кристаллитов диоксида церия токсичность растет, другие – что токсичность снижается. Из табл. 3.2 и рис. 3.4, 3.5 видно, что с точки зрения токсичности для диоксида церия существует несколько размерных диапазонов. Крупнокристаллический CeO_2 с размером частиц **>100 нм** обладает слабой токсичностью, которая практически не зависит от его дисперсности. С уменьшением размера частиц CeO_2 до **50–30 нм** их токсичность незначительно возрастает. Данный рост аналогичен общей закономерности, характерной практически для всех наноматериалов: он связан с увеличением удельной свободной поверхности частиц и, соответственно, с увеличением скорости различных гетерофазных процессов (в том числе процессов адсорбции и катализа) на поверхности. Диапазон **30–10 нм** представляет собой область, где проявляются и усиливаются эффекты, связанные со способностью частиц CeO_2 участвовать в окислительно-восстановительных

процессах, причем такие наночастицы диоксида церия выступают преимущественно в роли окислителя, вызывая окислительный стресс. В зависимости от предыстории, среды и стабилизатора токсичность может даже повышаться.

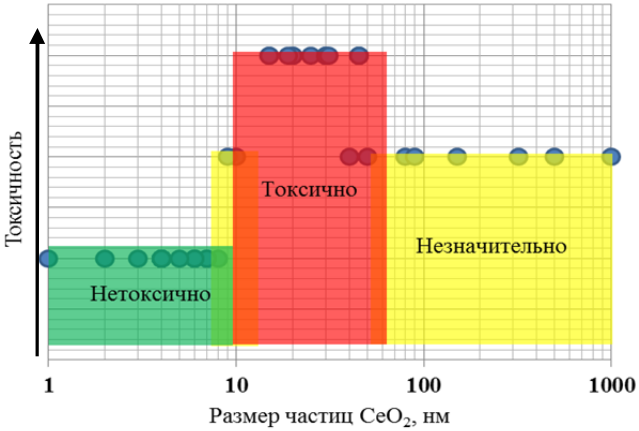


Рис. 3.4. Зависимость токсичности наночастиц диоксида церия от их размера (по данным табл. 3.2)

При дальнейшем уменьшении размеров наночастиц их токсичность снова снижается. Предположительно [59], данный факт связан с резким увеличением кислородной нестехиометрии частиц. Снижение токсичности наночастиц CeO_2 и рост антиоксидантной (восстановительной) активности продолжается вплоть до субнанометровых размеров. При переходе к истинным растворам соединений церия их токсичность снова возрастает.

Следует отметить, что указанные размерные диапазоны токсичности частиц диоксида церия весьма условны. В ряде случаев частицы размером 15 нм оказывались менее токсичными, чем частицы размером 5–6 нм. Помимо размерного фактора, большую роль играют способ получения частиц (предыстория), состав прекурсоров и стабилизаторов; очень важную роль в фармакокинетике определяет заряд поверхности частиц (точнее, их дзета-потенциал). Еще более существенное значение имеет pH биологической среды (в зоне накопления и активности наночастиц); кислотность среды влияет не только на дзета-потенциал, но и на редокс-свойства самих частиц CeO_2.

Таблица 3.2

Сводные сведения о токсичности образцов нанодисперсного диоксида церия

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
1	1000	Не указано	Из раствора, гидролизом гексаметилентетрамина. Стабилизированы глютаматом	Гиппокампальные нервные клетки (HT22) и макрофаги мыши (RAW164)	Показана незначительная токсичность микронных частиц диоксида церия	Незначительно	Не изучалось	[65]
2	500–250, 150–80, 80–40, 50–20	–25… –45 мВ	Высокотемпературный синтез – пиролиз ацетата церия (III)	Фибробласты легкого человека (MRC-9)	Показано, что с уменьшением размера частиц токсичность незначительно увеличивается, что связано с увеличением удельной поверхности частиц	Незначительно	Не изучалось	[66]
3	90–70	Не указано	Высокотемпературный синтез – пиролиз аэрозоля	Ткани легкого крысы	Никакого влияния CeO_2 на жизнеспособность ткани легкого, метаболизм глютатиона, активность супероксиддисмутазы не обнаружено. Клеточная защита справляется с частицами: пагубные последствия не выявлены	Незначительно	Не изучалось	[67]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
7	45, 30, 25, 15	Не указано	Высокотемпературный синтез в водном растворе при сверхкритических температурах	Бронхиальные эпителиальные клетки человека (BEAS-2B). Тест MTT, уровень АФК и глютатиона, активность каспазы-3, конденсация хромосом, проводили тест на поглощение наночастиц	Наночастицы вызывают увеличение уровня АФК, уменьшение уровня глютатиона и проявляют цитотоксичность по механизму апоптоза, что связано с окислительным повреждением клеток	Токсично	Прооксидант	[71]
8	35–40	Не указано	Высокотемпературный синтез – пиролиз прекурсора	Клетки эндотелия аорты человека (HAECs)	Даже в максимальной дозе (50 мкг/мл) воспалительный отклик незначительный	Незначительно	Не изучалось	[72]
9	30–20	–32,4 ± 5,6 мВ	Не указано	Самки крыс Wistar (200–250 г), ингаляция	Наночастицы вызывают воспаление легких у подопытных животных	Токсично	Прооксидант	[73]
10	~31±4	Исходный раствор –7,69± 3,7 мВ Физиологический раствор –35 мВ при pH 7.4	Не указано	Крысы, внутривенное введение (0, 50, 250 и 750 мг/кг)	У животных наблюдаются симптомы окислительного стресса	Токсично	Прооксидант	[74]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
11	20 ± 3	Не указано	Гидролиз в водном растворе с последующим отжигом	Клетки бронхоальвеолярной карциномы человека (A549)	Показано снижение жизнеспособности клеток, рост содержания АФК, перекисного окисления липидов и повреждение мембран, а также понижение уровня глютатиона и α-токоферола. Цитотоксичность коррелирует с дозой и длительностью экспозиции	Токсично	Прооксидант	[75]
12	20	Не указано	Коммерческий препарат Aldrich 643009	Крысы Sprague Dawley	Наночастицы вызывают воспаление легких у подопытных животных	Токсично	Прооксидант	[76]
13	19	Не указано	Пиролиз аэрозоля раствора ацетата церия (III)	Клеточные культуры MTSO, 3T3	Показана пониженная митохондриальная активность (MTT-тест) после 3- и 6-дневной экспозиции (3,75–30,0 мкМ). Линия клеток MTSO более чувствительна к введению CeO_2, чем линия 3T3. CeO_2 менее токсичен, чем другие исследованные наноматериалы. Зарегистрировано пониженное содержание ДНК в клетках MTSO и 3T3 после 3-дневной экпозиции (3,75–15,0 мкМ). Отмечено небольшое увеличение содержания ДНК через 6 дней экспозиции (7,5–30,0 мкМ)	Токсично	Прооксидант	[77]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
14	9,320	Не указано	Коммерческий препарат Envirox™	Модель эпидермиса человека EpiDerm™ EPI-200, MatTek Corporation (Ashland, MA, USA), тест на цитотоксичность BS EN ISO 10993-5, тест Эймс (Ames), тест жизнеспособности дафнии (Daphnia magna)	Показана потенциальная возможность раздражения кожи *in vivo*; существенного различия между нанокристаллическим и крупнокристаллическим CeO_2 не установлено	Незначительно	Не изучалось	[78]
15	<10	Отрицательный	Сольвотермальный	Мышиные фибробласты NIH/3T3	Показана биосовместимость цитрат- и полиакрилат-стабилизированного диоксида церия и фибробластов. Цитрат-стабилизированные наночастицы только в высоких концентрациях (более 1 г/л) показали незначительное угнетение митохондриальной активности	Незначительно	Не изучалось	[56]
16	16±2,4	Не указано	Не указано	Фибросаркома груди человека HT-1080	Наночастицы диоксида церия защищают клетки от апоптоза	Нетоксично	Антиоксидант	[79]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
17	16-6	Не указано	Осаждение аммиаком из раствора нитрата церия(III). Отжиг порошка при 800°C в течение 3 ч	Модель болезни Альцгеймера человека *in vitro*. Исследованы параметры выживания и смерти клеток, атрофии нейронов, локализация нейронного маркера и факторов экспрессии PPARß, BDNF, TrkB, включающие пути сигнальной трансдукции выживания нейронов	Показано, что нанодисперсный CeO_2 действует не только как антиоксидант, но и прямо или косвенно влияет на пути запуска процесса гибели нейронов, действуя в качестве нейропротектора	Нетоксично	Антиоксидант	[80]
18	9	Не указано	Не указано	Клетки L929, A549, ткани легкого	Показано, что CeO_2 не представляет опасности для жизнеспособности клеток	Незначительно	Антиоксидант	[81]
19	8	+ 15мВ в воде – 10 мВ в ростовой среде	Высокотемпературный синтез – пиролиз аэрозоля раствора 2-этилгексаноата церия(III) в ксилоле	Макрофаги мыши (RAW 267.4) и бронхиальные эпителиальные клетки человека (BEAS-2B)	Показаны защитное действие против окислительного стресса и цитопротекторный эффект; поглощение в клетке происходит мембранными везикулами без изменения структуры митохондрий	Нетоксично	Антиоксидант	[57]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
20	7	Не указано	Коммерческий препарат NanoActive™	Эксперимент выполняли на трансгенных мышах MCP-1 и в контрольных группах дикого типа	Наночастицы CeO_2 оказывают восстанавливающее действие за счет ослабления миокардиального окислительного стресса, ER-стресса и воспалительных процессов. После обработки нанодисперсным CeO_2 в миокарде мышей MCP понижено образование цитокинов (TNF, IL-1и IL-6)	Нетоксично	Антиоксидант	[82]
21	7-2	+ 5 мВ	Осаждение аммиаком из водного раствора соли церия (III) в присутствии мальтодекстрина	Мышиные фибробласты (L929)	Наночастицы диоксида церия защищают клетки от пероксида водорода; с уменьшением размера частиц степень защиты возрастает	Нетоксично	Антиоксидант	[83]
22	12, 6	Не указано	Гидролиз нитрата церия (III) в присутствии гексаметилентетрамина с последующей стабилизацией глютаматом	Гиппокампальные нервные клетки (HT22) и макрофаги мыши (RAW164)	Показана нейропротекторная активность CeO_2. Частицы размером 6–12 нм защищают нервные клетки от окислительного стресса, действуют в качестве антиоксидантов, уменьшая концентрацию АФК. Сделан вывод, что наночастицы можно использовать для управления окислительным стрессом в биологических системах	Нетоксично	Антиоксидант	[65]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
23	6	Не указано	Не указано	Клетки Aβ42	Показано, что наночастицы CeO_2 не влияют на фибрилляцию клеток Aβ42 (в отличие от наночастиц TiO_2, которые ускоряют процесс нуклеации и сокращают латентный период)	Нетоксично	Антиоксидант	[84]
24	5–6	Не указано	Сольвотермальный	Протеины хрусталика глаза	Влияние не выявлено	Нетоксично	Не изучалось	[85]
25	5–3	Не указано. По аналогии – отрицательный	Осаждение из нитрата церия (III) аммиаком в микроэмульсии в присутствии AOT	Клетки карциномы молочной железы человека (MCF-7) и нормальные эпителиальные клетки молочной железы (линия CRL8798) подвергали воздействию ионизирующего излучения (0–10 Гр)	Показаны радиопротекторные свойства CeO_2. Обработка нормальных клеток нанодисперсным CeO_2 (50 нМ) снижает их смертность от облучения практически на 99%, при этом защита опухолевых клеток отсутствует	Нетоксично	Антиоксидант	[86]

Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
26	5–2	Не указано. По аналогии – отрицательный	Осаждение из нитрата церия (III) аммиаком в микроэмульсии в присутствии АОТ	Первичная культура спинного мозга крысы; нейронные и глиальные клетки спинного мозга взрослой крысы	Показана нейропротекторная активность CeO_2. Одноразовая доза CeO_2 в наномолярной концентрации обеспечивает повышенное выживание нейронов спинного мозга взрослой крысы и обеспечивает защиту от окислительного стресса, вызванного введением пероксида водорода	Нетоксично	Антиоксидант	[87]
27	5–3	Не указано По аналогии – отрицательный	Осаждение из нитрата церия (III) пероксидом водорода в микроэмульсии в присутствии АОТ	Фибробласты легкого CCL 135	Наночастицы диоксида церия защищают от пневмонии, вызванной радиацией	Нетоксично	Антиоксидант	[88]
28	5–3	Не указано. По аналогии – положительный	Из раствора, окислением Ce(III) пероксидом водорода в кислой среде, стабилизатор – нитрат-анион	Фоторецепторные клетки крыс *in vivo*	Наночастицы диоксида церия защищают клетки сетчатки от дегенерации, вызванной внутриклеточными пероксидами	Нетоксично	Антиоксидант	[89]

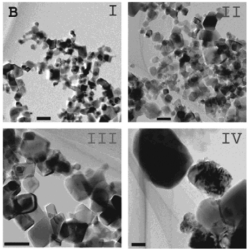
Продолжение табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
29	5–3	Не указано По аналогии – положительный	Из раствора, окислением Ce(III) пероксидом водорода в кислой среде, стабилизатор – нитрат-анион	Мышиные макрофаги J774A.1	Наночастицы диоксида церия проявляют противовоспалительные свойства	Нетоксично	Антиоксидант	[90]
30	5–3	Не указано По аналогии – положительный	Из раствора, окислением Ce(III) пероксидом водорода в кислой среде, стабилизатор – нитрат-анион	Мыши с отсутствующим геном Vldlr	Наночастицы диоксида церия проявляют антиоксидантные свойства, препятствуют патологическому процессу образования сосудов в сетчатке мышей с отсутствующим геном Vldlr	Нетоксично	Антиоксидант	[91]
31	5–3	Не указано По аналогии – положительный	1) Из раствора, стабилизатор – декстран. 2) Из раствора, окислением Ce(III) пероксидом водорода в кислой среде, стабилизатор – нитрат-анион	Мезенхимальные стволовые клетки человека HMSC	Наночастицы диоксида церия могут быть использованы в костных имплантатах для ускорения регенерации	Нетоксично	Антиоксидант	[92]

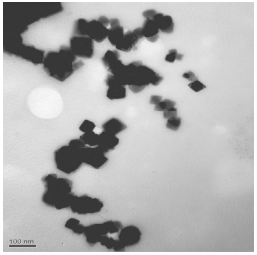
Окончание табл. 3.2

№ п/п	Размер частиц, нм	Заряд поверхности (ζ-потенциал)	Способ получения	Объект исследования	Основные результаты и выводы	Токсичность	Редокс-свойства	Ссылка
32	4	Не указано. По аналогии – положительный	Из раствора, стабилизатор – декстран	Кардиомиоциты (H9c2), фибробласты человека (BJ), клетки рака легкого (A-549) и клетки рака груди (BT-474)	Показана цитопротекторная pH-зависимая активность диоксида церия. Наночастицы диоксида церия защищают нормальные клетки от повреждения пероксидом водорода и не защищают малигнизированные	Нетоксично	Антиоксидант	[93]
33	≤2	–19 мВ	Из раствора, стабилизатор – цитрат	Мышиные фибробласты (L929), фибробластоподобные клетки зеленой мартышки (VERO)	Наночастицы диоксида церия защищают клетки от УФ-излучения как в профилактической, так и в лечебной схемах применения	Нетоксично	Антиоксидант	[94]

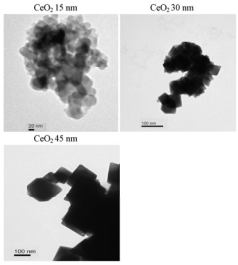
2



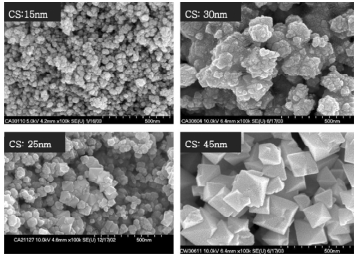
4



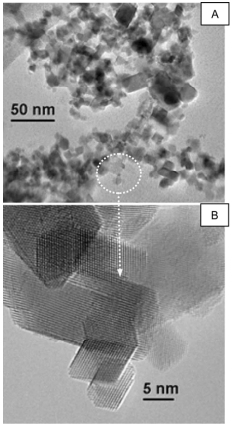
5



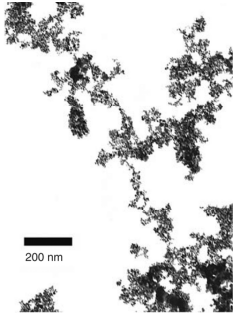
7



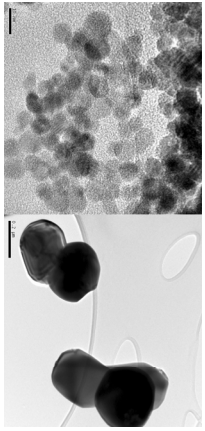
10



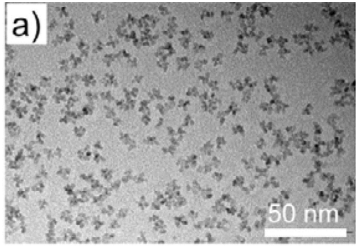
12



14



15



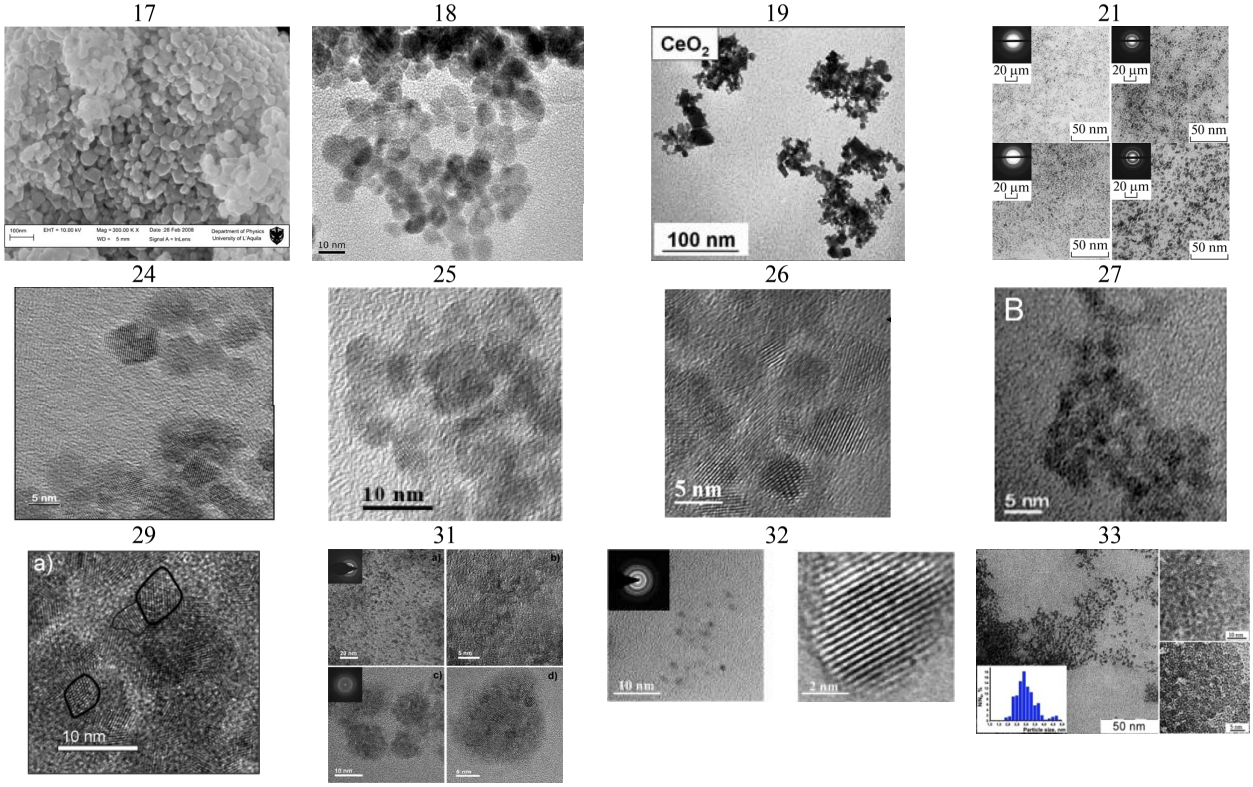


Рис. 3.5. Микрофотографии образцов нанодисперсного диоксида церия.
Нумерация фотографий соответствует таковой в табл. 3.2

3.4.2. Предыстория образования частиц

Из анализа данных, приведенных в табл. 3.2, следует, что наночастицы диоксида церия малого размера, имеющие минимальную токсичность, формируются преимущественно в мягких условиях, при синтезе «растворными» методами. Напротив, более крупные частицы, характеризующиеся высокой токсичностью, образуются обычно в результате высокотемпературных синтезов, в частности при пиролизе церийсодержащих прекурсоров или при высокотемпературных отжигах. Обработка наночастиц CeO_2 при высоких температурах повышает их кристалличность и снижает количество дефектов на поверхности, что неизбежно ведёт к потере антиоксидантной активности. Как правило, наночастицы нестехиометрического CeO_2 при термообработке подвергаются дополнительному окислению [60] и приобретают прооксидантные свойства. По мнению авторов [61], именно температура синтеза наночастиц диоксида церия определяет их поведение в биологических системах, в том числе и токсичность.

Образцы диоксида церия, полученные в одинаковых условиях, но с использованием разных прекурсоров, также могут отличаться по своим физико-химическим и биологическим свойствам. Так, в работе [62] 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). Предполагается, что осаждение из растворов церия(IV) приводит к образованию более стехиометричных по кислороду образцов наночастиц. С целью изучения влияния состава прекурсора на свойства нанодисперсного диоксида церия (НДЦ) нами были синтезированы частицы размером 2–3 нм из солей Ce^{+3} и Ce^{+4} с использованием в качестве стабилизатора низкомолекулярной полиакриловой кислоты и изучено их влияние на перевиваемые культуры фибробластов мышей (L929), эпителиальные клетки тестикул эмбрионов поросят (EPT) и фибробластоподобные клетки зеленой мартышки (VERO) [63]. Результаты исследования токсичности показали существенное отличие чувствительности разных клеточных культур к CeO_2.

Как было отмечено выше, определенный размер частиц CeO_2 ещё не означает, что ионы церия находятся в соответствующей (заранее известной) степени окисления, и известным образом будут участвовать в окислительно-восстановительных процессах. Размер определя-

ет лишь энергетически выгодную равновесную степень окисления ионов церия в нестехиометрическом диоксиде церия. Для перехода в это равновесное состояние частица должна иметь определенное лигандное окружение и/или предысторию. Авторы [64] показали, что наночастицы диоксида церия размером 3,5–14,0 нм, полученные гидротермальным способом, в отсутствие на поверхности лиганда являются полностью стехиометричными. Напротив, при модификации поверхности частиц олеиновой кислотой наблюдается описанная выше монотонная зависимость кислородной нестехиометрии от размера. Любопытно, что сформированные в присутствии олеиновой кислоты частицы после термического удаления лиганда с поверхности сохраняют нестехиометричность по кислороду и способны участвовать в окислительно-восстановительных процессах (имеют высокую кислородную емкость).

Помимо прочего, используемые при синтезе наночастиц диоксида церия лиганды (стабилизаторы) сами по себе могут обладать определенной биологической активностью и даже проявлять цитотоксичность. Выше уже был приведен пример, когда при оценке токсичности частиц авторы [58] не приняли во внимание присутствие продуктов разложения остатков прекурсора и стабилизатора. В наших экспериментах наночастицы диоксида церия, полученные с использованием другого стабилизатора (цитрата аммония), приводили не к ингибированию, а, напротив, к увеличению (до 40%) интенсивности биолюминесценции аналогичного штамма *V. fisheri* (тест-система Lumitester, Kikkoman Corp.), т.е. диоксид церия оказывал стимулирующее действие на тест-культуру [95].

3.4.3. Заряд поверхности

Из анализа данных, приведенных в табл. 3.2, не прослеживается непосредственная связь между токсичностью нанодисперсного диоксида церия и зарядом поверхности частиц CeO_2, однако, несомненно, дзета-потенциал частиц во многом определяет их поведение, в том числе – устойчивость при определенных значениях pH, способность сорбироваться на тех или иных границах раздела и проникать через мембраны. В работе [96] на примере наночастиц ряда оксидов металлов (в том числе диоксида церия) показано, что токсичность коррелирует со способностью наночастиц агломерироваться в биологической

среде. Данное свойство зависит от зета-потенциала и достигает максимума в точке нулевого заряда. При этом отмечена сравнительно низкая токсичность наночастиц диоксида церия.

В работе [97] проанализирована способность наночастиц диоксида церия адсорбировать протеины (на примере бычьего сывороточного альбумина) и поглощаться клетками аденокарциномы легкого (A549). С целью проверки были синтезированы два вида частиц: размером ~4,5 нм (микроэмульсионным способом) и ~9,5 нм (гидротермальным способом). Частицы, полученные микроэмульсионным способом, имели отрицательный зета-потенциал при pH > 4,5 (потенциал нулевого заряда, ПНЗ = 4,5 мВ), гидротермальным методом – при pH > 9,5. Таким образом, в диапазоне биологически релевантных pH (pH = 5–9) первые частицы были заряжены отрицательно, вторые – положительно. Образцы частиц, имеющие положительный дзета-потенциал, лучше адсорбировали протеины, в то время как отрицательно заряженные частицы либо сорбировали гораздо меньше альбумина, либо вообще не проявляли сорбционной активности. С другой стороны, следует учитывать, что по результатам цитологических исследований отрицательно заряженные частицы легче поглощаются клеткой [98].

В работе [56] сравнивали токсичность наночастиц диоксида церия (10 нм), стабилизированных цитратом или полиакрилатом натрия, и частиц без стабилизатора по отношению к мышиным фибробластам NIH/3T3. В условиях опыта в присутствии поликарбоновой кислоты зета-потенциал частиц был отрицательным; нестабилизированные частицы имели положительный заряд поверхности (рис. 3.6). Показано, что стабилизированные наночастицы полностью биосовместимы, поскольку все обработанные ими клетки сохранили 100% жизнеспособности. Наночастицы без стабилизатора (с положительным зарядом поверхности) при высоких концентрациях CeO_2 (> 1 г/л) немного понижали митохондриальную активность.

Авторы [99] синтезировали наночастицы диоксида церия размером 5 нм, стабилизированные цитратом натрия; за счет цитратной оболочки частицы имели отрицательный зета-потенциал. Такие частицы в дозировке 100 мг/кг не оказывали существенного про- или антиоксидантного действия на мозг крысы через 1–20 ч после парентерального (внутривенного) введения. По мнению авторов, данный факт связан с тем, что такие наночастицы (несмотря на столь малые размеры) не

могут пересечь гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Для данных частиц не было зарегистрировано нейротоксичности, они не вызывали значительного окислительного стресса. С другой стороны, коммерческий препарат CeO_2 с размером частиц 30 нм при внутривенном введении способен проникать через ГЭБ и оказывать токсическое действие на мозг по механизму окислительного стресса [74]. Следует отметить, что частицы размером 5 и 30 нм, по данным авторов [99], имели разный заряд поверхности; золи с отрицательным дзета-потенциалом не проникали через ГЭБ, несмотря на малые размеры (почти на порядок меньше).

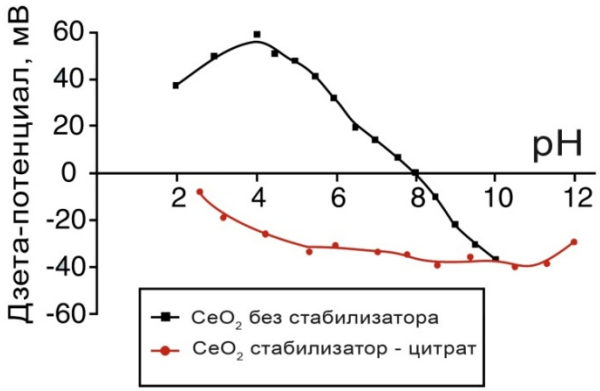


Рис. 3.6. Типичная pH-зависимость ζ-потенциала водных золей диоксида церия, не содержащих стабилизатора и стабилизированных цитратом аммония

В работе [1] обнаружено, что наночастицы CeO_2 (ядро – 7 нм, гидродинамический диаметр – 12 нм), имеющие в растворе положительный дзета-потенциал, способны повреждать ДНК фибробластов кожи человека. В то же время для наночастиц аналогичного размера, имеющих отрицательный дзета-потенциал (стабилизированных 3-фосфонопропионовой кислотой), авторами [100] не обнаружено никакого повреждения ДНК и хромосом (генотоксического эффекта) в эпителиальных клетках хрусталика человека.

С целью изучения влияния заряда поверхности наночастиц диоксида церия на его локализацию и цитотоксичность авторы [101] син-

тезировали ряд частиц, функционализированных лигандами с различным зарядом, а также незаряженными лигандами. Показано, что токсичность частиц CeO2 напрямую связана с их способностью проникать внутрь клетки: чем выше проникающая способность, тем выше и токсичность (см. рис. 3.7).

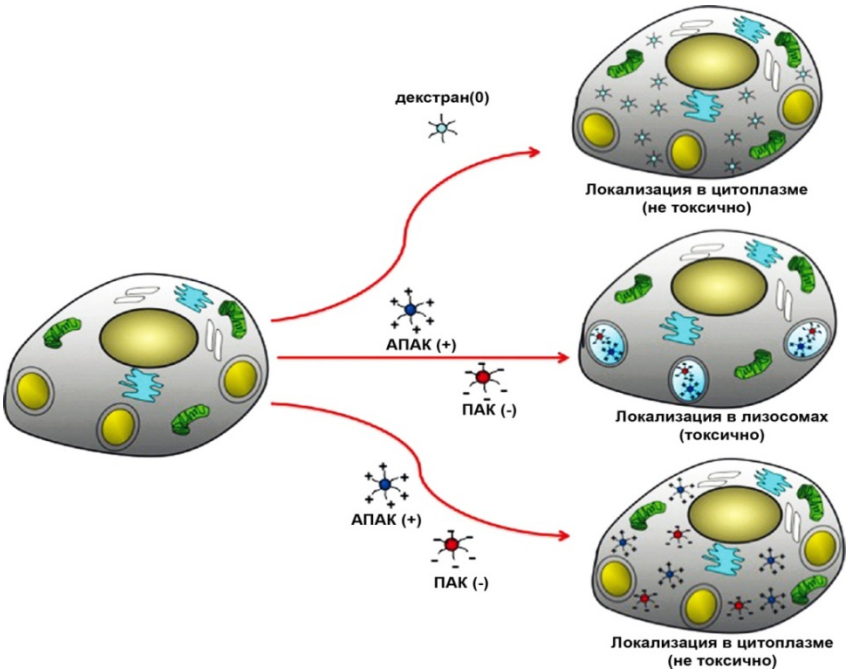


Рис. 3.7. Проникновение в клетку наночастиц диоксида церия с разным зарядом поверхности и предполагаемый механизм токсичности. При использовании в качестве стабилизатора незаряженного декстрана наночастицы CeO_2 локализованы в цитоплазме и токсичности не проявляют. При использовании отрицательно заряженной полиакриловой кислоты (ПАК(-)) или аминированной полиакриловой кислоты (АПАК(+)) в зависимости от типа клеток наночастицы могут оставаться в цитоплазме (нетоксично) или проникать в лизосомы. Содержимое лизосом, как правило, характеризуется пониженным значением pH, при этом наночастицы диоксида церия проявляют прооксидантную активность и могут быть цитотоксичными [101]

Кроме того, при попадании частиц внутрь клетки цитотоксичность различается в зависимости от места их локализации. Наночастицы

диоксида церия, которые локализуются преимущественно в цитоплазме, имеют более низкую токсичность по сравнению с частицами, которые накапливаются в лизосомах. Как оказалось, частицы с положительным и нейтральным зарядом способны проникать в большинство изученных типов клеток, частицы с отрицательным зарядом – преимущественно в малигнизированные линии клеток. При этом если незаряженные частицы концентрируются преимущественно в цитоплазме, то заряженные способны проникать в лизосомы.

Таким образом, частицы с положительным зарядом имеют максимальную токсичность, незаряженные – минимальную токсичность для всех изученных типов нормальных клеток, а частицы с отрицательным зарядом поверхности малотоксичны для нормальных и токсичны для раковых клеток.

3.5. Токсичность нанодисперсного диоксида церия, выпускаемого в промышленных масштабах

Диоксид церия выпускается в промышленных масштабах – в том числе и в нанодисперсном состоянии. CeO_2 входит в состав разнообразных катализаторов и присадок (например, катализатора Eolys, производимого компанией Rhodia Rare Earths и применяемого, в частности, в дизельных автомобилях Peugeot, добавляемых в дизельное топливо с целью сокращения выбросов загрязняющих веществ в атмосферу). Использование таких добавок неизбежно ведёт к накоплению диоксида церия в окружающей среде – в атмосфере, почве и водоемах. С выхлопными газами автомобилей или по пищевой цепочке CeO_2 может попадать в организм животных и человека. Следует отметить, что коммерческие наноматериалы на основе диоксида церия производятся преимущественно высокотемпературным синтезом и имеют размеры 10–30 нм. С учетом анализа, приведенного в разделе 3.3, такие частицы могут представлять определенную опасность для живых существ. Для оценки потенциальных рисков, связанных с массовым применением катализаторов дожига дизельного топлива, которые содержат церий, в проекте [102] было предпринято детальное исследование, ставившее целью сбор новой и систематизацию имеющейся информации о воздействии нанодисперсного диоксида церия на живые системы.

3.5.1. Результаты исследований токсичности нанодисперсного диоксида церия, входящего в состав катализаторов дожига моторных топлив

Диоксид церия в нанодисперсном состоянии улучшает полноту сгорания и широко применяется в качестве каталитической присадки моторных топлив. Поскольку в процессе сгорания топлива наночастицы диоксида церия попадают в воздух с выхлопными газами, ключевым способом поступления в организм промышленных соединений церия является ингаляционный. Наночастицы могут депонироваться в носоглотке, бронхах (трахеях) и лёгких благодаря нескольким основным механизмам, в зависимости от типа, размера и формы наночастицы (рис. 3.8 [103]).

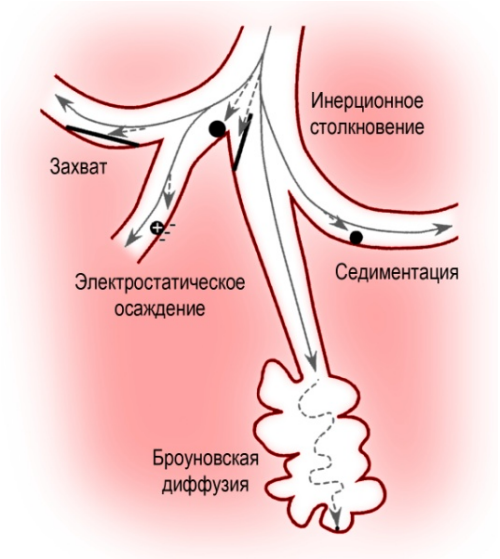


Рис. 3.8. Параметры, определяющие осаждение частиц в объеме легких. Крупные частицы тормозятся из-за инерционных столкновений, преимущественно в крупных дыхательных путях; более мелкие частицы оседают за счет седиментации под действием силы тяжести; мелкие частицы проникают в альвеолы благодаря диффузии. Электростатическое осаждение наблюдается для заряженных частиц, а для волокнистых частиц – захват [103]

По данным [102], продукты сгорания дизельного топлива с церийсодержащими присадками включают частицы диоксида, фосфата и сульфата церия размером менее 500 нм, а также композитные частицы аналогичного состава с сажей в качестве второго компонента. Авторы [102] отмечают, что оксиды и гидроксиды церия в силу малой растворимости в биологических средах относятся к категории соединений, медленно выводимых из организма (в течение нескольких лет). На рис. 3.9 приведена схема выведения из организма малорастворимых частиц (в том числе диоксида церия), поступающих при вдыхании аэрозолей.

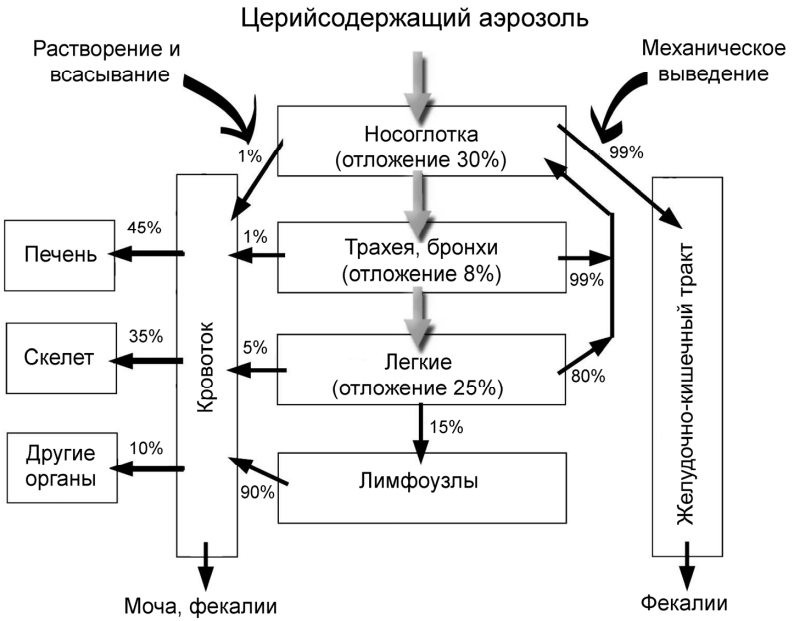


Рис. 3.9. Выведение из организма человека диоксида церия и других малорастворимых соединений церия, поступающих при вдыхании аэрозолей

Анализ образцов ткани легких у людей, чья профессиональная деятельность связана с работой с соединениями редкоземельных элементов, позволил установить, что церийсодержащие частицы удерживаются в легких в течение долгого времени и могут впоследствии попадать в другие органы [104]. Вероятно, частицы диоксида церия

(как и другие дисперсные материалы, например диоксид кремния) при длительной экспозиции способны формировать отложения в легких, альвеолах и соединительной ткани (в том числе проникать внутрь соответствующих клеток) и вызывать пневмокониоз (см. также [70]). Вместе с тем прямых доказательств возможности развития пневмокониоза вследствие ингаляции церийсодержащих соединений нет. Выведение церия из легких представляет собой длительный процесс, в котором в первую очередь задействован реснитчатый эпителий. С учетом того, что в желудочно-кишечном тракте усваивается крайне малая доля церия, церийсодержащие частицы, выводимые с помощью мукоцилиарного эскалатора, повторно не усваиваются.

Токсичность диоксида церия в связи с использованием церийсодержащих соединений в составе катализаторов дожига топлива в последнее время исследуется достаточно активно. Авторы [102] со ссылкой на экспериментальные работы [105, 106] указывают, что диоксид церия не проявляет острой токсичности (величина LD_{50} не может быть определена) даже при очень высоких дозах (до 1000–5 000 мг/кг). Сведения о хронической токсичности диоксида церия при ингаляционном способе введения также отсутствуют, однако во многих работах авторы отмечают острую токсичность наночастиц CeO_2 при ингаляции [68, 70, 73]. Способность диоксида церия вызывать иммунный ответ у человека не исследовалась; в работе, посвященной аллергизации крыс [107], было установлено, что концентрация иммуноглобулина E (IgE) в плазме крови и вес лимфоузлов при подкожном введении CeO_2 (150–300 мг/кг) оставались неизменными по сравнению с контрольной группой. Влияние диоксида церия на поведенческие особенности животных до настоящего времени не исследовано. Исследования генотоксичности CeO_2 были проведены в единственной работе [108]; установлено, что при введении мышам CeO_2 (2 000 мг/кг) соответствующих негативных эффектов не наблюдается. Исследования канцерогенного действия CeO_2 до настоящего времени не проводились.

В связи с разработкой целого ряда новых церийсодержащих катализаторов дожига топлива – Envirox+, Platinum Plus и Eolys DPX-9 – авторы [109] выполнили дополнительный анализ литературных данных (по состоянию на 2010 г.) о потенциальной токсичности нанодисперсного диоксида церия. Высказано предположение о том, что слабоагрегированные наночастицы диоксида церия при ингаляции

оказывают более значимое негативное воздействие на организм. В частности, продемонстрировано, что вдыхание неагрегированных наночастиц CeO_2, полученных в искровом разряде (в отличие от сильноагрегированных наночастиц того же размера), приводит к увеличению содержания лейкоцитов в бронхоальвеолярной жидкости. Вместе с тем авторы [109] отмечают, что любые негативные эффекты, связанные с ингаляцией наночастиц диоксида церия, практически не заметны на фоне негативных эффектов, вызванных контактом с продуктами неполного сгорания дизельного топлива.

Для оценки кожно-раздражающего действия наночастиц диоксида церия, входящих в состав топливной добавки Envirox™, а также крупнокристаллического CeO_2, в работе [78] применяли модель EpiDerm™. С использованием МТТ-теста определяли оптическую плотность при 540 нм (OD_{540}) и эффективное время 50%-ной гибели клеток (ET_{50}, мин). В качестве образца сравнения использовали 20%-ный раствор лаурилсульфата натрия, являющегося стандартным компонентом шампуней и моющих средств. Раздражающий потенциал (MIP) оценивали как отношение значений ET_{50} для образца сравнения и тестируемого материала. По результатам выполненных исследований, кожно-раздражающее действие диоксида церия оказалось на несколько порядков ниже, чем аналогичный показатель для лаурилсульфата натрия, причем с уменьшением размера частиц раздражающий потенциал уменьшается (см. табл. 3.3).

Таблица 3.3

Результаты исследований кожно-раздражающего действия наночастиц диоксида церия (Envirox™) на модели кожи EpiDerm™ [77]

Тестируемый материал	Время экспозиции, мин	Значение OD_{540}	% выживших	ET_{50}, мин	MIP
Образец сравнения, 20%-ный раствор лаурилсульфата натрия	15	0,983	58,34	20,68	1,00
	30	0,710	42,14		
	60	0,273	16,20		
	120	0,100	5,93		
Наночастицы CeO_2, ~9 нм	960	2,010	119,29	1517,18	<0,01
	1200	1,138	67,54		
	1440	1,089	64,63		
Крупнокристаллический CeO_2, ~ 320 нм	960	1,994	92,87	> 1440	0,03
	1200	1,975	97,36		
	1440	1,729	85,23		

Для оценки влияния размера наночастиц CeO_2 на ингаляционную токсичность авторы [110] сравнивали два наноразмерных образца и один микронный образец диоксида церия в 28-дневных исследованиях токсичности на крысах. Все три образца показывали дозозависимый воспалительный эффект и повреждение альвеоцитов, но без серьёзных патологических изменений. Не наблюдалось системного воспаления или каких-либо гематологических эффектов во всех трёх случаях. При пересчете на единицу массы максимальный эффект давали наноразмерные образцы, однако при пересчете на единицу поверхности наибольшее раздражение вызывал микронный образец НДЦ. В работе [111] авторы сравнивали пульмонологический эффект наночастиц диоксида церия примерно одинакового размера (3–5 нм), но с разной предысторией: один из них получали методом осаждения, второй – гидротермальным способом. Гидродинамический диаметр частиц в фосфорнокислом буфере составлял 313±30 и 1731±165 нм, соответственно. Оба образца НДЦ вызывали окислительный стресс у мышей и проявляли цитотоксичность, но в первом случае средний размер агломератов был меньше, частицы проникали глубже в лёгкие и вызывали более выраженное воспаление. Второй образец, полученный путем термообработки, проявлял свойства прооксиданта, генерировал АФК, что сопровождалось, как показано на материале бронхоальвеолярного лаважа, увеличением уровня перекисного окисления липидов.

Мышей с повышенным риском развития атеросклероза (аполипопротеина Е-дефицитных (АроЕ -/-)) выращивали на диете с повышенным содержанием жиров. Затем животные были подвергнуты ингаляционному действию аэрозоля дизельного топлива (ДТ) и дизельного топлива, содержащего наночастицы диоксида церия (НДЦ) [112]. После экспозиции ДТ у подопытных животных в корковой и подкорковой областях мозга была значительно снижена концентрация стресс-чувствительного фактора транскрипции АР-1 (активаторного белка-1). Компоненты фактора транскрипции АР-1 регулируются путем фосфорилирования и химического оксидирования специфических цистеиновых остатков, связанных с ДНК-связывающими доменами Fos и Jun. Введение НДЦ в состав дизельного топлива устраняло данный эффект. Таким образом, авторы показали, что НДЦ в составе ДТ защищают мозг подопытных животных от токсического действия дизельного топлива.

В работе [81] силами семи европейских лабораторий выполнен детальный многофакторный экспериментальный анализ токсичности нанодисперсного диоксида церия, являющегося основой катализатора дожига моторного топлива Envirox и характеризующегося средним размером частиц, равным 9 нм, и удельной поверхностью, равной ~100 $м^2$/г. Общую токсичность Envirox оценивали с использованием 3 методик, включая тест на раздражение кожи EpiDerm, стандартный метод исследования цитотоксичности BS EN ISO 10993-5 и тест Эймса на мутагенность. Во всех указанных исследованиях результаты были отрицательными.

Влияние нанодисперсного диоксида церия (в форме аэрозолей с массовым содержанием CeO_2, равным 157, 76 и 14 $мг/м^3$) на метаболические процессы в легких было проанализировано с использованием органотипических культур срезов легочной ткани крыс. Было установлено, что присутствие CeO_2 в воздухе никак не сказывается на жизнеспособности указанных клеточных культур, протекании глутатион-зависимых метаболических процессов, активности супероксиддисмутазы и содержании фактора некроза опухоли (TNF-α). Наблюдавшееся увеличение каталазной активности не было дозозависимым и не влекло за собой снижения жизнеспособности клеток.

В дополнение к указанной выше группе экспериментов были выполнены исследования окислительной способности диоксида церия (а также ряда других оксидных наноматериалов), в частности способности окислять аскорбиновую кислоту, а также взаимодействовать с компонентами искусственной выстилающей жидкости дыхательных путей (в том числе с солями аскорбиновой и мочевой кислот, а также глутатионом). Установлено, что индуцируемое введением CeO_2 снижение содержания аскорбиновой кислоты является достаточно незначительным; снижения содержания мочевой кислоты и глутатиона не наблюдалось. Полученные данные находятся в хорошем соответствии с исследованиями, выполненными *in vitro* с использованием культуры эпителиальных клеток человека A549: было показано, что нанодисперсный диоксид церия, входящий в состав катализатора Envirox, в отличие от оксидов меди, цинка и титана, не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток и не приводит к повышенной секреции провоспалительного цитокина интерлейкина 8.

3.5.2. Результаты исследований токсичности других промышленных образцов нанодисперсного диоксида церия

Помимо катализаторов дожига, нанодисперсный диоксид церия выпускается в промышленных масштабах для защиты поверхностей (например, деревянных) от выгорания при экспозиции под открытым небом в условиях интенсивного солнечного излучения. Как правило, такой НДЦ выпускается в двух вариантах: липофильный (для введения в состав масляных и других красок и грунтовок на неводной основе) и гидрофильный (для введения в состав водоэмульсионных и других красок на водной основе). Например, гидрофильный НДЦ выпускается компанией BYK под торговой маркой Nanobyk^{TM} 3810 (NB). Препарат представляет собой концентрированный водный золь, содержащий частицы CeO_2 размером 3±1 нм (гидродинамический диаметр ~7 нм), стабилизированный цитратом аммония (ζ-потенциал при pH=7±0,1 отрицательный, −45 ± 5 мВ).

В работе [113] исследовали токсичность данных наночастиц в исходном виде и после экспозиции (старения) под солнечным излучением в естественных условиях (NB-ЭА) и в кислой среде, имитирующей состояние желудочно-кишечного тракта (NB-ЭЖ) по отношению к клеткам кишечника человека Caco-2. Для сравнения использовали другой коммерческий золь НДЦ, выпускаемый компанией Rhodia и содержащий «голые» (нестабилизированные) частицы НДЦ примерно того же размера, но с положительным ζ-потенциалом (28 ± 2 мВ). После экспозиции частицы NB-ЭА и NB-ЭЖ частично утрачивали цитратную оболочку и их ζ-потенциал повышался (−28 ±2 мВ and −19±2 мВ, соответственно pH=7±0,2). При этом соотношение Ce^{3+} и Ce^{4+} оставалось неизменным. Исследования показали низкую цитотоксичность всех наночастиц – никакой токсичности в культуре клеток не наблюдалось до концентрации 170 мкг/мл в течение 24 и 72 ч контакта. Более чувствительный анализ генной экспрессии показал, что «голые» частицы влияют на метаболическую активность (особенно митохондриальные функции) клеток. Низкоуровневое регулирование главных генов этого пути было подтверждено полимеразной цепной реакцией в реальном времени (qRT-PCR). При этом частицы, покрытые цитратной оболочкой (NB), не влияли на респираторную цепь, а НДЦ, частично утратившие эту оболочку, оказывали промежуточное по величине воздействие (рис. 3.10).

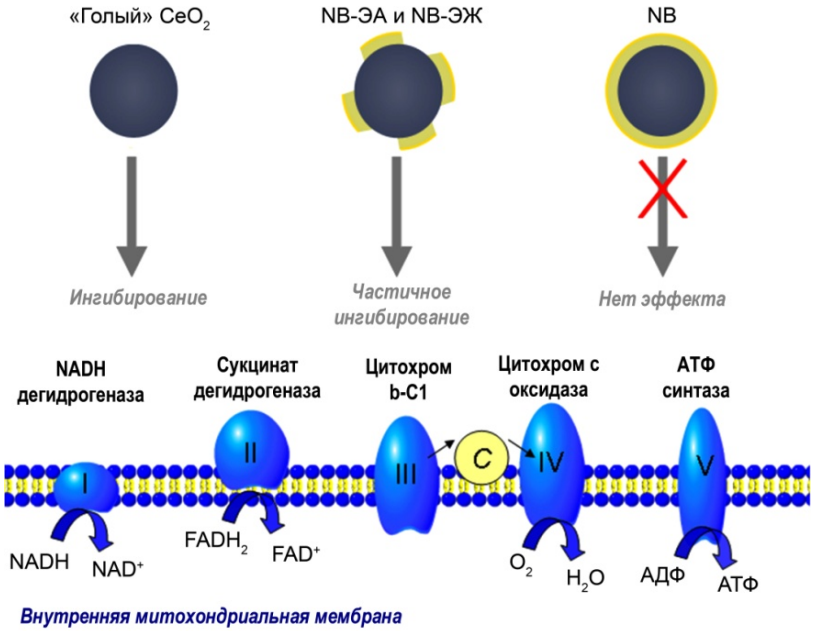


Рис. 3.10. Изменение комплексов респираторной цепи под действием частично деградированных наночастиц диоксида церия, стабилизированных цитратом. «Голые» частицы CeO_2 экспрессировали на низком уровне 27 генов, кодирующих субъединицы комплекса I, III (цитохром b-c1), IV и V. Деградированные под действием кислоты наночастицы диоксида церия (NB-ЭЖ) показали низкоуровневую регуляцию 10 генных подгрупп кодирования комплекса I (дегидраза НАД), комплекса II (дегидраза сукцината), комплекса IV (цитохром С оксидаза) и комплека V (синтаза АТФ). Деградированные под действием света наночастицы диоксида церия (NB-ЭЖ) регулировали три генные подгруппы кодирования комплекса II и IV. Исходные наночастицы CeO_2 (NB) не изменяли дыхательную цепь клетки [113]

3.5.3. Экотоксикологические характеристики нанодисперсного диоксида церия

Сравнительные исследования биологической активности ряда наноматериалов (в том числе TiO_2, ZrO_2, Al_2O_3, CeO_2, фуллерена и одностенных углеродных нанотрубок) с использованием биотестов, ориентированных на определение токсичности по отношению к вод-

ным организмам (бактериям, морским водорослям и рачкам) [99], включая биотесты Microtox (*Vibrio fischeri*), PAM (*Pseudokirchneriella subcapitata*), Chydotox (*Chydorus sphaericus*), Biolog (смесь почвенных бактерий)), свидетельствуют о том, что эти наноматериалы, будучи диспергированными в очищенной или прудовой воде, не оказывают негативного воздействия на указанные живые организмы даже в высоких концентрациях (EC50 > 100 мг/л, LC50 > 100 мг/л). Следует особо отметить, что в выбранных условиях наночастицы быстро агрегировали и выпадали в осадок, что приводило к резкому уменьшению реальной концентрации частиц в жидкой фазе. По мнению авторов, подобное уменьшение концентрации наночастиц является ключевым фактором, определяющим низкий уровень угрозы окружающей среде со стороны большинства синтетических наноматериалов. Вместе с тем в работе [114] показано, что наночастицы диоксида церия способны вызывать окислительный стресс у нематоды *Caenorhabditis elegans*. При этом наноразмерный диоксид церия оказался более токсичным, чем крупнодисперсный порошок [115]. Ингибирование развития нематод авторы связывают с антимикробной активностью наночастиц диоксида церия: при этом исчезает основное звено пищевой цепочки круглых червей и происходит торможение их роста.

В диссертационной работе [116] с использованием нескольких образцов коммерческих микро- и нанокристаллических образцов диоксида церия было исследовано действие последнего на ряд водных организмов, включая *C. carpio*, *D. rerio*, *P. subcapitata*, *D. magna*. Было экспериментально установлено, что изменение состава среды оказывает существенное влияние на гидродинамический размер частиц диоксида церия. Увеличение концентрации диоксида церия приводит к увеличению гидродинамического размера частиц. Добавление к суспензиям CeO_2 фульвовой кислоты приводит к уменьшению гидродинамического размера частиц. Показано, что в присутствии водных организмов средний гидродинамический размер частиц CeO_2 также значительно уменьшается. По данным автора [116], наночастицы CeO_2 проявляют токсическое действие по отношению к водоросли *P. subcapitata*, при этом токсичность возрастает с уменьшением размеров частиц (значения полумаксимальной эффективной концентрации EC50 для частиц размером 5, 7, 10 и 35 нм составляют 0,0013, 0,14, 0,35 и 0,8 мг/л соответственно). Дополнительные исследования позволили установить, что присутствие диоксида церия существенно

сказывается на метаболизме клеток *P. subcapitata*. В работе [117] отмечается, что размерная зависимость токсичности частиц диоксида церия выражена гораздо слабее, чем, например, у частиц металлического серебра. На модели гепатоцитов форели и человека *in vitro*, а также молоди карпа и *D. magna in vivo* авторы показали, что нано- и микрочастицы CeO_2 демонстрируют примерно одинаковую низкую экотоксичность. Авторы [118] отмечают, что несмотря на значительное накопление нанодисперсного диоксида церия в организме *D. magna*, острая токсичность не регистрировалась вплоть до самых высоких концентраций (до 1 000 мг/л) (см. рис. 3.11).

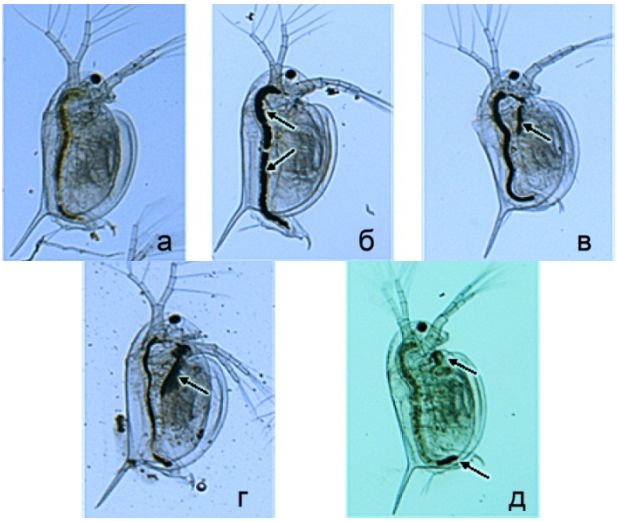


Рис. 3.11. *D. magna* после 48-часового экспонирования в суспензии наночастиц диоксида церия: *а* – контроль; *б* – 2,6 мг/л; *в* – 16 мг/л;) – 100 мг/л. Фотография (*д*) сделана после 2-часового инкубирования образца (*г*) в питательной среде, не содержащей диоксида церия. Черная окраска пищеварительного тракта свидетельствует о поглощении частиц CeO_2. Стрелки указывают на зоны накопления CeO_2 [118]

Исследование острой экотоксичности (EC_{50}) наночастиц диоксида церия по отношению к двум видам дафнид показали, что *D. similis* в 350 раз более чувствительна к CeO_2, чем *D. pulex*, 48-часовая EC_{50} для них составляла 0,26 и 91,79 мг/л соответственно [119]. Дополнительно, из-за морфологических особенностей строения кутикулы, *D. si-*

milis способна накапливать в два раза большее количество агрегатов наночастиц, чем *D. pulex*, что тормозит движение дафний и сказывается на различии в их плавательной способности.

В работе [120] на примере четырех типичных обитателей водных биоценозов (диатомовые водоросли Nitzschia palea, личинки комара-звонца Chironomus riparius, обитающие в иле, а также личинки земноводных: лягушки *Xenopus laevis* и тритона *Pleurodeles waltl*) исследовали экотоксичность двух типов наночастиц диоксида церия – малых (2–5 нм), стабилизированных цитратом наносфер и нестабилизированных (20–60 нм) нанопластинок. Острую токсичность (летальность через 48 или 96 ч в зависимости от испытуемого организма) оценивали в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мг/г. Сублетальные эффекты наночастиц оценивали на хирономидах в диапазоне концентраций от 0,01 до 1 мг/л. Летальность, торможение роста и генотоксические эффекты оценивали на личинках земноводных в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мг/л. Результаты показали отсутствие острой токсичности для всех исследованных организмов даже при максимальных концентрациях наночастиц CeO_2. Летальность (35%) наблюдается на личинках *Xenopus* через 12 дней экспозиции при максимальной концентрации частиц. Никаких эффектов на хирономид во время хронической экспозиции зарегистрировано не было. Рост личинок *Xenopus* тормозили концентрации выше 1 мг/л обоих видов НДЦ, в то время как для *Pleurodeles* торможение наблюдается только в случае максимальной концентрации одного вида частиц. Для *Xenopus* никаких генотоксических эффектов зарегистрировано не было, в то время как для *Pleurodeles* один тип наночастиц показал дозозависимый генотоксический эффект. В работе [121] авторы изучали токсичность и трансформацию 1 мг/л нестабилизированных и стабилизированных цитратом наночастиц CeO_2 в модельной экосистеме водоёма, где обитают бентические организмы – брюхоногие моллюски (*Planorbarius corneus*). Через четыре недели церий регистрировался в пищеварительной системе моллюсков, при этом для обоих видов частиц 65–80% церия было восстановлено из Ce^{4+} до Ce^{3+}. Нестабилизированные наночастицы вызывали окислительный стресс, тогда как наночастицы диоксида церия, стабилизированные цитратом, стресса не вызывали, несмотря на то что в обоих случаях концентрация и степень восстановления церия в пищеварительных органах моллюсков были одинаковы.

В работе [122] исследовали влияние наночастиц диоксида церия разного размера, крупнокристаллического диоксида церия и солей церия (гексанитратоцерата(IV) аммония) на выживание (28-й день) и воспроизводство (56-й день) земляного червя *Eisenia fetida*, а также на биоаккумуляцию и гистопатологические эффекты. Черви содержались в стандартной почве Lufa 2.2, в которую вносили три типа наночастиц CeO_2 размером 5–80 нм, один тип крупных частиц (300 нм) и соль церия(IV) в концентрации 41–10 000 мг Ce/кг почвы. Даже в самых высоких концентрациях нанодисперсный и крупнокристаллический диоксид церия не влияли на выживание и воспроизводство земляного червя, тогда как для ионов церия наблюдалась дозозависимая токсичность. Средняя летальная концентрация (LC_{50}) и эффективная концентрация (EC_{50}) гексанитратоцерата(IV) аммония находились на уровне 317,8 и 294,6 мг Ce/кг почвы соответственно. Несмотря на отсутствие токсических эффектов для всех образцов диоксида церия, наблюдалось дозозависимое накопление CeO_2 в организме червей, при этом гистологические исследования показали некоторые нарушения целостности эпителия кишечника *Eisenia fetida*.

3.6. Накопление в организме и клиренс НДЦ, применяемого в биологических исследованиях и при терапии

В работе [123] авторы определяли распределение и клиренс наночастиц диоксида церия разного размера и ионов церия при внутривенной инфузии крысам. Показано, что традиционные фармакокинетические модели наилучшем образом подходят для ионов церия и наночастиц CeO_2 размером 5 нм. Наночастицы размером более 5 нм быстро выводятся из крови. После начального снижения концентрация частиц размером 15 и 30 нм в крови увеличивалась (результат, который не может быть хорошо описан в рамках традиционной модели фармакокинетики). Ионы церия и частицы размером 5 и 55 нм в сыворотке или в сгустке крови концентрировались неизбирательно, смесь кубических и стержнеподобных частиц накапливалась преимущественно в сгустке, а частицы CeO_2 размером 15 и 30 нм мигрировали в сгусток примерно за 4 ч. Вероятно, ретикулоэндотелиальные органы не могут распознавать НДЦ размером 5 нм как наночастицы.

Полученные данные позволяют предположить, что наночастицы НДЦ размером 5 нм наиболее привлекательны для инфузии при медицинских применениях.

С целью применения НДЦ как антиоксиданта авторы [124] также исследовали биораспределение и клиренс наночастиц диоксида церия при внутривенном введении крысам. Животные, которым вводили стабилизированный цитратом НДЦ с размером частиц 5, 15, 30 и 55 нм (ζ-потенциал минус 30 мВ), были умерщвлены через 1, 20, или 720 ч после введения, и их органы были исследованы на содержание церия. Основное количество НДЦ накапливалось в печени и селезёнке, клиренс через 720 ч был незначительный. Очень немного НДЦ поступило в мозговую паренхиму (рис. 3.12, 3.13).

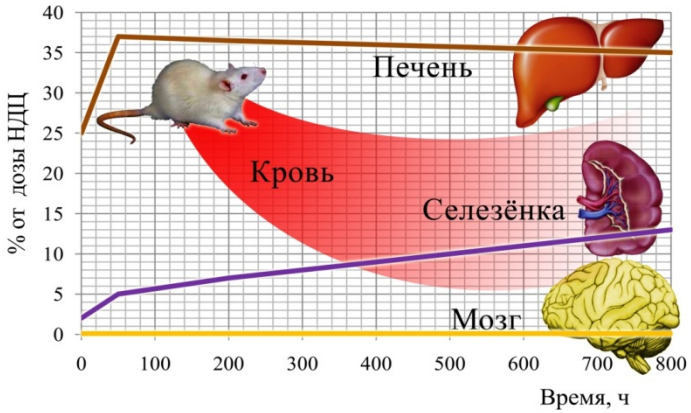


Рис. 3.12. Распределение НДЦ в органах крысы при внутривенном введении [124]

Из представленных данных авторы делают вывод, что частицы CeO_2 всех размеров не могут пересекать гематоэнцефалический барьер. В работе [125] данный факт исследован подробнее. Для визуализации с помощью конфокальной микроскопии наночастицы диоксида церия размером 10 нм функционализировали флуоресцеин изотиоцианатом. Содержание церия в органах (селезёнка, печень, лёгкие, почки и мозг) животных определяли с помощью плазменной масс-спектрометрии. Частицы вводили однократно в двух дозах (1 или 20 мг/кг) и исследовали биораспределение через 24 ч. В целом, результаты совпали с данными предыдущих авторов: наибольшее количество наночастиц накапливалось в печени и селезёнке, некоторая

часть депонировалась в лёгких и почках. Тем не менее вполне заметное количество наночастиц CeO_2 проникало в паренхиму головного мозга и активировало астроциты. Расположение электронноплотных частиц в мозге, рассеянных или в виде агломератов, было подтверждено ультраструктурными исследованиями.

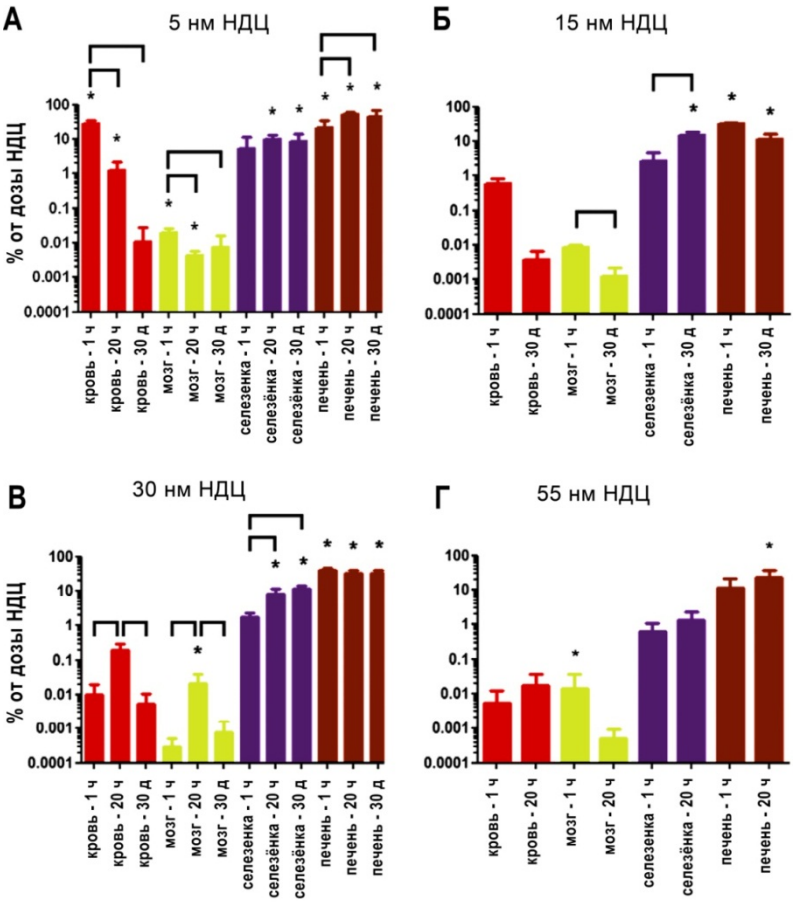


Рис. 3.13. Доля введённой дозы наночастиц CeO_2 разного размера в крови, мозге, селезёнке и печени крыс. *Существенное различие между обработанными (показано) и необработанными (не показано) животными. Полоски над гистограммой обозначают значительное различие в процентах дозы НДЦ между двумя сроками [124]

В работе [126] авторы изучали влияние способа введения наночастиц CeO_2 на их биораспределение в организме мышей *in vivo*. Частицы вводили перорально (ПО), внутривенно (ВВ) или интраперитонеально (ИП) в количестве 0,5 мг/кг веса мышей еженедельно в течение 2 или 5 недель. Затем определяли биораспределение и защитный эффект от окислительного стресса, вызванного четыреххлористым углеродом. Самое большое накопление НДЦ наблюдалось при ВВ и ИП способах введения (в селезёнке, далее – в печени, лёгких и почках). Выведение из всех органов происходило с калом. Введение наночастиц диоксида церия не показало токсичности, при ВВ и ИП индексы лейкоцитарной формулы были немного повышены. В то же время введение наночастиц CeO_2 снижало токсическое действие CCl_4 и уменьшало окислительный стресс – подобно действию традиционного антиоксиданта N-ацетил цистеина. Накопление в печени, селезёнке и легких – и соответствующий клиренс – радиоактивных наночастиц диоксида церия, содержащих ^{141}Ce, подтверждено авторами [127] (см. главу 6, рис. 6.21).

Авторы [128] исследовали биораспределение и клиренс наночастиц диоксида церия разного размера (и разной формы) при однократном и многократном внутривенном введении крысам. НДЦ с размером частиц 5 и 30 нм кубической/полиэдрической формы или в виде наностержней (9,9 × 264 нм средний диаметр и длина) вводили однократно; доза наночастиц размером 5 нм была распределена последовательно в течение 5 дней подряд. Крысы были умерщвлены во временном интервале от 1 ч до 90 дней, после чего в различных органах определяли содержание церия. Печень, селезенка и костный мозг содержали наибольший процент от введённой дозы. В нормализированном пересчёте распределение и удерживание повторных и более низких доз для частиц размером 5, 30 нм и наностержней практически не отличались от гораздо более высоких доз наночастиц CeO_2 размером 5 и 30 нм. Более высокие дозы наностержней приводили к большему проценту накопления в селезенке и костном мозге через 30 дней после введения, чем другие в случае других наночастиц. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что биораспределение и удержание при внутривенном введении наночастиц диоксида церия примерно одинаковы – вне зависимости от их формы и размера, а также дозы и схемы введения (см. рис. 3.14–3.15).

В работе [130] также исследовали зависимость аккумуляции и распределения наночастиц диоксида церия при различных способах введения (интратрахеально и внутрижелудочно). С этой целью использовали радиоактивные наночастицы $^{141}CeO_2$ диаметром 40 нм, ζ-потенциал +42 мВ. Показано, что при введении в желудок наночастицы диоксида церия выводятся из организма значительно быстрее, чем при введении в лёгкие. Причем эта закономерность наблюдается для всех органов (см. табл. 3.4).

Таблица 3.4

Концентрация в тканях церия через 7 дней после введения наночастиц $^{141}CeO_2$ крысам, нг/г [130]

Ткань	Интратрахеально (1 мг/кг)	Внутрижелудочно (5 мг/кг)
Легкие	127858±4427	0,16±0,05
Кровь	0,25±0,18	0,04±0,01
Плазма	0,04±0,03	0,01±0,01
Эритроциты	0,06±0,04	0,07±0,02
Костный мозг	6,61±0,41	0,12±0,08
Кости	16,86±0,89	0,11±0,09
Кожа	0,18±0,01	0,02±0,01
Мозг	0,01±0,01	0,05±0,03
Скелетная мускулатура	1,32±1,05	0,01±0,01
Тестикулы	0,11±0,03	0,07±0,2
Почки	5,45±0,77	0,07±0,02
Селезёнка	1,69±0,71	0,17±0,08
Сердце	1,07±0,18	0,12±0,06
Печень	28,06±2,77	0,14±0,11
Желудок	9,18±1,2	0,00±0,00
Тонкая кишка	4,70±0,44	0,78±0,54
Толстая кишка	12,04±2,28	0,12±0,04
Слепая кишка	13,81±2,59	0,00±0,00

Также было показано, что процент абсорбции и внелегочное поглощение ионного церия существенно выше, чем наночастиц диоксида церия (см. табл. 3.5). При искусственном вскармливании в одинаковой дозе (5 мг/кг) значительно более высокое содержание радиоактивного церия наблюдалось в случае $^{141}CeCl_3$ по сравнению с наночастицами $^{141}CeO_2$ в скелетной мускулатуре (0,001 против 0,0002%), в печени (0,001 против 0,0002%) и в желудке (0,003 против 0,0005%) [130].

Таблица 3.5

Распределение в тканях крыс ^{141}Ce через 28 дней после введения в виде соли или наночастиц диоксида церия [130]

Ткань	Наночастицы $^{141}CeO_2$ (1 мг/кг)	$^{141}CeCl_3$ (0,1 мг/кг)
Кровь	0,00±0,00	0,01±0,005
Костный мозг	0,08±0,01	0,70±0,06
Кости	0,32±0,04	2,50±0,33
Кожа	0,01±0,001	0,06±0,03
Мозг	0,0002±0,0001	0,001±0,0004
Скелетная мускулатура	0,01±0,0004	0,09±0,01
Тестикулы	0,0005±0,0001	0,01±0,002
Почки	0,01±0,0004	0,09±0,01
Селезёнка	0,002±0,001	0,01±0,01
Сердце	0,04±0,04	0,01±0,002
Печень	0,26±0,01	2,15±0,31
Желудочно-кишечный тракт	0,12±0,04	0,43±0,05

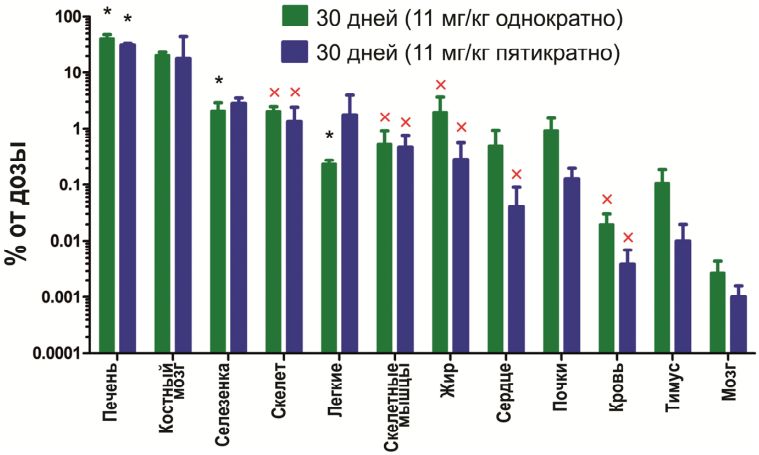


Рис. 3.14. Доля введённой дозы наночастиц CeO_2 в тканях и крови через 30 дней после однократного внутривенного введения 11 мг/мг наночастиц диоксида церия размером 5 нм, или пятикратного введения такого же количества НДЦ.
* Значительное отличие от контроля; X – отсутствует тест на значительное отличие от контроля, поскольку все значения для контрольных крыс идентичны (ниже медианы) [128]

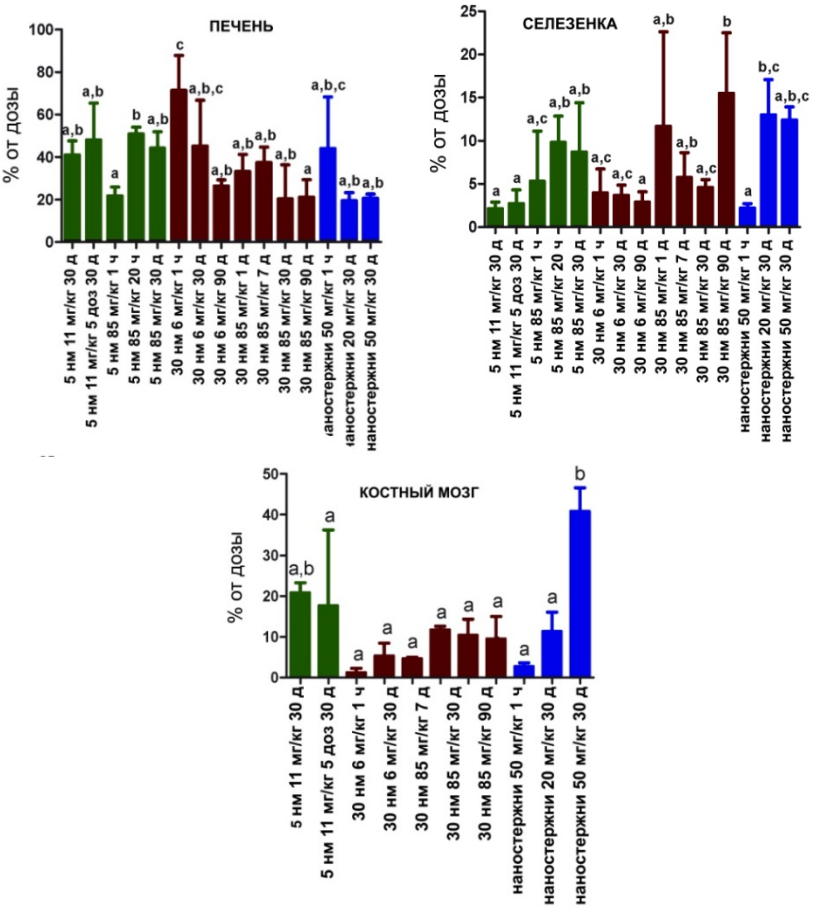


Рис. 3.15. Доля введённой дозы наночастиц CeO_2 в печени, селезенке и костном мозге. Сводные данные исследований [124, 128, 129]. Колонки, помеченные одинаковыми буквами, статистически одинаковы

В отношении саморегулирования и гомеостаза биологических объектов любопытен факт биотрансформации в организме крупных (размером 20–40 нм) токсичных наночастиц диоксида церия в мелкие (до 10 нм) нетоксичные [131, 132] (подробнее см. в гл. 4, рис. 4.12–4.13). Так, введенные внутривенно грызунам частицы диоксида церия кубической формы размером 31±4 нм проявляют прооксидантные

свойства и токсичны для печени и мозга, но через 90 дней растворяются, и на их месте обнаруживаются ультрамалые (<2 нм) частицы CeO_2, которые не только малотоксичны, но и обладают антиоксидантными свойствами [132].

Авторы [133] синтезировали нанокристаллический порошок диоксида церия с размером частиц менее 5 нм (окисление водного раствора соли церия (III) пероксидом водорода с последующим подщелачиванием аммиаком и гидротермальной обработкой осадка при 180°C). Полученный продукт использовали для изучения токсичности на крысах Вистар при пероральном введении. Было определено значение полулетальной дозы $LD_{50} \geq 2000$ мг/кг (что практически соответствует токсичности поваренной соли) и показано отсутствие разницы в биологических и гистологических характеристиках опытных (получавших наночастицы) и контрольных животных.

Литература

1. *Auffan M., Rose J., Orsiere T., De Meo M., Thill A., Zeyons O., Proux O., Masion A., Chaurand P., Spalla O., Botta A., Wiesner M.R., Bottero J.-Y.* CeO_2 nanoparticles induce DNA damage towards human dermal fibroblasts in vitro // Nanotoxicology. 2009. Vol. 3. P. 161–169.

2. *Huang S.F., Li Z.Y., Wang X.Q., Wang Q.X., Hu F.F.* Cerium caused life span shortening and oxidative stress resistance in Drosophila melanogaster // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2010. Vol. 73(1). P. 89–93.

3. *Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K.* Pharmacological properties of cerium compounds // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2005. Vol. 153. P. 101–111.

4. *Shannon R.D.* Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides // Acta Cryst. 1976. V. A32. P. 751–767.

5. *Jowsey J., Rowland R.E., Marshall J.H.* The deposition of the rare earths in bone // Radiat. Res. 1958. Vol. 8. P. 490–501.

6. *Berry J.P., Masse R., Escaig F., Galle P.* Intracellular localization of cerium. A microanalytical study using an electron microprobe and ionic microanalysis // Human Toxicol. 1989. Vol. 8. P. 511–520.

7. *Komiyama M., Matsumura K., Matsumoto Y.* Unprecedentedly fast hydrolysis of the RNA dinucleoside monophosphates ApA and UpU by rare earth metal ions // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1992. P. 640–641.

8. *Matsumura K., Komiyama M.* Hydrolysis of phosphatidylinositol by rare earth metal ion as a phospholipase C mimic // J. Inorg. Biochem. 1994. Vol. 55. P. 153–156.

9. *Heckert E.G., Seal S., Self W.T.* Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium // Environ. Sci. Technol. 2008. Vol. 42(13). P. 5014–5019.

10. *Yang W., Wang T., Lei H., Yang Y.* Study on the hepatic toxicity of cerous nitrate in rats// Wei Sheng Yan Jiu. 1999. Vol. 28(2). P. 91–92.

11. *Hirano S., Suzuki K.T.* Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds // Environ. Health Perspect. 1996. Vol. 104. S. 1. P. 85–95.

12. *Sturbaum B., Brooks A.L., McClellan R.O.* Tissue distribution and dosimetry of ^{144}Ce in Chinese hamsters // Radiat. Res. 1970. Vol. 44. P. 359–367.

13. *Thomas R.L., Scott J.K., Chiffelle T.L.* Metabolism and toxicity of inhaled ^{144}Ce in rats // Radiat. Res. 1972. Vol. 49. P. 589–610.

14. *Richmond C.R., London J.E.* Long-term in vivo retention of cerium-144 by beagles // Nature. 1966. Vol. 211. P. 1179.

15. *Beyer G.-J., Franke W.-G., Hinning K., Johannsen B.A., Khalkin V.A., Kretzschmar M., Lebedev N.A., Munzu R., Novgorodov A.F., Thieme K.* Comparative kinetic studies of simultaneously injected ^{167}Tm- and ^{67}Ga-citrate in normal and tumour bearing mice // Int. J. Appl. Radiat. Isotopes. 1978. Vol. 29. P. 673–681.

16. *Kitani K., Morita Y., Kanai S.* The effects of spilonolactone on the biliary excretion of mercury, cadmium, zinc, and cerium in rats // Biochem. Pharmacol. 1977. Vol. 26. P. 279–282.

17. *Eisele G.R., Mraz F.R., Woody M.C.* Gastrointestinal uptake of ^{144}Ce in the neonatal mouse, rat and pig // Health Phys. 1980. Vol. 39. P. 185–192.

18. *Takada K.* Comparison of the metabolic behavior of ^{144}Ce injected intravenously with that absorbed from the wound site in rats // Health Phys. 1978. Vol. 35. P. 537–543.

19. *Morganti J.B., Lown B.A., Stineman C.H., Massaro E.J.* Cerium tissue/organ distribution and alterations in open field and exploratory behavior following repeated exposure of the mouse to citrate complexed cerium // Gen. Pharmacol. 1978. Vol. 9. P. 257–261.

20. *Stineman C.H., Massaro E.J., Lown B.A., Morganti J.B., Al-Nakeeb S.* Cerium tissue/organ distribution and alterations in open field and exploratory behavior following acute exposure of the mouse to cerium (citrate) // J. Exp. Pathol. Toxicol. 1978. Vol. 2. P. 553–570.

21. *Seidel A., Wiener M., Kruger E., Wirth R., Haffner H.* Studies on the lysosomal binding of ^{141}Ce, ^{239}Np, ^{239}Pu and ^{241}Am in rat and Syrian hamster liver using carrier-free electrophoresis // Nucl. Med. Biol. 1986. Vol. 13. P. 515–518.

22. *Gachalyi A., Namenyi J., Szegedi I., Varga P.L.* Effect of mixed ligand complex therapy on the retention of ^{95}Nb and ^{144}Ce in mice // Radiat. Res. 1989. Vol. 120. P. 177–181.

23. *Schrand A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F.* Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment // WIREs Nanomed. Nanotech. 2010. Vol. 2. P. 544–568.

24. *Nel A., Xia T., Madler L., Li N.* Toxic potential of materials at the nanolevel // Science. 2006. Vol. 311. P. 622–627.

25. *Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W., Sisco P.N., Alkilany A.M., Goldsmith E.C., Baxter S.C.* Gold nanoparticles in biology: Beyond toxicity to cellular imaging // Acc. Chem. Res. 2008. Vol. 41. P. 1721–1730.

26. *Goodman C.M., McCusker C.D., Yilmaz T., Rotello V.M.* Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains // Bioconjugate Chem. 2004. Vol. 15. P. 897–900.

27. *Sayes C.M., Fortner J.D., Guo W., Lyon D., Boyd A.M., Ausman K.D., Tao Y.J., Sitharaman B., Wilson L.J., Hughes J.B., West J.L., Colvin V.L.* The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes // Nano Lett. 2004. Vol. 4. P. 1881–1887.

28. *Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X.* Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene // Environ. Sci. Tech. 2005. Vol. 39. P. 1378–1383.

29. *Hardman R. A* toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors // Environ. Health Perspectives. 2006. Vol. 114. P. 165–172.

30. *Hoshino A., Fujioka K., Oku T., Suga M., Sasaki Y.F., Ohta T., Yasuhara M., Suzuki K., Yamamoto K.* Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification // Nano Lett. 2004. Vol. 4. P. 2163–2169.

31. *Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J.* In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // Toxicol. in Vitro. 2005. Vol. 19. P. 975–983.

32. *Brunner T.J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R.N., Limbach L.K., Bruinink A., Stark W.J.* In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // Environ. Sci. Tech. 2006. Vol. 40. P. 4374–4381.

33. *Verma A., Stellacci F.* Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. // Small. 2010. Vol. 6(1). P. 12–21.

34. *Mocan T., Clichici S., Agoston-Coldea L., Mocan L., Simon S., Ilie I.R., Biris A.R., Muresan A.* Implications of oxidative stress mechanisms in toxicity of nanoparticles // Acta Physiol. Hungar. 2010. Vol. 97. P. 247–255.

35. *Sharma V., Singh P., Pandey A.K., Dhawan A.* Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles // Mutation Research – Genetic Toxicol. Environ. Mutagenesis. 2012. Vol. 745. P. 84–91.

36. *Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J.* Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells // Toxicology in Vitro. 2009. Vol. 23. P. 808–815.

37. *Xu J., Xu P., Li Z., Huang J., Yang Z.* Oxidative stress and apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in C6 cells // J. Biomed. Mater. Research – Part A. 2012. Vol. 100A. P. 738–745.

38. *Siddiqui M.A., Ahamed M., Ahmad J., Majeed Khan M.A., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A., Alrokayan S.A.* Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in cultured human cells that is abrogated by the dietary antioxidant curcumin // Food Chem. Toxicol. 2012. Vol. 50. P. 641–647.

39. *Lin X.-L., Zhao S.-H., Zhang L., Hu G.-Q., Sun Z.-W., Yang W.-S.* Dose-dependent cytotoxicity and oxidative stress induced by «Naked» Fe_3O_4 nanoparticles in human hepatocyte // Chem. Res. in Chinese Universities. 2012. Vol. 28. P. 114–118.

40. *Ševců A., El-Temsah Y.S., Joner E.J., Černík M.* Oxidative stress induced in microorganisms by zero-valent iron nanoparticles // Microbes and Environments. 2011. Vol. 26. P. 271–281.

41. *Horie M., Fukui H., Nishio K., Endoh S., Kato H., Fujita K., Miyauchi A., Nakamura A., Shichiri M., Ishida N., Kinugasa S., Morimoto Y., Niki E., Yoshida Y., Iwahashi H.* Evaluation of acute oxidative stress induced by NiO nanoparticles in vivo and in vitro // J. Occupational Health. 2011. Vol. 53. P. 64–74.

42. *Akhtar M.J., Ahamed M., Fareed M., Alrokayan S.A., Kumar S.* Protective effect of sulphoraphane against oxidative stress mediated toxicity induced by CuO nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts BALB 3T3 // J. Toxicol. Sci. 2012. Vol. 37. P. 139–148.

43. *Kumar A., Pandey A.K., Singh S.S., Shanker R., Dhawan A.* Engineered ZnO and TiO_2 nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of Escherichia coli // Free Rad. Biol. Med. 2011. Vol. 51. P. 1872–1881.

44. *Ahamed M., Akhtar M.J., Siddiqui M.A., Ahmad J., Musarrat J., Al-Khedhairy A.A., AlSalhi M.S., Alrokayan S.A.* Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells // Toxicol. 2011. Vol. 283. P. 101–108.

45. *Ahamed M., Posgai R., Gorey T.J., Nielsen M., Hussain S.M., Rowe J.J.* Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in Drosophila melanogaster // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2010. Vol. 242. P. 263–269.

46. *Burello E., Worth A.P.* A theoretical framework for predicting the oxidative stress potential of oxide nanoparticles // Nanotoxicol. 2011. Vol. 5. P. 228–235.

47. *Zhou Y., Yokel R.* The chemical species of aluminium uinfluence its paracellular flux and uptake into Caco-2 cells, a model of gastrointestinal absorption // Toxicol. Sci. 2005. Vol. 87. P. 15–26.

48. *Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L.* Pulmonary toxicity of single wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation // Toxicol. Sci. 2004. Vol. 77. P. 126–134.

49. *Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J.* Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles // Environ. Health Perspect. 2005. Vol. 113. P. 823–839.

50. *Lemarchand C., Gref R., Lesieur S., Hommel H., Vacher B., Besheer A., Maeder K., Couvreur P.* Physicochemical characterization of polysaccharide-coated nanoparticles // J. Control Release. 2005. Vol. 108. P. 97–111.

51. *Lanone S., Rogerieux F., Geys J., Dupont A., Maillot-Marechal E., Boczkowski J., Lacroix G., Hoet P.* Comparative toxicity of 24 manufactured nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines // Part. Fibre Toxicol. 2009. Vol. 6. P. 14.

52. *Kroll A., Dierker C., Rommel C., Hahn D., Wohlleben W., Schulze-Isfort C., Gobbert C., Voetz M., Hardinghaus F., Schnekenburger J.* Cytotoxicity screening of 23 engineered nanomaterials using a test matrix of ten cell lines and three different assays // Part. Fibre Toxicol. 2009. Vol. 8. P. 9.

53. *Worle-Knirsch J.M., Pulskamp K., Krug H.F.* Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays // Nano Lett. 2006. Vol. 6. P. 1261–1268.

54. *Monte-Riviere N.A., Inman A.O., Zhang L.W.* Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. Vol. 234. P. 222–235.

55. *Kroll A., Pillukat M.H., Hahn D., Schekenburger J.* Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009. Vol. 72. P. 370–377.

56. *Safi M., Sarrouj H., Sandre O., Mignet N., Berret J.-F.* Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state // Nanotechnology. 2010. Vol. 21. P. 145103.

57. *Xia T., Kovochich M., Liong M., Madler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J.I., Zink J.I., Nel A.E.* Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties // ACS Nano. 2008. Vol. 2. P. 2121–2134.

58. *García A., Espinosa R., Delgado L., Casals E., González E., Puntes E., Barata C., Font X., Sánchez A.* Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests // Desalination. 2011. Vol. 269. P.136–141.

59. *Щербаков А.Б., Иванов В.К., Жолобак Н.М., Иванова О.С., Крысанов Е.Ю., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д.* Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения // Биофизика. 2011. Т. 56, № 6. С. 995–1015.

60. *Rebellato J., Natile M.M., Glisenti A.* Influence of the synthesis procedure on the properties and reactivity of nanostructured ceria powders // Appl. Catalysis A. 2008. Vol. 339. P. 108–120.

61. *Karakoti A.S., Munusamy P., Hostetler K., Kodali V., Kuchibhatla S., Orr G., Pounds J.G., Teeguarden J.G., Thrall B.D., Baer D.R.* Preparation and characterization challenges to understanding environmental and biological impacts of ceria nanoparticles // Eur. Appl. Surf. Int. Analysis. 2011. Vol. 44(8). P. 882–889.

62. *Zhang Y.W., Si R., Liao C.S., Yan C.H., Xiao C.X., Kou Y.* Facile alcohothermal synthesis, size-dependent ultraviolet absorption and enhanced CO conversion activity of ceria nanocrystals // J. Phys. Chem. B. 2003. Vol. 107. P. 10159–10167.

63. *Жолобак Н.М., Щербаков А.Б., Иванов В.К., Олевинская З.М., Усатенко А.В., Спивак Н.Я.* Цитотоксичность водных золей наночастиц CeO_2, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // Биологические системы. 2010. Т. 2, № 1. С. 3–6.

64. *Zhang J., Naka T., Ohara S., Kaneko K., Trevethan T., Shluger A., Adschiri T.* Surface ligand assisted valence change in ceria nanocrystals // Phys. Rev. B. 2011. Vol. 84. P. 045411.

65. *Schubert D., Dargusch R., Raitano J., Chan S.W.* Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 342(1). P. 86.

66. *Limbach L.K., Li Y., Grass R.N., Brunner T.J., Hintermann M.A., Muller M., Gunther D., Stark W.J.* Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations // Environ. Sci. Technol. 2005. Vol. 39(23). P. 9370–9376.

67. *Fall M., Guerbet M., Park B., Gouriou F., Dionnet F., Morin J.-P.* Evaluation of cerium oxide and cerium oxide based fuel additive safety on organotypic cultures of lung slices // Nanotoxicology. 2007. Vol. 1(3). P. 227–234.

68. *Park E.J., Cho W.S., Jeong J., Yi J.H., Choi K., Kim Y., Park K.* Induction of inflammatory responses in mice treated with cerium oxide nanoparticles by intratracheal instillation // J. Health Sci. 2010. Vol. 56. P. 387–396.

69. *Eom H.J., Choi J.* Oxidative stress of CeO_2 nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B // Toxicol. Lett. 2009. Vol. 187. P. 77–83.

70. *Aalapati, Srinivas, Selvam Ganapathy, Saikumar Manapuram, Goparaju Anumolu, and Balakrishna Murthy Prakya.* Toxicity and bio-accumulation of inhaled cerium oxide nanoparticles in CD1 mice // Nanotoxicology. 2014. Vol. 8(7). P. 786–798.

71. *Park E.J., Choi J., Park Y.K., Park K.* Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells // Toxicology. 2008. Vol. 245. P. 90–100.

72. *Gojova A., Lee J.-T., Jung H.S., Guo B., Barakat A.I., Kennedy I.M.* Effect of cerium oxide nanoparticles on inflammation in vascular endothelial cells // Inhal. Toxicol. 2009. Vol. 21(s1). P. 123–130.

73. *Cho W.S., Duffin R., Poland C.A., Howie S.E., MacNee W., Bradley M., Megson I.L., Donaldson K.* Metal oxide nanoparticles induce unique inflammatory footprints in the lung: important implications for nanoparticle testing // Environ Health Perspect. 2010. Vol. 118(12). P. 1699–706.

74. *Yokel R.A., Florence R.L., Unrine J.M., Tseng M.T., Graham U.M., Wu P., Grulke E.A., Sultana R., Hardas S.S., Butterfield D.A.* Biodistribution and oxidative stress effects of a systemically-introduced commercial ceria engineered nanomaterial // Nanotoxicology. 2009. Vol. 3. P. 234–248.

75. *Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D., Ma Y.* Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells // Int. J. Toxicol. 2006. Vol. 25(6). P. 451–457.

76. *Ma J.Y., Zhao H., Mercer R.R., Barger M., Rao M., Meighan T., Schwegler-Berry D., Castranova V., Ma J.K.* Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats // Nanotoxicology. 2011. Vol. 5. P. 312–325.

77. *Brunner T.J., Wick P., Manser P., Spohn P., Grass R.N., Limbach L.K., Bruinink A., Stark W.J.* In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // Environ. Sci. Technol. 2006. Vol. 40(14). P. 4374–4381.

78. *Park B., Martin P., Harris C., Guest R., Whittingham A., Jenkinson P., Handley J.* Initial in vitro screening approach to investigate the potential health and environmental hazards of envirox trade mark – A nanoparticulate cerium oxide diesel fuel additive // Part. Fibre Toxicol. 2007. Vol. 4. P. 12–23.

79. *Clark A., Zhu A., Sun K., Petty H.R.* Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis // J. Nanopart. Res. 2011. Vol. 13(10). P. 5547–5555.

80. *D'Angelo B., Santucci S., Benedetti E., Di Loreto S., Phani R.A., Falone S., Amicarelli F., Ceru M.P., Cimini A.* Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal sur-

vival in a human alzheimer disease model by modulating BDNF pathway // Current Nanoscience. 2009. Vol. 5. P. 167–176.

81. *Park B., Donaldson K., Duffin R., Tran L., Kelly F., Mudway I., Morin J.P., Guest R., Jensinson P., Samaras Z., Giannouli M., Kouridis H., Martin P.* Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide-based diesel fuel additive – A case study // Inhal. Toxicol. 2008. Vol. 20. P. 547–566.

82. *Niu J.L., Azfer A., Rogers L.M., Wang X.H., Kolattukudy P.E.* Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy // Cardiovasc. Res. 2007. Vol. 73. P. 549–559.

83. *Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Ivanov V.K., Ivanova O.S., Marchevskii A.V., Baranchikov A.E., Spivak N.Ya., Tretyakov Yu.D.* Synthesis and antioxidant activity of biocompatible maltodextrin-stabilized aqueous sols of nanocrystalline ceria // Russ. J. Inorg. Chem. 2012. Vol. 57, № 11. P. 1411–1418.

84. *Wu W.H., Sun X., Yu Y.P., Hu J., Zhao L., Liu Q., Zhao Y.F., Li Y.M.* TiO_2 nanoparticles promote beta-amyloid fibrillation in vitro // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 373(2). P. 315.

85. *Pierscionek B.K., Keenan J., Yasseen A., Colhoun L.M., Li Y.B., Schachar R.A., Chen W.* CeO_2 nanoparticles have no detrimental effect on eye lens proteins // Current Anal. Chem. 2010. Vol. 6. P. 172–176.

86. *Tarnuzzer R.W., Colon J., Patil S., Seal S.* Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage // Nano Lett. 2005. Vol. 5(12). P. 2573–2577.

87. *Das M., Patil S., Bhargava N., Kang J.F., Riedel L.M., Seal S., Hickman J.J.* Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons // Biomaterials. 2007. Vol. 28(10). P. 1918–1925.

88. *Colon J., Herrera L., Smith J., Patil S., Komanski C., Kupelian P., Seal S., Jenkins D.W., Baker C.H.* Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med. 2009. Vol. 5. P. 225–231.

89. *Chen J.P., Patil S., Seal S., McGinnis J.F.* Nanoceria particles prevent ROI-induced blindness // Nat. Nanotechnol. 2006. Vol. 1. P. 142–150.

90. *Hirst S.M., Karakoti A.S., Tyler R.D., Sriranganathan N., Seal S., Reilly C.M.* Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles // Small. 2009. Vol. 5(24). P. 2848–2856.

91. *Zhou X., Wong L.L., Karakoti A.S., Seal S., McGinnis J.F.* Nanoceria inhibit the development and promote the regression of pathologic retinal neovascularization in the Vldlr knockout mouse // PLoS One. 2011. Vol. 6(2). P. e16733.

92. *Karakoti A.S., Tsigkou O., Yue Sh., Lee P.D., Stevens M.M., Jones J.R., Seal S.* Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration // J. Mater. Chem. 2010. Vol. 20. P. 8912–8919.

93. *Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis C.* Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // Small. 2008. Vol. 4. P. 552–556.

94. *Zholobak N.M., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Shaporev A.S., Polezhaeva O.S., Baranchikov A.Ye., Spivak N.Ya., Tretyakov Yu.D.* UV-shielding property,

photocatalytic activity and photocytotoxicity of ceria colloid solutions // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. Vol. 102. P. 32–38.

95. *Шекунова Т.О., Гиль Д.О., Иванова О.С., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д.* Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность золей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом // Наносистемы: Физика, Химия, Математика. 2013. Т. 4, № 1. С. 83–89.

96. *Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes Ch.M.* The relationship between pH and zeta potential of ~30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations // Nanotoxicology. 2009. Vol. 3(4). P. 276.

97. *Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W., Seal S.* Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential // Biomaterials. 2007. Vol. 28(31). P. 4600–4607.

98. *Suh W.H., Suslick K.S., Stucky G.D., Suh Y.-H.* Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience // Progress in Neurobiology. 2009. Vol. 87. P. 133–170.

99. *Hardas S.S., Butterfield D.A., Sultana R., Tseng M.T., Dan M., Florence R.L., Unrine J.M., Graham U.M., Wu P., Grulke E.A., Yokel R.A.* Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nanoscale ceria // Toxicol. Sci. 2010. Vol. 116. P. 562–576.

100. *Pierscionek B.K., Li Y., Yasseen A.A., Colhoun L.M., Schachar R.A., Chen W.* Nanoceria have no genotoxic effect on human lens epithelial cells // Nanotechnology. 2010. Vol. 21(3). P. 035102.

101. *Asati A., Santra S., Kaittanis C., Perez J.M.* Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2010. Vol. 4(9). P. 5321–5331.

102. Evaluation of Human Health Risk from Cerium Added to Diesel Fuel. Health Effects Institute, Boston, USA. 21 August 2009.

103. *McDonald J.W., Ghio A.J., Sheehan C.E., Bernhardt P.F., Roggli V.L.* Rare earth (cerium oxide) pneumoconiosis: Analytical scanning electron microscopy and literature review // Mod. Pathol. 1995. Vol. 8. P. 859–865.

104. *Bruce D.W., Hietbrink B.E., DuBois K.P.* The acute mammalian toxicity of rare earth nitrates and oxides // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1963. Vol. 5. P. 750–759.

105. Ceric oxide: Acute toxicity studies via the respiratory tract in the rat. Rhône-Poulenc, 1983. Report 302217. Rhône-Poulenc French Toxicology Institute, Courbevoie Ceuex, France.

106. *Spanhaak S.* A popliteal lymph node assay (PLNA) and IgE test with cerium oxide in rats: Final report. TNO Report V96.694, 1996. Netherlands Organisation for Applied Scientific Research (TNO), Nutrition and Food Research Institute, Zeist, The Netherlands.

107. *Pichard A.* Opaline (cerium oxide): Micronucleus test by oral route in mice. Study 9175 MAS. Rhône-Poulenc, Courbevoie Ceuex, France.

108. *Cassee F.R., van Balen E.C., Singh C., Green D., Muijser H., Weinstein J., Dreher K.* Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive // Crit. Rev. Toxicol. 2011. Vol. 41. P. 213–229.

109. *Velzeboer I., Hendriks A.J., Ragas M.J., van de Meent D.* Aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials // Environ. Toxicol. Chem. 2008. Vol. 27. P. 1942–1947.

110. *Gosens, Ilse, Liesbeth EAM Mathijssen, Bas GH Bokkers, Hans Muijser, and Flemming R. Cassee.* Comparative hazard identification of nano-and micro-sized cerium oxide particles based on 28-day inhalation studies in rats. // Nanotoxicology. 2012. Vol. 8(6). P. 643–653.

111. *Peng, Lu, Xiao He, Peng Zhang, Jing Zhang, Yuanyuan Li, Junzhe Zhang, Yuhui Ma et al.* Comparative Pulmonary Toxicity of Two Ceria Nanoparticles with the Same Primary Size. // International journal of molecular sciences. 2014. Vol. 15(4). P. 6072–6085.

112. *Lung, Shyang, Flemming R. Cassee, Ilse Gosens, and Arezoo Campbell*. Brain suppression of AP-1 by inhaled diesel exhaust and reversal by cerium oxide nanoparticles. // Inhalation Toxicology. 2014. Vol. 26(10). P. 636–641.

113. *Fisichella, Matthieu, Frederic Berenguer, Gerard Steinmetz, Melanie Auffan, Jerome Rose, and Odette Prat.* Toxicity evaluation of manufactured CeO_2 nanoparticles before and after alteration: combined physicochemical and whole-genome expression analysis in Caco-2 cells // BMC Genomics. 2014. Vol. 15(1). P. 700.

114. *Zhang H.F.Z.H.F., He X.A., Zhang Z.Y., Zhang P., Li Y.Y., Ma Y.H., Kuang Y.S., Zhao Y.L., Chai Z.F.* Nano-CeO_2 exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations // Environ. Sci. Technol. 2011. Vol. 45. P. 3725–3730.

115. *Arnold M.C., Badireddy A.R., Wiesner M.R., Di Giulio R.T., and Meyer J.N.* Cerium oxide nanoparticles are more toxic than equimolar bulk cerium oxide in Caenorhabditis elegans // Archives of environmental contamination and toxicology. 2013. Vol. 65 (2). P. 224–233.

116. *Cole P.* Nanoparticles in aqueous environments: A physicochemical and ecotoxicological study of cerium dioxide. PhD thesis. University of Birmingham, 2011. 260 p.

117. *Gaiser B.K., Fernandes T.F., Jepson M., Lead J.R., Tyler C.R., Stone V.* Assessing exposure, uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles from contaminated environments // Environ Health. 2009. Vol. 8. P. S2.

118. *Manier N., Garaud M., Delalain P., Aguerre-Chariol O., Pandard P.* Behaviour of ceria nanoparticles in standardized test media – influence on the results of ecotoxicological tests // J. Phys.: Conf. Ser. 2011. Vol. 304. P. 012058.

119. *Artells, Ester, Julien Issartel, Mélanie Auffan, Daniel Borschneck, Antoine Thill, Marie Tella, Lenka Brousset, Jérôme Rose, Jean-Yves Bottero, and Alain Thiéry.* Exposure to Cerium Dioxide Nanoparticles Differently Affect Swimming Performance and Survival in Two Daphnid Species // PloS one 8. 2013. Vol. 8. P. 71260.

120. *Bour, Agathe, Florence Mouchet, Laurent Verneuil, Lauris Evariste, Jérôme Silvestre, Eric Pinelli, and Laury Gauthier.* Toxicity of CeO_2 nanoparticles at different trophic levels // Effects on diatoms, chironomids and amphibians. Chemosphere 120 (2015). P. 230–236.

121. *Tella, Marie, Melanie Auffan, Lenka Brousset, Julien Issartel, Isabelle Kieffer, Christine Pailles, Elise Morel et al.* Transfer, transformation and impacts of ceria nanomaterials in aquatic mesocosms simulating a pond ecosystem // Environmental science & technology. 2014.

122. *Lahive E., Jurkschat K., Shaw B., Handy R., Spurgeon D., Svendsen C.* Toxicity of cerium oxide nanoparticles to the earth-worm Eisenia fetida: subtle effects // Environ. Chem. 2014. Vol. 11. P. 268.

123. *Dan Mo, Peng Wu, Eric A. Grulke, Uschi M. Graham, Jason M. Unrine, Robert A. Yokel.* Ceria-engineered nanomaterial distribution in, and clearance from, blood: size matters // Nanomedicine. 2012. Vol. 7(1). P. 95–110.

124. *Yokel R.A., Tseng M.T., Dan M., Unrine J.M., Graham U.M., Wu P., Grulke E.A.* Biodistribution and biopersistence of ceria engineered nanomaterials: size dependence // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013. Vol. 9(3). P. 398–407.

125. *Portioli Corinne, Donatella Benati, Youry Pii, Paolo Bernardi, Marcello Crucianelli, Sandro Santucci, Marina Bentivoglio, Maurizio Passacantando.* Short-Term Biodistribution of Cerium Oxide Nanoparticles in Mice: Focus on Brain Parenchyma // Nanoscience and Nanotechnology Letters. 2013. Vol. 5(11). P. 1174–1181.

126. *Hirst Suzanne Marie, Ajay Karakoti, Sanjay Singh, William Self, Ron Tyler, Sudipta Seal, Christopher M. Reilly.* Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice // Environmental toxicology 28. 2013. Vol. 2. P. 107–118.

127. *Yang L., Sundaresan G., Sun M., Jose P., Hoffman D., McDonagh P.R., Lamichhane N., Cutler C.S., Perez J.M., Zweit J.* Intrinsically radiolabeled multifunctional cerium oxide nanoparticles for in vivo studies // J. Mater. Chem. B. 2013. Vol. 1. P. 1421–1431.

128. *Yokel R.A., Unrine J.M., Wu P., Wang B., Grulke E.A.* Nanoceria biodistribution and retention in the rat after its intravenous administration are not greatly influenced by dosing schedule, dose, or particle shape // Environmental Science: Nano. 2014.

129. *Yokel R.A., Au T.C., MacPhail R., Hardas S.S., Butterfield D.A., Sultana R., Grulke E.A.* Distribution, elimination, and biopersistence to 90 days of a systemically introduced 30 nm ceria-engineered nanomaterial in rats // Toxicological Sciences. 2012. Vol. 127(1). P. 256–268.

130. *Molina, Ramon M. et al.* Bioavailability, distribution and clearance of tracheally instilled, gavaged or injected cerium dioxide nanoparticles and ionic cerium // Environmental Science: Nano. 2014.

131. *Yokel R.A.* Nanoceria Reactivity: Biological Implications // 23rd North American Catalysis Society Meeting. Nam, 2013.

132. *Graham, Uschi M., Michael T. Tseng, Jacek B. Jasinski, Robert A. Yokel, Jason M. Unrine, Burtron H. Davis, Alan K. Dozier et al.* In Vivo Processing of Ceria Nanoparticles inside Liver: Impact on Free-Radical Scavenging Activity and Oxidative Stress // ChemPlusChem. 2014.

133. *Ramesh A., Narasimha Naik Ratla, Rajitha Indukuri, Venkatesh K., Tirupathi Rao S.* Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the cerium oxide nanoparticles in Wistar rats // International Journal of Phytopharmacology. 2014. Vol. 5(1). P. 46–50.

4. ЭНЗИМОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Как известно, ферменты (энзимы) участвуют практически во всех биологических процессах. В связи с этим одной из наиболее интересных и перспективных задач биомедицины и фармакологии является разработка небелковых аналогов энзимов. За несколько предыдущих десятилетий создан целый ряд искусственных энзимов [1–5], заменяющих природные аналоги во множестве практических приложений; наконец, в последние годы энзимоподобная активность была обнаружена и у некоторых наноматериалов. Такие наноразмерные искусственные энзимы получили название «нанозимы» и были выделены в отдельный класс биомиметиков [6–8]. На схеме 4.1 кратко показана хронология открытия и исследования трех поколений энзимов.

У природных энзимов и хорошо известных неорганических технических катализаторов имеется много общего. И те и другие увеличивают скорость реакций, которые в их отсутствие протекают очень медленно. И те и другие способны к регенерации, т.е. после завершения каталитического цикла возвращаются в исходное состояние. Очевидно, что накопленные знания о природе катализа и свойствах катализаторов могут оказаться полезными и в биомедицинских приложениях. Как правило, основное отличие природных энзимов и технических катализаторов заключается в скорости протекания соответствующих химических (биохимических) процессов; по этому показателю природные энзимы гораздо активнее искусственных. Вместе с тем последние исследования в области наноматериалов позволили создавать катализаторы, характеристики которых не уступают природным энзимам, а в некоторых процессах и превосходят их. Природные энзимы очень чувствительны к условиям протекания реакции; являясь соединениями преимущественно белковой природы, они инактивируются при высоких температурах и критических значениях pH. Они имеют: 1) высокую селективность по отношению к субстрату, 2) селективность направления реакции и 3) стереоселективность. Искусственные аналоги энзимов оказались привлекательными благодаря низкой себестоимости и более широкому диапазону активности и стабильности (pH, температура, механические свойства).

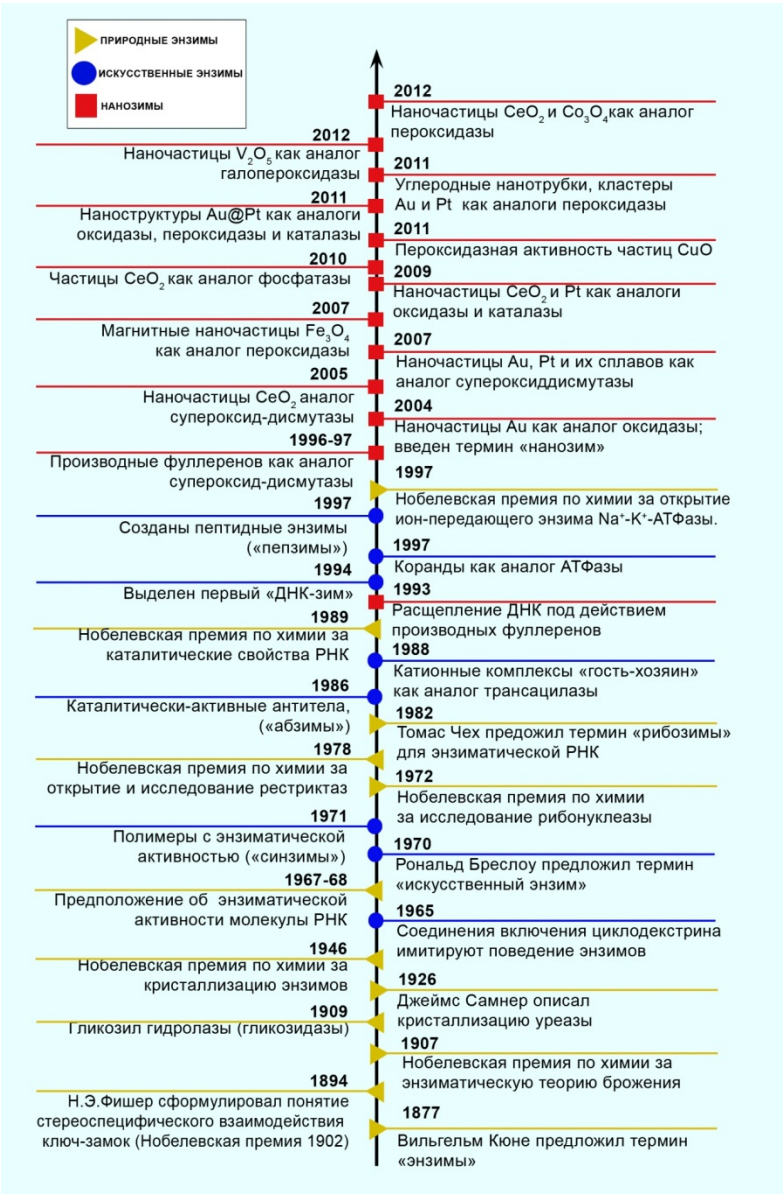


Схема 4.1. Хронология открытия и исследования энзимов

Нанозимы также способны работать в жестких условиях, хотя и менее селективны: несмотря на то что большинство процессов с их участием описывается уравнением Михаэлиса–Ментен, указанное выше правило «трех селективностей» для них не выполняется. Интересно, что отдельные нанозимы в разных условиях ведут себя подобно совершенно разным энзимам. Так, наночастицы благородных металлов и углеродные нанотрубки способны выполнять функции каталазы, оксидазы и супероксиддисмутазы. Для наночастиц диоксида церия показана также фосфатазная и, вероятно, NO-редуктазная активность.

Как известно, каталитические свойства проявляют многие металлы, полупроводники и диэлектрики, но лишь незначительная их часть пригодна для биомедицинского использования *in vivo*. Это связано с токсичностью наноматериалов, которая определяется несколькими факторами: например, токсичностью их компонентов, выделяющихся в биологические жидкости в виде молекул или ионов. Наночастицы соединений переходных металлов могут участвовать в реакциях Фентона и Габера–Вейса, при этом образуется токсичный гидроксильный радикал. Наконец, именно вследствие каталитических свойств многие наночастицы сами генерируют активные формы кислорода и вызывают окислительный стресс (в качестве примера можно привести оксиды цинка, титана, кобальта, меди и многие другие, углеродные нанотрубки и пр.). В связи с этим выбор неорганических биологических катализаторов (нанозимов) как потенциальных нанофармацевтических препаратов весьма ограничен, наиболее привлекательными сегодня представляются наночастицы некоторых благородных металлов (золото, платина, палладий) и диоксид церия.

На сегодняшний день ключевая роль среди нанозимов принадлежит наноматериалам на основе диоксида церия. Способность нанодисперсного диоксида церия катализировать протекание окислительно-восстановительных реакций известна достаточно давно и широко используется в промышленности (например, при создании катализаторов дожига моторного топлива). Как показано в гл. 2, каталитические свойства нанокристаллического диоксида церия рассматривают, прежде всего, в рамках гипотезы о высокой кислородной нестехиометрии данного материала. Низкая энергия образования кислородных вакансий является причиной того, что наночастицы диоксида церия легко вступают в окислительно-восстановительные процессы с уча-

стием активных форм кислорода. Соответствующие исследования активно ведутся для неорганических систем, включая топливные элементы [9], катализаторы [10, 11] и газовые сенсоры [12]. Общепринятая схема кислородного обмена на поверхности CeO_2 выглядит следующим образом:

$$O_2(\text{газ}) \rightarrow O_2(\text{адс.}) \rightarrow O_2^-(\text{адс.}) \rightarrow O_2^{2-}(\text{адс.}) \rightarrow 2O^-(\text{адс.}) \rightarrow 2O_2^{2-}(\text{тв.})$$

Несмотря на то что аналогичный процесс для биологических систем на данный момент не описан, авторы [13] высказали предположение о возможном подобии механизмов (рис. 4.1).

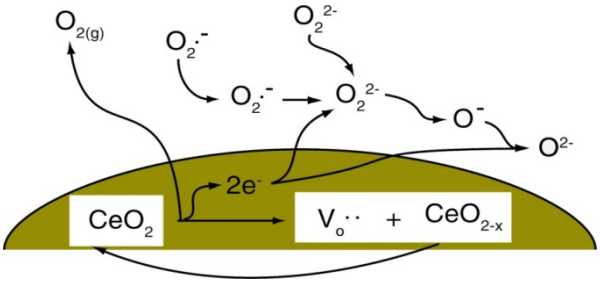


Рис. 4.1. Гипотетическая модель инактивирования свободных кислородных радикалов нанодисперсным диоксидом церия в биологических системах. Кислородные вакансии $V_{\ddot{O}}$ обеспечивают адсорбцию на поверхности частиц CeO_2 супероксидного ($O_2^{\bullet-}$) и пероксидного (O_2^{2-}) радикалов. Кислородные вакансии обеспечивают также превращение радикалов в ионы кислорода и их миграцию в кристаллическую решетку CeO_2 [13]

Согласно многочисленным квантово-механическим расчетам, энергия образования кислородных вакансий для диоксида церия уменьшается с уменьшением размера частиц CeO_2 (см. гл. 2). Более того, между кластерами CeO_x и макрокристаллическим CeO_2 на шкале размеров частиц CeO_2 существует область, где энергия образования вакансий минимальна. По мнению авторов [14], именно эта особенность лежит в основе необычных свойств наноразмерного диоксида церия (рис. 4.2).

С точки зрения химии твердого тела наиболее значимо размерные эффекты проявляются у частиц, у которых соотношение числа атомов на поверхности и в объеме ≥ 1 (соответствующее расчетное значение для наночастиц CeO_2 составляет ~3,5 нм, рис. 4.3). В свою очередь, с

точки зрения физики конденсированного состояния выраженные квантовые эффекты проявляются у частиц полупроводников, размер которых меньше Боровского радиуса экситона для данного материала (для CeO_2 – ~7–8 нм [15]). Наконец, как показано в гл. 3, с позиций биологии предпочтительны частицы CeO_2 размером менее 6 нм, поскольку в этом случае они обладают наименьшей цитотоксичностью [16]. Более того, как показано в § 3.6, при исследовании биораспределения и клиренса наночастиц диоксида церия установлено, что золи, содержащие частицы минимального размера (5 нм) ведут себя подобно истинным растворам, описываются стандартными уравнениями фармакокинетики и распределяются и выводятся из организма лучше, чем частицы больших размеров.

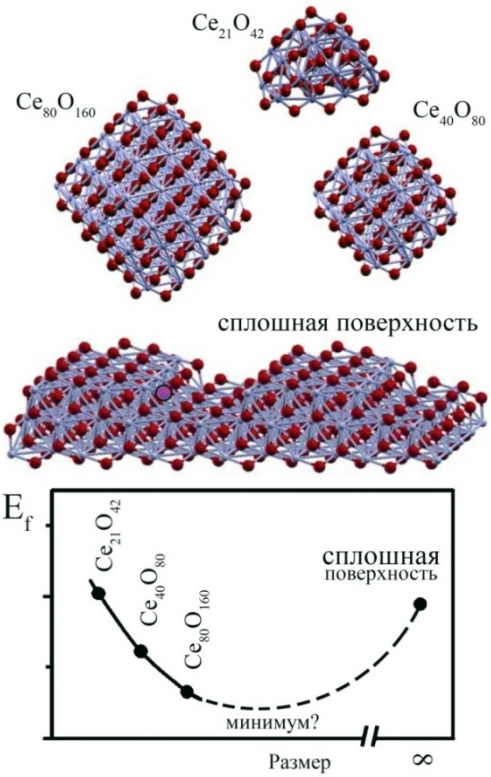


Рис. 4.2. Расчетные модели и зависимость энергии образования кислородной вакансии от размера частицы CeO_2 [14]

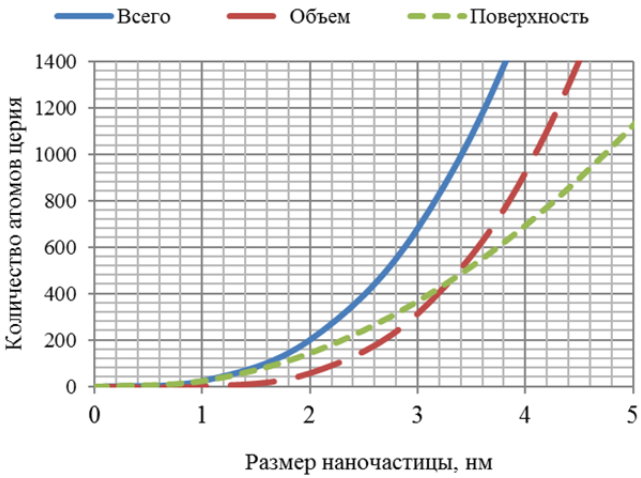


Рис. 4.3. Расчетная зависимость количества атомов церия на поверхности и в объеме наночастицы CeO_2 от ее размера

Имеющиеся в настоящее время данные позволяют предполагать, что заметного изменения окислительно-восстановительных свойств нанодисперсного диоксида церия можно достичь не только благодаря изменению дисперсности CeO_2 или варьированию состава окружающей среды, но и за счет изменения состава лигандной оболочки наночастиц [17]. Возможное объяснение наблюдаемому эффекту может заключаться в том, что кислородные вакансии, образование которых и приводит к изменению валентности ионов церия, стабилизируются молекулами-лигандами. Альтернативное объяснение состоит в том, что изменение валентности церия определяется изменением координации ионов церия на поверхности частиц.

Таким образом, перспективы биомедицинского применения нанокристаллического диоксида церия (НДЦ) обусловлены двумя основными факторами: кислородной нестехиометрией и сравнительно низкой токсичностью. Первый фактор определяет способность НДЦ каталитически участвовать в окислительно-восстановительных процессах в живой клетке, особенно при разрушении активных форм кислорода. Второй обеспечивает сравнительную безопасность применения НДЦ *in vivo*. К специфическим свойствам НДЦ следует также отнести способность к регенерации кислородной нестехиометрии, которая

выражается в том, что наночастицы диоксида церия после участия в окислительно-восстановительном процессе за сравнительно небольшой промежуток времени способны возвращаться в исходное состояние, что обеспечивает возможность их многократного использования. Регенерация – крайне важное свойство нанокристаллического диоксида церия, которое проявляется в способности многократно участвовать в окислительно-восстановительных процессах. Традиционные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, токоферол, метионин и пр.) способны участвовать только в одном редокс-цикле, после чего инактивируются. Очевидно, что нанодисперсный диоксид церия в данном случае имеет преимущество перед существующими антиоксидантами, а в ряде случаев и превосходит их по своей активности.

НДЦ как аналог супероксиддисмутазы

Супероксидный радикал ($O_2^{\bullet-}$) – одна из наиболее разрушительных активных форм кислорода (АФК). В клетке супероксидные радикалы образуются преимущественно в митохондриях. Эти радикалы способны повреждать белки, инициируют перекисное окисление липидов, а также могут протонироваться с образованием еще более реакционноспособных гидропероксильных радикалов ($HO_2^{\bullet}$) или реагирует с оксидом азота с образованием радикала пероксинитрита (ONO_2^-). Супероксидный радикал инактивирует ферменты, содержащие кластеры железо-сера, высвобождая ионы железа, которые далее участвуют в реакции Фентона, приводящей к формированию гидроксильного радикала ($OH^{\bullet}$). В свою очередь, в биологических системах $O_2^{\bullet-}$ инактивируется с помощью фермента супероксиддисмутазы (СОД). Способность выполнять функции СОД была одним из первых обнаруженных энзимоподобных свойств НДЦ [18–21], причем механизмы в случае природного фермента и наночастиц CeO_2 оказались похожи. Действительно, известно, что инактивирование супероксид-анионов супероксиддисмутазой протекает в две стадии, причем дисмутация радикала приводит к образованию менее токсичных пероксида водорода и кислорода; СОД при этом регенерирует. Для медьсодержащей СОД процессы представлены на схеме 4.2 (А). Совокупная реакция $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ для нестехиометрического CeO_2 имеет аналогичный вид и также включает две стадии [21], при этом в итоге эффективная степень окисления церия в CeO_2 также остается неизменной, схема 4.2 (*Б*).

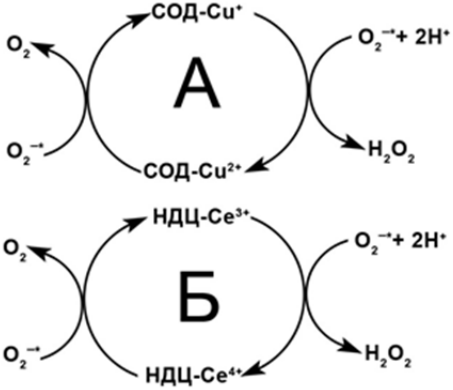


Схема 4.2. НДЦ как аналог супероксиддисмутазы

Интересно, что предварительная обработка НДЦ пероксидом водорода, приводящая к окислению находящихся на поверхности ионов Ce^{3+} до Ce^{4+}, влечет за собой полную утрату способности наночастиц CeO_2 выполнять функции супероксиддисмутазы [19]. Тем не менее по прошествии определенного времени после окисления наночастицы вновь приобретали эту способность, то есть возвращались в исходное состояние. Эти результаты убедительно подтверждают, что состояние поверхности частиц CeO_2 играет важную роль в инактивировании супероксидных радикалов, и наиболее значимым фактором является именно присутствие церия (III) в поверхностном слое. Отмечается также, что активность наночастиц CeO_2 может в значительной степени зависеть от толщины и проницаемости слоя органического стабилизатора на их поверхности [20]. Способность нанодисперсного диоксида церия выполнять функции СОД напрямую определяется размерным фактором. Так, препарат CeO_2, содержащий частицы размером 3–5 нм, по своей способности инактивировать супероксидные радикалы сопоставим с феррицитохромом С, тогда как аналогичный препарат с частицами большего размера (5–8 нм) является существенно менее активным [21]. Известно, что автоокисление адреналина в щелочной среде протекает через стадию образования супероксидного радикала; нами впервые показано, что нанодисперсный диоксид церия ингибирует данный процесс по механизму действия СОД; скорость процесса ингибирования при этом также зависит от размера частиц и pH раствора

[22]. Используя аналогичную методику, авторы [23] исследовали устойчивость золей НДЦ в различных электролитах и обнаружили, что при достижении порога коагуляции способность выполнять функции СОД у наночастиц диоксида церия резко снижается.

В работе [24] авторы исследовали СОД-подобную активность и способность выполнять функции оксидазы для наночастиц диоксида церия, допированных диоксидом титана. При этом оказалось, что введение TiO_2 в количестве до 15 мольных процентов практически не изменяет оксидазную активность CeO_2. В то же время СОД-подобная активность существенно снижается (рис. 4.4). Такое снижение активности авторы связывают с изменением морфологии частиц диоксида церия при введении титана.

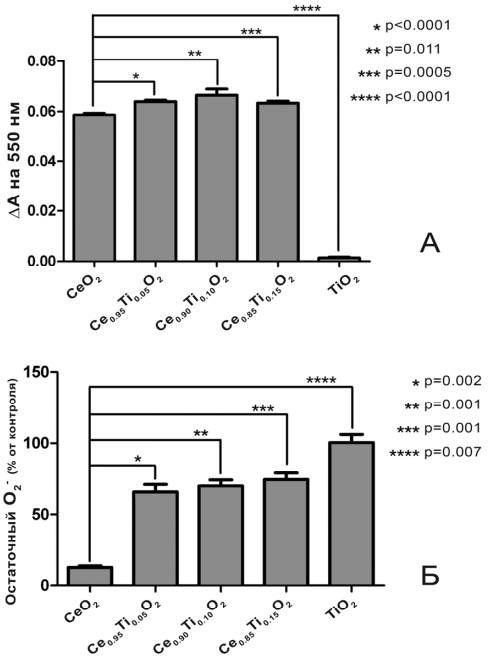


Рис. 4.4. Оксидазоподобная (*А*) и СОД-подобная (*Б*) активность наночастиц диоксида церия, допированных титаном. Оксидазная активность приведена в единицах изменения окраски субстрата N-этил-N-(4-иминоциклогекса-2,5-диен-1-илиден)этанамина. СОД-подобную активность оценивали по остаточному содержанию супероксид-радикала (в % от контроля) [24]

Авторы [25] показали, что способность НДЦ выполнять функцию оксидоредуктаз зависит от ионного состава раствора – в частности, от присутствия фосфат-ионов. Как правило, фосфат-ионы вызывают фосфатирование поверхности частицы и её способность выполнять роль СОД и каталазы снижается. Использование полимерного стабилизатора нелинейным образом изменяет чувствительность к инактивирующему действию фосфата (рис. 4.5); основную роль играет соотношение Ce^{3+}/Ce^{4+} – частицы, содержащие больше четырёхвалентного церия, хуже фосфатируются и менее чувствительны к ионному составу раствора.

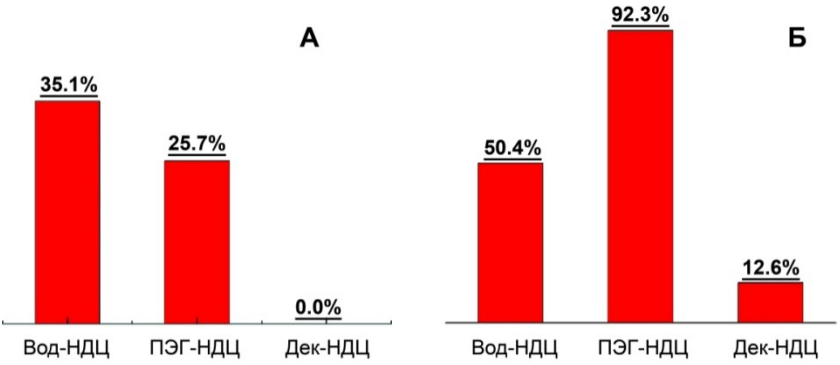


Рис. 4.5. Снижение СОД-подобной (*А*) и каталазоподобной (*Б*) активности наночастиц диоксида церия, экспонированных в присутствии фосфат-ионов [25]. Вод-НДЦ – голые частицы, синтезированные в воде [26]; ПЭГ-НДЦ – частицы, синтезированные в присутствии полиэтиленгликоля (300 Д) [27]; Дек-НДЦ – частицы, синтезированные в присутствии декстрана (1000 Д) [28]

В обзоре [29] авторы подробно исследовали ряд СОД-миметиков (марганец и его соединения, производные порфирина и металлопорфирины, фуллерены, нитроксиды и оксиды металлов). Показано, что среди прочих соединений СОД-подобная активность для НДЦ (размер частиц 3÷5 нм) имеет максимальное значение, практически на уровне натурального энзима ($log\ k_{cat}(O_2^{\bullet-}) = 9{,}55$). В том же обзоре авторы исследовали каталитическую дисмутацию супероксидного радикала с точки зрения его электрохимического поведения в растворе.

Реакцию дисмутации супероксидного радикала на гидратированной поверхности НДЦ можно записать следующим образом:

$$O_2^{\bullet-} + Ce(OH)_4 + 4H^+ \leftrightarrow O_2 + Ce^{3+} + H_2O;$$
$$O_2^{\bullet-} + Ce^{3+} \leftrightarrow O_2 + H_2O_2 + Ce(OH)_4 + 2H^+$$

При одновременном образовании четырехвалентного церия в виде $Ce(OH)_4$ и пероксида водорода на поверхности НДЦ протекают реакции образования и разрушения гидропероксида церия $Ce(OOH)(OH)_3$ с восстановлением исходного гидратированного оксида церия(IV):

$$Ce(OOH)(OH)_3 \rightarrow Ce(OH)_4 + ½\ O_2$$
$$Ce(OOH)(OH)_3 \rightarrow CeO_2 + 2H_2O + ½\ O_2$$
$$CeO_2 + 2H_2O \leftrightarrow Ce(OH)_4$$

Фактически, на поверхности НДЦ при дисмутации супероксидного радикала протекают три основные электрохимические реакции:

– окисления $O_2^{\bullet-} - \bar{e} \rightarrow O_2$;

– восстановления $O_2^{\bullet-} + \bar{e} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$;

– окисления-восстановления $Ce^{3+} + 4H_2O \leftrightarrow Ce(OH)_4 + 4H^+ + e^-$.

Электродный потенциал дисмутации супероксидного радикала при pH = 7,0 в случае реакции окисления E = –0,16 В, в случае реакции восстановления E = +0,89 В (относительно нормального водородного электрода, НВЭ) [29, 30].

Стандартный электродный потенциал для реакции окисления-восстановления соединений церия в случае пары $Ce^{3+}/Ce(OH)_4$ равен E_o = +1,97 В [31]; согласно уравнению Нернста при pH = 7,0:

$$E = 1,97 + RT/(nF)\bullet(\log([Ce(OH)_4]/[Ce^{3+}]) - 4pH) =$$
$$= 0,314 - 0,05916\bullet\log([Ce^{3+}]/[Ce(OH)_4]).$$

Видно, что редокс-потенциал существенно зависит от соотношения $[Ce^{3+}]/[Ce(OH)_4]$ на поверхности наночастицы.

На рис. 4.6 изображена редокс-диаграмма восстановления и окисления супероксидного радикала с помощью СОД, а также расчетные значения редокс-потенциала стехиометрического и нестехиометрического НДЦ при pH = 7.0. В диапазоне 0,2–0,4 В лежит редокс-потенциал «идеального» катализатора дисмутации $O_2^{\bullet-}$. Из рис. 4.6 видно, что НДЦ является хорошим редокс-аналогом СОД, оптимальное значение окислительно-восстановительного потенциала расположено в области высокого содержания ионов церия (III), когда на поверхности частицы $[Ce^{3+}] \approx [Ce(OH)_4]$. При увеличении кислородной нестехиометрии у частицы возрастают окислительные свойства, при

уменьшении нестехиометрии (увеличении концентрации Ce^{3+}) – восстановительные.

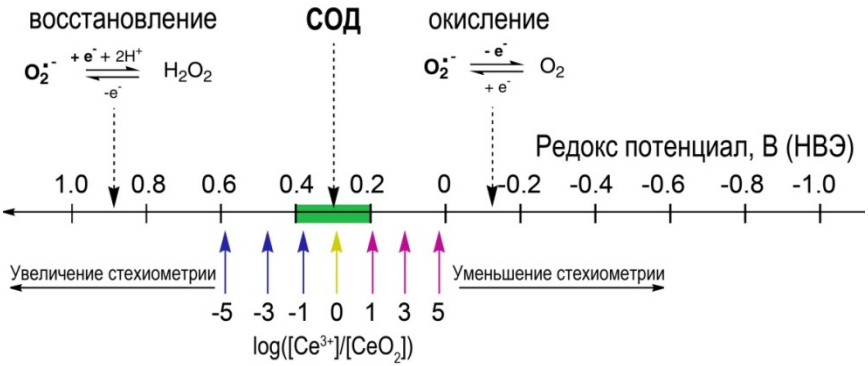


Рис. 4.6. Редокс-диаграмма восстановления и окисления супероксидного радикала с помощью СОД [29, 30] (верхняя часть). Расчетные значения редокс-потенциала стехиометрического и нестехиометрического НДЦ при pH = 7.0 (нижняя часть). В диапазоне 0,2–0,4 В (~0,3 В) расположен редокс-потенциал СОД – оптимального катализатора дисмутации $O_2^{\bullet-}$ [30]

Данный результат подтверждает выводы авторов [19] о том, что частицы диоксида церия с высокой концентрацией трёхвалентного церия обладают высокой СОД-подобной активностью. Вместе с тем из рис. 4.6 видно, что с увеличением концентрации Ce^{3+} каталитическая активность системы возрастает нелинейно, и после достижения определённого значения будет наблюдаться её снижение.

Способность НДЦ к разрушению гидоксильных радикалов

Гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$) является одной из наиболее агрессивных АФК, он окисляет практически все органические молекулы – в том числе белки, нуклеиновые кислоты и другие биополимеры, способен отрывать атом водорода от молекул ненасыщенных жирных кислот и инициировать перекисное окисление липидов. При этом специфический энзим, способный инактивировать гидроксильный радикал, в природе отсутствует. Из-за своей высокой активности гидроксильный радикал в организме разрушается молекулярными антиоксидантами (витамин Е, аскорбиновая кислота), но не ферментатив-

ным путем, поскольку время жизни радикала меньше, чем требуется для диффузии к реакционному центру энзима [32].

В присутствии наночастиц диоксида церия разрушающая способность $OH^{\bullet}$ резко снижается, что позволяет предположить наличие у НДЦ каталитических свойств в реакции инактивации гидроксильного радикала. Ввиду отсутствия природного аналога энзима однозначно определить и с чем-либо сопоставить схему данного каталитического процесса не представляется возможным (схема 4.3 (*А*)), однако в работе [33] предложен механизм разрушения гидроксильного радикала в растворе ионами церия. Вероятно, механизм инактивации гидроксильного радикала наночастицами диоксида церия будет иметь аналогичный вид (схема 4.3 (*Б*)). Ещё один механизм предложен в работе [34], схема 4.3 (*В*). Авторы показали, что наночастицы диоксида церия эффективно защищают молекулы красителя метилового фиолетового от окисления под действием гидроксильного радикала, образующегося в реакции Фентона.

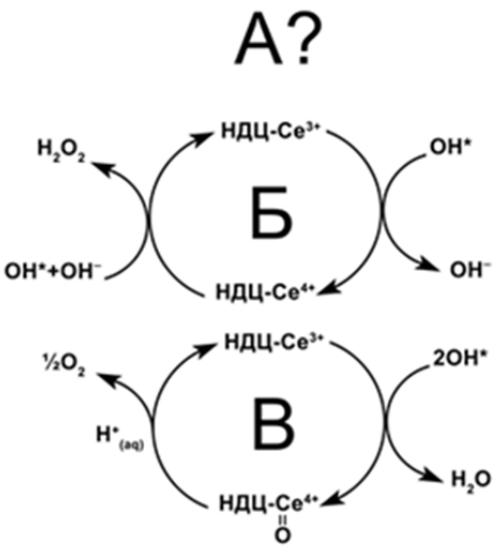


Схема 4.3. НДЦ разрушает гидроксильный радикал

Следует отметить, что способность наночастиц CeO_2 инактивировать гидроксильный радикал резко возрастает с уменьшением их раз-

меров, что, по мнению авторов [34], обусловлено увеличением содержания Ce^{3+} в поверхностном слое частиц. Тенденция к увеличению активности наночастиц при уменьшении их размеров была подтверждена нами [35] на примере препарата нанодисперсного диоксида церия, стабилизированного мальтодекстрином (рис. 4.7).

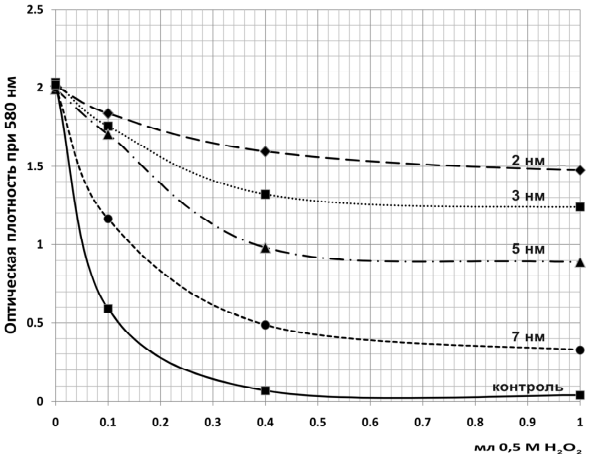


Рис. 4.7. Обесцвечивание красителя метилового фиолетового под действием гидроксил-радикала в отсутствие («контроль») и в присутствии наночастиц диоксида церия разного размера, стабилизированных мальтодекстрином [35]

В работе [36] способность наночастиц диоксида церия с размером частиц 3–5 нм инактивировать как супероксид-, так и гидроксил-радикалы была подтверждена методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).

НДЦ как аналог оксидазы

При протекании реакций, катализируемых оксидазой, субстрат окисляется молекулярным кислородом с образованием воды, пероксида водорода или свободных кислородных радикалов. В простейшем виде механизм действия оксидазы представлен на схеме 4.4 (А), где E•(Red) и E(Ox) – восстановленная и окисленная форма энзима, Sub(H_2) и Sub(Ox) – восстановленная и окисленная форма субстрата соответственно.

В работе [37] установлено, что при низких значениях pH препарат CeO_2, стабилизированный декстраном, способен вызывать окисление органических красителей, традиционно используемых в иммунологических тестах совместно с пероксидазой хрена, в частности 3,3',5,5'-тетраметилбензидина и 2,2-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты). При этом (в отличие от системы пероксидаза хрена – пероксид водорода) для окисления субстрата введения H_2O_2 не требуется (см. рис. 4.6).

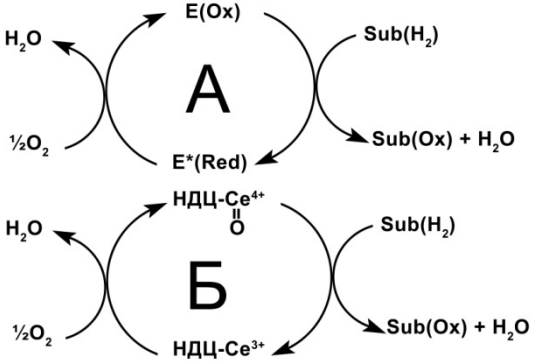


Схема 4.4. НДЦ как аналог оксидазы

Авторы [37] показали, что способность НДЦ выполнять функции оксидазы может найти применение в иммуноанализе (рис. 4.8).

Вероятный механизм оксидазной активности НДЦ может быть также представлен в виде схемы 4.4 (*Б*). Согласно диаграмме Пурбе церия с понижением pH окислительные свойства Ce^{4+} увеличиваются и возрастает скорость реакции по схеме 4.4 (*Б*) (правая часть), но снижается степень регенерации частиц по схеме 4.4 (*Б*) (левая часть). Концентрации четырехвалентного (в виде CeO_2) и трёхвалентного церия (в ионном виде) в водном растворе связаны между собой соотношением $\log(Ce^{4+}_{CeO2}/Ce^{3+}) = 3pH - 7{,}288 + ¼\log(P_{O2})$ [31]. При атмосферном давлении кислорода ($P_{O2} = 0{,}2$) для CeO_2 предельное значение, при котором $[Ce^{4+}_{CeO2}] = [Ce^{3+}]$, составляет pH ≈ 2,5; при pH = 2 лишь около 1% ионов Ce^{3+} в наночастице способны окисляться кислородом до Ce^{4+} [31]. Например, при pH = 5 соотношение концентраций Ce^{4+}_{CeO2}/Ce^{3+} примерно равно $3 \cdot 10^7$, т.е. в системе практически отсутствуют ионы Ce^{3+}.

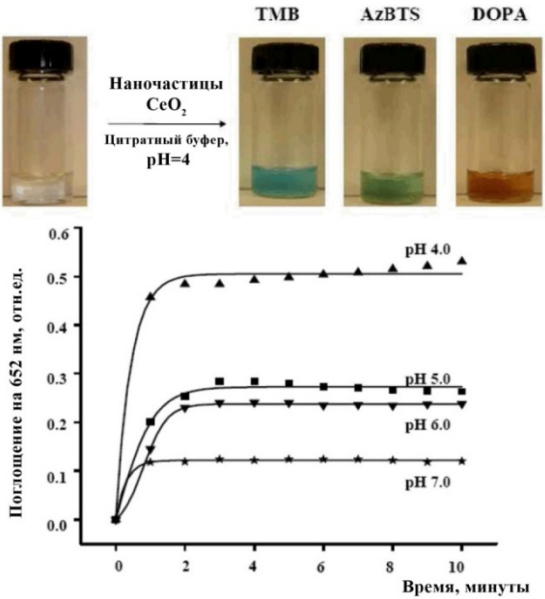


Рис. 4.8. Образование окрашенного продукта окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB), 2,2-азинобис-(3-этилбензотизолин-6-сульфоновой) кислоты (ABTS) и допамина (DOPA) в присутствии нанодисперсного диоксида церия при различных значениях pH [37]

Ранее было показано, что способность НДЦ выполнять функции оксидазы не зависит от присутствия малых ионов в растворе (включая ацетат или цитрат), однако адсорбция ДНК полностью нивелирует энзимоподобную активность, предотвращая доступ субстрата к поверхности наночастицы [38]. Авторы [39] разработали быстрый колориметрический метод для обнаружения нуклеиновых кислот, который базируется на экранировании нуклеиновыми кислотами поверхности НДЦ. Данный метод позволяет идентифицировать целевые нуклеиновые кислоты в течение нескольких минут и не требует их дополнительной очистки. Принцип нового метода показан на рис. 4.9. Образец, содержащий целевую ДНК, сначала подвергают ПЦР-амплификации, а затем смешивают с НДЦ (частицы размером ~25 нм) с последующим добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) – субстрата, который дает цветовую реакцию.

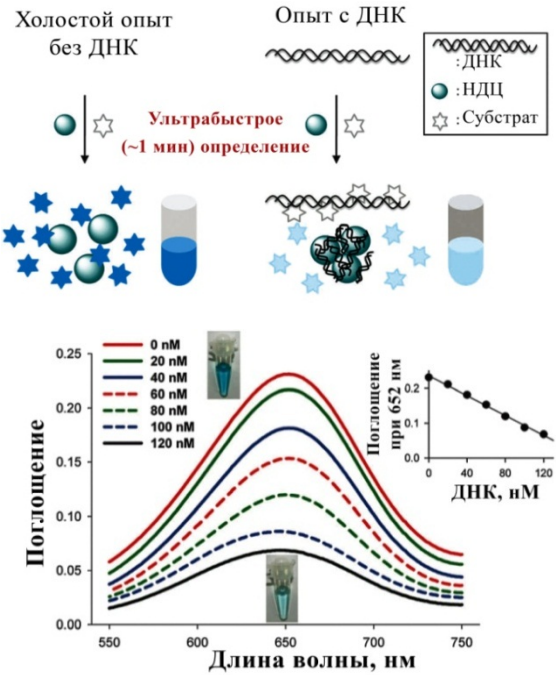


Рис. 4.9. Схематическая иллюстрация определения целевой ДНК на основе экранирования оксидазоподобной активности наночастицы диоксида церия [39]

Амплифицированная ДНК-мишень быстро адсорбируется на поверхности НДЦ вследствие электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами и положительно заряженной поверхностью наночастиц. Вследствие этого прямой контакт ТМБ с поверхностью НДЦ, необходимый для прохождения реакции окисления, блокируется. Кроме того, отрицательно заряженные нуклеиновые кислоты захватывают положительно заряженный субстрат, что также предотвращает его свободный доступ к НДЦ. Наконец, ДНК в растворе вызывает агрегирование наночастиц CeO_2, что уменьшает свободную поверхность золя и, соответственно, его каталитическую активность. Эти объединенные эффекты вызывают значительное снижение оксидазоподобной активности НДЦ и, соответственно, уменьшение колориметрического сигнала, формируемого

в результате окисления ТМБ. В отличие от случая, когда амплифицированная нуклеиновая кислота не образуется (ДНК-мишень не присутствует в образце), НДЦ за счет оксидазоподобных свойств окисляет ТМБ и раствор окрашивается в интенсивный синий цвет.

С другой стороны, нуклеозидтрифосфаты (НТФ) выступают как коэнзимы по отношению к НДЦ и повышают его оксидазоподобную активность [40]. При гидролитическом отщеплении фосфатной группы от НТФ выделяется энергия ($\Delta G = -30{,}5$ кДж/М), которая расходуется в процессе другой энзимоподобной реакции. Таким образом, энергия, запасаемая в НТФ (АТФ), может использоваться не только в биологических, но и в сугубо химических процессах. Так, по мнению авторов, оксидазоподобная активность НДЦ повышается за счет его фосфатазоподобной активности (рис. 4.10).

При низких pH, особенно в присутствии кислот, способных к комплексообразованию с ионами церия (лимонная, этилендиаминтетрауксусная), после стадии окисления субстрата (Схема 4.3В, правая часть), наночастицы CeO_2 могут даже растворяться [41]. Однако через определенное время (особенно при повышении pH) ионы Ce^{3+} повторно окисляются растворенным кислородом и снова формируется наночастица CeO_2 (рис. 4.11 и 4.12). На рис. 4.11 на примере окисления индикатора N,N-диэтил-р-фенилендиамина (DPD) показано образование окрашенного продукта в присутствии НДЦ в качестве аналога фермента оксидазы при различных значениях pH. В серии фотографий, представленных на рис. 4.12, видно изменение эффекта Тиндаля (коллоидного состояния системы) в процессе окисления красителя. При смешении золя диоксида церия и раствора DPD немедленно происходит окисление индикатора с образованием окрашенных продуктов реакции. При этом концентрация ионов церия(IV) в наночастицах диоксида церия снижается, однако раствор по-прежнему остается коллоидным. Затем в течение нескольких минут в кислой среде в присутствии цитрат-ионов наночастицы диоксида церия растворяются, формируя истинный раствор, и конус Тиндаля почти исчезает. Впоследствии, из-за присутствия растворенного кислорода, ионы Ce^{3+} снова окисляются до Ce^{4+}. Это приводит к образованию наночастиц церия и частичному восстановлению эффекта Тиндаля (в зависимости от pH раствора, рис. 4.12).

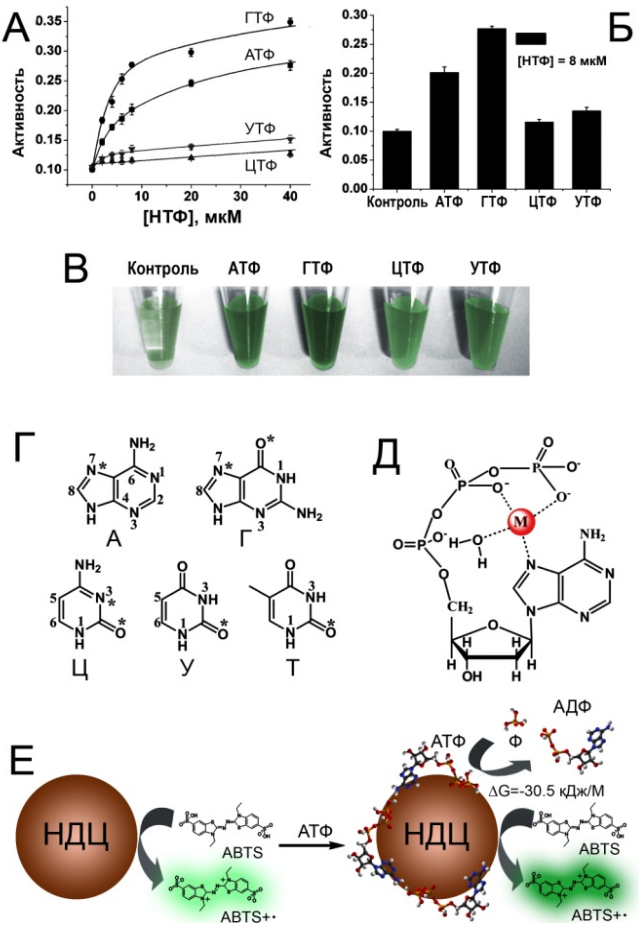


Рис. 4.10. *А* – увеличение оксидазоподобной активности НДЦ в присутствии низких концентраций нуклеозидтрифосфатов (НТФ). *Б* – Оксидазоподобная активность НДЦ в отсутствии (контроль) или присутствии 8 мкМ НТФ (после инкубации 100 с). *В* – Фотография системы НДЦ-ABTS в отсутствии (контроль) и присутствии 8 мкМ НТФ после инкубации 0,5 ч. *Г* – Структура различных нуклеозидов: А – аденозинтрифосфат (АТФ), Г – гуанозинтрифосфат (ГТФ), Ц – цитидинтрифосфат (ЦТФ), Т – тимидинтрифосфат (ТТФ) и У – уридинтрифосфат (УТФ). Д) Структура координационного соединения иона металла и НТФ (АТФ). Е) Реакция окисления ABTS, сопровождаемая гидролизом АТФ [40]

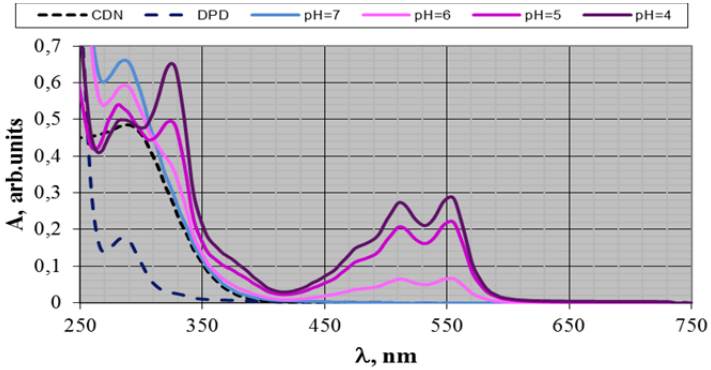


Рис. 4.11. Спектр поглощения 0,1 мМ золя НДЦ (размер частиц 3–5 нм, стабилизированные цитратом, ζ-потенциал –20 мВ), 0,1 мМ раствора N,N-диэтил-р-фенилендиамина (DPD) и их смесей через 5 мин экспозиции при различных значениях pH раствора

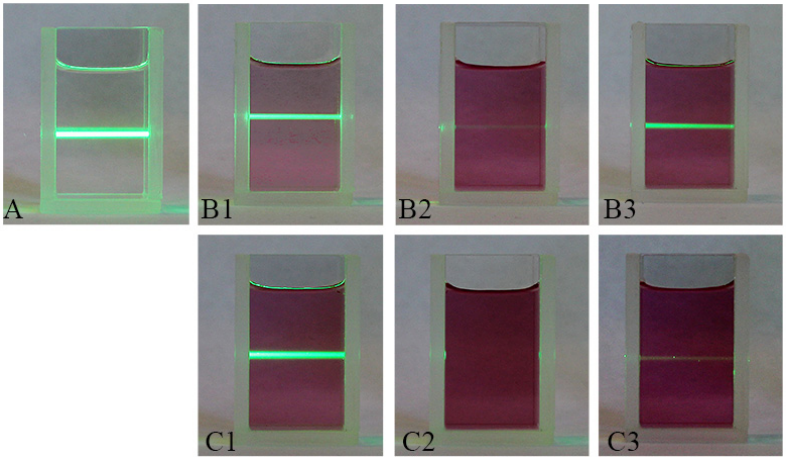


Рис. 4.12. Серия фотографий, демонстрирующих эффект Тиндаля (лазер λ = 543 нм) в процессе окисления 1,0 мМ DPD в присутствии 1.0 мМ золя НДЦ (размер частиц 3–5 нм, стабилизирован цитратом, ζ-потенциал –20 mV): *A* – pH= 7,0, *B* – pH = 5,0, *C* – pH = 4,0. B1, C1 – немедленно после смешивания растворов DPD и НДЦ; B2, C2 – через 5 мин после смешивания растворов DPD и НДЦ; B3, C3 – через 6 ч после смешивания растворов DPD и НДЦ с периодическим встряхиванием. При необходимости pH регулировали соляной кислотой

В случае обратимого растворения CeO_2 вероятный механизм оксидазоподобной активности НДЦ может быть представлен в виде схемы 4.5, где Dye(Red) и Dye (Ox) – восстановленная и окисленная формы красителя соответственно.

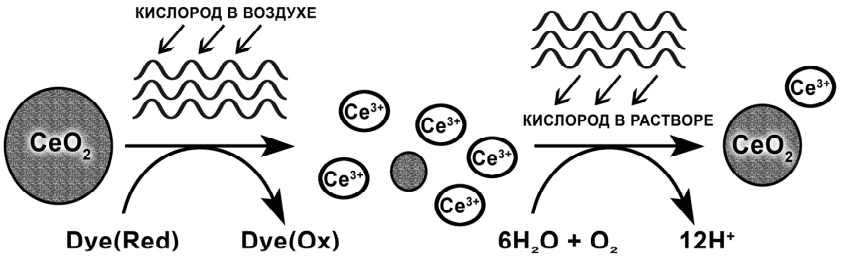


Схема 4.5. Механизм оксидазоподобной активности НДЦ

Таким образом, наночастицы диоксида церия выступают в роли аккумулятора кислорода, который быстро высвобождается в процессе окисления и медленно запасается, поскольку концентрация кислорода в растворе лимитирована скоростью диффузии через границу раздела фаз воздух / вода.

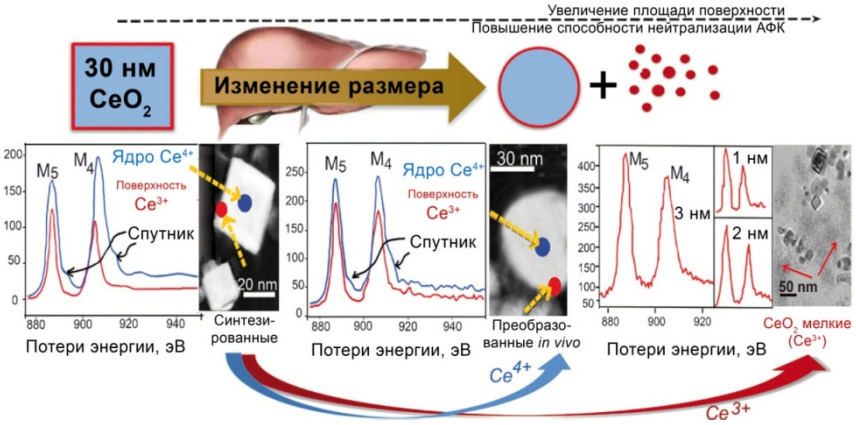


Рис. 4.13. Преобразование наночастиц диоксида церия *in vivo* [42]

Любопытно, что растворение НДЦ при окислении им субстрата и процесс формирования вторичных наночастиц диоксида церия могут происходить не только *in vitro*, но и *in vivo*.

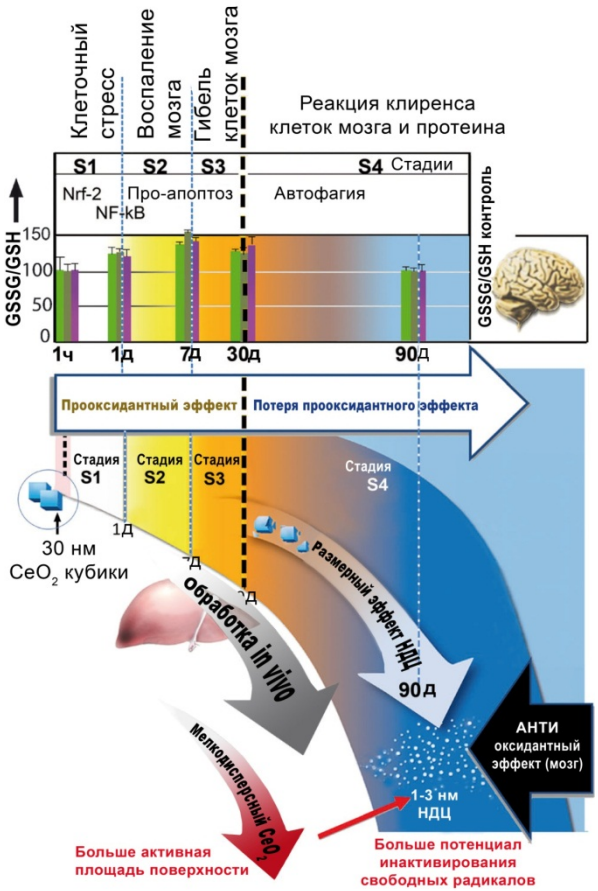


Рис. 4.14. Предположительная модель преобразования CeO_2 в печени крыс *in vivo* (изображена во временном отношении к эффектам в мозгу) после внутривенного введения НДЦ (частицы 30 нм). Верхняя часть иллюстрирует сигнальные пути (Nrf-2; NF-kB, проапоптотический, аутофагия) с регистрацией соотношения глутатион дисульфид:глутатион (GSSG:GSH) в трех областях мозга (светло-зеленый – гиппокамп; оливково-зеленый – кора; фиолетовый – мозжечок), взятые в разные промежутки времени, начиная от 1 ч до 90 дней. Нижняя часть иллюстрирует *in vivo* преобразование CeO_2 в печени в течение тех же временных интервалов с образованием ультрамелких наночасти CeO_2 (НДЦ второго поколения). Четыре различных этапа (S1-S4) обозначены как для мозга, так и для печени. Образование вторичных наночастиц CeO_2 на 90-й день совпадает с регистрируемой потерей прооксидантного эффекта в мозге [42]

Известно, что прооксидантные свойства частиц зависят не только от pH, но и от их размера. Крупные наночастицы диоксида церия могут окислять субстрат и при нейтральных значениях pH. Так, в работе [42] авторы зарегистрировали разрушение и образование наночастиц диоксида церия при биологических значениях pH в организме млекопитающих. Введенный внутривенно диоксид церия (кубические частицы размером 31±4 нм, полученные гидротермальным методом) проявляет прооксидантные свойства и токсичен для печени и мозга. В процессе окисления биологических тканей частицы растворяются, при этом через девяносто дней в печени формируются более мелкие (1–3 нм) наночастицы CeO_2 второго поколения (рис. 4.13), которые обладают антиоксидантными свойствами (рис. 4.14).

НДЦ как аналог каталазы и пероксидазы

Одной из важнейших форм активного кислорода в биологической клетке является пероксид водорода (H_2O_2). В реакциях с участием каталазы пероксид водорода является субстратом, на который направлено действие энзима, и в процессе реакции H_2O_2 разлагается на нетоксичные компоненты (воду и кислород). В свою очередь, для пероксидазы субстратом являются как пероксид водорода, так и сторонние неорганические или органические молекулы, которые окисляются пероксидом водорода в присутствии этого энзима.

Каталаза (наряду с глутатион-пероксидазой) является основным первичным антиоксидантом системы клеточной защиты. Как показали многочисленные исследования, каталазоподобная активность НДЦ способна защищать клетку от окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода экзогенного и эндогенного происхождения [43].

Совокупный механизм действия каталазы можно представить в виде схемы 4.6 (А); совокупный механизм каталитического действия НДЦ традиционно описывают в виде аналогичной схемы 4.6 (Б), однако данная схема не вполне корректна. В случае разложения H_2O_2 наночастицами диоксида церия процесс имеет более сложный вид и протекает в несколько стадий 4(В). На первой стадии ионы трехвалентного церия, которые находятся на поверхности НДЦ, окисляются пероксидом водорода с образованием Ce^{4+} (схема 4.6 (В1) справа). Одновременно с этим H_2O_2 необратимо адсорбируется на поверхностных гидратированных ионах Ce^{4+}, образуя пергидроксид церия

(схема 4.6 (В2) справа); в свою очередь, пергидроксид разлагается с образованием кислорода (схема 4.6 (В2) слева).

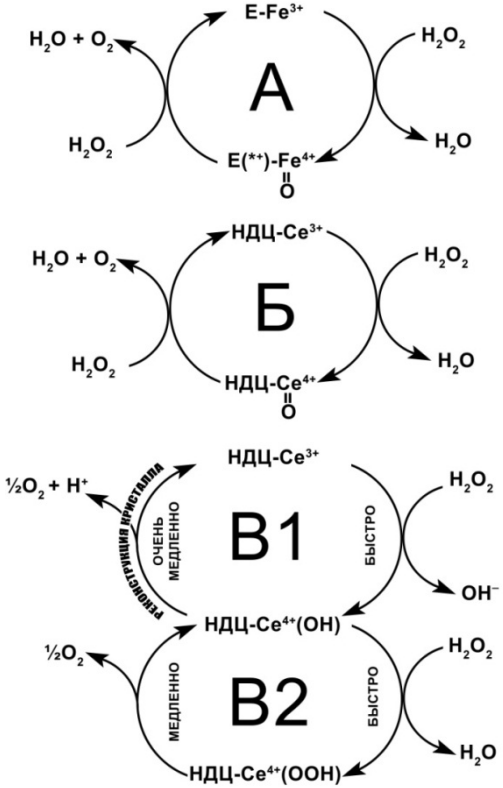


Схема 4.6. НДЦ как аналог каталазы

После расходования всего пероксида водорода в системе часть ионов четырехвалентного церия за счет реконструкции (восстановления) кристаллической решетки частицы возвращается в исходное состояние Ce^{3+} (схема 4.6 (В1) слева). Механизм разложения пергидроксида на поверхности НДЦ до конца неясен. В случае ионных растворов в качестве интермедиатов авторы [44, 45] предполагают образование гидроксил и супероксид (гидропероксил) радикалов; в работе [46] также показано, что разложение пероксида водорода ионами церия(III) происходит по

механизму реакций Фентона и Габера–Вейсса. Однако для наночастиц диоксида церия данные свободные радикалы либо не образуются совсем, либо разлагаются в момент образования по схемам 4.1 и 4.2.

Оценить вклад процесса, приведённого на схеме 4.6 (B1), в механизм разрушения пероксида водорода наночастицами диоксида церия можно с точки зрения редокс-поведения H_2O_2 и соединений церия в водных растворах (см. ниже). В ряде работ отмечается, что каталазоподобные свойства НДЦ (в отличие от супероксиддисмутазоподобных) существенно зависят от содержания четырехвалентного церия в частице [47, 48], поэтому можно предположить, что цикл 4.6 (B2) вносит значительный (если не основной) вклад в каталитическое разложение пероксида водорода наночастицами диоксида церия.

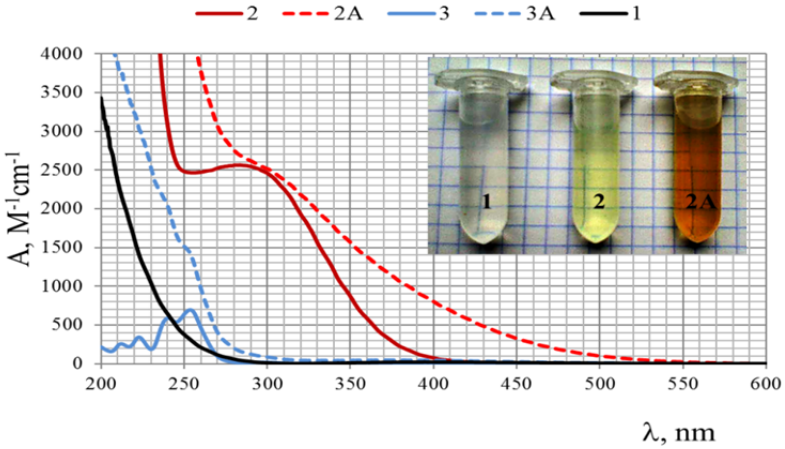


Рис. 4.15. Спектр поглощения пероксида водорода (*1*), ионов Ce^{4+} (соль $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$) в водном растворе (*2*) и после введения пероксида водорода (*2A*) и ионов Ce^{3+} (соль $CeCl_3$) до (*3*) и после (*3B*) введения эквимолярного количества пероксида водорода. На врезке – соответствующие растворы в видимом свете

Следует особо отметить, что с образованием и разрушением темноокрашенного пергидроксида церия связано распространенное заблуждение, что визуальное усиление окраски золя CeO_2 при введении пероксида водорода (и последующее обесцвечивание при экспозиции или нагревании) обусловлено окислением и восстановлением ионов церия в наночастице.

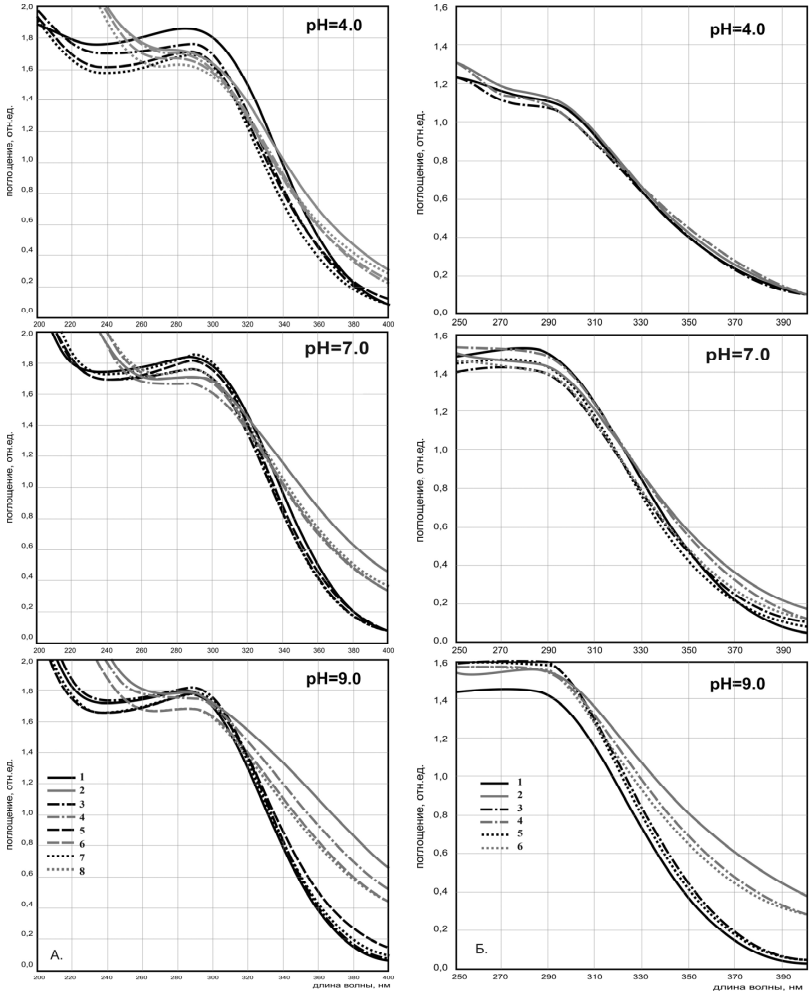


Рис. 4.16. Регенерация 0,5 мМ золя наночастиц диоксида церия в щелочных, нейтральных и кислых средах после обработки пероксидом водорода:
1 – исходный золь CeO_2 (стабилизатор – цитрат); *2* – введение 1 мМ H_2O_2;
3 – кипячение в течение 5 мин; *4* – дополнительное введение 1 мМ H_2O_2;
5 – кипячение в течение 5 мин; *6* – дополнительное введение 1 мМ H_2O_2;
7 – кипячение в течение 5 мин; *8* – дополнительное введение 1 мМ H_2O_2.
А – стабилизатор цитрат, частицы 2–3 нм; *Б* – аналогичные данные для золя CeO_2, стабилизированного полиакрилатом, частицы 4–5 нм [43]

Данное явление можно проследить на примере растворов солей церия. На рис. 4.15 показано изменение спектра поглощения и окраски раствора водорастворимой соли Ce^{4+} (гексанитратоцерат(IV) аммония) при введении H_2O_2. Очевидно, что церий находится в высшей степени окисления и далее окисляться не может, тем не менее в растворе развивается интенсивная окраска; при этом ионы Ce^{3+} (нитрат церия(III)) немедленно после введения пероксида водорода окраску не изменяют.

На рис. 4.16 приведены спектры поглощения водных золей диоксида церия до введения пероксида водорода и в ходе нескольких циклов разложения при разных значениях pH. Видно, что с уменьшением pH окрашивание золя диоксида церия при введении пероксида водорода уменьшается, что говорит о замедлении скорости реакции по схеме 4 (B1 и B2, справа). Также при уменьшении pH снижается совпадение графиков до и после обработки H_2O_2 – способность частиц к регенерации по схеме 3 (B1 и B2, слева).

Кинетика взаимодействия пероксида водорода с наночастицами диоксида церия показана на рис. 4.17.

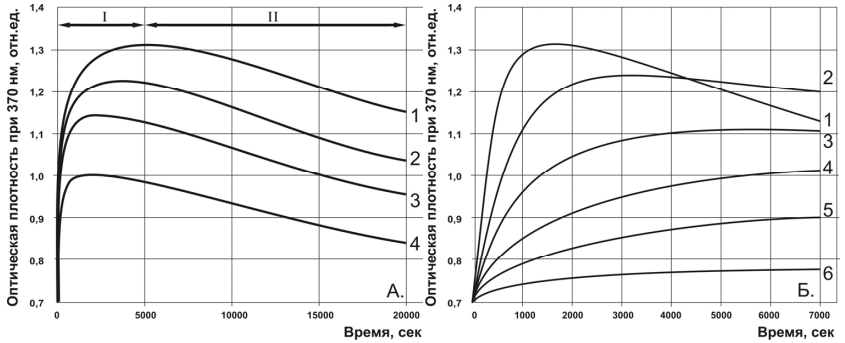


Рис. 4.17. Динамика изменения оптической плотности 400 мкМ раствора наночастиц CeO_2 (длина волны λ=370 нм) при введении пероксида водорода: *А* – зависимость от концентрации H_2O_2: *1* – 400 мкМ; *2* – 200 мкМ; *3* – 100 мкМ; *4* – 50 мкМ (pH=8,0). Сверху для кривой *1* показаны интервалы протекания процессов, соответствующих уравнениям I – (4.3б) и II – (4.3в). *Б* – зависимость от pH раствора: *1* – pH=9; *2* – pH=8; *3* – pH=7; *4* – pH=6; *5* – pH=5; *6* – pH=4 (концентрация H_2O_2 200 мкМ) [43]

Из рис. 4.17 видно, что скорость прохождения одного редокс-цикла (образования и разложения монопероксотригидрата) в меньшей

степени зависит от соотношения концентраций наночастиц диоксида церия и H_2O_2 и в большей – от pH раствора. Скорость образования пергидроксида и разложения пероксида водорода резко падает с уменьшением pH раствора – например, в случае комплексных соединений церия константа скорости реакции диспропорционирования пероксида при t = 25°C и pH→5.0 снижается практически до нуля [45]. В сильнокислых растворах пергидроксид церия не образуется, хотя в перхлоратных средах его наблюдали и при pH = 2.0 [49], что, по мнению авторов, связано с образованием «*коллоидных полимерных цериевых ионов* [Ce-O-Ce]». Литературные данные также свидетельствуют, что каталазоподобная активность нанодисперсного CeO_2 зависит от pH раствора [50] (при повышении pH возрастает, при снижении – падает). При определенных значениях pH НДЦ начинает проявлять пероксидазоподобные свойства.

Изменение окраски НДЦ при появлении в системе пероксида водорода авторы [51] использовали для создания колориметрических тест-полосок для экспресс-анализа. Такие тест-полоски, содержащие НДЦ, предлагается использовать для определения в растворе концентрации H_2O_2 или глюкозы. В первом случае цветовая реакция наблюдается непосредственно вследствие образования темноокрашенного пергидроксида церия. Во втором случае в тест-полоски иммобилизуют дополнительно глюкозооксидазу, которая окисляет глюкозу с образованием H_2O_2. Пероксид водорода в присутствии НДЦ образует пергидроксид церия, и бумага окрашивается в коричневый цвет. По интенсивности окраски можно определять концентрацию глюкозы в растворе (рис. 4.18).

В работе [52] изучали влияние размера и поверхностного покрытия наночастиц CeO_2 на их реакционную способность по отношению к H_2O_2 в растворах и клетках. Монодисперсные нанокристаллы CeO_2 были синтезированы в органическом растворителе при разложении прекурсоров церия, а затем переведены в воду с использованием амфифильного покрытия. Количественный анализ антиоксидантной активности CeO_2 с помощью газовой хроматографии и тест с люминолом показали, что в реакции участвует 2 моля H_2O_2 на каждый моль церия (III); данный факт позволил авторам предположить, что реакция протекает по механизму Фентона. Наночастицы меньшего диаметра, содержащие больше церия(III), оказались более реакционноспособными по отношению к H_2O_2. Кроме того, присутствие поверх-

ностного покрытия не препятствовало взаимодействию между ионами церия(III) на поверхности наночастиц и пероксидом водорода. Наиболее реакционноспособными были самые маленькие частицы (3.8 нм в диаметре) с самым тонким поверхностным покрытием (например, олеиновой кислотой).

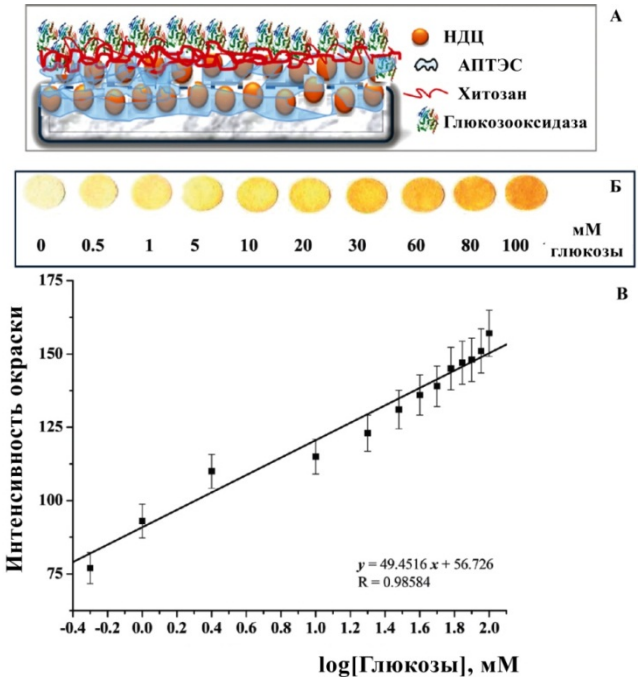


Рис. 4.18. Принцип действия тест-полосок на глюкозу, содержащих нанодисперсный диоксид церия (НДЦ) и глюкозооксидазу. Для закрепления НДЦ на бумажном носителе используют аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС), а глюкозооксидазы – хитозан. *А* – последовательность иммобилизации компонентов на силированную бумагу; *Б* – колориметрическая реакция бумажных индикаторов на глюкозу в диапазоне концентраций от 0 до 100 мМ; *В* – линейная калибровочная кривая для глюкозы [51]

Самым интересным результатом исследований явился тот факт, что синтезированные наночастицы показали антиоксидантную способность в 9 раз выше, чем коммерческие антиоксиданты, такие как Trolox. Отмечается, что уникальной особенностью наночастиц CeO_2

является то, что они могут участвовать в редокс-процессе несколько раз: в течение нескольких недель частицы, обогащенные ионами Ce(IV), возвращаются в исходное состояние (в отношении содержания ионов Ce(III)). Почти во всех случаях наночастицы остаются коллоидно-стабильными (неагрегированными) и могут применяться в качестве антиоксидантов многократно. Полученные результаты были подтверждены при исследовании на культуре клеток фибробластов кожи человека, где синтезированные НДЦ снижали окислительный стресс, вызванный введением H_2O_2, с эффективностью, пропорциональной их реакционной способности в растворе. Полученные данные показывают, что органические покрытия на поверхности наночастиц диоксида церия не ограничивают его антиоксидантного действия и способность регенерировать окислительно-восстановительные свойства сохраняется даже в присутствии стабилизаторов.

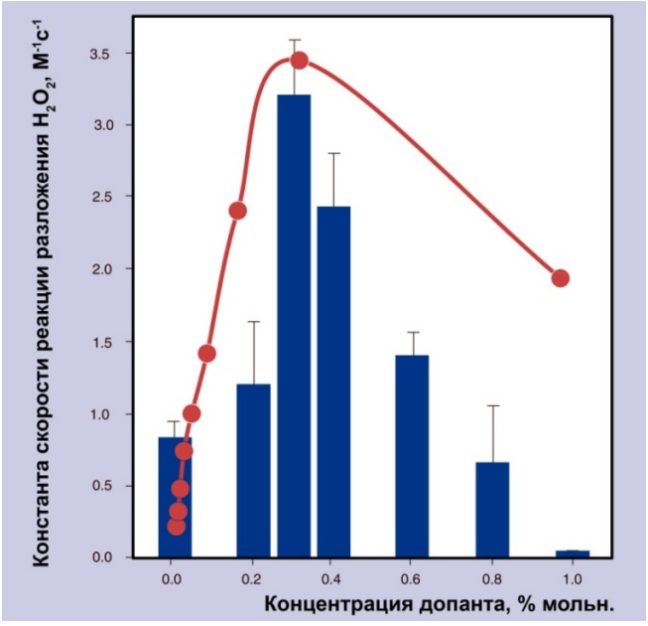


Рис. 4.19. Зависимость константы скорости реакции разложения H_2O_2 наночастицами $Ce_{1-x}Zr_xO_2$ (гистограмма [53]) и $Ce_{1-x}Mn_xO_2$ (сплошная линия, наши данные) от мольной концентрации допанта

Каталазоподобная активность наночастиц диоксида церия изменяется при введении в кристаллическую решетку допантов. В работе [53] из обратных эмульсий синтезировали наночастицы CeO_2, допированные цирконием, после чего исследовали золи этих частиц, стабилизированные цитратом, в реакциях разложения пероксида водорода. Константа скорости реакции разложения H_2O_2 частицами $Ce_{1-x}Zr_xO_2$ возрастала с увеличением мольной доли циркония, достигала максимума при x = 0,3 (k = 3,2 $М^{-1}с^{-1}$) и далее снижалась. В наших работах аналогичная зависимость наблюдалась для наночастиц смешанных оксидов $Ce_{1-x}Mn_xO_2$, полученных цитратным методом [54]. Константа скорости реакции разложения H_2O_2 возрастала с увеличением мольной доли марганца, достигала максимума при x = 0,32 (k = 3,4 $М^{-1}с^{-1}$) и далее снижалась (рис. 4.19).

Любопытно, что в работе [55] с увеличением концентрации допанта каталазная активность наночастиц $Ce_{1-x}Sm_xO_2$ монотонно снижалась, что, по мнению авторов, объясняется уменьшением концентрации Ce^{3+} в $Ce_{1-x}Sm_xO_2$. Вместе с тем нельзя исключить и частичной сегрегации соединений самария на поверхности наночастиц. В целом литературные данные свидетельствуют, что каталазоподобная активность нанодисперсного CeO_2 зависит от содержания ионов церия(III) на поверхности частиц [47] и от pH раствора [50] (при повышении pH>7 каталазоподобная активность растет, при понижении – падает).

Пероксидазоподобная активность НДЦ и баланс про- и антиоксидантных свойств

Способность НДЦ ускорять окисление органических соединений пероксидом водорода в кислой среде (пероксидазоподобная активность) была впервые отмечена нами на примере природных флавоноидов (антоцианов винограда) [56]. В этой же работе было показано, что баланс про- и антиоксидантных свойств НДЦ зависит от pH среды. Авторы работы [57] подробно исследовали пероксидазную активность НДЦ (в том числе определили константы Михаэлиса–Ментен) и обосновали перспективу использования золей диоксида церия вместо пероксидазы хрена (HRP) при окислении субстрата (3,3,5,5-тетраметилбифенил дигидрохлорида) в тесте на глюкозу. Показано, что в случае субстрата H_2O_2 максимальная скорость реакции для НДЦ превосходит аналогичное значение для HRP ($5{,}07\cdot10^{-8}$ $М\cdot с^{-1}$ и $3{,}34\cdot10^{-8}$ $М\cdot с^{-1}$ соответственно).

Преимущества совместного использования пероксидазы хрена и наночастиц диоксида церия (в виде покрытия на подложке) продемонстрировали авторы [58] при изготовлении сенсоров для определения пероксида водорода. Интересно, что в пионерских работах по влиянию ионов металлов на каталитическую активность пероксидазы показано [59, 60], что только ионы марганца и церия способны увеличивать скорость каталитических процессов (в отличие, например, от ионов Zn, Mg, Cu, Co, Fe, Ni, Cd, Ca, Al, Sn или молибдата), при этом действие ионов Ce^{3+} значительно превосходило Mn^{2+} [60] (рис. 4.20).

Современные данные о pH-зависимости пероксидазоподобной активности нанокристаллического диоксида церия носят аналогичный характер ([57], рис. 4.21), что подтверждает роль ионов церия(III) в описываемом процессе.

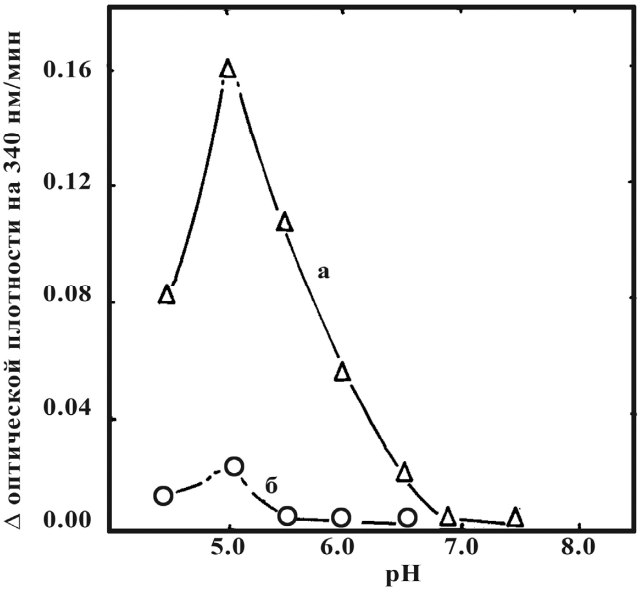


Рис. 4.20. Влияние pH на окисление дифосфопиридин нуклеотида (DPNH) в присутствии 0,3 мл раствора пероксидазы хрена и 5 мкМ солей: $CeCl_3$ (*а*) и $MnCl_2$ (*б*) в сукцинатном буфере [60]

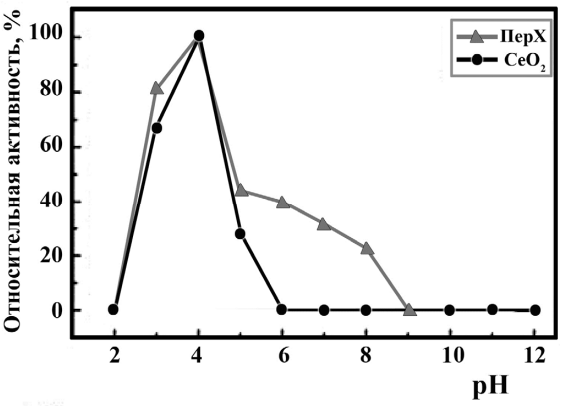


Рис. 4.21. Влияние pH на пероксидазоподобную активность наночастиц диоксида церия (CeO_2) и пероксидазы хрена (ПерХ) [57]

На схеме 4.7 (А) в упрощенной форме показан каталитический цикл пероксидазы, здесь E•(Red) и E(Ox) – восстановленная и окисленная формы энзима, Sub(Red) и Sub(Ox) восстановленная и окисленная (или радикальная) формы субстрат, соответственно. На схеме 4.7 (Б) представлена возможная схема пероксидазоподобного поведения НДЦ [57]. Как и в случае с оксидазоподобной активностью, снижение pH усиливает окислительные свойства Ce^{4+} и повышает скорость реакции по схеме 4.7 (Б, правая часть), но снижает способность частиц к регенерации 4.7 (Б, левая часть). При pH>6.0 пероксидазоподобные свойства у НДЦ отсутствуют [Там же]. Как уже говорилось ранее, при высоких значениях pH нанокристаллический диоксид церия выполняет функцию фермента каталазы.

Для стехиометрических наночастиц диоксида церия, полученных высокотемпературной обработкой, пероксидазные свойства могут наблюдаться и при более высоких значениях pH. Так, авторы [61] синтезировали НДЦ (20–30 нм) при взаимодействии хлорида церия(III) в безводном этаноле с окисью этилена и последующем прокаливании прекурсора при 600°C. Полученные частицы в буферном растворе при pH = 7.2 за счет пероксидазоподобной активности ускоряют взаимодействие пероксида водорода с люминолом и усиливают люминесценцию последнего. При этом на поверхности частицы в

качестве интермедиата образуется пергидроксид церия, который в отсутствии ионов Ce(III) разлагается с образованием супероксидного и гидроксильного радикалов (рис. 4.22).

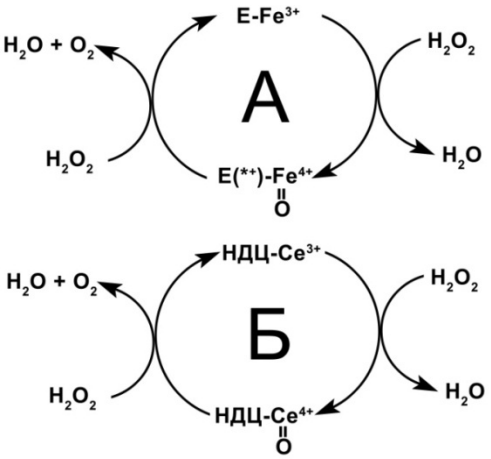


Схема 4.7. НДЦ как аналог пероксидазы

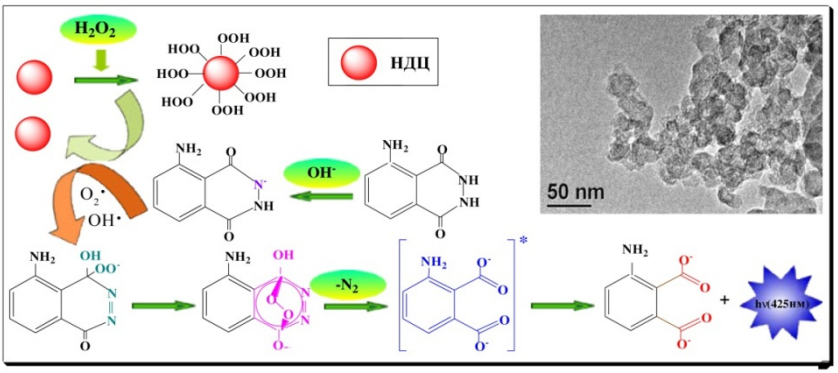


Рис. 4.22. Микрофотография наночастиц диоксида церия (НДЦ) и предполагаемый механизм люминесценции в системе H_2O_2–НДЦ–люминол [61]

Таким образом, НДЦ может улучшать результаты лабораторных анализов с участием H_2O_2 и люминола – в качестве примера авторы рассматривают возможность регистрации пероксида водорода в процессе его разложения эритроцитами человека.

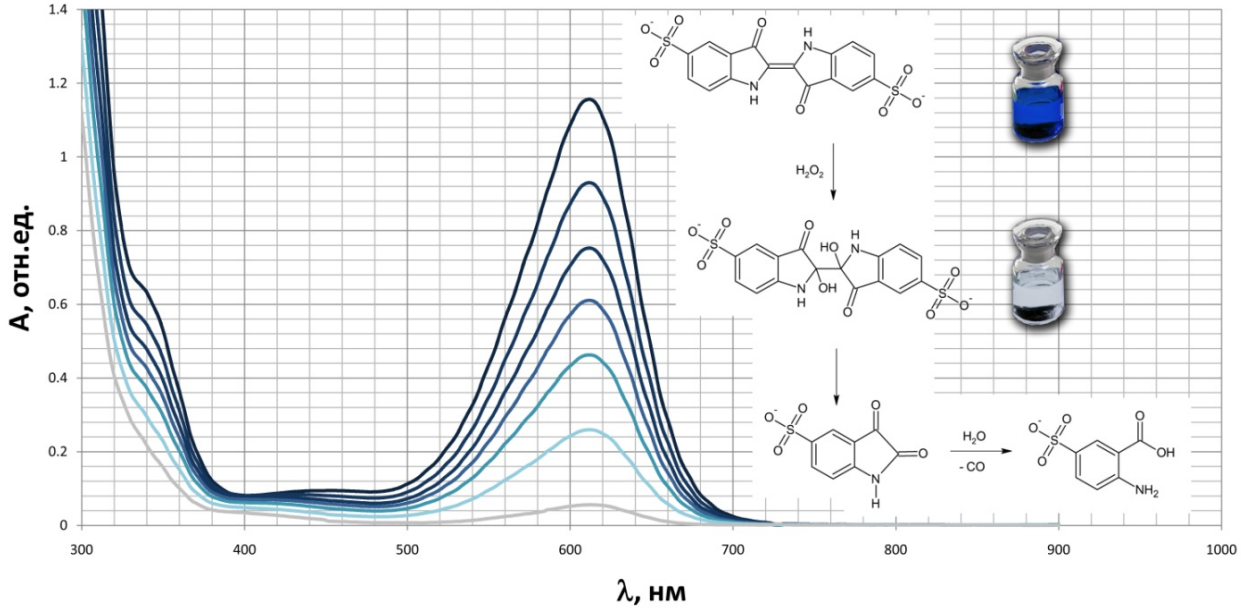


Рис. 4.23. Динамика уменьшения оптической плотности раствора индигокармина (75 мкМ) в присутствии пероксида водорода (1 мМ) и схема разрушения красителя под действием H_2O_2

При этом относительная интенсивность хемилюминесценции линейно связана с концентрацией H_2O_2 в диапазоне от 0,01 до 50 μM, предел обнаружения пероксида водорода находится на уровне 6,5 × × 10^{-11} M и относительное допустимое отклонение 2,1% для 1 μM H_2O_2.

Про- и антиоксидантные свойства НДЦ тесно связаны между собой и определяются несколькими основными факторами. В качестве примера рассмотрим влияние НДЦ на окисление красителя индигокармина пероксидом водорода. Индигокармин легко разрушается активными формами кислорода (АФК) до неокрашенных продуктов во всем диапазоне pH (см. рис. 4.23). При введении НДЦ (размер частиц 3–5 нм, стабилизированные цитратом, дзета-потенциал около минус 20 мВ) в систему, содержащую индигокармин и H_2O_2, скорость окисления красителя изменяется (рис. 4.24). В диапазоне pH < 6 НДЦ ускоряет разрушение красителя пероксидом водорода, т.е. выступает в роли фермента пероксидазы. Наоборот, при pH > 7 нанокристаллический диоксид церия проявляет каталазоподобную активность, защищая краситель, в результате чего скорость обесцвечивания раствора снижается (рис. 4.25, точки, левая ось).

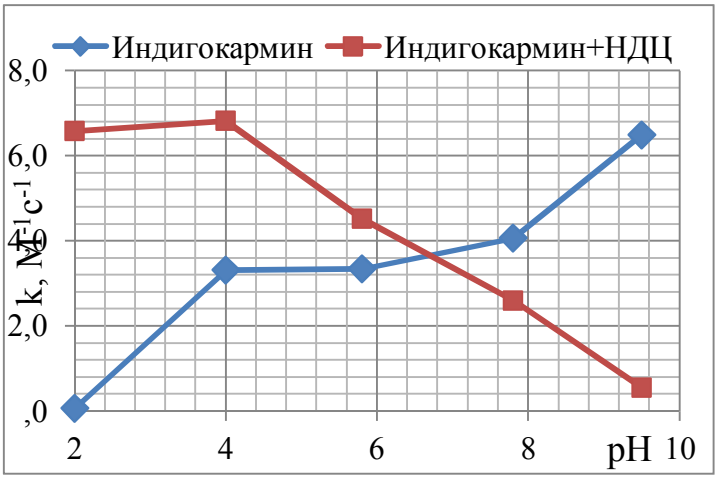


Рис. 4.24. Зависимость константы скорости обесцвечивания красителя индигокармина (75 мкМ) пероксидом водорода (1 мМ) в отсутствии и присутствии НДЦ (50 мкМ) от pH раствора

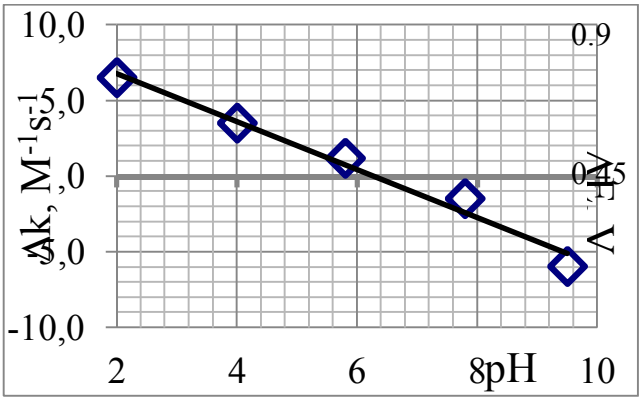


Рис. 4.25. Точки – зависимость изменения константы скорости реакции разрушения красителя индигокармина (75 мкМ) пероксидом водорода (1 мМ) в присутствии НДЦ (50 мкМ) от pH раствора (левая ось). Прямая линия – расчетная зависимость разности редокс-потенциала НДЦ и пероксида водорода от pH (правая ось)

Способность CeO_2 разлагать пероксид водорода (преимущественная реализация схемы 4.6 (В1) или 4.7 (Б)) можно описать с точки зрения электрохимического поведения соединений церия в водных растворах. Стандартные электродные потенциалы CeO_2/Ce^{3+} $E_0 = 1{,}66$ В; O_2/H_2O_2 $E_0 = 0{,}695$ В [31] .

В соответствии с уравнением Нернста для системы $Ce^{3+} + 2H_2O \rightarrow CeO_2 + 4H^+ + e^-$ зависимость от pH:

$$E1 = 1{,}66 + RT/(nF)\cdot(\log([CeO_2]/[Ce^{3+}]) - 4pH) =$$
$$= 1{,}66 + 0{,}05916\cdot(\log([CeO_2]/[Ce^{3+}]) - 4pH).$$

Для системы $H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H^+ + 2e^-$ зависимость от pH:

$$E2 = 0{,}695 + RT/(nF)\cdot(\log(p_{O2}/[H_2O_2]) - 2pH) =$$
$$= 0{,}695 + RT/(2F)\cdot(\log(p_{O2}/[H_2O_2]) - 2pH) =$$
$$= 0{,}695 + 0{,}02958(\log(p_{O2}/[H_2O_2]) - 2pH).$$

Очевидно, что НДЦ будет антиоксидантом, обеспечивающим защиту против пероксида водорода (восстановителем для H_2O_2), если $E1<E2$ или $1{,}66 + 0{,}05916\ (\log([CeO_2(НДЦ)]/[Ce^{3+}]) - 4pH) < 0{,}695 + 0{,}02958\ (\log(p_{O2}/[H_2O_2]) - 2pH)$. Примем $p_{O2} = 0{,}1$ и обозначим долю

ионов Ce(III) в частице как D (поскольку диоксид церия практически нерастворим и других источников церия в системе нет), тогда $pH>5,6 – ⅓(\log(D) + 1/6 \log[H_2O_2])$.

Концентрации пероксида водорода выше ≈ 1 мМ вызывает тотальную гибель клеток млекопитающих. Разложение пероксида водорода до меньших концентраций будет происходить при $pH \geq 5,1 – \log(D)/3$.

В стехиометрическом крупнокристаллическом CeO_2 трехвалентный церий практически отсутствует (мольная доля 10^{-8} и меньше) [62]. Для такого диоксида церия предельное значение $pH > 5,1 – –\log(10^{-8})/3 = 7,77$. Иначе говоря, при pH<7.8 стехиометрический диоксид церия не выполняет функцию антиоксиданта против пероксида водорода (поскольку в этом диапазоне pH его редокс-потенциал выше, он сам является более сильным окислителем и может выступать в качестве прооксиданта). В нестехиометрическом диоксиде церия (особенно в присутствии органического стабилизатора) D достигает значений 0,01–0,001 и более [62]. Для НДЦ с D = 0,001 предельное значение $pH > 5,1 – \log(10^{-3})/3 = 6.1$. Иначе говоря, при pH > 6 нестехиометрический НДЦ может защищать биологические системы и компоненты среды от пероксида водорода.

На рис. 4.25 приведена зависимость разницы редокс-потенциалов НДЦ (D = 0,001) и 1 мМ пероксида водорода (ΔE = E1–E2) от pH среды (сплошная линия, правая ось). Данная прямая совпадает с линией тренда для изменения константы скорости окисления красителя пероксидом водорода при введении НДЦ (про- и антиоксидантного действия) (точки, левая ось).

Приведенный расчет позволяет оценить защитное действие различных частиц диоксида церия против АФК (пероксида водорода) с учетом значения pH в клетке и органеллах [63]. Соответствующие данные для стехиометрического и нестехиометрического диоксида церия показаны на рис. 4.26.

Очевидно, что тем или иным образом меняя стехиометрию, можно регулировать антиоксидантные и прооксидантные свойства НДЦ в широком диапазоне значений pH, характерных для биологических сред. Как видно из рис. 4.26, минимальная защита от окисления (максимальный прооксидантный эффект) наблюдается для содержимого везикул (лизосомы, эндосомы). Как известно, именно везикулярный механизм поглощения у эукариот обеспечивает большую часть поступления веществ в клетку; вместе с по-

лезными продуктами (белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, липопротеидными комплексами) путем эндоцитоза в клетку попадают и нежелательные компоненты (токсины, вирусы, бактерии и т.п.).

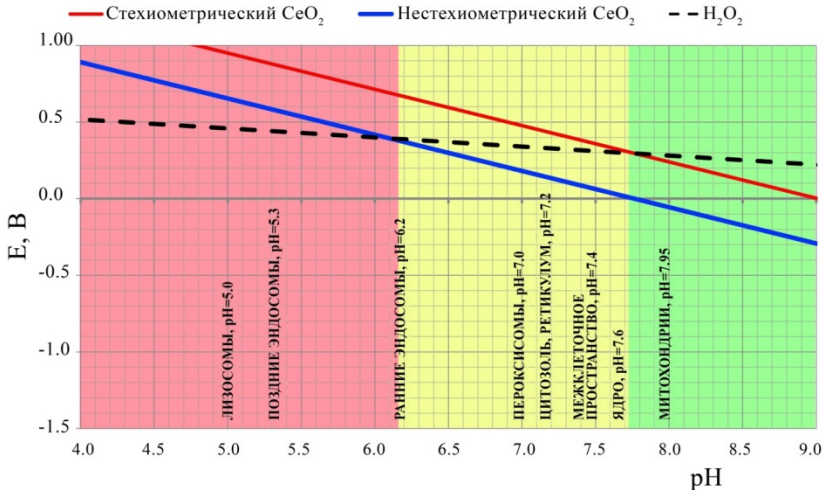


Рис. 4.26. E-pH зависимости для стехиометрического и нестехиометрического CeO_2, а также для пероксида водорода. Вдоль оси абсцисс указаны клеточные органеллы с соответствующим значением pH

Окислительные свойства НДЦ могут оказаться полезными для разрушения нежелательных экзогенных компонентов и в процессе везикулярного питания клетки. С другой стороны, из анализа pH-зависимого редокс-поведения НДЦ следует, что максимальная защита от окислительного стресса проявляется в митохондриях. Как известно, митохондрии являются основным источником эндогенного окислительного стресса внутри клетки, они активно участвуют в генерации АФК и в каскаде запрограммированной гибели клеток; доказана корреляция между избытком выработки митохондриальных АФК и процессом старения. В настоящее время показано, что митохондриально-нацеленные антиоксиданты являются эффективными протекторами клеток и их органелл в условиях окислительного стресса и старения [64].

Рис. 4.26 демонстрирует, что поведение НДЦ будет значительным образом зависеть от стехиометрии даже в условиях, схожих биологических экспериментов, выполненных при одинаковом значении pH.

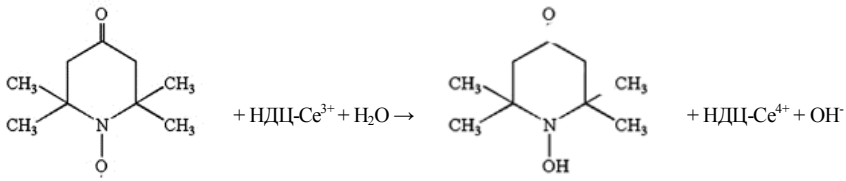
Например, мы показали [65], что наночастицы диоксида церия (2–5 нм) защищают мышиные ооциты от окислительного стресса и повышают их активность, в то время как авторы [66] обнаружили, что наночастицы CeO_2 практически того же размера (~3 нм) являются прооксидантами по отношению к мышиным ооцитам и вызывают окислительное повреждение ДНК. В первом случае наночастицы были получены из солей церия(III) в «мягких условиях» и содержали более 15% Ce^{3+} [67]; во втором случае наночастицы (Rhodia) были синтезированы из солей церия(IV) и практически не содержали Ce^{3+} (менее, чем 0,04% [68]).

Такой pH-зависимый баланс про- и антиоксидантных свойств НДЦ представляет большой интерес с точки зрения нанофармацевтики – например, для создания противовирусных препаратов. Большинство вирусов, проникающих в клетку с помощью эндоцитоза, для агглютинации и высвобождения наследственного материала требуют пониженного pH везикул.

Так, гемагглютинин вируса гриппа при pH = 7 неактивен, пептид слияния меняет конформацию только в кислой среде (при pH $\leq$ 5). При этом значении pH нанокристаллический диоксид церия проявляет выраженные прооксидантные свойства и может повреждать нуклеиновые кислоты вириона. Еще более интересным и перспективным представляется использование вышеописанных свойств НДЦ с целью редокс-терапии новообразований.

Инактивация активных форм азота в присутствии НДЦ

Наночастицы диоксида церия способны инактивировать азотсодержащие свободные радикалы и другие активные формы азота (АФА). Так, авторы [69] показали активность частиц CeO_2 против нитрозил-радикала (короткоживущего нитроксильного радикала) $NO^{\bullet}$. В работе [70] нами было установлено, что нанокристаллический диоксид церия может инактивировать не только короткоживущие, но и стабильные нитроксильные радикалы:



Были исследованы два вида наночастиц CeO_2 – размером 1–2 нм (стабилизированные цитратом натрия) и 3–5 нм (стабилизированные аденозинтрифосфатом натрия). Интересно, что скорость инактивирования также существенно зависит от размеров частиц CeO_2 и пропорционально увеличивается с их уменьшением. Поскольку с уменьшением размеров частиц возрастает доля Ce(III) на поверхности, очевидно, что определяющую роль в инактивации радикалов также играют именно ионы трехвалентного церия. Окисление Ce^{3+} в процессе инактивирования нитроксильного радикала позволяет предположить, что наночастицы диоксида церия выполняют в данном случае функции NO-редуктазы, и одновременно являются донором электрона. Следует отметить, что полученные нами результаты ставят под вопрос правомерность использования 5,5-диметилпирролин-N-оксида (DMPO) в качестве спиновой ловушки [36] при изучении инактивирующего действия наночастиц CeO_2 по отношению к гидроксил-радикалам. Действительно, образующийся при этом стабильный радикал DMPO, подобно исследованному в настоящей работе нитроксильному радикалу, также может инактивироваться наночастицами CeO_2.

Пероксинитрит ($ONOO^-$) также относится к АФА и является сильным окислителем. В биологических системах он образуется при взаимодействии оксидов азота и супероксид-аниона: $O_2^{\bullet-} + {}^{\bullet}NO \leftrightarrow ONOO^-$. Благодаря своим свойствам он способен вызывать повреждения широкого спектра молекул в клетке, в том числе ДНК и белков. В работе [71] авторы показали способность НДЦ инактивировать высокореакционную молекулу пероксинитрита, при этом скорость инактивирования не зависит от соотношения Ce^{3+}/Ce^{4+} на поверхности частицы, но значительно снижается в инертной атмосфере. По мнению авторов, предположительный механизм разложения пероксинитрита связан с адсорбцией на поверхности НДЦ карбонат-ионов (CO_2).

Фосфатазная активность НДЦ

Согласно современным данным, нанодисперсный диоксид церия способен выступать не только в роли оксидоредуктазы (редокс-активных ферментов), но и в роли фермента фосфатазы [72]. В частности, диоксид церия катализирует расщепление эфирной связи в органических эфирах фосфорной кислоты, например в п-нитрофенилфосфате (НФФ), аденозинтрифосфате, о-фосфо-L-тирозине и др. Начальная скорость реакции зависит от pH среды и увеличивается с его уменьшением (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Относительная начальная скорость расщепления эфирной связи в п-нитрофенилфосфате в присутствии НДЦ при различных значениях pH [72]

Значение pH	Относительная скорость реакции
4	1.7
7	1.0
10	0.1

Интересно, что предварительное окисление нанодисперсного диоксида церия пероксидом водорода, приводящее к уменьшению концентрации Ce^{3+}, также приводит к резкому снижению скорости реакции дефосфорилирования. Авторы [73] различными способами синтезировали наночастицы диоксида церия и исследовали их способность выполнять функции АТФ-азы. Из одинаковых прекурсоров НДЦ получали с помощью окисления пероксидом водорода, осаждения водным раствором аммиака и в присутствии гексаметилентетрамина. Максимальную АТФ-азную активность демонстрировали наночастицы, полученные из раствора с гексаметилентетрамином (восстанавливающая среда из-за присутствия в реакционной смеси формальдегида), минимальную – с пероксидом водорода (окислительная среда). В данном случае наблюдается аналогичная связь фосфатазной активности и степени окисления частиц.

Предположительный механизм, определяющий фосфатазную активность НДЦ, можно проанализировать на примере гидролиза п-нитрофенилфосфата – стандартного субстрата для определения уровня щелочной фосфатазы. Под действием фермента или НДЦ бесцветный НФФ отщепляет фосфатную группу с образованием п-нитро-

фенола, который в щелочной среде имеет ярко-желтую окраску (рис. 4.27). На рисунке также приведен вероятный механизм участия НДЦ в процессе дефосфорилирования органических соединений.

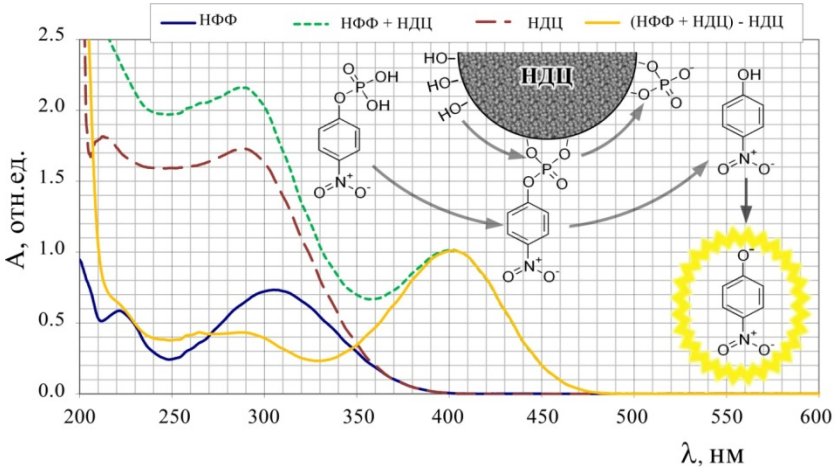


Рис. 4.27. Спектр поглощения раствора п-нитрофенилфосфата (НФФ, 50 мкМ) до и после введения НДЦ (500 мкМ), pH=7.8. На врезке: предполагаемый механизм дефосфорилирования органических соединений с участием НДЦ

При сопоставлении упрощенной схемы поведения фермента фосфатазы (схема 4.8 (А)) и НДЦ (схема 4.8 (Б)) видно, что в данном случае нанокристаллический диоксид церия вряд ли можно назвать полноценным аналогом фосфатазы, поскольку фосфатная группа связывается с ионом церия необратимо. Однако (судя по значительному количеству циклов дефосфорилирования) после образования фосфат церия десорбируется, поверхность частицы CeO_2 обновляется и может повторно участвовать в реакции, подобной энзиматической, вплоть до полного растворения наночастицы.

Способность НДЦ разлагать фосфорорганические соединения была использована авторами [74] для дезактивации ряда пестицидов и дегазации отравляющих веществ (в том числе зомана и VX) (табл. 4.2). Любопытно, что скорость дефосфорилирования нелинейно зависела от температуры отжига НДЦ (рис. 4.28, *Б*). Допирование CeO_2 другими редкоземельными элементами (La, Pr. Nd) в концен-

трации 1–3% повышало степень конверсии фосфорорганики (рис. 4.28, *В*).

В работе [75] использовали НДЦ для концентрирования и количественного дефосфорилирования фосфопептидов. Авторы [76] показали, что нанодисперсный CeO_2 может стимулировать фосфорилирование митоген-активируемой белковой киназы в бронхиальных эпителиоцитах человека (Beas2B), проявляя при этом прооксидантные свойства.

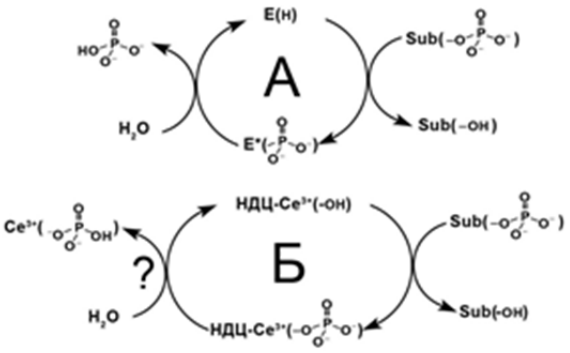


Схема 4.8. НДЦ как аналог фосфатазы

Таблица 4.2

Деградация некоторых органофосфатов в ацетонитриле (пестициды) и в нонане (вещества с нервнопаралитическим действием) с использованием НДЦ, отожженного при 500°С

Соединение	Основной продукт разложения	Степень конверсии через 128 мин, %	Время полуреакции, мин
Паратионметил	4-нитрофенол	93,2±2,3	0,17
Фенхлорофос	2,4,6-трихлорфенол	81,1±4,1	12,6
Протиофос	2,4-дихлдорфенол	45,2±4,6	30,1
Хлорпирифос	3,5,6-трихлорпиридинол	18,2±2,7	99,0
Дихлофентион	2,4-дихлорфенол	41,7±3,3	10,3
Зоман[a)]	НУ	100 (10 мин)	НУ
VX[b)]	НУ	100 (30 мин)	НУ

Примечание. [a)] О-пинаколиловый эфир метилфторфосфоновой кислоты; [b)] О-этиловый эфир метилтиофосфоновой кислоты; НУ – не установлено.

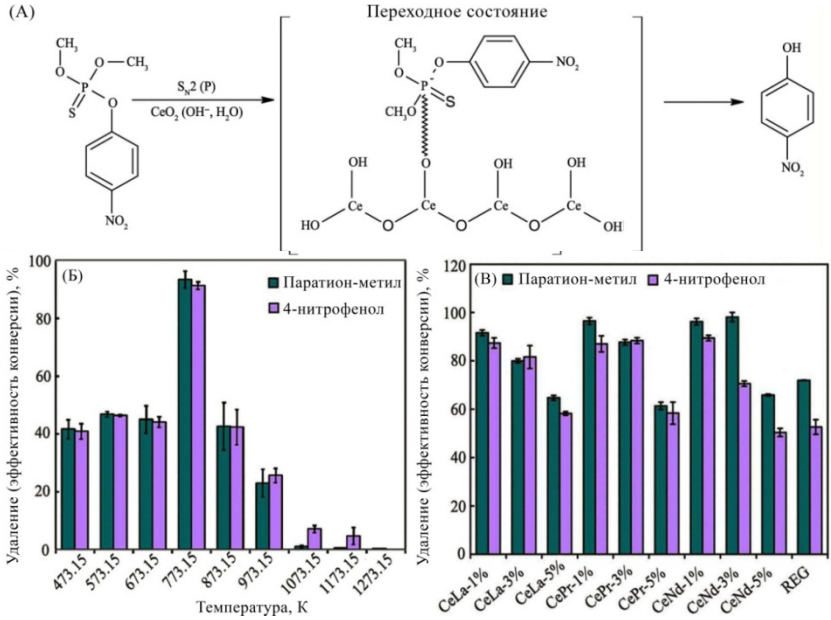


Рис. 4.28. Предложенный авторами [74] механизм разложения паратион-метила на НДЦ (*А*). Сравнение эффективности разложения фосфорорганических соединений на образцах НДЦ, отожженных при различных температурах (*Б*), и образцы НДЦ с разной концентрацией легирующих веществ (*В*). REG – диоксид церия, изготовленный из 1670 Cerox (Rhodia) [74]

Активирование транскрипционного фактора NF-κB напрямую связано с процессами фосфорилирования ингибирующего протеина IκBα киназами. NF-κB участвует в воспалительных процессах и активируется физическими или химическими внешними факторами (радиация, ультрафиолетовый свет, токсины), инфекционными агентами (бактерии, вирусы, паразиты и продукты их жизнедеятельности), сигнальными молекулами и пр. Так, токсины, содержащиеся в экстракте табачного дыма, вызывают воспалительный отклик в культуре клеток. Предварительная обработка клеток наночастицами CeO_2 (10 нМ, за 24 ч до внесения 10%-ного экстракта) повышает выживание культуры кардиомиоцитов крыс H9c2 [77]. Биохимические исследования показали, что наночастицы подавляют фосфорилирование IκBα, снижая транслокацию субъединицы p65, вызванную активированием NF-κB.

Помимо этого, в клетках, обработанных наночастицами диоксида церия, снижен уровень интерлейкинов (IL)-1 β, IL-6, фактора некроза опухоли TNF-α и синтазы окиси азота (iNOS). Гиперактивация транскрипционного фактора приводит к синтезу ряда воспалительных простагландинов, среди которых семейство интерлейкинов (IL), фактор некроза опухоли (TNF-α), γ-интерферон, активизирующий макрофаги и т.д. Стресс-киназа p38 активирует каскад арахидоновой кислоты, которая высвобождается из фосфолипидов мембраны клетки в процессе перекисного окисления липидов. При этом происходит активация циклооксигеназы (COX) с последующим синтезом воспалительных простогландинов (PG) и липооксигеназы (LOX) с последующим синтезом лейкотриенов (LT), медиаторов аллергической реакции немедленного типа. Все эти каскады выполняют прооксидантные функции, при этом воспалительный отклик многократно усиливается. Возможность целенаправленного регулирования активности нуклеарного транскрипционного фактора открывает возможность терапии большого количества патологических процессов в клетке. Например, вирусы, активируя киназу IKK, используют сигнальные пути и факторы транскрипции клетки для собственной репликации. Фосфорилирование ингибиторного белка IκB вызывает активацию транскрипционного нуклеарного фактора NF-κB; в свою очередь, активация NF-κB увеличивает экспрессию вирусного генетического материала. Традиционные противовирусные препараты не влияют на каскад реакций IKK; в то же время использование простагландина A1, снижающего активность IKK, позволяет уменьшить репликацию вируса более чем в 3 000 раз [78]. Обратимые реакции окислительного фосфорилирования и дефосфорилирования – основа энергетического и сигнального метаболизма в клетках, и возможность направленного участия в них открывает новую перспективу в применении наночастиц диоксида церия [79].

Способность НДЦ выполнять функции энзимов представляет несомненную перспективу при купировании всевозможных патологических процессов, связанных прежде всего с окислительным стрессом (рис. 4.29).

Уже сегодня фосфатазоподобные свойства НДЦ исследуются с целью терапии многих заболеваний – например, вирусных или онкологических. Вероятно, в ближайшее время будут исследованы и другие биохимические процессы, идущие с участием НДЦ в качестве аналога фосфатазы (акцептора фосфат-аниона или органических фосфатов).

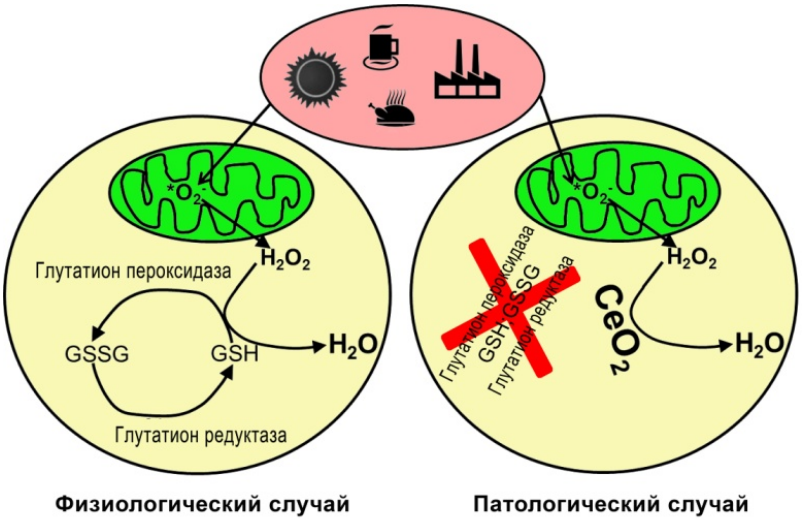


Рис. 4.29. Различные внешние источники (пища, солнечный свет, загрязнение окружающей среды и т.д.) вызывают образование свободных радикалов в клетке (например, H_2O_2). В нормальном физиологическом случае (слева) внутриклеточные механизмы защиты (например, система глутатиона) превращают эти радикалы в безопасные продукты, такие как H_2O. В случае болезни, старости или неблагоприятных внешних факторов этих механизмов может быть недостаточно – в этом случае образуется избыток свободных радикалов, которые провоцируют воспалительные процессы. Наночастицы CeO_2 выполняют те же функции, что и механизмы защиты клетки в каталитических реакциях превращения свободных радикалов в нетоксичные продукты (справа) [80]

Например, для создания новых антидотов при отравлении фосфорорганическими соединениями было бы крайне перспективно исследовать действие НДЦ как реактиватора ацетилхолинэстеразы.

Литература

1. *Kirby A.J.* Die Nachahmung von Enzymen // Angewandte Chemie. 1994. Vol. 106, № 5. P. 573–576.

2. *Kirby A.J.* Enzyme mechanisms, models, and mimics // Angewandte Chemie International Edition in English. 1996. Vol. 35, № 7. P. 706–724.

3. *Breslow R.* Artificial enzymes and enzyme models. New York : John Wiley & Sons, 1986. Vol. 58. P. 1–60.

4. *Schmuck C., Merschky M., Rether C., Geibel B.* Artificial Enzyme Mimics in Supramolecular Chemistry: from Molecules to Nanomaterials / eds. by J.W. Steed and P.A. Gale. Chichester, UK : John Wiley & Sons Ltd, 2012. P. 1447–1496.

5. *Breslow R., Overman L.E.* "Artificial enzyme" combining a metal catalytic group and a hydrophobic binding cavity //Journal of the American Chemical Society. 1970. Vol. 92, № 4. P. 1075–1077.

6. *Manea F., Houillon F.B., Pasquato L., Scrimin P.* Nanozymes: Gold-nanoparticles-based Transphosphorylation Catalysts // Angew. Chem. Int. Ed. 2004. Vol. 43. P. 6165–6169.

7. *Hu X.N., Liu J.B., Hou S., Wen T., Liu W.Q., Zhang K., He W.W., Ji Y.L., Ren H.X., Wang Q., Wu X.C.* Research progress of nanoparticles as enzyme mimetics // Sci China-Phys Mech Astron. 2011. Vol. 54 (10). P. 1749–1756.

8. *Wei H., Wang E.* Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // Chemical Society Reviews. 2013. Vol. 42. P. 6060–6093.

9. *Ormerod R.M.* Solid oxide fuel // Chem. Soc. Rev. 2003. Vol. 32 (1). P. 17–28.

10. *Trovarelli A.* Catalysis by ceria and related materials. London, UK : Imperial College Press, 2005.

11. *Duprez D., Descorne C., Birchem T., Rohart E.* Oxygen storage and mobility on model three-way catalysts // Topics Catal. 2001. Vol. 16 (1–4). P. 49–56.

12. *Janinski P., Suzuki T., Anderson H.U.* Nanocrystalline undoped ceria oxygen sensor // Sens. Actuators B. 2003. Vol. 95 (1–3). P. 73–77.

13. *Tsai Y.Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al.* Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // Nanomedicine. 2007. Vol. 2(3). P. 325–332.

14. *Migani A., Vayssilov G.N., Bromley S.T. et al.* Dramatic reduction of the oxygen vacancy formation energy in ceria particles: a possible key to their remarkable reactivity at the nanoscale // J. Mater. Chem. 2010. Vol. 20. P. 10535–10546.

15. *Wang Z., Quan Z., Lin J.* Remarkable changes in the optical properties of CeO_2 nanocrystals induced by lanthanide ions doping // Inorg. Chem. 2007. Vol. 46, № 13. P. 5237–5242.

16. *Щербаков А.Б., Иванов В.К., Жолобак Н.М., Иванова О.С., Крысанов Е.Ю., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д.* Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения // Биофизика. 2011. Т. 56, № 6. С. 995–1015.

17. *Zhang J., Naka T., Ohara S. et al.* Surface ligand assisted valence change in ceria nanocrystals // Phys. Rev. B. 2011. Vol. 84. P. 045–411.

18. *Tarnuzzer R.W., Colon J., Patil S., Seal S.* Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage // Nano Lett. 2005. Vol. 5 (12). P. 2573–2577.

19. *Heckert E.G., Karakoti A.S., Seal S., Self W.T.* The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria // Biomater. 2008. Vol. 29. P. 2705–2709.

20. *Karakoti A.S., Singh S., Kumar A., Malinska M., Kuchibhatla S.V.N.T., Wozniak K., Self W.T., Seal S.* PEGylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry // JACS. 2009. Vol. 131. P. 14144–14145.

21. *Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W.T.* Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles // Chem. Commun. 2007. P. 1056–1058.

22. *Щербаков А.Б., Иванов В.К., Сирота Т.В., Третьяков Ю.Д.* Ингибирование автоокисления адреналина нанокристаллическим диоксидом церия // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 437, № 2. С. 197–200.

23. *Klochkov V.K., Grigorova A.V., Sedyh O.O., Malyukin Yu.V.* The influence of agglomeration of nanoparticles on their SOD mimetic activity // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 2012. Vol. 409. P. 176–182.

24. *Zhu A., Sun K., Petty H.R.* Titanium doping reduces superoxide dismutase activity, but not oxidase activity, of catalytic CeO_2 nanoparticles // Inorg. Chem. Commun. 2012. Vol. 15. P. 235–237.

25. *McCormack, Rameech, Priscilla Mendez, Swetha Barkam, Craig J. Neal, Soumen Das, and Sudipta Seal.* Inhibition of Nanoceria's Catalytic Activity due to Ce^{3+} Site Specific Interaction with Phosphate Ions. // The Journal of Physical Chemistry C. 2014.

26. *Hirst S.M., Karakoti A.S., Tyler R.D.; Sriranganathan N., Seal S.; Reilly C.M.* Anti-Inflammatory Properties of Cerium Oxide Nanoparticles // Small. 2009. Vol. 5. P. 2848–2856.

27. *Karakoti A., Monteiro-Riviere N.* Nanoceria as Antioxidant // Synthesis and Biomedical Applications. Jom. 2008. Vol. 60. P. 33–37.

28. *Alili L., Sack M., Karakoti A.S., Teuber S., Puschmann K., Hirst S.M., Reilly C.M., Zanger K., Stahl W., Das S. et al.* Combined Cytotoxic and Anti-Invasive Properties of Redox-Active Nanoparticles in Tumor-Stroma Interactions // Biomaterials. 2011. Vol. 32. P. 2918–2929.

29. *Batinić-Haberle, Ines, Júlio S. Rebouças, Ivan Spasojević.* Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential // Antioxidants & redox signaling. 2010. Vol. 13 (6). P. 877–918.

30. *Iranzo Olga.* Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: a balance between different factors // Bioorganic chemistry. 2011. Vol. 39 (2). P. 73–87.

31. *Yu P., Hayes S.A., O'Keefe T.J., O'Keefe M., Stoffer J.O.* The phase stability of cerium species in aqueous systems: II. the Ce(III/IV)-H_2O-H_2O_2/O_2 systems. Equilibrium considerations and Pourbaix diagram calculations // J. Electrochem. Soc. 2006. Vol. 153, is. 1. P. C74–C79.

32. *Manda G., Nechifor M.T., Neagu T-M.* Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies // Curr. Chem. Biol. 2009. Vol. 3. P. 342–366.

33. *Evans M.G., Uri N.* Photo-oxidation of Water by Ceric Ions // Nature. 1950. № 4223. P. 602–603.

34. *Xue Y., Luan Q., Yang D., Yao X., Zhou K.* Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles // J. Phys. Chem. C. 2011. Vol. 115. P. 4433–4438.

35. *Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К., Иванова О.С., Марчевский А.В., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д.* Синтез и антиоксидантная активность биосовместимых водных золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57, № 11. С. 1499–1507.

36. *Babu S., Velez A., Wozniak K., Szydlowska J., Seal S.* Electron paramagnetic study on radical scavenging properties of ceria nanoparticles // Chem. Phys. Lett. 2007. Vol. 442. P. 405–408.

37. *Asati A., Santra S., Kaittanis C., Nath S., Perez J.M.* Oxidase activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles // Angew. Chem. Int. Ed. 2009. Vol. 48. P. 2308–2312.

38. *Pautler, Rachel, Erin Y. Kelly, Po-Jung Jimmy Huang, Jing Cao, Biwu Liu, Juewen Liu.* Attaching DNA to Nanoceria: Regulating Oxidase Activity and Fluorescence Quenching // ACS applied materials & interfaces. 2013. Vol. 5 (15). P. 6820–6825.

39. *IláKim, Moon, Ki SooáPark, and Hyun GyuáPark.* Ultrafast colorimetric detection of nucleic acids based on the inhibition of the oxidase activity of cerium oxide nanoparticles // Chemical Communications. 2014. Vol. 50 (67). P. 9577–9580

40. *Xu, Can, Zhen Liu, Li Wu, Jinsong Ren, Xiaogang Qu.* Nucleoside Triphosphates as Promoters to Enhance Nanoceria Enzyme-like Activity and for Single-Nucleotide Polymorphism Typing // Advanced Functional Materials. 2014. Vol. 24(11). P. 1624–1630.

41. *Peng Y., Chen X., Yi G., Gao Z.* Mechanism of the oxidation of organic dyes in the presence of nanoceria // Chemical Communications. 2011. Vol. 47 (10). P. 2916–2918.

42. *Graham M. Uschi, Michael T. Tseng, Jacek B. Jasinski, Robert A. Yokel, Jason M. Unrine, Burtron H. Davis, Alan K. Dozier et al.* In Vivo Processing of Ceria Nanoparticles inside Liver: Impact on Free-Radical Scavenging Activity and Oxidative Stress // ChemPlusChem. 2014.

43. *Иванов В.К., Щербаков А.Б., Баранчиков А.Е., Козик В.В.* Синтез, структура, физико-химические свойства и биологическая активность нанодисперсного диоксида церия. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2013. 284 с.

44. *Floor M., Kieboom A.P.G., Van Bekkum H.* Redox properties of cerium-exchanged Y-zeolites // Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas. 1989. Vol. 108, № 4. P. 128–132.

45. *Rizkalla E.N., Lajunen L.H.J., Choppin G.R.* Kinetics of the decomposition of hydrogen peroxide in the presence of ethylenediaminetetraacetatocerium (IV) complex // Inorganica chimica acta. 1986. Vol. 119, № 1. P. 93–98.

46. *Heckert E.G., Seal S., Self W.T.* Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth inner transition metal cerium // Environ. Sci. Technol. 2008. Vol. 42 (13). P. 5014–5019.

47. *Pirmohamed T., Dowding J.M., Singh S., Wasserman B., Heckert E., Karakoti A.S., King J.E., Seal S., Self W.T.* Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity // Chem. Commun. 2010. Vol. 46 (16). P. 2736–2738.

48. *Das S. et al.* Cerium oxide nanoparticles: applications and prospects in nanomedicine // Nanomedicine. 2013. Vol. 8, № 9. P. 1483–1508.

49. *Ardon M., Stein G.* The decomposition of hydrogen peroxide by ceric salts. Part II. The action of ceric perchlorate // Journal of the Chemical Society (Resumed). 1956. P. 104–106.

50. *Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis A.* Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // Small. 2008. Vol. 4 (5). P. 552–556.

51. *Ornatska M., Sharpe E., Andreescu D., Andreescu S.* Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes // Analytical chemistry. 2011. Vol. 83 (11). P. 4273–4280.

52. *Lee Seung Soo, Wensi Song, Minjung Cho, Hema L. Puppala, Phuc Nguyen, Huiguang Zhu, Laura Segatori, Vicki L. Colvin.* Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating // ACS nano. 2013. Vol. 7 (11). P. 9693–9703.

53. *Tsai Y.Y., Oca-Cossio J., Lin S.M. et al.* Reactive oxygen species scavenging properties of ZrO_2–CeO_2 solid solution nanoparticles // Nanomedicine. 2008. Vol. 3(5). P. 637–645.

54. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Шапорев А.С. и др.* Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журн. неорган. химии. 2010. Т. 55, № 3. С. 368–373.

55. *Celardo I., De Nicola M., Mandoli C. et al.* Ce^{3+} ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2011. Vol. 5(6). P. 4537–4549.

56. *Иванов В.К., Усатенко А.В., Щербаков А.Б.* Исследование антиоксидантной активности нанокристаллического диоксида церия по отношению к антоцианам // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54, № 10. С. 1596–1601.

57. *Jiao X., Song H., Zhao H., Bai W., Zhang L., Lv Y.* Well-redispersed ceria nanoparticles: Promising peroxidase mimetics for H_2O_2 and glucose detection // Anal. Methods. 2012. Vol. 4. P. 3261–3267.

58. *Ansari A.A., Solanki P.R., Malhotra B.D.* Hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized nanostructured cerium oxide film // J. Biotechnol. 2009. Vol. 142(2). P. 179–184.

59. *Brooks J.L.* Oxidase reactions of tomato anionic peroxidase // Plant Physiol. 1986. Vol. 80(1). P. 130–133.

60. *Mudd J.B., Burris R.H.* Participation of metals in peroxidase-catalyzed oxidations // J. Biol. Chem. 1959. Vol. 234. P. 2774–2777.

61. *Li Xiaohua, Zhujun Zhang, Liang Tao, Yongbo Li, Yun yun Li.* A Chemiluminescence Microarray Based on Catalysis by CeO_2 Nanoparticles and Its Application to Determine the Rate of Removal of Hydrogen Peroxide by Human Erythrocytes.// Applied biochemistry and biotechnology. 2013. Vol. 171 (1). P. 63–71.

62. *Stoianov O.O., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B. et al.* Determination of cerium(III) and cerium(IV) in nanodisperse ceria by chemical methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 59 (2). P. 15.

63. *Linnane A.W., Kios M., Vitetta L.* Healthy aging: regulation of the metabolome by cellular redox modulation and prooxidant signaling systems: the essential roles of superoxide anion and hydrogen peroxide // Biogerontology. 2007. Vol. 8 (5). P. 445–67.

64. *Smith R.A., Murphy M.P.* Mitochondria-targeted antioxidants as therapies // Discov. Med. 2011. Vol. 11. P. 106–114.

65. *Shepel E.A. et al.* Ceria nanoparticles boost activity of aged murine oocytes // Nano Biomedicine and Engineering. 2012. Vol. 4, № 4. P. 188–194.

66. *Courbiere, Blandine, Mélanie Auffan, Raphaël Rollais, Virginie Tassistro, Aurélie Bonnefoy, Alain Botta, Jérôme Rose, Thierry Orsière, Jeanne Perrin.* Ultrastructural

Interactions and Genotoxicity Assay of Cerium Dioxide Nanoparticles on Mouse Oocytes // International Journal of Molecular Sciences. 2013. Vol. 14, № 11. P. 21613–21628.

67. *Stoyanov A.O., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Stoyanova I.V., Chivireva N.A., Antonovich V.P.* Determination of Cerium(III) and Cerium(IV) in Nanodisperse Ceria by Chemical Methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 59, № 2. P. 15–23.

68. *Chane-ching, Jean-yves.* Cerium IV Compound And Method For Its Preparation // European Patent No. EP 0208580. 17 Jan. 1990.

69. *Dowding J.M., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self W.T.* Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (˙NO) // Chem. Commun. 2012. Vol. 48 (40). P. 4896–4898.

70. *Иванов В.К., Щербаков А.Б., Рябоконь И.Г., Усатенко А.В., Жолобак Н.М., Третьяков Ю.Д.* Инактивирование нитроксильного радикала наночастицами диоксида церия // Докл. Акад. наук. 2010. Т. 430, № 5. С. 639–642.

71. *Dowding J.M., Seal S., Self W.T.* Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite ($ONOO^-$) // Drug Delivery and Translational Research. 2013. Vol. 3, is. 4. P. 375–379.

72. *Kuchma M.H., Komanski C.B., Colon J., Teblum A., Masunov A., Alvarado B., Babu S., Seal S., Summy J., Baker C.H.* Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine: Nanotech. Biol. Med. 2010. Vol. 6. P. 738–744.

73. *Dowding, Janet M., Soumen Das, Amit Kumar, Talib Dosani, Rameech McCormack, Ankur Gupta, Thi XT Sayle et al.* Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials // ACS nano. 2013. Vol. 7. P. 4855–4868.

74. *Janos Pavel, Pavel Kuran, Martin Kormunda, Vaclav Stengl, Tomas Matys Grygar, Marek Dosek, Martin Stastny, Jakub Ederer, Vera Pilarova, Lubos Vrtoch.* Cerium dioxide as a new reactive sorbent for fast degradation of parathion methyl and some other organophosphates // Journal of Rare Earths. 2014. Vol. 32 (4). P. 360–370.

75. *Jia W., Andaya A., Leary J.A.* Novel mass spectrometric method for phosphorylation quantification using cerium oxide nanoparticles and tandem mass tags // Anal. Chem. 2012. Vol. 84 (5). P. 2466–2673.

76. *Park E.J., Choi J., Park Y.K., Park K.* Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells // Toxicology. 2008. Vol. 245. P. 90–100.

77. *Niu J.L., Wang K.K., Kolattukudy P.E.* Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor-κB activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Vol. 338. P. 53–61.

78. *Amici C., Belardo G., Rossi A., Santoro M. G.* Activation of Iκb kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 28759–28766.

79. *Celardo I., Pedersen J.Z., Traversa E., Ghibelli L.* Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles // Nanoscale. 2011 Vol. 3(4). P. 1411–1420.

80. *Casals Eudald, Victor Puntes.* La revolución del óxido de cerio // Revista Nano Ciencia y Tecnología. 2013. Vol. 1, № 1. P. 46–52.

5. НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ДИОКСИД ЦЕРИЯ КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Подавляющее большинство живых организмов на Земле в своей жизнедеятельности не может обходиться без потребления кислорода. При этом в результате цепочки реакций одноэлектронного восстановления кислорода в животных и растительных клетках образуются активные формы кислорода (рис. 5.1, табл. 5.1).

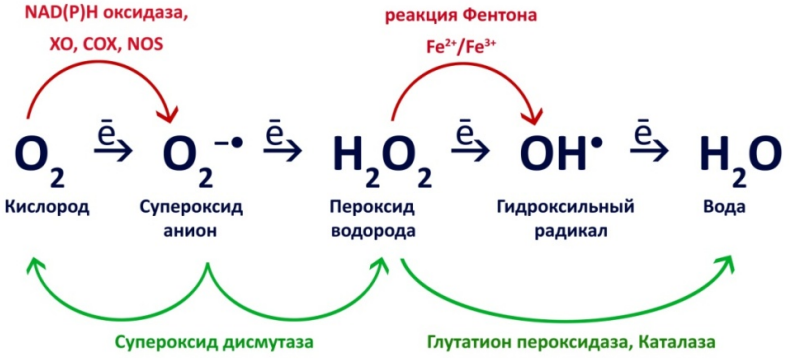


Рис. 5.1. Образование и разрушение основных активных форм кислорода в биологической клетке

NAD(P)H оксидаза, циклооксигеназа (COX), ксантиноксидаза (XO) и синтаза оксида азота (NOS) ответственны за образование супероксид-анионов, часть из которых просачивается из электронной транспортной цепи [1] и повреждает белки, а также может протонироваться с образованием еще более реакционноспособных пероксильных радикалов [2–5]. Супероксид-анионы под действием фермента супероксиддисмутазы (СОД) превращаются в пероксид водорода. В присутствии ионов некоторых переходных металлов (например, железа) пероксид водорода способен вступать в реакции Фентона и Габера–Вейса с образованием высокореактивного гидроксильного радикала. Гидроксильный радикал окисляет практически все органические молекулы – в том числе белки,

нуклеиновые кислоты и другие биополимеры, способен отрывать атом водорода от молекул ненасыщенных жирных кислот и инициировать перекисное окисление липидов. В свою очередь, тот же пероксид водорода под действием ферментов глутатион пероксидазы и каталазы распадается в клетке до нетоксичной воды и кислорода, минуя стадию образования гидроксильного радикала [1, 5].

Таблица 5.1

Клеточный механизм генерации АФК [8]

Тип АФК	Описание
Супероксид-анион ($O_2^{\bullet-}$)	Одноэлектронное восстановленное состояние молекулярного кислорода
	Генерация: формируется как побочный продукт митохондриальной дыхательной цепи и в реакциях, катализируемых оксидазами NAD(P)H или ксантиноксидазой. *Нейтрализация:* • Супероксид-анион подвергается спонтанной дисмутации: $2O_2^{\bullet-} + 2H_2O \rightarrow O_2 + H_2O_2 + 2OH.$ • Супероксид-анион превращается в пероксид водорода посредством СОД, см. реакцию ниже. СОД – сильный антиоксидант, поскольку она деактивирует первую активную форму кислорода, образующуюся во время окислительного стресса. Однако если другие компоненты антиоксидантной системы (каталаза, глутатион-пероксидаза) не работают должным образом, формирование пероксида водорода может усиливать окислительный стресс. *Взаимодействие:* • Может протонироваться с образованием более реакционноспособного пероксильного радикала: $O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}.$ • в биологических системах основные реакции супероксид-аниона – с самим собой (спонтанная дисмутация) или с другими биологическими радикалами, такими как оксид азота (заканчивается формированием токсичного пероксинитрита); • супероксид-анион инактивирует ферменты, содержащие кластеры железо–сера, высвобождая таким образом свободные катионы железа, которые далее участвуют в реакции Фентона, приводящей к формированию гидроксильного радикала; • супероксид-анион инициирует перекисное окисление липидов; • вследствие своей довольно низкой реакционной способности супероксид-анион может оказаться далеко от зоны образования и, таким образом, вызывать окислительный стресс во всей клетке.

Продолжение табл. 5.1

Тип АФК	Описание
Пероксид водорода (H_2O_2)	Двухэлектронное восстановленное состояние молекулярного кислорода
	Генерация: формируется прямым восстановлением молекулярного кислорода и дисмутацией супероксид-аниона, катализируемой супероксид-дисмутазой (СОД): СОД-$M^{(n+1)+}$ + $O_2^{\bullet-}$ → СОД-M^{n+} + O_2, СОД-M^{n+} + $O_2^{\bullet-}$ + $2H^+$ → СОД-$M^{(n+1)+}$ + H_2O_2, где M = Cu (n = 1); Mn (n = 2); Fe (n = 2); Ni (n = 2). *Нейтрализация:* • пероксид водорода быстро превращается в воду при участии каталазы: 2 H_2O_2 → $2H_2O$ + O_2. Каталаза сконцентрирована в пероксисомах, которые расположены в клетках повсеместно; • глутатион-пероксидаза восстанавливает пероксид водорода, передавая энергию глутатиону. Селенсодержащие ферменты также переносят электроны от пероксидов к глутатиону; • пероксиредоксины нейтрализуют пероксид водорода в пределах митохондрий, цитозоля и ядра. *Взаимодействие:* • H_2O_2 расходуется для генерации более токсичных АФК, таких как гидроксил-радикал (реакции Фентона и Габера–Вейса) и хлорноватистая кислота (реакция, катализируемая миелопероксидазой); • H_2O_2 взаимодействует с липидами, белками и нуклеиновыми кислотами. Пероксид водорода растворим в липидах и из-за его структурного подобия воде и сравнительно низкой изначальной реакционной способности может свободно диффундировать в клетку и обратно
Гидроксил-радикал ($OH^{\bullet}$)	Трехэлектронное восстановленное состояние молекулярного кислорода
	Генерация: • формируется в ходе реакции Фентона $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$, Fe^{2+} далее регенерирует в соответствии с реакцией $Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + {}^{\bullet}OOH + H^+$; • также формируется в реакции Габера–Вейса $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$. *Нейтрализация:* • в отличие от супероксид-аниона, который может быть инактивирован СОД, гидроксил-радикал не может разлагаться ферментативным способом, поскольку период полураспада радикала крайне мал. Гидроксил-радикал нейтрализуется за счет взаимодействия с любым окисляющимся соединением

Окончание табл. 5.1

Тип АФК	Описание
Гидроксил-радикал ($OH^{\bullet}$)	Трехэлектронное восстановленное состояние молекулярного кислорода
	Взаимодействия: • гидроксил-радикал и пероксид водорода реагируют в присутствии комплексных соединений железа(III) с образованием супероксид-аниона: $H_2O_2 + OH^{\bullet} \rightarrow H_2O + O_2^{\bullet -} + H^+$. Гидроксил-радикал является чрезвычайно реакционноспособным и атакует большинство молекул, включая углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды и белки
Синглетный кислород ($^1O_2$)	Возбужденное состояние молекулярного кислорода
	Синглетный кислород – общее название, используемое для двух метастабильных состояний молекулярного кислорода с более высокой энергией, чем стандартное состояние молекулярного кислорода (триплетный кислород). Теория молекулярных орбиталей предсказывает существование трех низколежащих возбуждённых синглетных состояний – $O_2(a^1\Delta_g)$, $O_2(a'^1\Delta'_g)$ и $O_2(b_1\Sigma_g^+)$. Эти электронные состояния отличаются только спином и занятостью вырожденных разрыхляющих πg-орбиталей. Состояния $O_2(a^1\Delta_g)$ и $O_2(a'^1\Delta'_g)$ вырождены. Состояние $O_2(b^1\Sigma_g^+)$ очень короткоживущее и быстро релаксирующее в более низколежащее возбуждённое состояние $O_2(a^1\Delta_g)$. Поэтому обычно именно $O_2(a^1\Delta_g)$ называют синглетным кислородом. *Взаимодействие:* • синглетный кислород реагирует с белками и липидами. Вопреки общим представлениям синглетный кислород может быть весьма долгоживущим и диффундировать на значительные расстояния, пересекая клеточную мембрану и проникая во внеклеточную среду. *Нейтрализация:* излучательная релаксация (1270 нм)

Необходимый уровень активных форм кислорода в организме регулируют ферменты; в случае дисбаланса между продукцией АФК и концентрацией ферментов возникает окислительный стресс (ОС). Неферментативные компоненты антиоксидантной системы (витамины А и Е, некоторые белки, мочевая кислота) обеспечивают еще одну линию защиты организма от АФК; дисфункция любого из них также может привести к окислительному стрессу. ОС может возникнуть под влиянием психологических стрессов, экзогенных и эндогенных интоксикаций, техногенных загрязнений окружающей среды и ионизирующего излучения (последнее, в частности, приводит к образованию

гидроксильных радикалов в результате радиолиза воды в клетке). 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, таких как диабетическая ретинопатия, макулярная и ретинальная дегенерация (рис. 5.2).



Рис. 5.2. Заболевания, ассоциированные с АФК и окислительным стрессом

Наконец, при старении любого здорового организма может возникать возрастной ОС – за счет снижения активности естественной антиоксидантной (ферментативной) системы, а также в связи с увеличением концентрации продуктов перекисного окисления липидов и сво-

бодных радикалов, образованных, прежде всего, за счет модифицирующего воздействия липоперекисей [6, 7]. При нарушении защитной (антиоксидантной) системы организма или при значительном повышении уровня экзогенных АФК необходим сторонний регулятор, способный выполнять функцию фермента или антиоксиданта. Как показано в гл. 4, нанокристаллический диоксид церия может выступать в роли оксидоредуктаз – энзимов, регулирующих окислительно-восстановительные процессы в биологических системах. Очевидно, НДЦ должен предохранять клетки от разрушения под действием неблагоприятных внутренних и внешних факторов, вызывающих ОС.

Основные пути отклика живой клетки на экзогенные и эндогенные активные формы кислорода представлены на рис. 5.3.

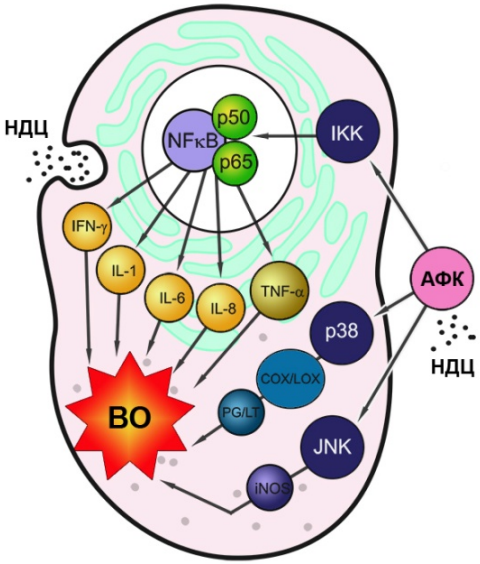


Рис. 5.3. Активные формы кислорода (АФК), наночастицы диоксида церия (НДЦ) и воспалительный отклик (ВО) в клетке

Помимо непосредственного окисления и разрушения форменных элементов, АФК воздействует на редокс-чувствительные киназы, такие как IKK, p38 и JNK, что запускает целый каскад биохимических реакций, приводящих к воспалительному отклику и гибели клетки.

IKK активизирует транскрипционный фактор NF-κB, приводящий к синтезу ряда воспалительных цитокинов, среди которых семейство интерлейкинов (IL), фактор некроза опухоли (TNF-α), γ-интерферон, активизирующий макрофаги, и т.д. Стресс-киназа p38 активирует каскад арахидоновой кислоты, которая высвобождается из фосфолипидов мембраны клетки в процессе перекисного окисления липидов (рис. 5.3). При этом происходит активация циклооксигеназы (COX) с последующим синтезом воспалительных простагландинов (PG) и липооксигеназы (LOX) с последующим синтезом лейко-триенов (LT), медиаторов аллергической реакции немедленного типа. Протеинкиназа JNK активирует синтазу оксида азота (iNOS), что приводит к образованию важного медиатора NO. Помимо реакции на АФК, все эти каскады сами по себе выполняют прооксидантные функции, при этом воспалительный отклик многократно усиливается. Как показано многочисленными исследованиями, нанокристаллический диоксид церия регулирует концентрацию и поведение АФК, а также снижает активность iNOS за счет инактивирования нитрозильного радикала. Более того, диоксид церия способен регулировать сигнальные пути всех киназ.

Применение нанокристаллического диоксида церия для защиты от ОС достаточно подробно рассмотрено в обзорах [9, 10]. Показано, что наночастицы диоксида церия способны участвовать в биологических процессах в качестве регулятора АФК и акцептора свободных радикалов как *in vitro*, так и *in vivo*, вследствие присущей им кислородной нестехиометрии [11]. В частности, в работе [12] синтезировали наночастицы CeO_2, в которых кислородную стехиометрию регулировали путём допирования Sm^{3+}. Было обнаружено, что защитное действие данных наночастиц против окситоза лейкоцитов прямо пропорционально содержанию в них трехвалентного церия. Интересно, что сами по себе соли Ce^{3+} не обладают антиоксидантной активностью. Данный факт впервые продемонстрировали авторы [13]. Для этого в клетках гиппокампа мыши HT22 искусственно вызывали окислительный стресс введением глутаминовой кислоты. Наночастицы CeO_2 синтезировали гидролизом нитрата церия в присутствии гексаметилентетрамина (ГМТА), периодически отбирая аликвоты и оценивая изменение защитного действия реакционных смесей по мере формирования CeO_2. На рис. 5.4 показана зависимость защитного действия смешанного раствора нитрата церия и ГМТА в ходе образования на-

ночастиц CeO_2. Для сравнения приведены данные для нитрата церия без ГМТА (сам ГМТА в данных условиях эффекта не проявлял).

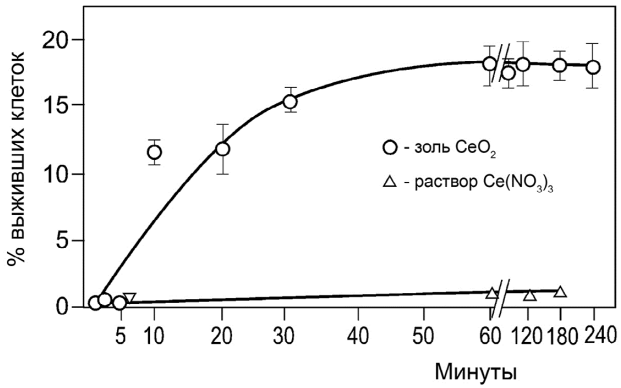


Рис. 5.4. Зависимость защитного действия наночастиц диоксида церия в процессе получения по отношению к клеткам HT22 (по отношению к контролю, обработанному только глутаминовой кислотой). Для сравнения – защитное действие раствора нитрата церия той же концентрации [13]

Авторы [13] впервые *in vivo* показали, что наночастицы CeO_2, вводимые внутривенно, благодаря своим антиоксидантным свойствам снижают миокардиальный окислительный стресс, ЭР-стресс (*endoplasmic reticulum stress*) и воспалительные процессы у мышей и, таким образом, защищают против прогрессирования сердечной дисфункции. Не менее эффективны золи нанодисперсного диоксида церия и в случае экзогенных источников АФК.

5.1. Окислительный стресс за счет введения экзогенных АФК

Пероксид водорода относится к АФК, его избыток способен повреждать биомолекулы и клеточные мембраны; концентрация H_2O_2 в цитоплазме выше 1 мкМ вызывает состояние окислительного стресса и приводит к гибели клеток. В работе [14] показано, что благодаря введению нанодисперсного диоксида церия (d = 3–5 нм) в культуру нейронов мыши гибель клеток после обработки H_2O_2 снижается примерно в три раза. В соответствии с полученными результатами введе-

ние CeO_2 способствует значительному уменьшению скорости отмирания клеток в колониях вследствие ярко выраженной способности диоксида церия связывать свободные радикалы. В работе [15] изучали способность наночастиц диоксида церия (размером 16,0±2,4 нм) и платины (1,9±0,2 нм) замедлять апоптоз клеток фибросаркомы молочной железы человека HT-1080 под действием пероксида водорода. Показано, что оба вида частиц проявляют свойства супероксиддисмутазы и препятствуют апоптозу клеток под действием АФК, что определено по активации каспазы-3. При этом активность частиц CeO_2 проявлялась в гораздо более низких концентрациях.

Нами [10] для проведения сходных исследований были использованы мышиные фибробласты L929 и фибробластоподобные клетки почек зеленой мартышки VERO, а также золи CeO_2 с размером частиц 1–2 нм, стабилизированные цитратом натрия. Показано, что если пероксид водорода в концентрации 800 мМ практически полностью уничтожал монослой клеток в культуре VERO, то при добавлении в эту систему CeO_2 выживаемость клеток, обработанных таким же количеством пероксида водорода, значительно повышалась. В концентрации 2,3 мг/мл нанокристаллический диоксид церия полностью защищал клетки от окислительного стресса и гибели, вызванной пероксидом водорода (рис. 5.5).

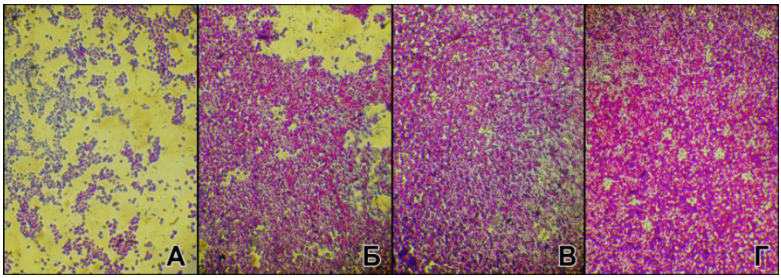


Рис. 5.5. Культура клеток VERO, обработанная: *А* – 0,8 М H_2O_2; *Б* – 0,8 М H_2O_2 + 0,29 мг/мл CeO_2; *В* – 0,8 М H_2O_2 + 1,17 мг/мл CeO_2; *Г* – 0,8 М H_2O_2 + 2,3 мг/мл CeO_2 [10]

Аналогичная картина наблюдалась и для мышиных фибробластов (клеточная линия L929). Исходные клетки, а также клетки, обработанные по отдельности CeO_2 пероксидом водорода и обоими реагентами вместе, окрасили люминесцентными красителями. Один из них (Hoechst 33442) проникает через неповрежденные мембраны и окрашивает ядра живых клеток в зелено-синий цвет. Другой (propidium

iodide) проникает только в клетки с поврежденными мембранами и окрашивает ядра погибших клеток в оранжевый цвет. По пять случайных микрофотографий каждого образца в одинаковом масштабе с одинаковым количеством клеток раскладывали по каналам люминесценции propidium iodide и Hoechst 33442 и оценивали интенсивность окраски кадра попиксельно в диапазоне 0–255. Сравнительный анализ экспериментальных данных представлен на рис. 5.6. Из рисунка видно, что количество живых клеток (окраска по каналу Hoechst 33442) возрастает после обработки диоксидом церия как в условиях окислительного стресса, так и в контроле. Более того, количество жизнеспособных клеток в контроле культуры меньше, чем в культуре, обработанной наночастицами CeO_2, как в условиях окислительного стресса, так и без введения пероксида водорода.

В одной из первых работ, посвященных биологической активности нанодисперсного CeO_2 [17], показано, что наночастицы диоксида церия защищают от пероксида водорода фоторецепторные клетки крыс *in vitro*. Клетки инкубировали в присутствии разных концентраций CeO_2 (1, 3, 5, 10 или 20 нМ) в течение 0,5, 12, 24 или 96 ч, после чего в культуру вводили 1 мМ H_2O_2. Концентрацию АФК оценивали по флуоресценции 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетата. Показано, что наночастицы диоксида церия эффективны во всем диапазоне исследованных концентраций при экспозиции 12 ч и более.

Хорошо известно, что окислительный стресс вызывает повреждения эндотелиальных клеток (ECs), что, в свою очередь, вызывает сердечно-сосудистые заболевания. В работе [18] авторы исследовали защитный эффект и основные механизмы действия НДЦ при окислительном повреждении ECs. Регистрировали жизнеспособность клетки, выделение лактатдегидрогеназы, поглощение частиц клетокой и внутриклеточную локализацию, а также уровни АФК, механизм эндоцитоза, апоптоз клетки и митохондриальной мембранный потенциал. Результаты продемонстрировали, что НДЦ не является цитотоксичным по отношению к ECs, но при этом способен предотвращать повреждение клеток, вызванное H_2O_2. НДЦ может поглощаться клетками с помощью кавеолярного и клатрин-зависимого эндоцитоза и распределяться по всей цитоплазме. Поглощенный НДЦ эффективно нивелировал избыток АФК, вызванный H_2O_2. Также предварительная обработка НДЦ значительно снижала апоптоз (рис. 5.7).

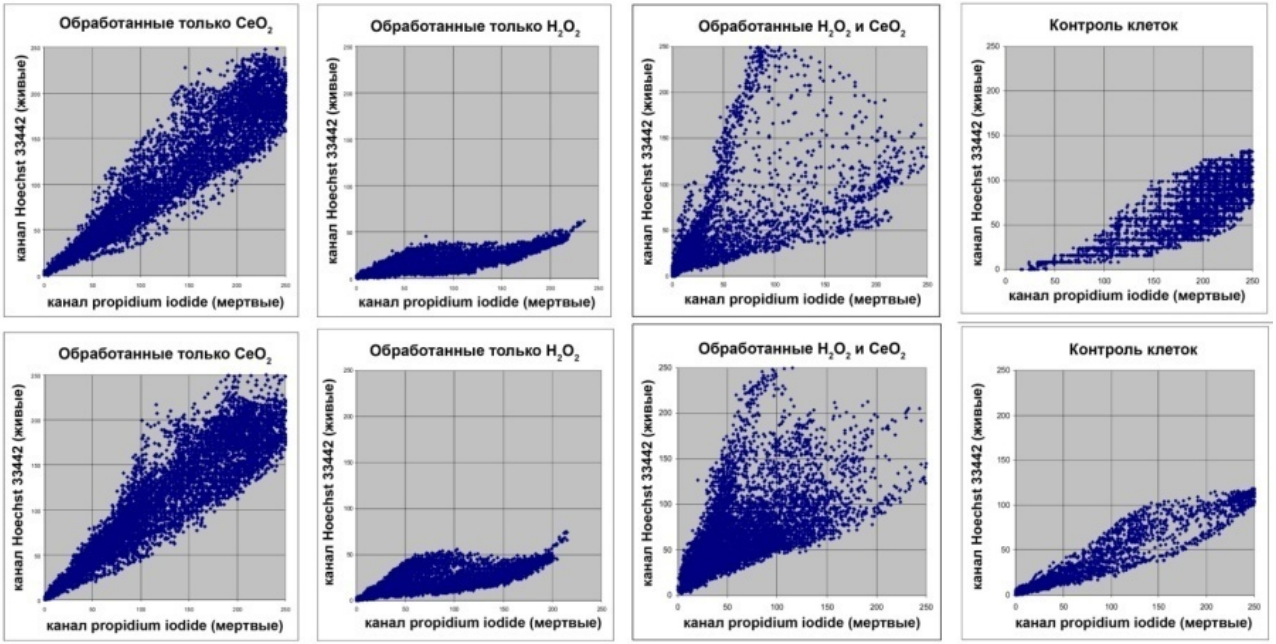


Рис. 5.6. Зависимость интенсивности люминесценции клеток мышиных фибробластов от обработки наночастицами диоксида церия по каналам Propidium iodide и Hoechst 33442 в контроле и в условиях окислительного стресса [16]

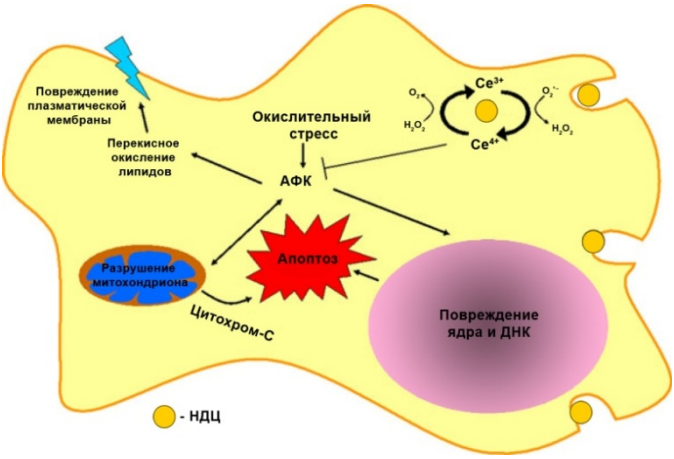


Рис. 5.7. Механизм защитного действия НДЦ
против апоптоза эндотелиальных клеток [18]

В работе [19] на примере первичных кортикальных клеток авторы исследовали в условиях окислительного стресса антиапоптическое действие НДЦ. Культуру нейронов обрабатывали наночастицами CeO_2 (размер 7-10 нм, концентрация 25 нМ) и пероксидом водорода (50 мкМ) и регистрировали значение потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi m$). Было показано, что H_2O_2 нарушает $\Delta\psi m$, а применение НДЦ в условиях окислительного стресса поддерживает митохондриальный потенциал на уровне контроля. Авторы предполагают, что данный факт (а также восстановление соотношения $NADH/NAD^+$ и уровня АТФ в клетке) лежит в основе антиапоптической активности НДЦ.

Также антиапоптический эффект НДЦ изучали на примере панкреатических β-клеток [20]. Сахарный диабет 1-го типа – нарушение обмена веществ, вызванного повреждением панкреатических β-клеток главным образом из-за окислительного стресса и связанного с ним апоптоза. При этом может быть показана трансплантация островков Лангерганса, но данная процедура осложнена гибелью островков в процессе манипуляций, что связано с окислительным стрессом. Экспонирование островков *in vitro* с H_2O_2 (50 мкМ, 2 ч) приводило к образованию АФК и апоптозу клеток. Предварительная обработка наночастицами CeO_2 и/или Y_2O_3 снижала образование АФК и предотвра-

щала апоптоз, при этом возрастала выживаемость клеток, а также выработка АТФ и секреция инсулина под действием глюкозы. Авторы утверждают, что такая комбинация может защитить панкреатические β-клетки от апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

В работе [21] показано, что наночастицы диоксида церия, допированные TiO_2 (размером 15-20 нм), обладают каталазоподобной и супероксиддисмутазоподобной активностью и также способны купировать апоптоз клеток под действием пероксида водорода (см. гл. 4). Аналогичный защитный эффект наблюдался при использовании вместо пероксида водорода органических перекисей, например, гидроперекиси трет-бутила (ГТБ). Как известно, ГТБ повышает концентрацию внутриклеточных АФК [22]. В работе [23] окислительный стресс моделировали на клетках яичника китайского хомяка CHO-K1 *in vitro*. С помощью МТТ-теста показано, что обработка 1 мМ ГТБ увеличивает гибель клеток по сравнению с контролем (83%, $p < 0{,}05$), при этом обработка клеток 0,125 мМ раствором наночастиц диоксида церия (3 нм, стабилизатор – ПЭГ) значительно повышает жизнеспособность клеток (113%, $p < 0{,}05$).

5.2. Окислительный стресс при культивировании клеток *in vitro*

При культивировании *in vitro* клетки находятся в состоянии перманентного окислительного стресса. Например, кардиальные прогениторные клетки (CPC) являются многообещающим источником для кардиальной регенеративной медицины. К сожалению, десятилетия интенсивных исследований не позволили определить протоколы культивирования клеток CPC и сохранения их регенеративного потенциала *in vitro*, поскольку эти клетки требуют микроокружения, максимально приближенного к естественным условиям *in vivo*. Главным требованием к такому микроокружению является необходимость поддержания уровня АФК в пределах физиологических уровней. Авторы [24, 25] показали, что диоксид церия улучшает условия культивирования клеток CPC. При экспозиции в течение 24 ч наночастицы диоксида церия (5, 10, и 50 мкг/мл) не влияли на рост и функционирование CPC, но при этом могли защищать клетки от цитотоксического действия H_2O_2 в течение по крайней мере 7 дней; эти исследования подтвержда-

ют большой потенциал НДЦ для культивирования клеток *in vitro* и снижения окислительного стресса, вызванного АФК.

Запатентован способ стимулирования пролиферации стволовых клеток с помощью наночастиц CeO_2 размером 3–20 нм [26]; сферические частицы CeO_2 размером 10 нм обеспечили значительное (более 50%) увеличение пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (MSC) мышей и человека. В работе [27] кардиальные (CSC) и MSC клетки мышей 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 пролиферация и рост стволовых клеток на подложке, содержащей наночастицы CeO_2, протекают гораздо лучше, чем на ненаполненной полимерной подложке или на подложке, содержащей другой оксидный наполнитель (рис. 5.8).

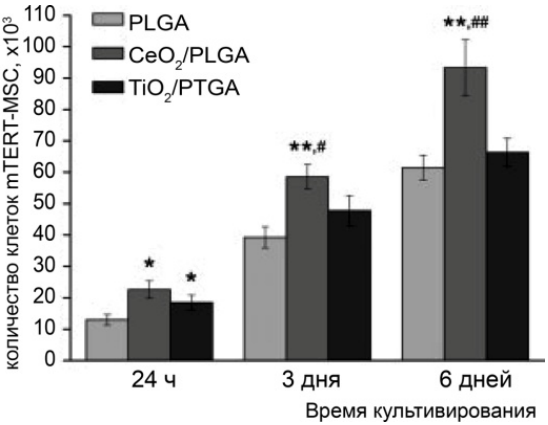


Рис. 5.8. Зависимость количества мезенхимальных клеток от наличия наполнителя в матрице из поли- (D,L-молочной-со-гликолевой) кислоты (PLGA) при различном времени культивирования. Начальная концентрация 15×10^3 клеток на 1 см^2. $^{*}p < 0{,}05$ и $^{**}p < 0{,}005$ по сравнению с контролем (PLGA). $\#\, p < 0{,}05$ и $\#\#\, p < 0{,}005$ по сравнению с образцом TiO_2/PLGA [27]

Приведенные в [28, 29] данные свидетельствуют о том, что введение наночастиц CeO_2 значительно повышает жизнеспособность целого ряда клеток головного мозга (рис. 5.9), включая астроциты, нейроны, микроглиальные клетки и олигодендроциты. Было показано, что

культуры указанных клеток в присутствии CeO_2 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 (см. также § 8.4). Отмечается, что использование микрокристаллического диоксида церия, а также нанокристаллических порошков оксидов других металлов (включая празеодим, лантан, титан и рутений) не позволяет добиться подобного эффекта.

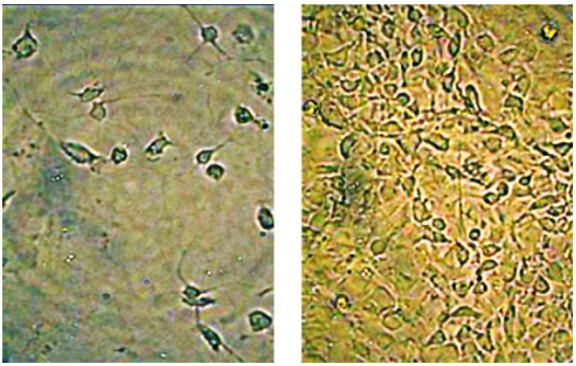


Рис. 5.9. Оптическая микрофотография культуры органотипических клеток мозга. Слева: контроль на 37-й день культивирования *in vitro*. Справа: клетки на 37-й день культивирования *in vitro*, которые на 10-й день были обработаны 10 нМ диоксида церия. Справа наблюдается сплошной слой астроцитов с действующими нейронами [28, 29]

В работе [30] синтезировали НДЦ, стабилизированный ПЭГ (гидродинамический диаметр частиц 250,6 и 153,3 нм соответственно, ζ-потенциал минус 7,86 мВ и минус 10.4 мВ). МТТ тест с использованием эпидермальных клеток человека (А431) показал, что частицы нетоксичны во всём диапазоне концентраций, а тест с 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетатом показал значительное снижение уровня АФК в культуре клеток.

В работе [31] на примере нейроноподобных клеток PC12 впервые изучены механизмы антиоксидантного действия НДЦ на генном уровне с помощью количественного метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-PCR). Через три дня после обработки клеток НДЦ было оценено состояние 86 генов, ответственных за

антиоксидантную защиту, метаболизм АФК и кодирование транспортеров кислорода.

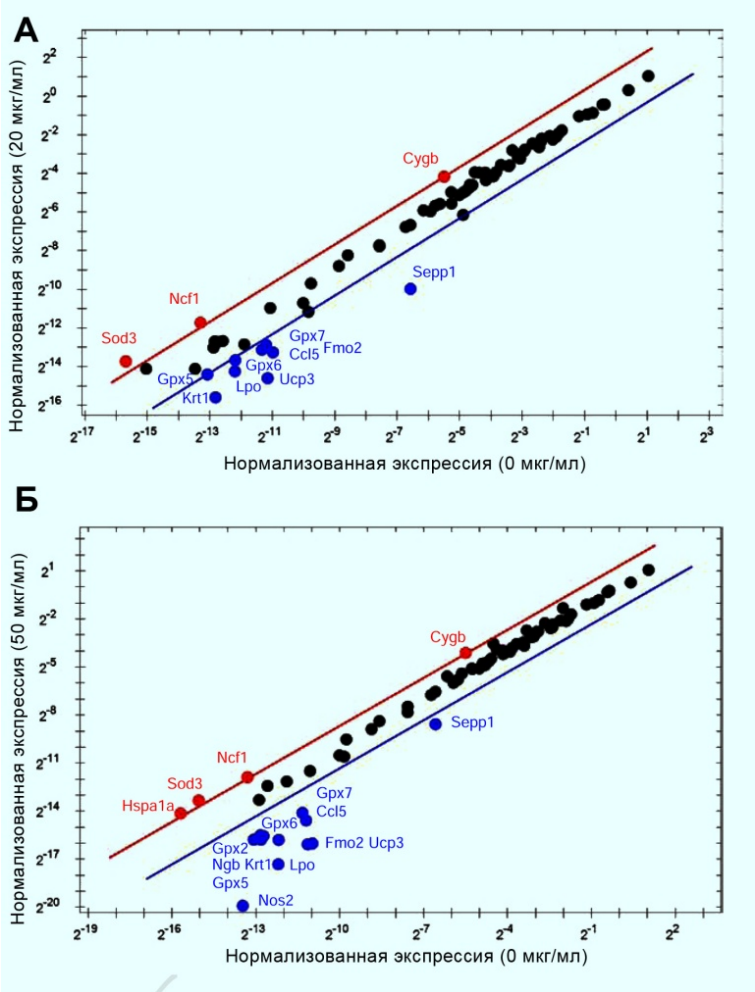


Рис. 5.10. Диаграммы рассеяния, показывающие прямое и обратное регулирование проанализированных генов в клетках PC12 после обработки 20 мкг/мл (А) и 50 мкг/мл (Б) НДЦ относительно контроля культуры (НДЦ = 0 мкг/мл) [31]

В результате исследований показано, что НДЦ действительно выступает в роли экзогенного инактиватора АФК. Нанокристаллический диоксид церия является модулятором генов, участвующих в естественной защите клетки, фактором снижения экспрессии генов, ответственных за воспалительные процессы, а также фактором повышения экспрессии генов, ответственных за нейропротекторные процессы (рис. 5.10).

Авторы [32] исследовали влияние состава буферного раствора, используемого при культивировании клеток, на антиоксидантные свойства НДЦ против окислительного повреждения ДНК. Показано, что стандартный ТРИС-буфер и сульфатные системы не влияют на защитные свойства НДЦ, тогда как фосфатный буфер существенно снижал способность наночастиц диоксида церия связывать активные формы кислорода. Очевидно, фосфат церия, формирующийся на поверхности наночастиц, гораздо хуже участвует в редокс-процессах и ингибирует взаимодействие ионов церия с АФК. Данный факт следует принимать во внимание при выборе среды культивирования при экспериментах с НДЦ.

5.3. Окислительный стресс, возникающий при введении экзогенных токсичных веществ

Многие токсины (например, содержащиеся в экстракте табачного дыма) в организме или в условиях *in vitro* вызывают отклик по механизму окислительного стресса. Авторами [33] было показано, что предварительная обработка кардиомиоцитов крыс H9c2 наночастицами CeO_2 (10 нМ, за 24 ч до внесения 10% экстракта табачного дыма) повышает выживаемость клеток в культуре. Биохимические исследования показали, что наночастицы подавляют фосфорилирование IκBα, снижая транслокацию субъединицы p65, вызванную активированием фактора NF-κB. Помимо этого, в клетках, обработанных наночастицами диоксида церия, понижен уровень интерлейкинов (IL)-1β, IL-6, фактора некроза опухоли TNF-α и синтазы окиси азота (iNOS).

Монокроталин – растительный пирролизидиновый алкалоид, который вызывает окислительное веноокклюзивное заболевание печени. Действие монокроталина может быть купировано применением антиоксидантов и акцепторов свободных радикалов, например глутатиона. В работе [33] *in vivo* было показано, что внутрибрюшинное введение

нанокристаллического диоксида церия даже в очень низких дозах (0,00001 мг/кг веса) снижает окислительный стресс в печени самцов крыс (Sprague Dawley), вызванный монокроталином (МСТ, 10 мг/кг веса), и регулирует содержание общего глутатиона, а также энзиматическую активность глутатион-редуктазы, глутатион-пероксидазы, глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы и каталазы (табл. 5.2). Таким образом, показаны гепатопротекторные свойства диоксида церия при окислительном повреждении печени.

Таблица 5.2

Изменение цитозольной и митохондриальной активности глутатион-редуктазы (GR), глутатиона (GSH), глутатион-S-трансферазы (GST) и глутатион-пероксидазы (GPX) в печени крыс под действием монокроталина (МСТ), диоксида церия (CeO_2) и при их совместном применении

Группа	GR, нмоль/мин/мл	GSH, мкм/мл	GST, нмоль/мин/мл	GPX, нмоль/мин/мл
Контроль	507,8 ± 27,48	5,40 ± 0,59	15,66 ± 1,55	129,4 ± 17,42
CeO_2	572,9 ± 26,06	5,49 ± 0,72	16,85 ± 1,55	340,9 ± 17,93
МСТ	115,5 ± 4,6	1,34 ± 0,099	1,31 ± 0,35	27,12 ± 1,01
МСТ + CeO_2	489,6 ± 19,98	6,34 ± 0,20	13,9 ± 2,5	113,1 ± 16,04

Глутаминовая кислота – один из наиболее изученных прооксидантов для клеточной линии HT22. Как уже отмечалось выше, в пионерской работе [13] было показано, что наночастицы диоксида церия защищают клетки от гибели в результате окситоза (апоптоза, вызванного окислительным стрессом). Авторы [35] исследовали активность наночастиц CeO_2 (частицы 3,7 нм, стабилизированные лецитином) против окислительного стресса в клетках млекопитающих, возникающего под действием гидрохинона. Частицы вводили в βTC-tet клетки инсулиномы крыс и определяли концентрацию свободных радикалов. Полученные результаты свидетельствуют, что в присутствии наночастиц концентрация свободных радикалов снижается до первоначального уровня; кроме того, показано, что CeO_2 значительно повышает выживаемость клеток в условиях окислительного стресса.

Пестицид Paraquat вызывает гибель насекомых вследствие образования свободных радикалов и широко используется в биологии для моделирования окислительного стресса. На примере плодовой мушки *D. melanogaster* было показано [36], что наночастицы диоксида церия купируют токсическое действие пестицида. Исследования проводили,

добавляя 1 и 10 мкМ CeO_2 непосредственно в пищу мушкам в течение 21 дня, после чего колонию на 3 ч переносили на фильтровальную бумагу, пропитанную 10 мМ пестицида (LD_{50}) в 5%-ном растворе сахарозы. Из рис. 5.11 видно, что Paraquat быстро уничтожил 80% контрольной колонии мушек. Однако в группе, получавшей 10 мкМ диоксида церия, через 24 ч выжила почти половина особей. Более того, окислительный стресс, вызванный пестицидом, формирует у насекомых снижение моторной функции по схеме развития болезни Паркинсона. В работе показано, что НДЦ улучшают моторику у *D. melanogaster* и поддерживают нормальный геотаксис.

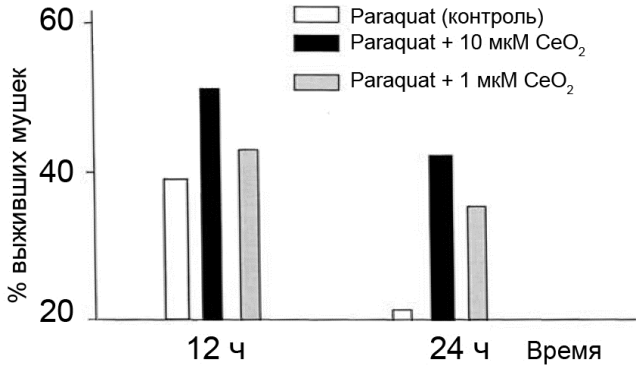


Рис. 5.11. Зависимость доли выживших мушек *D. melanogaster* (колонии по 100 особей) после воздействия пестицида Paraquat и НДЦ [36]

Воспалительный отклик в организме при инфекционных заболеваниях связан с токсинами, продуцируемыми микроорганизмами. Например, бактерии синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) производит токсин пиоцианин, который стимулирует образование АФК в клетке и вызывает ее повреждение по механизму окислительного стресса. В работе [37] показано, что с помощью наночастиц диоксида церия можно контролировать протекание инфекционных заболеваний.

В работе [38] изучали защитное действие НДЦ в условиях токсического стресса *in vivo*, вызванного введением тетрахлорметана (CCl_4). Мышам вводили еженедельно в течение 2 или 5 недель НДЦ в количестве 0,5 мг/кг веса перорально (PO), внутривенно (IV) или интраперитонеально (IP). Было показано, что максимальное накопление наблюдалось при IV или IP введении, при этом НДЦ накапливался

преимущественно в селезёнке, затем по концентрации наночастиц шла печень, лёгкие и почки. Во всех случаях НДЦ удалялся из организма с калом, быстрее всего при РО – в течение 24 ч мыши выделяли более 95% НДЦ. При всех способах введения НДЦ не показал явной токсичности, однако индексы лейкоцитарной формулы были повышены в случаях IV и IP. Авторами было показано, что НДЦ способен снижать гепатотоксичное действие тетрахлорметана подобно действию N-ацетилцистеина, который стандартно используется для снижения окислительного стресса. Авторы делают вывод, что накопленный в тканях НДЦ может уменьшать уровень АФК и уменьшать окислительный стресс, вызванный токсинами.

5.4. Окислительный стресс при повреждении тканей

Механические или термические травмы вызывают целый каскад биохимических реакций, при которых образуется большое количество свободных радикалов и активных форм кислорода. В работе [39] смешанные органотипические культуры клеток мозга были травмированы *in vitro*. На рис. 5.12 показано действие наночастиц CeO_2 на травмированные клетки мозга. Как следует из представленных данных, в присутствии CeO_2 жизнеспособность нейронов существенно возрастает; таким образом, наночастицы диоксида церия могут выполнять как профилактическую, так и терапевтическую функцию защиты клеток головного мозга от окислительного стресса, вызванного травмой. В обзорных работах [28, 40] авторы также отмечают перспективы использования нанокристаллического диоксида церия для лечения нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотрофического бокового склероза, рассеянного склероза, болезни Хантингтона и пр.

После гибели нейрона в системе остается характерный энзим – нейрон-специфическая енолаза (NSE). На рис. 5.13 показан процент выделения NSE в культуру ткани от общего количества енолазы в культуре (в том числе в живых нейронах). Массовая гибель нейронов и максимальное образование NSE наблюдается на 20–26-й день; на 30-й день в системе не остается живых нейронов. При введении наночастиц диоксида церия содержание NSE в среде не повышается (остается на базовом уровне), что указывает на выживание всех нейронов.

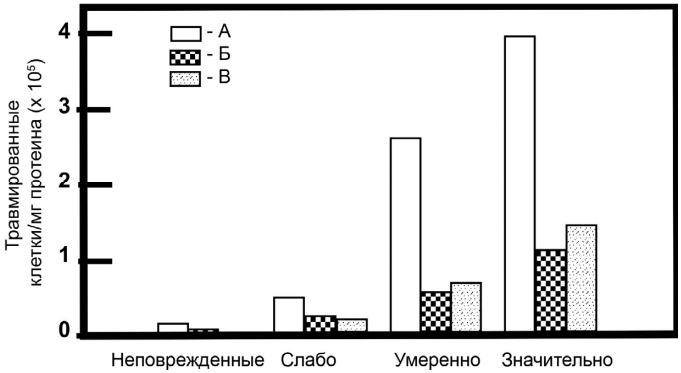


Рис. 5.12. Гибель неповрежденных, а также слабо, умеренно и значительно повреждённых нейронов мозга в культурах, обработанных наночастицами диоксида церия и в контрольных экспериментах. По оси абсцисс – степень травмирования. *А* – контроль; *Б* – травмирование через 10 дней *in vitro* после внесения 10 нМ наночастиц CeO_2; *В* – внесение 10 нМ наночастиц CeO_2 после травмирования [39]

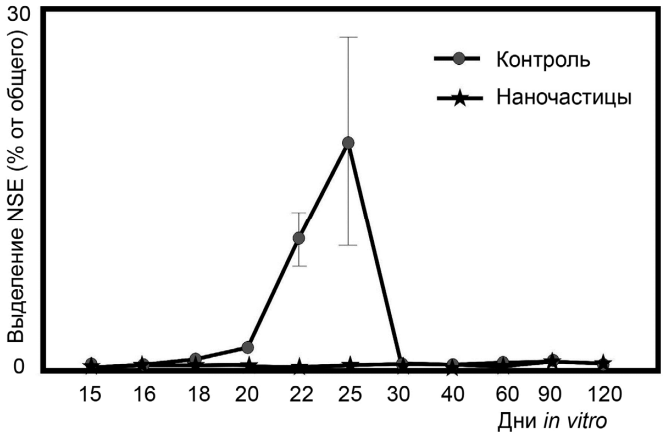


Рис. 5.13. Количество енолазы (NSE) в среде культивирования нейронов в присутствии и в отсутствии НДЦ [39]

Единичная доза наночастиц диоксида церия (синтезированных микроэмульсионным способом, размер 3–5 нм) в наномолярной концентрации защищает нейроны и способствует восстановлению их сигнальных функций в модели травмы спинного мозга [14]. Предпо-

лагается, что использование диоксида церия в сочетании с другими антиоксидантами может смягчить последствия травм позвоночника.

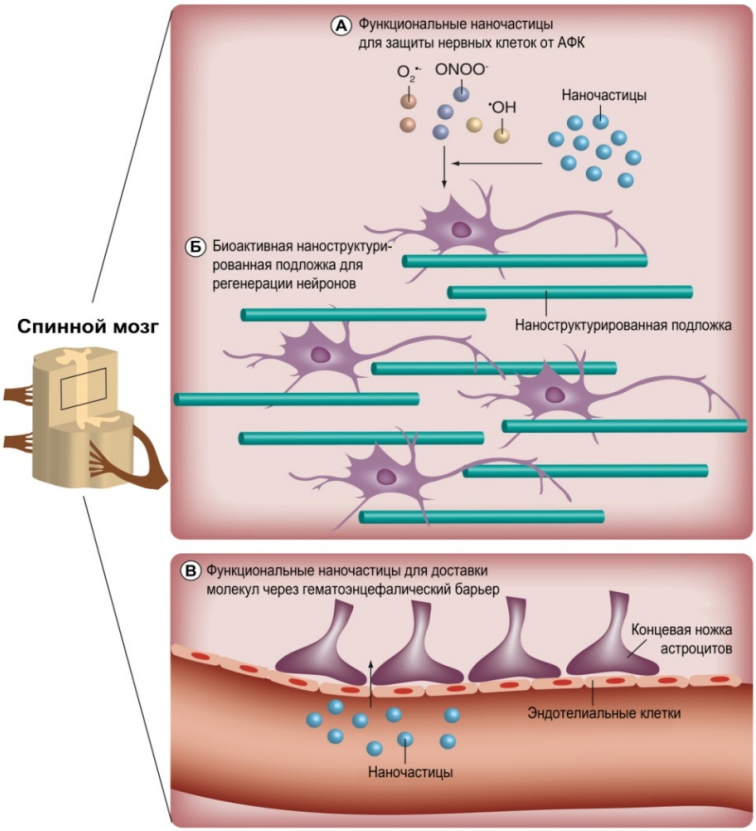


Рис. 5.14. Наночастицы в клинической неврологии [41, 42]. Нанотехнология может ограничить и/или повернуть вспять нейропатологические процессы на молекулярном уровне – либо упростить или улучшить другие терапевтические методы. *А* – Наночастицы, защищающие от свободных радикалов и АФК, которые образуются при травмировании и после него (например, за счет вторичных механизмов повреждения центральной нервной системы). *Б* – Разработка и использование наноструктурированных подложек, которые выполняют роль внеклеточной матрицы и обеспечивают физическую и/или биоактивную среду для регенерации нервов. *В* – Наночастицы для транспортировки лекарств и малых молекул через гематоэнцефалический барьер

В работе [41] описаны основные направления использования нанотехнологий при травмах позвоночника. Варианты применения наночастиц включают (рис. 5.14): А) защиту от свободных радикалов и АФК, которые образуются при/после травмирования; Б) функцию подложки, которая выполняет роль внеклеточной матрицы и обеспечивает физическую и/или биоактивную среду для невральной регенерации; В) транспортировку лекарств и малых молекул через гематоэнцефалический барьер. Авторы подтверждают высокий потенциал НДЦ в данном направлении.

Травматическое повреждение мозга ведёт к нарушению поведенческих и когнитивных функций. В работе [43] изучали влияние НДЦ на последствия повреждения мозга животных *in vivo*. У крыс Long-Evans вызывали травму мозга и через 30 мин внутривенно вводили НДЦ в концентрации 0.0 (контроль носителя), 0,05 мкг/г, 0,50 мкг/г и 5,0 мкг/г. После травмы через 1–5 дней исследовали моторную функцию с использованием задачи рычажных весов и через 11–15 дней – когнитивную функцию с использованием водного лабиринта Морриса. Во всех случаях введение НДЦ демонстрировало зависимость улучшения состояния крыс с повреждённым мозгом от использованной дозы. Полученные результаты показали, что НДЦ может быть перспективным для лечения дисфункций, вызванных повреждением мозга.

Травма вызывает воспаление, а также меняет местные и общие иммунные реакции в организме через клетки Лангерганса (тканевые макрофаги), которые запускают Т-клеточный ответ. Следовательно, путем стимуляции макрофагов можно моделировать травматический или воспалительный окислительный стресс. В работе [44] изучали содержание АФК в нормальных и стимулированных липополисахаридом мышиных макрофагах J774A.1, а также влияние в этих условиях НДЦ на содержание АФК. Содержание АФК определяли с помощью флуоресцентного красителя дихлорфлуоресцеина (DCF). Пять случайных участков каждого образца фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа (длина волны возбуждения – 488 нм, длина волны испускания – 515–555 нм), оценивая количество светящихся пикселей в кадре, а затем определяя среднее значение в серии (рис. 5.15). Показано, что после обработки 10 мкМ диоксида церия люминесценция стимулированных макрофагов находится на уровне необработанных нестимулированных. Аналогичные результаты для макрофагов J774A.1 были получены также в работе [44], авторы кото-

рой использовали наночастицы CeO_2 размером 3–5 нм, полученные в растворе «мягким» окислением соли Ce^{3+} пероксидом водорода. У макрофагов, обработанных диоксидом церия, наблюдалось дозозависимое снижение концентрации нитрозил-радикала и активности синтазы окиси азота iNOS (как в стимулированных, так и в нестимулированных). Любопытно, что, по данным авторов [45], наночастицы CeO_2 размером 10–30 нм, полученные высокотемпературным синтезом, не влияли на воспалительный отклик моноцитов человека при их стимулировании липополисахаридами.

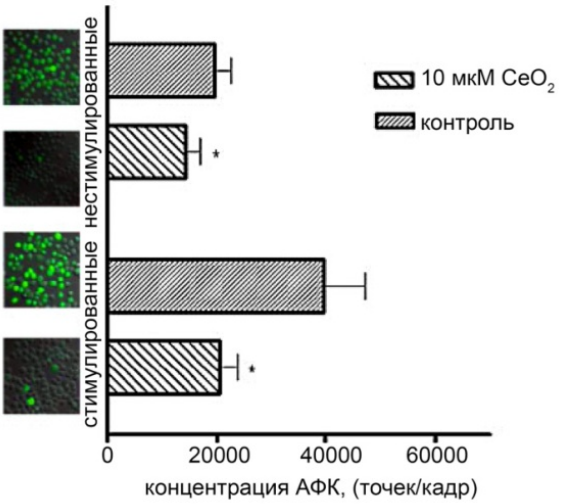


Рис. 5.15. Зависимость концентрации АФК в нестимулированных и стимулированных мышиных макрофагах от введения 10 мкМ наночастиц диоксида церия [44]

В работе [46] показано, что НДЦ блокируют разрушительное действие глиальных макрофагов (микроглии), которые активируются при травмах мозга и способны повреждать нервные клетки. Функционализация наночастиц биологически активными молекулами увеличивает интенсивность их поглощения макрофагами. В работе [47] на поверхность нанодисперсного CeO_2 (12 нм, синтез пиролизом аэрозолей) через силоксановый линкер привили гепарин (примерно 120 молекул на частицу CeO_2). Такие частицы лучше усваивались моноцитами человека (клеточная линия U937). Более того, функционализи-

рованные гепарином наночастицы более эффективно нейтрализовали АФК, продуцируемые при активации макрофагов форбол-12-миристат-13-ацетатом, чем немодифицированные частицы. Конъюгат гепарин-CeO_2 разрушался в клетке примерно за 48 ч. В работе [48] наночастицы диоксида церия диаметром 4,5 нм инкапсулировали в полость апоферритина (рис. 5.16). Такие конъюгаты не только обладали повышенной биосовместимостью, но и более эффективно нейтрализовали АФК. Ферментативная активность частиц АФТ-CeO_2 по отношению к супероксид-радикалу в несколько раз превышала активность немодифицированных частиц CeO_2 и СОД. Напротив, фосфат-ионы ухудшали способность наночастиц диоксида церия защищать ДНК от разрушительного действия АФК [49]. Очевидно, фосфатирование поверхности наночастиц CeO_2 затрудняет участие ионов церия в клеточных редокс-процессах, вследствие чего биологическая активность наночастиц нивелируется.

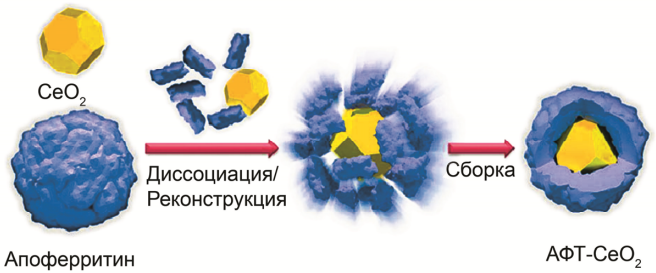


Рис. 5.16. Схема инкапсулирования наночастиц CeO_2 в полость апоферритина (АФТ) за счет диссоциации / реконструкции [48]

В работе [50] исследовали влияние нанокристаллического диоксида церия на скорость заживления механических ран и протекания процесса лечения. Показано, что наночастицы диоксида церия размером 3–5 нм, полученные окислением в растворе солей Ce^{3+} и стабилизированные нитрат-анионами, ускоряют заживление ран за счет снижения окислительного повреждения мембран и белков, повышают пролиферацию и миграцию фибробластов, кератиноцитов и эндотелиальных клеток сосудов (VECs) (рис. 5.17).

Посттравматическое восстановление хрящевой и костной тканей является одной из важнейших проблем в реконструктивной хирургии различных опорно-двигательных систем организма.

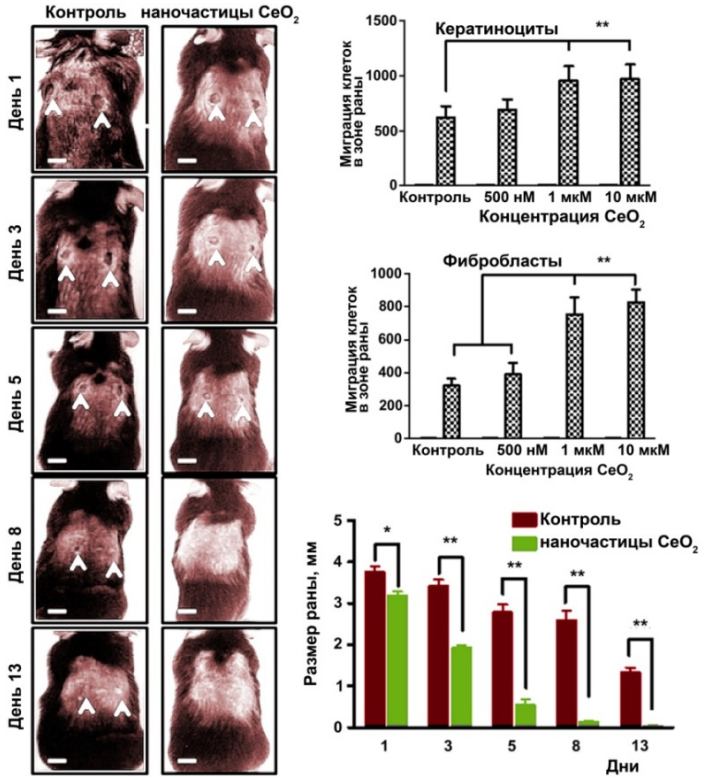


Рис. 5.17. Наночастицы CeO_2 улучшают миграцию фибробластов и кератиноцитов в зоне повреждения и значительно ускоряют заживление ран [50]. $^{**}p < 0{,}01$; $^{*}p < 0{,}05$ ($n = 6$ мышей в группе). Шкала на фотографиях = 4 мм

Основной проблемой восстановления суставного хряща при травме или артрите является значительный воспалительный процесс. Для снижения вредных эффектов провоспалительного цитокина интерлейкина 1α авторы [51] предлагают вводить в синтетический хрящевой имплант наночастицы CeO_2. Показано, что НДЦ совместим с бычьими хондроцитами до концентрации 1 000 мкг/мл (60 000 клеток / мкг НДЦ), а его наличие значительно улучшает механические свойства и биохимический состав (гликозаминогликаны) спроектированного хряща. С помощью рамановской микроспектроскопии показано, что после поглощения НДЦ в индивидуальных хондроцитах повышаются концен-

трации пирролидин-α-карбоновой кислоты, проколлагена и гликогена по сравнению с необработанными клетками. Также НДЦ частично замедляет воспалительную реакцию, вызванную физиологически соответствующими количествами интерлейкина 1α (0,5 нг/мл). По мнению авторов, полученные результаты являются пионерскими в области использования НДЦ для улучшения суставных свойств хрящевых тканей и для их долговременной обработки против воспалительной реакции.

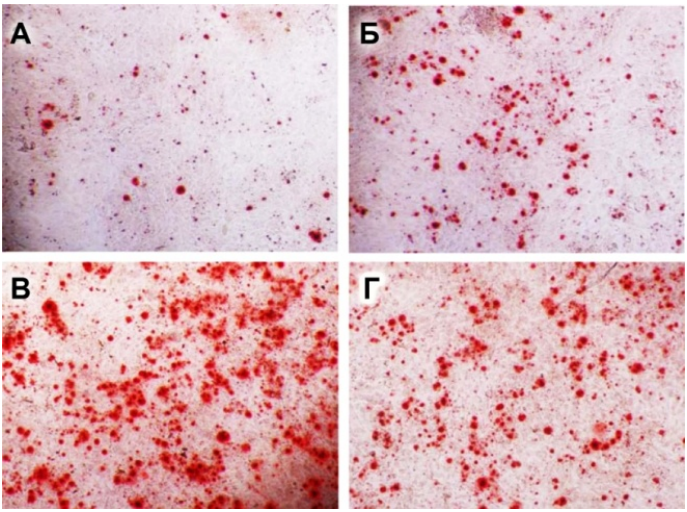


Рис. 5.18. Влияние НДЦ на формирование минерализованных матричных узелков остеобластов (окрашены ализариновым красным S, увеличение ×100):
А – контроль без питательной среды для дифференцирования;
Б – контроль с питательной средой для дифференцирования;
В – питательная среда для дифференцирования + НДЦ (40 нм, 40 мкг/мл);
Г – питательная среда для дифференцирования + НДЦ (60 нм, 40 мкг/мл) [52]

Также при восстановлении костных травм важную роль играет состояние остеобластов. В работе [52] оценивали влияние НДЦ на пролиферацию, дифференциацию и функцию минерализации первичных остеобластов *in vitro*. Результаты показали, что биологическая активность НДЦ зависит от размера частиц, концентрации и времени инкубации. Наночастицы диоксида церия размером 60 нм оказались ток-

сичными для первичных остеобластов при экспозиции 48 ч. Наночастицы CeO_2 диаметром 40 нм стимулировали дифференцирование остеобластов, скорость дифференциации изменялась прямо пропорционально концентрации частиц. Наночастицы диаметром 60 нм в низких концентрациях поддерживали дифференцирование остеобластов, но замедляли в высоких концентрациях. При этом наночастицы CeO_2 в дозозависимом виде поддерживали адипогенное трансдифференцирование остеобластов и формирование минерализованных матричных узелков остеобластов во всем диапазоне исследованных концентраций, норма поддержки увеличивалась с уменьшением размера частиц (рис. 5.18).

Важным фактором в формировании морфологических и функциональных изменений в развитии остеопороза является окислительное повреждение. Авторы [53] исследовали НДЦ в качестве потенциального терапевтического агента для лечения остеопороза. Первичные остеобласты обрабатывали пероксидом водорода (H_2O_2) и наночастицами CeO_2. Показано, что наночастицы уменьшают H_2O_2-индуцированное окислительное повреждение остеобластов. После обработки НДЦ отмечено увеличение уровня антиоксидантных ферментов и снижение апоптоза.

В работе [54] в качестве подложки для остеобластов (MG63) и мезенхимальных стволовых клеток человека (hMSCs) использовали поли-L-лактид, наполненный наночастицами диоксида церия, а также исследовали влияние Ce^{4+} и Ce^{3+} на рост, пролиферацию и морфологию клеток. Показано, что введение в состав подложки НДЦ ускоряет рост исследованных клеточных культур. Однако, в зависимости от преобладания Ce^{4+} или Ce^{3+} в составе НДЦ, эффект наночастиц для обоих типов клеток (MG63 и hMSCs) отличался: изменялось распределение клеток по поверхности подложки, их перемещение и адгезия, что, в свою очередь, влияло на скорость роста клеточной культуры (рис. 5.19).

Как правило, травма мозга сопровождается гипоксией, и наоборот – недостаточное снабжение мозга кислородом может привести к его травмированию. В работе [55] изучали влияние НДЦ (размер частиц 7–10 нм) на гипоксию у грызунов. 48 животных были случайным образом разделены на четыре равных группы: контроль (К), обработка НДЦ (О), гипоксия (Г) и обработка НДЦ плюс гипоксия (О+Г). Животным интраперитонеально вводили либо 0,5 мкг/кг веса /неделю

НДЦ (группы О и О+Г), либо плацебо (группы К и Г) в течение 5 недель.

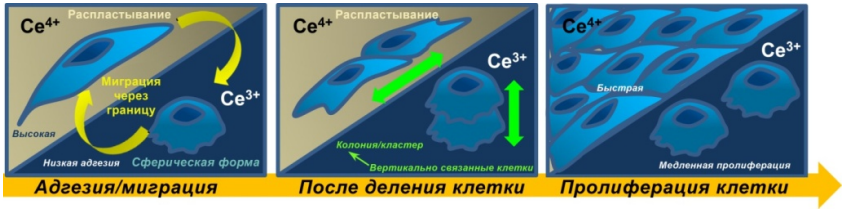


Рис. 5.19. Наночастицы диоксида церия с преобладанием Ce^{4+} или Ce^{3+} могут обратимо контролировать морфологию клетки (распластанная и сферическая формы соответственно). После деления клетки слабо закреплены в области Ce^{3+} и соединяются вертикально без миграции в течение длительного времени (> 8 ч) [54]

После введения последней дозы животные из групп Г и О+Г были подвергнуты гипобарической гипоксии, в то время как группы К и О содержались в условиях нормоксии. Затем у животных были извлечены легкие, гомогенизированы, и в них было исследовано содержание АФК, глутатиона, карбонилированных белков и продуктов перекисного окисления липидов. Методом твердофазного иммуноферментного анализа исследовали содержание воспалительных цитокинов в плазме. В результате было показано, что накопление НДЦ не вызывает воспалительной реакции – наоборот, защищает от действия свободных радикалов во время гипобарической гипоксии.

Существенному травмированию подвергаются сосуды при ангиопластике. Так, для восстановления кровотока в суженную или закупоренную артерию имплантируют металлический стент, восстанавливающий проходимость сосуда. Данная процедура травмирует стенки сосудов; более того, с течением времени такие стенты могут вызвать воспаление и турбулентные потоки крови, что ведет к новым закупоркам сосудов. Недавно южнокорейские ученые разработали устройство, несущее на себе набор электронных датчиков и наночастицы лекарств (в том числе диоксида церия), необходимых для обнаружения и преодоления этих проблем [56].

На рис. 5.20 вверху показана принципиальная схема такого «умного стента». Основная пружина выполнена из сплава магния и после устранения «засора» в сосудах способна растворяться. На пружину

интегрированы датчики температуры и потока крови, а также элементы памяти (RRAM).

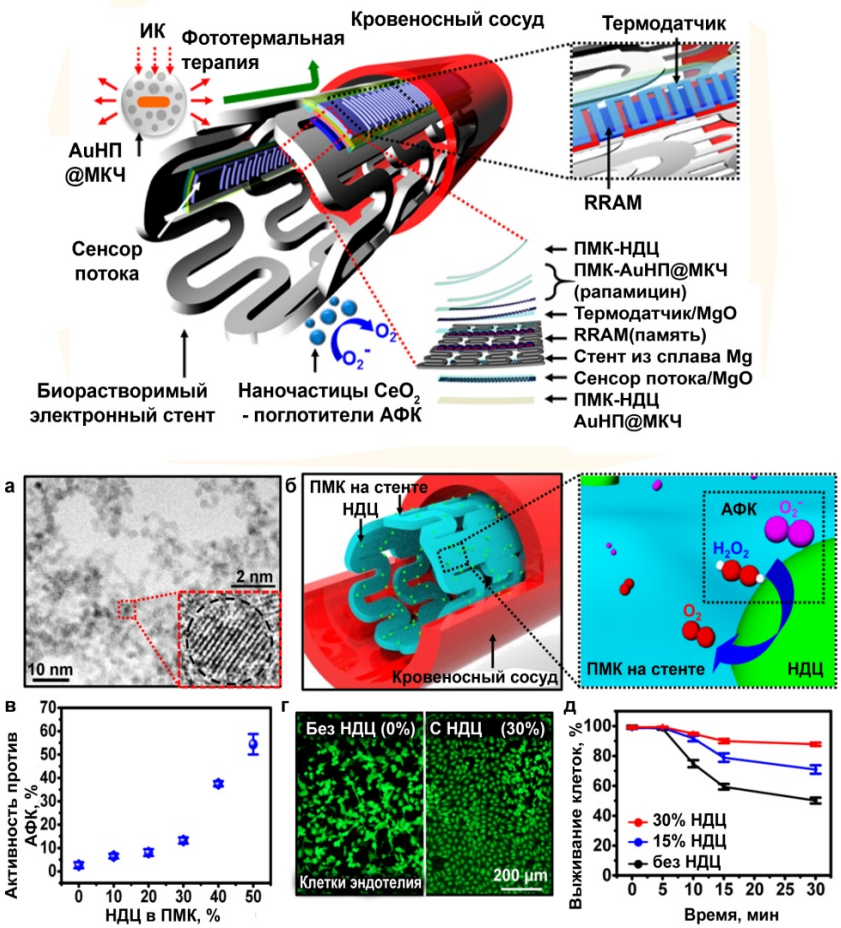


Рис. 5.20. Биорастворимый электронный стент [56]. Пояснения в тексте

Сверху изделие покрыто полимолочной кислотой (ПМК), в которую включены наночастицы диоксида церия, а также композит золотых нанопалочек с мезопористым кремнеземом (AuНП@МКЧ), содержащий лекарство (рапомицин), которое выделяется при облучении

данного нанокомпозита ИК-лазером. Особая роль отводится наночастицам диоксида церия (рис. 5.20, *а*, *б*), которые нейтрализуют АФК (рис. 5.20, *в*), образующиеся при всех травмирующих манипуляциях в процессе введения стента и последующей терапии и, таким образом, существенно повышают выживание клеток сосудов (рис. 5.20, *г*, *д*). Имплантирование такого стента в сонную артерию собаки показало его безопасность и терапевтическую эффективность без каких-либо побочных эффектов.

5.5. Возможность прямого мониторинга инактивации АФК с помощью НДЦ в клетке *in vitro*

Как показано в гл. 4, активные формы кислорода (в частности, пероксид водорода) на первой стадии взаимодействия прочно и необратимо связываются с НДЦ и способны вытеснять лиганды и / или стабилизаторы с поверхности частицы. Данный факт был использован нами [57] для мониторинга процесса инактивации АФК в клетке *in vitro*.

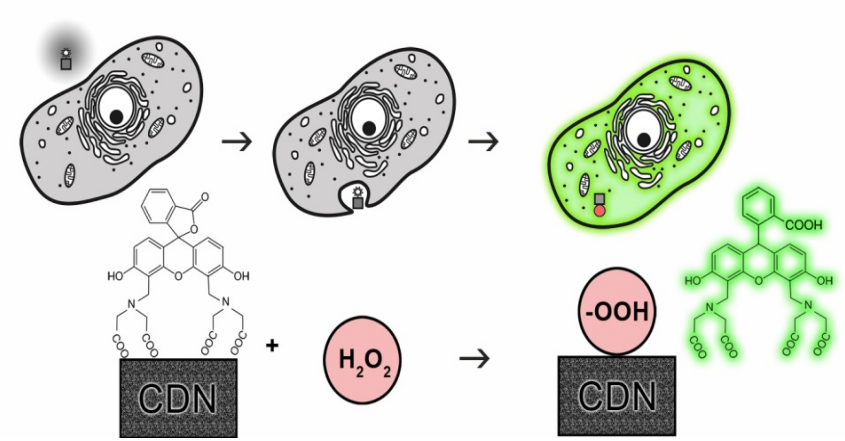


Рис. 5.21. Несветящийся комплекс кальцеин-НДЦ проникает в клетку, взаимодействует с АФК (пероксид водорода) и выделяет люминесцентный кальцеин [57]

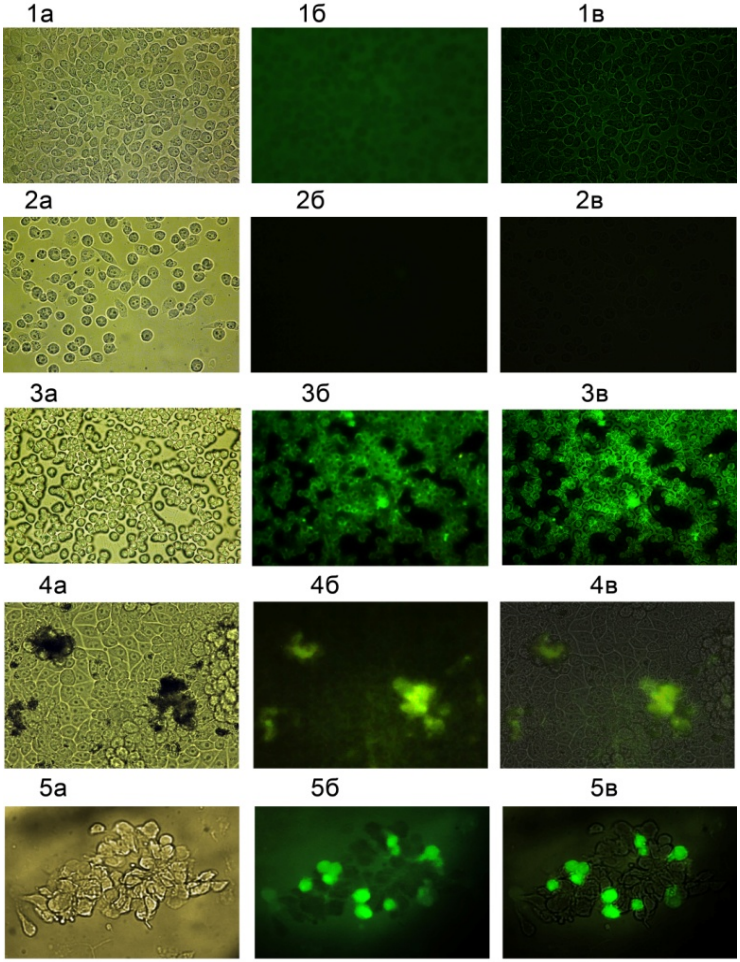


Рис. 5.22. *1* – перевиваемые клетки тестикул поросенка (ST), обработанные комплексом НДЦ-кальцеин; *2* – клетки ST, обработанные комплексом НДЦ-кальцеин и отмытые от избытка комплекса буферным раствором; *3* – отмытые клетки (*2*), обработанные пероксидом водорода (экзогенный АФК); *4* – отмытые клетки (*2*), обработанные частицами латекса (эндогенный АФК от механического раздражения); *5* – отмытые клетки (*2*), инфицированные вирусом везикулярного стоматита (эндогенный АФК от вирусной инфекции). *а* – микрофотографии в видимом свете, *б* – люминесцентные микрофотографии, *в* – совмещение *а* и *б* [57]

Было показано, что флуоресценция кальцеина (флуорексона) гаснет при адсорбции красителя на поверхности наночастицы CeO_2. Нефлуоресцентный комплекс НДЦ-кальцеин более гидрофобен, чем сам кальцеин, и легко проникает через мембрану неповреждённой клетки (или путём пиноцитоза). Если в системе появляются эндогенный или экзогенный пероксид водорода, он адсорбируется на поверхности НДЦ с образованием пергидроксида, при этом десорбируется свободный кальцеин, который ярко флуоресцирует. Примечательно, что кальцеин не может проникнуть обратно через клеточную мембрану и окрашивает именно ту клетку, которая находится в состоянии окислительного стресса. Принципиальная схема данного процесса представлена на рис. 5.21.

Экспериментальные подтверждения возможности прямого мониторинга инактивации АФК с помощью комплекса кальцеин-НДЦ в живых клетках (перевиваемые клетки тестикул поросенка) представлены на рис. 5.22.

Литература

1. *Poon H.F., Calabrese V., Scapagnini G., Butterfield D.A.* Free radicals and brain aging // Clin. Geriatr. Med. 2004. Vol. 20. P. 329–359.

2. *Darley-Usmar V.M., O'Leary V.J., Wilson M.T., Hogg N.* Hydroxyl radical formation from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxid: mechanisms and implications for the pathogenesis of atherosclerosis // Free Radical Res. Commun. 1992. Vol. 16(S1). P. A.13.1.

3. *Beckman J.S., Ischiropoulos H., Zhu L. et al*. Pro-duction of peroxynitrite by activated rat alveolar macrophages // Free Radical Res. Commun. 1992. Vol. 16(S1). P. A.13.4.

4. *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. Vol. 87. P. 1620–1624.

5. *Evans P., Halliwell B.* Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria // Ann. N.Y.: Acad. Sci. 1999. Vol. 884. P. 19–40.

6. *Harman D.* Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life // Radiat. Res. 1962. Vol. 16. P. 753–763.

7. *Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. 1956. Vol. 11(3). P. 298–300.

8. *Manda G., Nechifor M.T., Neagu T.M.* Reactive oxygen species, cancer and anticancer therapies // Curr. Chem. Biol. 2009. Vol. 3. P. 342–366.

9. *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.

10. *Щербаков А.Б., Иванов В.К., Жолобак Н.М. и др.* Нанокристаллический диоксид церия – перспективный материал для биомедицинского применения // Биофизика. 2011. Т. 56, № 6. С. 995–1015.

11. *Rzigalinski B.A., Meehan K., Davis R.M. et al*. Radical nanomedicine // Nanomedicine. 2006. Vol. 1(4). P. 399–412.

12. *Celardo I., De Nicola M., Mandoli C. et al*. Ce^{3+} ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2011. Vol. 5(6). P. 4537–4549.

13. *Schubert D., Dargusch R., Raitano J., Chan S.W.* Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 342(1). P. 86–91.

14. *Das M., Patil S., Bhargava N. et al*. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons // Biomaterials. 2007. Vol. 28(10). P. 918–1925.

15. *Clark A., Zhu A., Sun K., Petty H.R.* Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis // J. Nanopart. Res. 2011. Vol. 13(10). P. 5547–5555.

16. *Иванов В.К., Щербаков А.Б., Баранчиков А.Е., Козик В.В.* Нанокристаллический диоксид церия: свойства, получение, применение. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2013. 284 с. ISBN 978-5-7511-2182-2

17. *Chen J., Patil S., Seal S., McGinnis J.F.* Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides // Nature Nanotechnology. 2006. Vol. 1. P. 142–150.

18. *Chen Shizhu, Yingjian Hou, Gong Cheng, Cuimiao Zhang, Shuxiang Wang, Jinchao Zhang.* Cerium oxide nanoparticles protect endothelial cells from apoptosis induced by oxidative stress // Biological trace element research. 2013. Vol. 154 (1). P. 156–166.

19. *Arya Aditya, Niroj Kumar Sethy, Mainak Das, Sushil Kumar Singh, Anubhav Das, Sanjeev Kumar Ujjain, Raj Kishore Sharma, Manish Sharma, and Kalpana Bhargava.* Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential // Free radical research. 2014. 0. P. 1–10.

20. *Hosseini A., Baeeri M., Rahimifard M., Navaei-Nigjeh M., Mohammadirad A., Pourkhalili N., Hassani S., Kamali M., Abdollahi M.*. Antiapoptotic effects of cerium oxide and yttrium oxide nanoparticles in isolated rat pancreatic islets // Human & experimental toxicology. 2013. Vol. 32 (5). P. 544–553.

21. *Clark Andrea, Aiping Zhu, Howard R. Petty.* Titanium-doped cerium oxide nanoparticles protect cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis // Journal of nanoparticle research. 2013. Vol. 15 (12). P. 1–9.

22. *Zhao K., Zhao G.M., Wu D. et al.* Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling, oxidative cell death, and reperfusion injury // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279(33). P. 34682–34690.

23. *Kim C.K., Kim T., Choi I.-Y. et al.* Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke // Angew. Chem. Int. Ed. 2012. Vol. 51. P. 11039–11043.

24. *Pagliari F., Mandoli C., Forte G. et al*. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress // ACS Nano. 2012. Vol. 6(5). P. 3767–3775.

25. *Pagliari Francesca, Paolo Di Nardo.* Cerium Oxide Nanoparticles Counteract the Oxidative Stress in Cardiac Progenitor Cells // In Advanced Bioactive Compounds Countering the Effects of Radiological, Chemical and Biological Agents. Springer Netherlands, 2013. P. 101–112.

26. *Sugaya K., Seal S.* Methods and materials for stimulating proliferation of stem cell // United States Patent Application 20080166412. Publication Date: 07/10/2008.

27. *Mandoli C., Pagliari F., Pagliari S. et al.* Stem cell aligned growth induced by CeO_2 nanoparticles in PLGA scaffolds with improved bioactivity for regenerative medicine // Adv. Funct. Mater. 2010. Vol. 20. P. 1617–1624.

28. *Rzigalinski B.A.* Nanoparticles and cell longevity // Tech. Cancer Res. Treatment. 2005. Vol. 4. P. 651–659.

29. *Singh N., Cohen C.A., Rzigalinski B.A.* Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. Vol. 1122. P. 219–230.

30. *Singh Ragini, Ritesh K. Shukla, Ashutosh Kumar, Alok Dhawan, Sanjay Singh.* PEGylated nanoceria protect human epidermal cells from reactive oxygen species. // Molecular Cytogenetics. 2014. Vol. 7. Suppl. 1. P. 78.

31. *Ciofani Gianni, Giada Graziana Genchi, Barbara Mazzolai, Virgilio Mattoli.* Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PC12 cells following treatment with cerium oxide nanoparticles // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1840. 2014. Vol. 4 (1). P. 495–506.

32. *Xue Ying, Yanwu Zhai, Kebin Zhou, Lei Wang, Haina Tan, Qingfen Luan, Xin Yao.* The vital role of buffer anions in the antioxidant activity of CeO_2 nanoparticles // Chemistry-A European Journal. 2012. Vol. 18 (35). P. 11115–11122.

33. *Niu J.L., Wang K.K., Kolattukudy P.E.* Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor-κB activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Vol. 338. P. 53–61.

34. *Amin K.A., Hassan M.S., Awad el-S.T., Hashem K.S.* The protective effects of cerium oxide nanoparticles against hepatic oxidative damage induced by monocrotaline // Int. J. Nanomedicine. 2011. Vol. 6. P. 143–149.

35. *Tsai Y.Y., Oca-Cossio J., Agering K. et al.* Novel synthesis of cerium oxide nanoparticles for free radical scavenging // Nanomed. 2007. Vol. 2(3). P. 325–332.

36. *Rzigalinski B.* Antioxidant nanoparticles // Nanomedicine in Health and Disease / eds.: Hunter. R.J., Preedy V.R. N.Y. : Science Publishers, 2011. 444 p.

37. *Elswaifi S.F., Palmieri J.R., Hockey K.S., Rzigalinski B.A.* Antioxidant nanoparticles for control of infectious disease // Infectious Disorders – Drug TargetsDisorders. 2009. Vol. 9(4). P. 445–452.

38. *Hirst, Suzanne Marie, Ajay Karakoti, Sanjay Singh, William Self, Ron Tyler, Sudipta Seal, Christopher M. Reilly.* Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice // Environmental toxicology. 2013. Vol. 28 (2). P. 107–118.

39. *Rzigalinski B., Clark A., Ariane M.* Anti-inflammatory, radioprotective, and longevity enhancing capabilities of cerium oxide nanoparticles. WO/2007/002662. Publication Date: 04.01.2007.

40. *Nowacek A., Zhang G., McMillan J. et al.* Nanomedicine and nurodegenerative dsorders. In: Nanomedicine in Health and Disease / eds. by R.J. Hunter, V.R. Preedy. N.J. : Science Publishers, 2011. 444 p.

41. *Kumar, Pradeep, Yahya E. Choonara, Girish Modi, Dinesh Naidoo, Viness Pillay.* Nanoparticulate strategies for the five R's of traumatic spinal cord injury intervention: restriction, repair, regeneration, restoration and reorganization // Nanomedicine. 2014. Vol. 9 (2). P. 331–348.

42. *Silva, Gabriel A.* Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges // Nature Reviews Neuroscience. 2006. Vol. 7 (1). P. 65–74.

43. *Hicks, Hilary J., Pamela Jackson, Jeffrey Willner, and Mark Whiting.* Post-Injury Administration of Cerium Oxide Nanoparticles: A Dose-Response Study: PhD diss. Radford University, 2013.

44. *Hirst S.M., Karakoti A.S., Tyler R.D. et al.* Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles // Small. 2009. Vol. 5(24). P. 2848–2856.

45. *Hussain S., Al-Nsour F., Rice A.B. et al.* Cerium dioxide nanoparticles do not modulate the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human monocytes // Int. J. Nanomedicine. 2012. Vol. 7. P. 1387–1397.

46. *Callahan P., Colon J., Merchant S. et al.* Deleterious effects of microglia activated by in vitro trauma are blocked by engineered oxide nanoparticles // J. Neurotrauma. 2003. Vol. 20(10). P. 1057.

47. *Simon Ting S.R.S., Whitelock J.M., Tomic R. et al.* Cellular uptake and activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles in monocytes // Biomaterials. Vol. 34(17). P. 4377–4386.

48. *Liu X., Wei W., Yuan Q. et al.* Apoferritin–CeO_2 nano-truffle that has excellent artificial redox enzyme activity // Chem. Commun. 2012. Vol. 48. P. 3155–3157.

49. *Xue Y., Zhai Y., Zhou K. et al.* The vital role of buffer anions in the antioxidant activity of CeO_2 nanoparticles // Chemistry. 2012. Vol. 18(35). P. 11115–11122.

50. *Chigurupati S., Mughal M.R., Okun E. et al.* Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes, fibroblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing // Biomaterials. 2013. Vol. 34(9). P. 2194–2201.

51. *Ponnunrangam, Sathish, Grace O'Connell, Irina Valeri Chernyshova, Katherine Wood, Clark Tung-hui Hung, and Somasundaran Ponisseril.* Beneficial Effects of Cerium Oxide Nanoparticles in Development of Chondrocyte-Seeded Hydrogel Constructs and Cellular Response to Interleukin Insults // Tissue Engineering ja. 2014.

52. *Zhou, Guoqiang, Guangqi Gu, Yang Li, Qun Zhang, Wenying Wang, Shuxiang Wang, Jinchao Zhang.* Effects of cerium oxide nanoparticles on the proliferation, differentiation, and mineralization function of primary osteoblasts in vitro // Biological trace element research. 2013. Vol. 153 (1–3). P. 411–418.

53. *Zhou, Guoqiang, Yang Li, Baofeng Zheng, Wenying Wang, Jing Gao, Haiying Wei, Shenghui Li, Shuxiang Wang, and Jinchao Zhang.* Cerium oxide nanoparticles

protect primary osteoblasts against hydrogen peroxide induced oxidative damage // Micro & Nano Letters., Vol. 9, is. 2. February 2014. P. 91–96.

54. *Naganuma Tamaki, Enrico Traversa.* The effect of cerium valence states at cerium oxide nanoparticle surfaces on cell proliferation // Biomaterials. 2014. Vol. 35 (15). P. 4441–4453.

55. *Arya, Aditya, Niroj Kumar Sethy, Sushil Kumar Singh, Mainak Das, Kalpana Bhargava.* Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation // International journal of nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 4507.

56. *Son D., Lee J., Lee D.J., Ghaffari R., Yun S., Kim S.J., Kim D.H.* Bioresorbable Electronic Stent Integrated with Therapeutic Nanoparticles for Endovascular Diseases // ACS nano. 2015. Vol. 9 (6). P. 5937–5946.

57. *Zholobak N., Shcherbakov A., Vitukova E., Yegorova A., Scripinets Y., Leonenko I., Ivanov V.* Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells // RSC Advances // 2014. Vol. 4 (93). P. 51703–51710.

6. НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ДИОКСИД ЦЕРИЯ В ТЕРАНОСТИКЕ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

6.1. Наночастицы в онкологии

Перспективы использования наноматериалов в терапии и диагностике (тераностике) онкологических заболеваний достаточно высоки [1–18]. Хорошо известны примеры успешного применения наночастиц в качестве основных компонентов систем адресной доставки лекарств, люминесцентных и магнитных меток, компонентов сенсорных и диагностических устройств и т.д. [2–11]. Потенциальные области применения нанобиоматериалов включают в себя предотвращение и контроль онкозаболеваний, раннее обнаружение онкозаболеваний, визуализацию опухолей (вплоть до клеточного уровня), терапию онкозаболеваний и улучшение качества жизни онкобольных. Для реализации и координации соответствующих исследований Национальный институт рака (НИР) США разработал долгосрочную программу нанотехнологического обеспечения диагностики, лечения и профилактики рака [12–13]. В соответствии с «Нанотехнологическим планом рака» («Cancer Nanotechnology Plan») НИР наночастицы для тераностики злокачественных новообразований создаются с привлечением разнообразных химических методов и могут находиться в разнообразных физических формах. Эти частицы могут состоять из металлов, неметаллов, синтетических полимеров, дендримеров, липидов, нуклеиновых кислот, биологических объектов (например, вирусные векторы), синтетических пептидов и их комбинаций. Наночастицы могут иметь сферическую (например, квантовые точки, наночастицы окиси железа и т.д.) или несферическую конфигурации (например, наностержни, наноалмазы, нанотреугольники, наноклетки и гибридные формы из разных композиционных материалов) [13]. Уже сегодня созданы эффективные препараты для гипертермии на основе магнитных наночастиц или наночастиц золота [14–17], наноматериалы, обеспечивающие визуализацию злокачественных новообразований, в том числе самого малого размера [18], средства адресной доставки цитостатических препаратов [19, 20] и др.

При конструировании наночастиц для тераностики онкологических заболеваний (рис. 6.1) основное внимание уделяют составу и свойствам самих наночастиц (что определяет требуемые терапевтические и / или диагностические характеристики), а также составу и свойствам функциональных групп или лигандов на поверхности частиц (что определяет поведение частиц в биологической системе). Обычно поверхность наночастиц модифицируют как минимум двумя видами лигандов. Один из лигандов выполняет стабилизирующую функцию и продлевает «время жизни» наночастицы в среде, по крайней мере, на период от введения препарата до его накопления в необходимой концентрации в патологическом очаге.

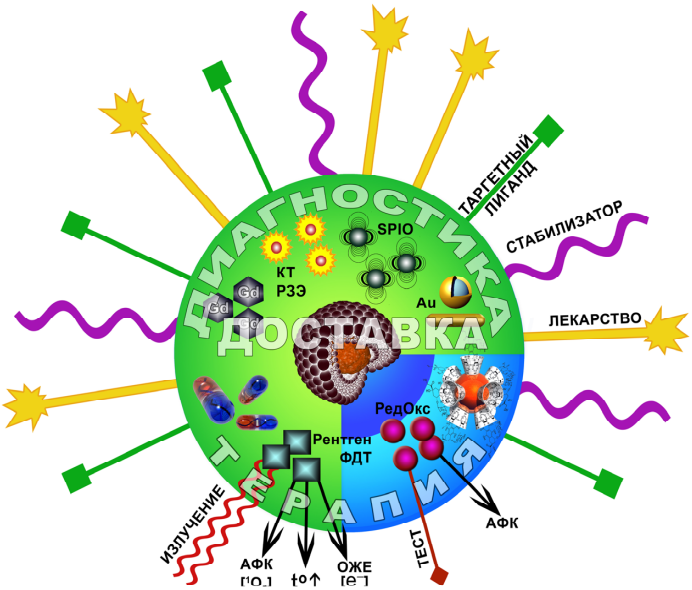


Рис. 6.1. Схематическое представление основных направлений использования наночастиц в тераностике онкологических заболеваний

Для адресной доставки наночастиц в зону онкогенеза используют таргетные лиганды, имеющие тропность к опухолевым клеткам (например, фолиевую кислоту, фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), сахара и др. [22]). Возможность проникновения препарата в клетку определяется сродством наночастицы к мембране, которое, в

свою очередь, существенно зависит от заряда поверхности наночастицы (рис. 6.2).

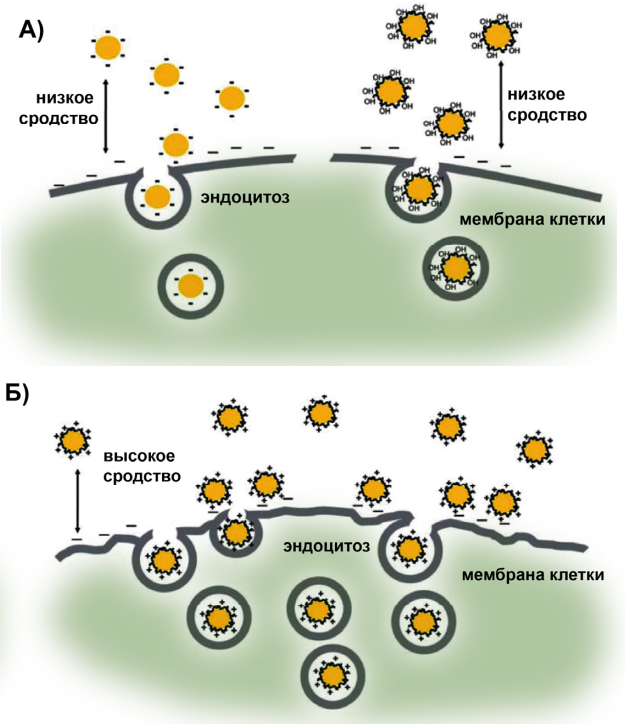


Рис. 6.2. Схема взаимодействия наночастиц Au с разным поверхностным зарядом и клеток рака молочной железы SK-BR-3. К отрицательно заряженной клеточной мембране незаряженные частицы (стабилизатор – поливиниловый спирт) и частицы, имеющие отрицательный заряд (стабилизатор – цитрат), демонстрируют низкое сродство (*А*). Положительно заряженные частицы (покрытые полиаллиламингидрохлоридом) характеризуются высоким сродством к клеточной мембране (*Б*) [21]

Наночастицы различных типов широко используются для доставки лекарственных препаратов в опухоль. При этом лекарственный препарат (например, антибиотик, цитотоксический агент или цитостатик – цисплатин, доксорубицин и др.) может размещаться как внутри наночастицы [23], так и на ее поверхности [24]. В первом случае такая

«нанокапсула» должна саморазрушаться в опухолевой клетке, высвобождая лекарство [25]. Во втором случае лекарство выступает в роли еще одного (третьего) поверхностного лиганда. Сама наночастица при этом либо является инертным носителем, либо также выполняет дополнительные функции, например, контрастного вещества [24]. Лекарство на поверхности наночастицы может быть дополнительно инкапсулировано – например, в полость молекулы циклодекстрина. Так, циклодекстрин используют при закреплении на поверхности наночастиц конъюгата адамантан-ПЭГ-трансферрин для доставки малых интерферирующих РНК (siRNA) в генной терапии рака [26]. Среди нанокомпозиций для доставки лекарств при химиотерапии опухолей, уже получивших клиническое одобрение, – липосомальные препараты цитарабина, доксорубицина (*Myocet*®) и ПЭГ-доксорубицина (*Doxil*®), даунорубицина (*DaunoXome*®), полимерные наночастицы метокси-ПЭГ-L,D-полилактида с таксолом (*Genexol-PM*®) и ПЭГ-L-аспарагиназы (*Oncaspar*®), альбуминовые препараты паклитаксела (*Abraxane*®) [25] и пр.

При выборе материала наночастиц для диагностики учитывается прежде всего возможность их использования в рамках существующих методов исследования и аппаратуры. Для магниторезонансной томографии (МРТ) в качестве контрастного вещества используют наночастицы, содержащие соединения гадолиния [27–29] или суперпарамагнитный оксид железа Fe_3O_4 (SPIO) [29]. В качестве рентгеноконтрастного вещества используют наночастицы производных йода, благородных металлов [30], нетоксичных оксидов некоторых тяжелых металлов и соединений редкоземельных элементов (РЗЭ) [31–34]. Для визуализации опухолевых клеток также используют наночастицы золота, квантовые точки (КТ) на основе халькогенидов Cd и Zn и наночастицы, содержащие ионы РЗЭ, прежде всего Eu, Tb и Dy. В ряде случаев синтезированные наночастицы способны выполнять несколько функций одновременно: например, флуоресцентной метки и контрастирующего агента для рентгеновской диагностики и МРТ [33, 34]. В качестве контрастирующего агента для ультразвуковых исследований (УЗИ) успешно апробированы «нанопузырьки» – липосомы на основе поверхностно-активных веществ природного (фосфолипиды [35]) или синтетического (фторированные ПАВ [61]) происхождения. В ряде случаев такие липосомы выступают не только в качестве контрастного вещества при УЗИ, но и как средство доставки лекарственных веществ [36, 37].

Наночастицы для терапии опухолей, как правило, разрабатываются на основе диагностических наночастиц и способны выполнять одновременно обе функции (или более двух функций). В соответствии с рекомендациями НИР США [12], наночастицы для тераностики могут быть сконструированы из различных химических элементов, находящихся в соответствующем физическом состоянии. Эти частицы могут состоять из металлов, неметаллов, синтетических полимеров, дендримеров, липидов, нуклеиновых кислот, биопрепаратов (например, вирусные векторы), синтетических пептидов и их комбинаций. Они могут быть в форме сфер (например, квантовые точки, наночастицы оксида железа и т.д.) или иметь несферическую геометрию (например, наностержни, наноклетки и гибриды этих форм). При этом важным аспектом биомедицинского применения нанотехнологий является то, что наиболее перспективные системы могут быть использованы для создания многофункциональных диагностических и терапевтических устройств. В качестве примера здесь можно привести наночастицы золота, которые выступают не только в качестве контрастирующего агента, но и в качестве основного или вспомогательного фотосенсибилизаторов при фототермальной или фотодинамической терапии (ФДТ) [38–40]. В процессе ФДТ в результате оптического возбуждения сенсибилизатора (как правило, под действием ИК-лазера) генерируются активные формы кислорода (АФК) – синглетный кислород, гидроксидный и супероксидный радикалы, – которые разрушают опухолевые клетки. При радиотерапии опухолей используют рентгеновское излучение и соответствующие радиосенсибилизаторы (например, наночастицы диоксида гафния, которые увеличивают разрушающее действие излучения в зоне опухоли за счет испускания Оже-электронов и увеличения генерации АФК) [41]. В нейтрон-захватной терапии в качестве сенсибилизаторов используют наночастицы, содержащие соединения бора или гадолиния [42, 43].

Наноматериалы на основе диоксида церия также весьма перспективны в тераностике онкологических заболеваний. За счет своих уникальных свойств наночастицы CeO_2 уже находят применение и в качестве средства доставки лекарственных препаратов в зону опухоли, и как средство диагностики (самостоятельно или в составе существующих композиций), и как средство терапии новообразований.

6.2. Соединения церия в терапии онкологических заболеваний

Применение соединений церия в терапии злокачественных новообразований имеет многолетнюю историю. Так, например, ещё в начале XX в. для лечения лимфогранулематоза и неоперабельных сóлидных опухолей применяли йодид церия (торговая марка *Introcid* [44]); при этом использование других иодидов (калия, кальция) не позволяло достичь аналогичных результатов [45]. Было показано, что хлорид церия угнетает пролиферацию опухолевых клеток PAMC82 и K562 [46, 47]. Вероятный механизм его действия авторы связывали со снижением концентрации кальмодулина и повышенной экспрессией некоторых генов (p53 и p21) в опухолевых клетках. Обработка 2 мМ раствором $CeCl_3$ значительно ингибировала пролиферацию лейкемических клеток NB4 и через 72 ч вызывала их апоптоз [48]. На примере двух линий опухолевых клеток – HeLa и MCF-7 – было показано [49], что противоопухолевая активность ионов церия возрастает в присутствии некоторых белков, например трансферрина. В качестве противоопухолевого агента запатентован комплекс церия с порфирином, вызывающий апоптоз опухолевых клеток [50]. Отмечена противоопухолевая активность нитрата церия [51]: это соединение в концентрациях, превышающих 0,64 мМ, ингибировало *in vitro* рост и пролиферацию опухолевых клеток HeLa, SGC-7901, B16, карциномы легкого Льюиса, K562 и H22; при этом токсичность нитрата церия по отношению к нормальным клеткам FL и L929 была невысокой. Противоопухолевую активность нитрата церия исследовали также *in vivo* (мыши Kunming, опухолевые клетки H22 вводили внутримышечно в левую паховую область [52]). Нитрат церия применяли в дозировках 50, 100 и 200 мг/кг в течение двух недель. По мнению авторов, нитрат церия ингибирует рост опухолей за счет активирования иммунного отклика у мышей.

Механизмы, лежащие в основе биологической активности ионов церия, ещё ждут своего объяснения [45]. Вместе с тем следует отметить, что водорастворимые соли трёхвалентного церия в биологических средах легко гидролизуются с образованием соответствующих гидроксосоединений (для реакции $Ce^{3+} + H_2O \rightarrow CeOH^{2+} + H^+$, pKa = 8,3 [53]). При pH ≥ 7–8 трехвалентный церий быстро окисляется растворенным кислородом воздуха с образованием Ce^{4+}, который

ещё более склонен к гидролизу [54] и немедленно образует осадок гидроксида, дегидратирующегося с образованием диоксида церия. Согласно уравнению Нернста, концентрации четырехвалентного (в виде CeO_2) и трехвалентного церия в водном растворе связаны между собой соотношением [55]: $\log([Ce^{4+}{}_{CeO2}]/[Ce^{3+}]) = 3pH - 7{,}288 + ¼\log(P_{O2})$. При минимальном парциальном давлении кислорода в тканевых жидкостях 10–20 мм. рт. ст. (что соответствует $P_{O2} \approx 0{,}015$ атм) и $pH \approx 7$ соотношение концентраций $[Ce^{4+}{}_{CeO2}]/[Ce^{3+}] \approx 10^{13}$. Иначе говоря, практически весь церий, попавший в организм в виде водорастворимых солей, переходит в нерастворимый диоксид церия, который в присутствии биологических полимеров (белки, полисахариды и пр.), выполняющих стабилизирующие функции, формирует обособленные или агрегированные наночастицы. Приведенные расчеты позволяют предположить, что биологическую активность соединений церия в значительной степени определяют именно наночастицы CeO_2.

6.3. Редокс-активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний

Активные формы кислорода играют большую роль как в процессе канцерогенеза, так и в терапии онкологических заболеваний [56]. Редокс-терапия опухолей базируется на использовании веществ, способных в определенных условиях вызывать окислительный стресс (или защищать от окислительного стресса) [57]. При этом селективность терапевтического воздействия определяется тем, насколько сильно различается поведение препаратов в опухолевой ткани и в здоровых клетках. Как известно, одним из специфических признаков, по которому нормальные ткани отличаются от зоны опухоли, является водородный показатель (pH). Внеклеточный pH в опухолях в среднем на 0.3–0.5 ед. ниже, чем в нормальных тканях [58, 59]. Так, в саркомах мягких тканей pH на 0.45 ед. ниже, чем в соответствующей нормальной ткани, в случае рака молочной железы различие составляет приблизительно 0.35 ед. pH, в первичных опухолях головного мозга (глиобластома) pH примерно на 0.2 ед. ниже, чем в нормальной ткани головного мозга [58].

Таким образом, увеличение селективности редокс-терапии может быть достигнуто за счет использования препаратов, реагирующих на изменение pH среды. Нанодисперсный диоксид церия имеет в этом отношении большие перспективы.

Способность CeO_2 разлагать АФК и защищать живые системы от окислительного стресса либо, напротив, выступать в роли прооксиданта, исполняя роль фермента оксидазы, описано в соответствующем разделе данной монографии (см. главу 4). Если сопоставить зависимость редокс-свойств стехиометрического и нестехиометрического НДЦ от pH среды (рис. 4.20) с гистограммой, описывающей типичное распределение кислотности в нормальных тканях и в зоне опухоли, можно видеть, что pH-зависимый баланс про- и антиоксидантных свойств НДЦ представляет большой интерес с точки зрения редокс-терапии новообразований (рис. 6.3).

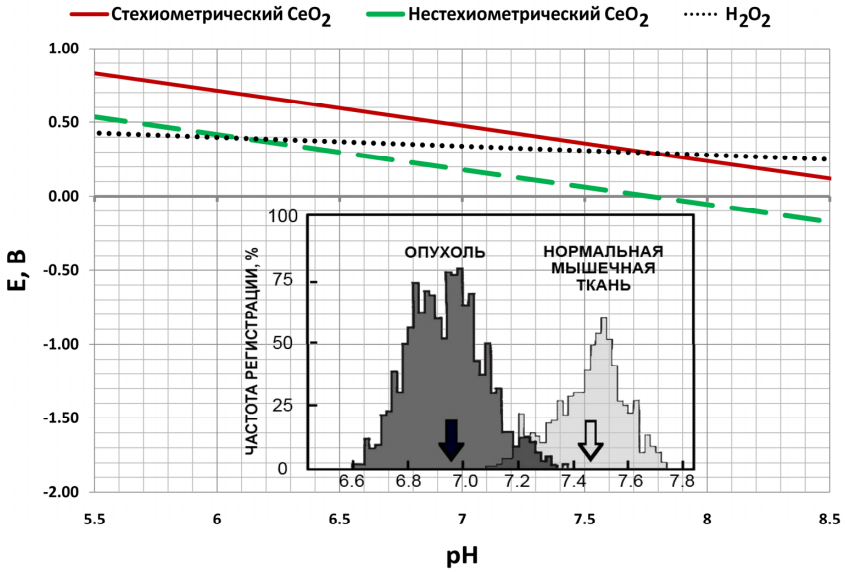


Рис. 6.3. E–pH зависимость для стехиометрического и нестехиометрического CeO_2, а также для пероксида водорода (расчет). На врезке: средняя частота регистрации значений pH в зоне SCK-клеток карциномы и в нормальных мышечных тканях мышей [59]

Кроме того, опухоль находится в перманентном состоянии гипоксии; иными словами, в опухоли понижено парциальное давление

кислорода. Принято считать оксигенацию, при которой в ткани содержится более 10% кислорода, физиологической, около 0,5% – умеренной и около 0,1% – низкой, что соответствует сильно выраженной или тяжелой гипоксии [58]. Если при расчете в гл. 4 pH-зависимого редокс-поведения НДЦ для нормальной ткани парциальное давление кислорода принимали $p_{O_2} \approx 0{,}1$ атм, то для опухоли это значение может находиться в пределах 0,01–0,001 атм и, соответственно, в зоне опухоли диапазон pH разложения активных форм кислорода (пероксида водорода) в присутствии НДЦ начинается со значений pH на 0.2–0.4 ед. выше, чем в нормальных тканях. Следует ожидать, что наночастицы CeO_2 могут избирательно защищать нормальные клетки от окислительного стресса (в отличие от малигнизированных, рис. 6.4).

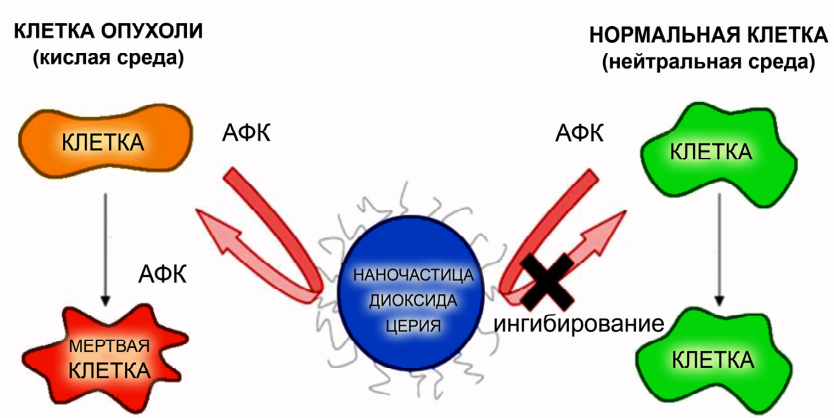


Рис. 6.4. Избирательная защита от окислительного стресса с помощью наночастиц диоксида церия в зоне опухоли

Пионерские опыты с окислительным разрушением клеток нормальных тканей (кардиомиоциты, фибробласты) и клеток опухолей (карцинома легкого, рак молочной железы) доказали справедливость предположения об избирательной защите, оказываемой НДЦ в условиях окислительного стресса [60]. Согласно нашим данным, представленным в работе [61], стабилизированные пантенолом наночастицы диоксида церия имеют практически одинаково высокую активность при защите от УФ-облучения как нормальных клеток тестикул

поросенка (ST), так и малигнизированных эпителиальных клеток карциномы гортани человека (HEp-2). Вместе с тем при воздействии на клетки раствора пероксида водорода золь НДЦ практически полностью защищает нормальные клетки, и только частично – малигнизированные (рис. 6.5). Избирательность в защитном действии НДЦ может наблюдаться и при окислительном стрессе, индуцированном УФ-облучением [62].

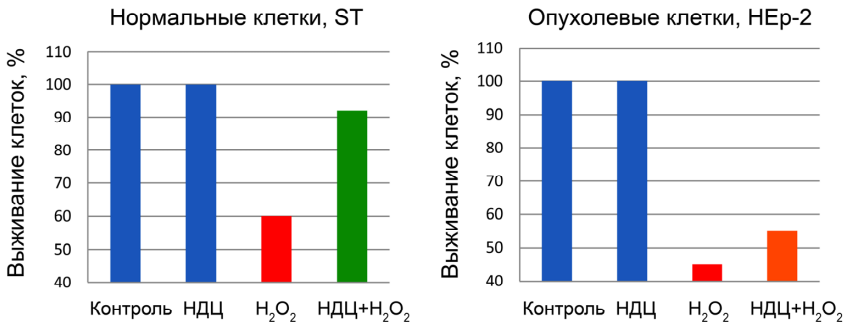


Рис. 6.5. Доля выживших нормальных (ST) и малигнизированных (HEp-2) клеток при действии (слева направо): контроль; НДЦ (63 мкМ); пероксид водорода (0,5 мМ); пероксид водорода + НДЦ [61]

Наночастицы CeO_2 определенного размера и стехиометрии способны избирательно защищать нормальные клетки и выступать в качестве промотора окислительного стресса для малигнизированных клеток. В качестве примера можно привести золи диоксида церия, стабилизированные низкомолекулярными глюканами [63, 64]. Симбатно изменению соотношения церий:глюкоза в смеси прекурсоров изменяются размер получаемых частиц диоксида церия и их защитные свойства как в модельном эксперименте при инактивации гидроксильного радикала, так и в культуре клеток – против пероксида водорода [64]. Следует отметить, что понижение pH и гипоксия в зоне новообразований связаны с усиленным аэробным гликолизом (образование лактата, эффект Крэбтри), при этом опухоль выступает в роли своеобразной «ловушки» глюкозы [58]. Можно ожидать, что модификация поверхности НДЦ сахарами (полиглюканами) повысит способность наночастиц диоксида церия накапливаться в зоне опухоли; до-

полнительно такие частицы будут способствовать гипоксии и снижению pH, многократно усиливая окислительный стресс.

В работе [65] исследовали механизмы токсичности НДЦ по отношению к клеткам аденокарциномы легкого A549. После интернализации наночастицы диоксида церия вызывали значительную цитотоксичность и морфологические изменения; при этом гибель опухолевых клеток была вызвана апоптозом и связана с потерей митохондриального потенциала. Наблюдалось значительное увеличение окислительного повреждения ДНК, что было подтверждено фосфорилированием гена p53 и присутствием расщепленной поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP). По мнению авторов, это повреждение связано с увеличенной продукцией АФК и сопутствующим уменьшением уровня глютатиона (GSH). Повреждение ДНК и гибель клеток снижались с помощью ингибиторов АФК и апоптоза: N-ацетил-L-цистеина и синтетического пептида Z-DEVD-fmk соответственно. Авторы показали, что ключевой механизм цитотоксичности НДЦ по отношению к раковым клеткам A549 – генерация АФК и повреждение ДНК, а также арест клеточного цикла, что приводит к апоптозу клеток опухоли.

6.4. Фосфатазоподобная активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний

Согласно современным данным, нанодисперсный диоксид церия способен выполнять функцию не только оксидоредуктаз (редокс-активных ферментов), но, фосфатазы [66] (см. гл. 4), в том числе АТФ-азы [67]. В частности, НДЦ катализирует расщепление эфирной связи в органических эфирах фосфорной кислоты, например в п-нитрофенилфосфате, аденозинтрифосфате, о-фосфо-L-тирозине и др. Как и в случае редокс-поведения НДЦ, начальная скорость соответствующих реакций зависит от pH среды; подобно оксидазной, фосфатазная активность НДЦ увеличивается с уменьшением pH.

С переносом и отщеплением фосфатной группы напрямую связаны многие процессы в клетке [68] (в том числе канцерогенез), и возможность управлять этими процессами позволит разрабатывать эффективные препараты для лечения и профилактики рака. Так, по мнению авторов [69–71], хорошую мишень для терапии новообразований являет собой транскрипционный ядерный фактор NF-κB. Активирование ядерного фактора kB определяется фосфорилированием ингиби-

рующего протеина IκBα киназами [72], а также происходит по сигнальному пути PI3K-AKT-mTOR при воздействии на рецепторы интерлейкина-1β (IL-1β) [73] (рис. 6.6, А).

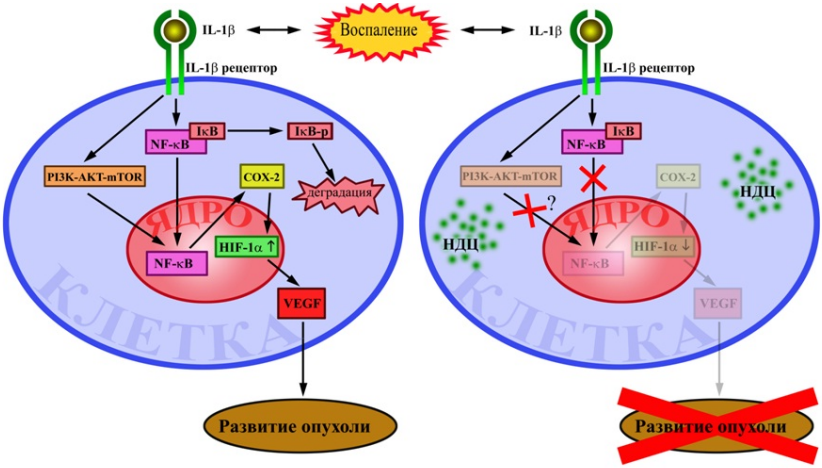


Рис. 6.6. Внутриклеточный сигнальный механизм регулирования HIF-1α под влиянием IL-1β; *А* – механизм, предложенный в [73]: провоспалительный сигнал (IL-1/NF-kB/COX-2) переходит в онкогенный сигнал (стимулирование VEGF) через повышенную регуляцию HIF-1α (IkB-p – фосфорилированный ингибирующий kB-протеин); *В* – НДЦ может ингибировать фосфорилирование IkB и (вероятно) PI3K-AK-mTOR, препятствуя секреции VEGF и, таким образом, тормозить развитие рака

Экспериментальные данные демонстрируют строгую корреляцию между активностью ядерного фактора kB и злокачественной трансформацией клетки. Активирование NF-κB влияет на развитие рака через транскрипцию генов, участвующих в пролиферации клеток, в ангиогенезе, в образовании метастазов, в воспалительных процессах, а также в подавление апоптоза (рис. 6.7). При этом снижение апоптотической реакции клетки повышает устойчивость опухолевых клеток к терапии [69, 74, 75].

Авторы [69] рассматривают возможность применения «идеального ингибитора» IKK/NF-κB в качестве индивидуального противоракового препарата. На разных стадиях исследования в качестве противоопухолевых препаратов находятся ингибиторы сигнального пути

PI3K-AKT-mTOR [76, 77], который отвечает за предотвращение апоптоза, рост, пролиферацию и метаболизм клеток. Некоторые фосфатазы (например, PLHPP) способны вызывать апоптоз опухолевых клеток за счет дефосфорилирования гидрофобного мотива киназы AKT (Ser-473 в AKT1). Концентрация PHLPP заметно снижена при некоторых видах опухолей (рак толстой кишки, глиобластома), при этом введение PHLPP в клеточную линию глиобластомы вызывает значительную супрессию роста опухоли [78]. Вероятно, соединения, способные выполнять функции фосфатазы (в том числе НДЦ), также могут вмешиваться в процесс онкогенеза и тормозить развитие новообразований.

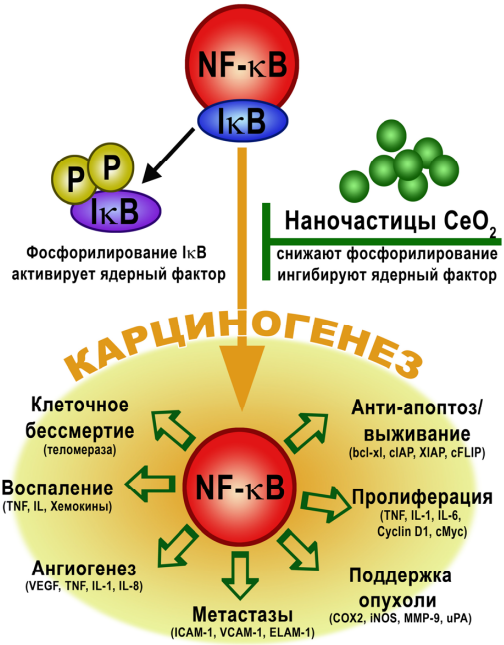


Рис. 6.7. Роль ядерного фактора κB в карциногенезе
и влияние НДЦ на активацию NF-κB

Исследования влияния интерлейкина-1β (IL-1β) на альфа-субъединицу гипоксия-индуцируемого фактора HIF-1α показали, что физиологическая воспалительная реакция может трансформироваться

в онкологическую [76]. При этом происходит активация HIF-1-зависимого васкулярного эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), контролируемого NF-κB. Таким образом, IL-1β опосредует синтез NF-κB-зависимой циклооксигеназы-2 (cyclooxygenases-2, COX-2), которая, в свою очередь, приводит к образованию простагландина E2 (prostaglandin E2), доза-зависимого индуктора HIF-1α. Завершением этого каскада является секреция VEGF, необходимого для развития опухоли и метастаз (рис. 6.6, *A*). Активацию NF-κB вызывают и другие факторы канцерогенеза – например, химические компоненты сигаретного дыма, ответственные за развитие рака лёгкого у курильщиков [79, 80]. Биохимические исследования показали, что наночастицы диоксида церия снижают активирование NF-κB, вызванное компонентами сигаретного дыма [81]. Очевидно, ингибируя фосфорилирование IκBα и (возможно) сигнальный путь PI3K-AKT-mTOR (рис. 6.6, *B*), НДЦ может иметь перспективу и в терапии новообразований. Как уже отмечалось, ядерный фактор κB обеспечивает устойчивость клеток к апоптозу и затрудняет терапию новообразований; применение НДЦ в качестве ингибитора NF-κB должно усиливать действие традиционных противораковых препаратов [82], проявляя синергизм. Более того, при разработке ингибиторов ядерного фактора с целью терапии рака остро стоит вопрос их селективности [69, 83] для того, чтобы в нормальных клетках активность фактора κB сохранялась на прежнем уровне или понижалась незначительно. Как было отмечено, способность НДЦ выполнять функции фермента фосфатазы увеличивается с уменьшением pH среды – вероятно, как и в случае редокс-активности, токсическое действие НДЦ по сигнальному пути NF-κB будет направлено прежде всего на малигнизированные клетки в зоне опухоли, где значение pH понижено.

6.5. Противовирусная активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний

На рис. 6.8. показано, что при вирусном инфицировании одним из путей патогенеза клетки является её трансформация в опухолевую клетку.

Сегодня вирусная инфекция считается одним из основных канцерогенных факторов. Еще в середине 40-х годов XX столетия Л.А. Зильбером была предложена вирусогенетическая теория рака

[84]. Тогда было известно несколько вирусов, однозначно вызывавших опухоли, для остальных возможность индукции канцерогенеза не была доказана. На данный момент показано, что многие из вирусов, ранее считавшихся неканцерогенными, вызывают опухолевый процесс. К ним, например, принадлежат общеизвестные вирусы семейства Herpesviridae. Так, вирусом Эпштейна–Барра обусловлено формирование злокачественного фенотипа в клетках лимфомы [85], ДНК вируса Эпштейна–Барра обнаружена в сыворотке крови больных с карциномой носоглотки [86]. Способность к трансформации показана и для вирусов простого герпеса (ВПГ) первого и второго типов. ВПГ-1 ингибирует процессы апоптоза в вирус-инфицированных клетках [87]. Для ВПГ-2 доказано, что трансплантация бестимусным мышам клеток, трансформированных ВПГ-2, вызывает у них формирование опухолей [88]. Онкогенный потенциал показан и в отношении цитомегаловирусов [89]. Некоторые из герпес-вирусов способны продуцировать в процессе развития инфекции белки-гомологи человеческих онкогенов [90].

Как видно из рис. 6.8, в случае трансформации нормальной клетки в опухолевую основные стадии взаимодействия вириона и клетки совпадают. Очевидно, что применение противовирусных препаратов будет эффективно и в терапии злокачественных опухолей вирусной этиологии. Так, использование аномальных нуклеозидов эффективно угнетает рост назофарингеальной карциномы у мышей [91]. Запатентованы методы лечения опухолевых больных, включающие целенаправленное применение противовирусных средств: направленных на блокирование репликации вирусных нуклеиновых кислот (Ацикловир, Валацикловир); действующих на каскад внутриклеточных противовирусных сигналов (альфа-интерферон); увеличивающих чувствительность иммунокомпетентных клеток к вирусным антигенам (специфических антивирусных иммуноглобулинов) [92]. Их используют в качестве дополнительного компонента перед или в составе стандартной хирургической, радиологической и химиотерапевтической схемы лечения больных раком. Такие подходы позволяют значительно улучшать результаты лечения онкологических больных, уменьшать количество рецидивов, улучшать качество жизни пациентов и значительно продлевать их жизнь.

Нами показан противовирусный эффект наночастиц диоксида церия против РНК-содержащих (*Rhabdoviridae*) и ДНК-содержащих

(*Herpesviridae*) вирусов [93], что является косвенным свидетельством возможного участия НДЦ в предотвращении канцерогенеза на уровне ингибирования функций вирусных нуклеиновых кислот. НДЦ эффективен против внеклеточного вируса, снижая его титры в культуре клеток на 2.6–4.8 lg.

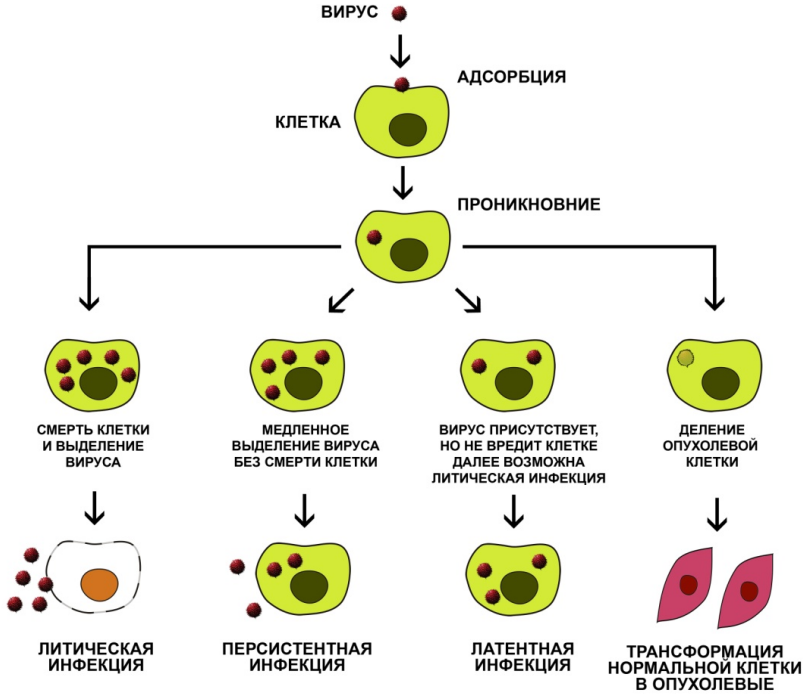


Рис. 6.8. Основные пути развития вирусной инфекции в клетке

В условиях *in vitro* показана противовирусная эффективность полиакрилат-стабилизированного НДЦ при профилактическом применении: в диапазоне концентраций 0,1–0,01 мМ НДЦ культуры мышиных фибробластов (L929) и клеток тестикул свиней (ST) становятся нечувствительными к инфицированию вирусом везикулярного стоматита (ВВС) [94]. Цитрат-стабилизированный НДЦ эффективен против ВВС и ВПГ-1 как при профилактическом применении, так и в условиях, когда инфицирование клеток уже произошло [93]. Помимо того,

что НДЦ обладает самостоятельной противовирусной активностью, наночастицы диоксида церия способны усиливать активность традиционных препаратов, используемых в противовирусной терапии – в том числе и в случае онковирусов. Так, нами показано, что наночастицы диоксида церия увеличивают противовирусную активность препаратов человеческого рекомбинантного α-2-интерферона [95]. Имеющиеся данные позволяют говорить о перспективности применения НДЦ в условиях опухолевого процесса вирусной этиологии, а также открывают перспективу совместного использования композитов НДЦ и белковых противоопухолевых препаратов. Результатом такого применения могут быть повышение эффективности терапевтического воздействия и уменьшение побочных токсических эффектов (в связи с возможностью снижения эффективной противоопухолевой дозы) при использовании препаратов интерферона для лечения злокачественных опухолей – меланомы кожи и глаза; рака почки, мочевого пузыря, яичников, молочной железы; саркомы Капоши, миеломной болезни [95].

6.6. Примеры применения НДЦ в онкологии

В концентрациях 3,5, 10,5 и 23,3 мкг/мл при экспозиции 24, 48 и 72 ч наночастицы диоксида церия размером 20 нм оказывали оксидантное действие на клетки рака легкого человека A549 [96]. Жизнеспособность клеток значительно уменьшалась пропорционально дозе наночастиц и длительности экспозиции. Во всем диапазоне концентраций НДЦ вызывали окислительный стресс в отношении клеток A549, при этом снижались концентрации глутатиона и α-токоферола и возрастали концентрации малонового диальдегида и лактатдегидрогеназы – индикаторов перекисного окисления липидов и повреждения мембраны клетки. Предполагается, что прооксидантный механизм действия НДЦ может быть описан следующей системой уравнений:

$$Ce^{4+} + A^{-}_{red} \rightarrow Ce^{3+} + A_{ox},$$
$$Ce^{3+} + O_2 \rightarrow Ce^{4+} + O_2^{-},$$
$$O_2^{-} + O_2^{-} + 2H^{+} \rightarrow O_2 + H_2O_2,$$
$$H_2O_2 + Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+} + OH^{-} + OH^{\bullet},$$
$$LOOH + Ce^{3+} \rightarrow Ce^{4+} + LO^{\bullet} + OH^{-},$$

где A^{-}_{red} – восстанавливающие компоненты биологической среды (тиоловые соединения, аскорбаты); A_{ox} – их окисленные формы.

Показано [97], что наночастицы CeO_2 уменьшают жизнеспособность клеток гепатомы человека SMMC-7721, вызывают их морфологические повреждения и апоптоз по механизму окислительного стресса. Наночастицы CeO_2 в этих клетках значительно увеличивают образование АФК и значительно уменьшают активность супероксиддисмутазы, глутатион-пероксидазы и каталазы. После обработки CeO_2 значительно увеличивалась степень фосфорилирования MAP киназ ERK1/2, JNK и p38. В работе [98] наночастицы CeO_2 размером около 100 нм синтезировали отжиговым и гидролитическим методами. «Отжиговые» частицы практически не содержали трехвалентного церия, для «гидролитических» было показано присутствие на поверхности Ce^{3+}. Частицы, не содержащие трехвалентного церия, оказались немного более токсичными по отношению к нормальным клеткам L929 и значительно более токсичными по отношению к клеткам рака простаты PC-3.

Меланома – агрессивная злокачественная опухоль, возникающая из-за неконтролируемой пролиферации меланоцитов. Клетки меланомы обладают высокой метастатической активностью, и шансы на излечение от меланомы невысоки из-за ее высокой резистентности к обычной химиотерапии. Авторы [99] исследовали возможность использования наночастиц диоксида церия для уничтожения клеток меланомы человека (A375) *in vitro* и редокс-терапии меланомы *in vivo* у иммунодефицитных (голых) мышей. В опытах использовали нестабилизированные наночастицы CeO_2 и наночастицы с оболочкой из декстрана. Соотношение Ce^{3+}/Ce^{4+} в частицах составляло 67/33 и 21/79 соответственно. Наночастицы во всех исследованных концентрациях оказались нетоксичными для стромальных клеток (фибробласты, эндотелиальные клетки) и обусловили значительное уменьшение жизнеспособности опухолевых клеток, при этом ингибирование жизнедеятельности клеток меланомы было пропорционально концентрации наночастиц и длительности экспозиции. Анализ индикаторов окислительного стресса и апоптоза (уровень АФК, карбонилирование белка, распад поли(АДФ-рибоза)-полимераз, активность каспазы-3) показал, что наночастицы CeO_2 вызывают значительный окислительный стресс в опухолевых клетках, приводящий к снижению их жизнеспособности и уменьшению способности к инвазии. При исследованиях *in vivo* первой группе мышей (контроль) внутрибрюшинно вводили раствор декстрана (0,1 мг/кг массы тела в течение 30 дней), вто-

рой группе – наночастицы диоксида церия (0,1 мг/кг массы тела в течение 30 дней) начиная с первого дня с момента инъекции клеток опухоли A375, третьей группе – начиная с десятого дня. Было показано, что введение наночастиц диоксида церия значительно тормозит развитие злокачественной опухоли (примерно на 70% по сравнению с контролем на 30-й день). Интересно, что между группами 2 и 3 разница в торможении развития опухоли была незначительной (рис. 6.9).

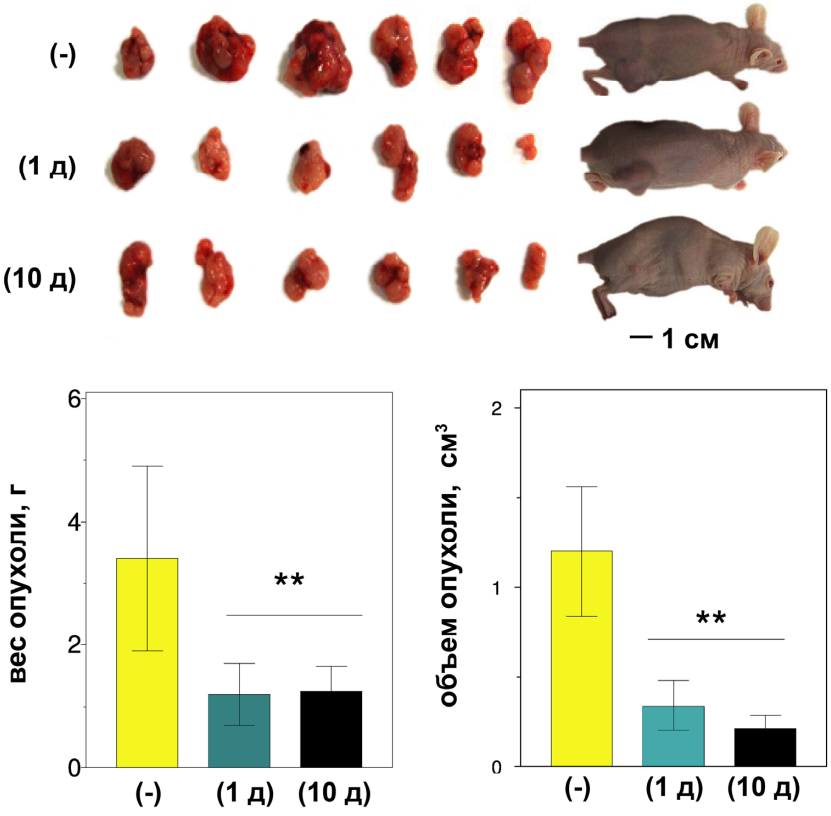


Рис. 6.9. Ингибирующее действие наночастиц диоксида церия на рост опухоли A375 у мышей: (–) – контроль; 1д – введение наночастиц с первого дня; 10д – введение наночастиц с десятого дня [99]

Рак яичников находится на пятом месте среди причин женской смертности, связанных с онкологическими заболеваниями. Было показано [100], что нанокристаллический диоксид церия *in vitro* снижает миграцию и инвазию клеток рака яичника человека SKOV3 и A2780 под действием факторов SDF1, HB-EGF, VEGF165 и HGF. Обработка CeO_2 ингибировала пролиферацию раковых клеток, вызванную фактором роста эндотелия сосудов VEGF165, ангиогенез, активацию VEGFR2 и MMP2 в эндотелиальных клетках сосудов пуповины человека (HUVEC). В экспериментах *in vivo* голым мышам внутрибрюшинно вводили культуру опухолевых клеток A2780, а затем – наночастицы диоксида церия (0,1 мг/кг массы). При этом наблюдалось значительное замедление роста опухоли по сравнению с контролем (рис. 6.10). Авторы утверждают, что нанокристаллический диоксид церия может потенциально использоваться как антиангиогенное терапевтическое средство при раке яичника.

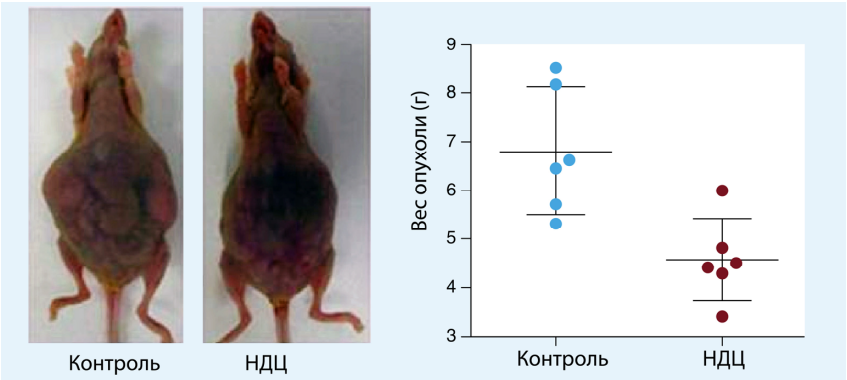


Рис. 6.10. Ингибирующее действие НДЦ на рост перевивного рака яичника в модели *in vivo* [100]

Ретинобластома – злокачественная опухоль глаза, возникающая в области невральной ткани, выстилающей глазное дно. Во время инициирования опухоли и ангиогенеза повышается концентрация АФК; при этом НДЦ способен инактивировать АФК и, таким образом, замедлять процесс патологического образования новых сосудов в сетчатке мыши [101]. Авторы предположили, что с помощью обработки НДЦ *in vivo* можно снижать концентрацию фактора роста VEGF, ин-

гибировать ангиогенез и, таким образом, уменьшать рост опухоли в модели мышей с наследственной ретинобластомой (мыши P53TKO, Chx10-cre; Rb Lox/–; p53 Lox/–; P107–/–). В дальнейших экспериментах мыши получали единственную интравитреальную инъекцию НДЦ (172 нг/глаз) в начале онкогенеза. Размер опухоли и наличие кровеносных сосудов анализировали с помощью фундоскопии, ядерного магнитного резонанса и вазографии. Для мониторинга опухоль-ассоциированных генов и экспрессии протеинов использовали вестерн-блоттинг, полимеразную цепную реакцию в реальном времени (RT-PCR) и иммуногистохимический анализ. Было показано, что НДЦ более чем на 50% снижал объём ретинобластомы через 3 недели после инъекции. Авторы делают вывод, что НДЦ – мощный ингибитор роста опухоли и может представлять новые перспективы в терапии злокачественных новообразований глаза.

Авторы [102] исследовали цитотоксическое действие редокс-активных наночастиц диоксида церия, синтезированных микроэмульсионным методом (размер кристалла 3–5 нм, гидродинамический диаметр 10–15 нм, ζ-потенциал (28,60 ± 4,24 мВ)) на линию клеток колоректальной аденокарциномы человека (HCT 15). Воздействие НДЦ в концентрации в диапазоне от 10 до 100 мкМ в течение 24 ч привело к значительному дозозависимому снижению жизнеспособности клеток. Кроме того, НДЦ в концентрации 10 мкМ проявлял цитотоксический эффект в зависимости от времени экспонирования (24, 48 или 72 ч). В зависимости от дозы НДЦ после обработки в клетках значительно повысилось содержание АФК и продуктов перекисного окисления липидов, что является маркером окислительного стресса. При этом наблюдалась деполяризация митохондриальной мембраны, что приводило к падению мембранного потенциала и инициации апоптоза. Сканирующая электронная микроскопия показала морфологические изменения в клетке и потерю филоподий и ламеллиподий, что указывает на прерывание метастазирования (рис. 6.11).

Установлено, что наночастицы диоксида церия (размером 3–5 нм, стабилизированные декстраном) проявляют селективную цитотоксичность по отношению к клеткам карциномы SCL-1, а также антиинвазивные свойства при взаимодействии стромальных элементов и клеток опухоли [103]. Предполагаемый авторами механизм предотвращения роста опухоли с помощью НДЦ представлен на рис. 6.12. Клетки опухоли выделяют факторы роста и цитокины (например,

TGFβ1), которые инициируют АФК-зависимую генерацию αSMA-позитивных (стромальных) миофибробластов. Проинвазивные сигналы миофибробластов стимулируют способность раковых клеток к инвазии. Эти сигналы могут быть подавлены или блокированы с помощью наночастиц диоксида церия. Наночастицы CeO_2 нетоксичны по отношению к стромальным клеткам, но проявляют цитотоксичность и антиинвазивное действие по отношению к опухолевым клеткам. При этом те же наночастицы CeO_2 защищают нормальные (немалигнизированные) фибробласты кожи человека (HDF) от окислительного стресса.

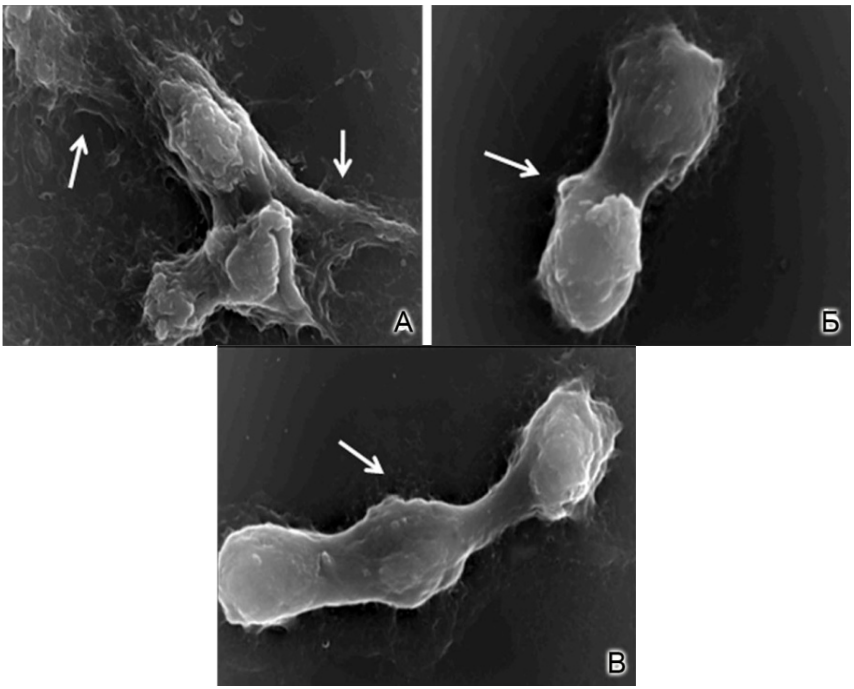


Рис. 6.11. Сканирующая электронная микрофотография клеток колоректальной аденокарциномы человека HCT 15: *А* – контроль; *Б* и *В* – клетки, обработанные 10 мкМ НДЦ в течение 24 ч. Стрелками показаны филоподии и ламеллиподии, необходимые для инвазивных свойств раковой клетки. Видно, что в клетках, обработанных НДЦ, эти органеллы отсутствуют, что говорит о потере способности к образованию метастазов [102]

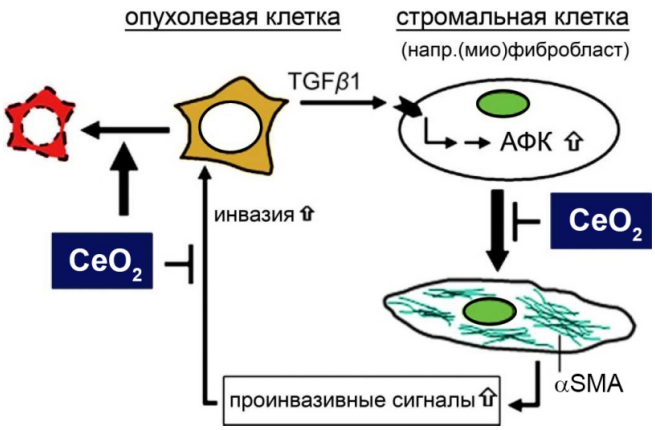


Рис. 6.12. Принцип предотвращения развития опухоли
с помощью наночастиц диоксида церия [99]. Пояснения в тексте

В обзоре [104] авторы составили перечень наночастиц, которые способны вызывать окислительный стресс в раковых клетках. Показано, что НДЦ вызывает окситоз (апоптоз, связанный с окислительным стрессом) клеток гепатомы SMMC-7721 через АФК-ассоциированную активацию ERK1/2, JNK и p38 MAPK.

Такая избирательная защита/индукция окислительного стресса открывает новое направление в редокс-терапии злокачественных опухолей [105], и нанокристаллический диоксид церия в этом отношении может иметь большие перспективы практического применения [106, 107].

6.7. НДЦ в радиотерапии опухолей

Применение наночастиц в радиотерапии опухолей имеет большую перспективу. В обзоре [108] авторы указали основные направления соответствующего использования наноматериалов (рис. 6.13). Уникальные свойства нанокристаллического диоксида церия оказались полезными в радиотерапии опухолей. При этом НДЦ может выступать как в качестве радиосенсибилизатора, избирательно повышающего разрушающее действие излучения на опухоль [109], так и в качестве радиопротектора нормальной ткани для снижения побочных эффектов при лучевой терапии [110–115].

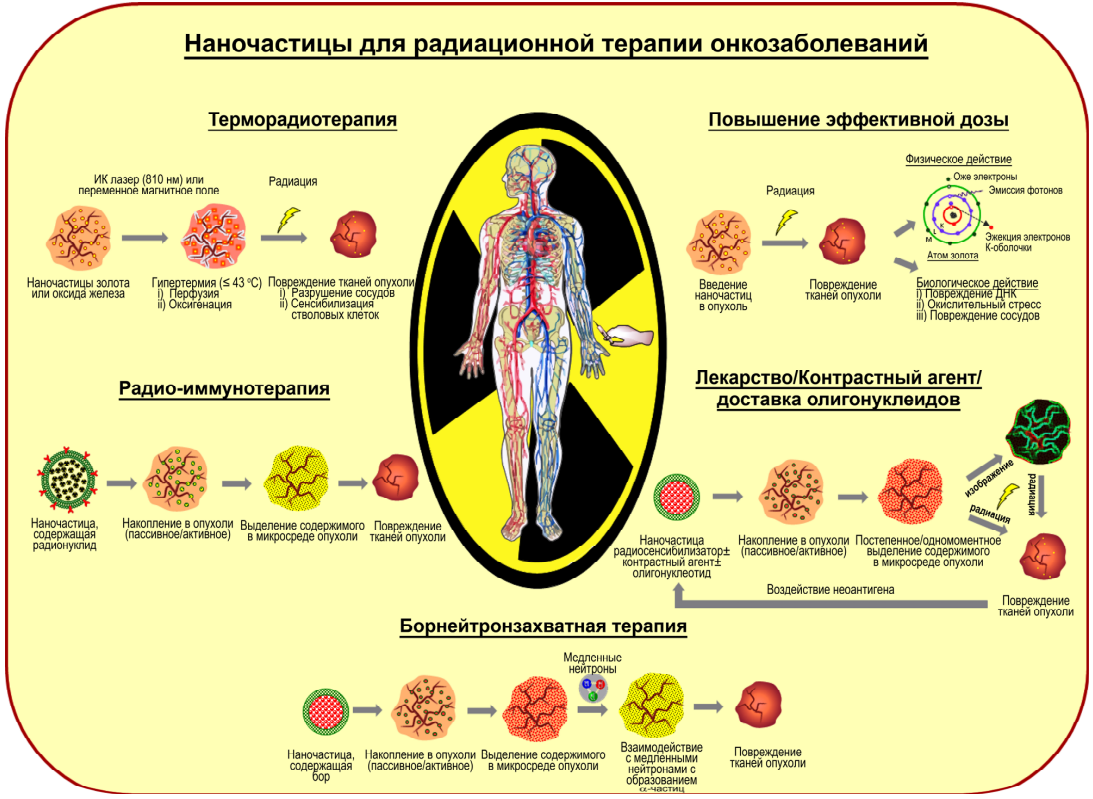


Рис. 6.13. Применение наночастиц в радиационной терапии онкозаболеваний [108]

Наночастицы, содержащие химические элементы с большой атомной массой (металлы или оксиды), способны усиливать разрушающее действие ионизирующего излучения. Основные механизмы взаимодействия рентгеновских лучей с такими наночастицами представлены на рис. 6.14 [109].

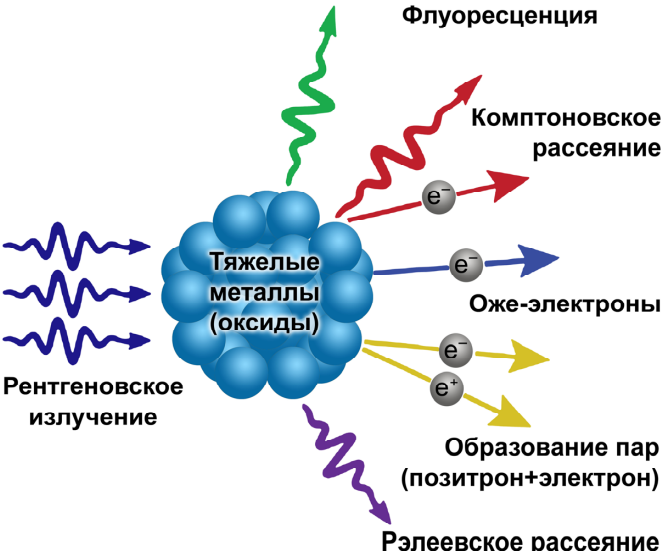


Рис. 6.14. Взаимодействие рентгеновского излучения с наночастицей, содержащей тяжелый металл [109]

По мнению ряда авторов, изучение и практическое применение наночастиц диоксида церия при радиотерапии опухолей сегодня является крайне актуальным [110–116], особенно с учетом радиопротекторного действия НДЦ (см. гл. 7). Например, лучевая терапия – один из немногих методов лечения рака легкого. Однако ткань легкого очень чувствительна к радиации, и эффективность лучевой терапии ограничена низкой переносимостью: у примерно 30% пациентов, получавших радиотерапию, имели место нарушения структуры и функции легочной ткани, в частности развивалась радиационная пневмопатия. Использование радиопротектора, избирательно защищающего нормальную легочную ткань от лучевого повреждения, могло бы существенно повысить эффективность радиотерапии рака

легкого и нивелировать последствия облучения [111]. В работе [112] нормальные фибробласты легкого (CCL-135) в отсутствии и в присутствии наночастиц диоксида церия (10 нМ) подвергали облучению в дозе 20 Гр и через 48 ч оценивали жизнеспособность клеток люминесцентным методом (Cell Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay). Было показано, что обработка НДЦ значительно повышает жизнеспособность фибробластов в условиях облучения по сравнению с необработанным клеточным контролем. При этом НДЦ не защищал от радиационного повреждения клеточную линию рака легкого А549. На примере опухолевых клеток рака молочной железы линии MCF-7, эпителиальных клеток молочной железы CRL 8798, нормальных фибробластов легкого CCL 135 и слабодифференцированных клеток рака легкого А549 те же авторы [113] подтвердили селективность действия НДЦ *in vitro*. *In vivo* (на модели голых бестимусных мышей) было показано, что по своим цитопротекторным свойствам нанокристаллический диоксид церия превосходит клинический препарат Амифостин, который традиционно применяется для купирования последствий разрушения ДНК, вызванного химио- или радиотерапией. После облучения, применения Амифостина, комбинирования «облучение+CeO_2» или «облучение+Амифостин» средняя продолжительность жизни мышей составляла 132, 119, 210 и 81 день соответственно.

Исследованы радиопротекторные свойства CeO_2 по отношению к гастроинтестинальному эпителию [114]. Одноразовая предварительная обработка (за 24 ч до облучения) диоксидом церия нормальных клеток толстой кишки человека (CRL 1541) обеспечивала защиту от лучевого поражения, снижала продукцию АФК и увеличивала экспрессию супероксиддисмутазы-2 (СОД2) в пробе (пропорционально дозе CeO_2). Показано [115], что применение наночастиц диоксида церия позволяет снизить ксеростомию и лучевой дерматит у мышей и может быть целесообразно при лучевой терапии опухолей области головы и шеи. В работе [116] нормальные и опухолевые клетки человека (рак молочной железы, линия MCF-7) обрабатывали диоксидом церия (2–5 нм), выдерживали 24 ч, после чего клетки облучали стандартным способом и определяли количество выживших клеток. Обработка диоксидом церия обеспечивала практически полную защиту нормальных клеток от радиационной гибели, но практически не влияла на гибель клеток опухоли. Как уже отмечалось, в зоне злокачественной опухоли значение pH среды понижено.

Очевидно, в основе механизма защиты нормальных клеток и угнетения жизнедеятельности малигнизированных клеток лежат всё те же pH-зависимые анти- и прооксидантные редокс-свойства НДЦ [60].

На примере радиационно-устойчивых клеток глиосаркомы 9L было показано [117], что высокоэнергетическое рентгеновское излучение генерирует АФК, при этом наночастицы диоксида церия защищают клетки и повышают их выживание. В свою очередь, низкоэнергетическое рентгеновское излучение не только генерирует АФК, но и взаимодействует с CeO_2, формируя поток Оже-электронов; при этом защитный эффект наночастиц нивелируется и жизнеспособность клеток снижается (рис. 6.15). В данном случае НДЦ выступает в роли радиосенсибилизатора.

Известно, что злокачественные опухоли поджелудочной железы являются одними из наименее чувствительных к радиотерапевтическому воздействию образований и побочные эффекты лучевой терапии при таких заболеваниях очень высоки. Использование наночастиц диоксида церия позволяет не только уменьшить повреждение нормальных тканей при радиотерапии таких опухолей, но и целенаправленно усилить разрушающее действие ионизирующего излучения по отношению к раковым клеткам [110]: в данном случае НДЦ также выступает в роли радиосенсибилизатора.

Следует отметить, что наночастицы диоксида церия успешно выступают в качестве сенсибилизатора не только при радиационной, но и при фотодинамической терапии (ФДТ) новообразований. Так, синтезированные нами золи НДЦ (размер 2,8–3,5 нм, ζ-потенциал около –15 мВ) проявляют активность при ФДТ перевивных опухолей [118], выступая в роли как самостоятельных фотосенсибилизаторов, так и усиливая действие традиционного фотосенсибилизатора Фотолона (хлорина Е6) [119]. При инкубации образцов клеток в присутствии НДЦ с последующим облучением показатель гибели клеток превышал контроль на 10% и возрастал с повышением концентрации диоксида церия; темновая цитотоксичность НДЦ практически отсутствовала. При фотодинамической обработке образцов малигнизированных клеток с Фотолоном переинкубация клеток с наночастицами диоксида церия вызвала значительное увеличение гибели (52,2–71,5%) по сравнению с образцами, проинкубированными с одним Фотолоном (27,9%).

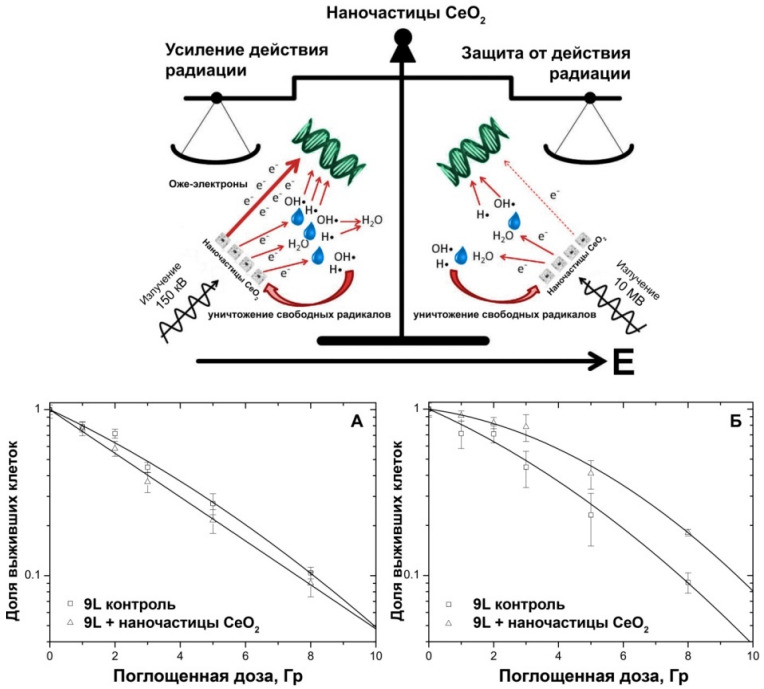


Рис. 6.15. Вверху – схема биологической активности наночастиц диоксида церия в условиях рентгеновского облучения разной мощности. Внизу – соответствующая схеме зависимость доли выживших клеток 9L от поглощенной дозы радиации при введении 50 мкг/мл наночастиц диоксида церия. Энергия излучения: *А* – 150 кВ; *Б* – 10 МВ [117]

Эффект усиления фотодинамического действия при применении НДЦ наблюдался во всем диапазоне исследованных концентраций и выходил на максимум при 0,5 мкг/мл CeO_2. Перспективность использования НДЦ при ФДТ опухолей подтверждается данными о селективной цитотоксичности наночастиц диоксида церия по отношению к малигнизированным клеткам под воздействием УФ-излучения [62]. Частицы диоксида церия, стабилизированные поливинилпирролидоном, защищают от УФ-повреждения нормальные клетки и проявляют фотоцитотоксичность по отношению к клеткам гепатомы HepG2. Одновременно НДЦ может выступать в качестве средства доставки лекарственных препаратов в клетки гепатомы [62]; таким образом,

фотодинамическая терапия злокачественных новообразований может сочетаться с химиотерапией.

6.8. НДЦ как активное средство доставки лекарственных препаратов

Практически все препараты для химиотерапии опухолей обладают высокой цитотоксичностью по отношению как к малигнизированным, так и к нормальным клеткам. Известно, что многие противоопухолевые вещества вызывают окислительный стресс в тканях [120], при этом повреждение нормальных клеток осложняет лечение больных, ограничивает терапевтические дозы препаратов и ухудшает качество жизни пациентов [121]. Метаболическая токсичность препаратов остается общей и трудноразрешимой проблемой [122]. Поскольку наночастицы диоксида церия способны избирательно защищать клетки в условиях окислительного стресса, протекторные свойства НДЦ могут иметь решающее значение при выборе средства доставки лекарственных препаратов в онкологии. Кроме того, большую роль играет адресная доставка препарата в требуемое место, значительно снижающая общую токсичность лекарственного средства, повышающая терапевтический эффект [123]. pH-чувствительные свойства НДЦ предоставляют возможность для создания средств доставки «умных» лекарственных препаратов, например противоопухолевых нанопрепаратов, высвобождающих лекарство в нужном месте в нужное время [124–127]. Было продемонстрировано влияние заряда поверхности частиц диоксида церия на адсорбцию бычьего сывороточного альбумина (BSA) и сродство НДЦ к клеткам аденокарциномы легкого (A549) [123]. ζ-потенциал частиц существенно зависел от pH среды, с увеличением pH ζ-потенциал частиц снижался; образцы НДЦ с положительным ζ-потенциалом демонстрировали максимальную адсорбцию альбумина, тогда как накопление в клетке было максимальным при отрицательном заряде поверхности частиц.

Как показано в гл. 3, токсичность НДЦ по отношению клеткам (в том числе опухолевым) зависит от распределения частиц в цитоплазме и органеллах. С целью изучения влияния заряда поверхности наночастиц диоксида церия на их локализацию и цитотоксичность авторы [128] синтезировали ряд частиц, функционализированных лигандами с различным зарядом, а также незаряженными лигандами.

Показано, что токсичность частиц CeO_2 напрямую связана с их способностью проникать внутрь клетки: при увеличении степени проникновения возрастает и токсичность. Кроме того, при попадании частиц внутрь клетки их цитотоксичность различается в зависимости от места локализации. Наночастицы диоксида церия, которые локализуются преимущественно в цитоплазме, имеют более низкую токсичность по сравнению с частицами, которые накапливаются в лизосомах. Как оказалось, частицы с положительным и нейтральным зарядом способны проникать в большинство изученных типов клеток, частицы с отрицательным зарядом – преимущественно в малигнизированные клетки. При этом если незаряженные частицы концентрируются преимущественно в цитоплазме, то заряженные способны проникать в лизосомы.

Таким образом, частицы с положительным зарядом имеют максимальную токсичность, незаряженные – минимальную токсичность для всех изученных типов нормальных клеток, а частицы с отрицательным зарядом поверхности малотоксичны для нормальных и токсичны для опухолевых клеток. На основании такого распределения и редокс-поведения НДЦ предложен «умный» нанопрепарат для доставки и высвобождения противоопухолевого препарата флоксуридина (FUDR) в раковой клетке (рис. 6.16) [127]. Модифицированные β-циклодекстрином наночастицы диоксида церия могут «запечатывать» функционализированный ферроценом мезопористый кремнезём (MSN) за счет взаимодействия «гость – хозяин». Такой нанопрепарат попадает в раковую клетку лизосомальным путем и нетоксичен для нормальных клеток. В случае малигнизированных клеток НДЦ в кислой среде окисляет ферроценил до ферроцена, который гораздо хуже удерживается в полости циклодекстрина. При этом НДЦ отрывается с поверхности MSN, распечатывая мезопоры и высвобождая цитотоксичный препарат.

В качестве средства доставки лекарственных веществ предложено использовать везикулы на основе олеата натрия, кремнезема и НДЦ, синтезируемые методом самосборки [129]. При использовании НДЦ в качестве средства доставки в ряде случаев он проявляет синергизм и с другими лекарственными препаратами, применяемыми в онкологии, – например с интерфероном [93] или с доксорубицином [131], что позволяет достичь большего эффекта и/или снизить терапевтическую дозу препарата.

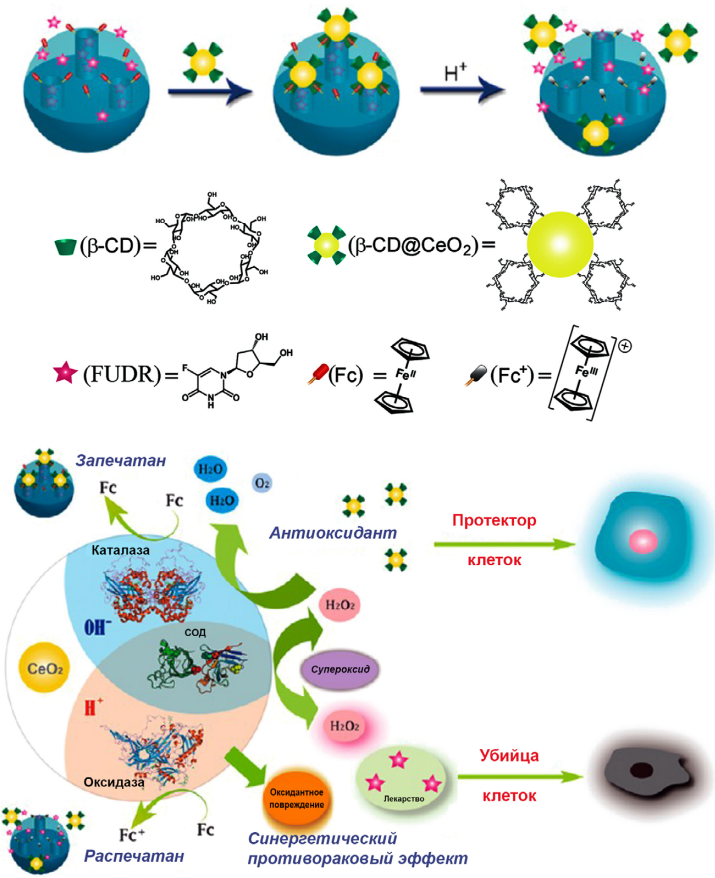


Рис. 6.16. Вверху: Схема pH-зависимого выделения в цитозоль противоракового препарата (FUDR) из частицы «ферроцен – мезопористый кремнезём» (Fc-MSN), «запечатанной» наночастицей «β-циклодестрин – НДЦ» (β-CD@CeO_2). Механизм управляемого выделения препарата основан на окислении диоксидом церия молекулы ферроценила в лизосомах раковых клеток; образующийся при этом ферроцен имеет низкое сродство к циклодекстрину, что вызывает отделение «запечатывающих» наночастиц CeO_2. Внизу: энзимоподобная активность НДЦ при различных pH [127]. При нейтральных и щелочных значениях pH НДЦ проявляет СОД-подобную и каталазоподобную активность, защищая нормальные клетки. В кислой среде НДЦ проявляет СОД-подобную и оксидазоподобную активность, уничтожая раковые клетки

В работе [130] авторы изучали синергизм НДЦ и доксорубицина по отношению к клеткам меланомы A375 и к клеткам нормальных фибробластов кожи человека HDF. Клетки A375 культивировали 48 ч в присутствии 300 мкМ НДЦ, или 24 ч в присутствии 0,5 мкМ доксорубицина, или при в присутствии НДЦ и доксорубицина одновременно. Жизнеспособность клеток в случае НДЦ составляла 88% от контроля (необработанных клеток A375), в случае доксорубицина – 40–50%, в случае их совместного использования жизнеспособность клеток составила 20%. В отличие от клеток меланомы, по отношению к нормальным фибробластам НДЦ цитотоксичности не проявлял. Доксорубицин в концентрации 25 мкМ снижал жизнеспособность клеток HDF до 60–70%. При этом использование 150 мкМ НДЦ совместно с 25 мкМ доксорубицина полностью нивелировало цитотоксическое действие последнего. По мнению авторов, терапевтический подход, основанный на комбинировании низких концентраций доксорубицина (с целью минимизации побочных эффектов) и НДЦ (который защищает клетки стромы), может быть новым инструментом для эффективной терапии рака.

Антикоагулянт гепарин представляет интерес в качестве препарата для терапии злокачественных новообразований [132]. В работе [133] синтезированный пиролизом (d = 12 нм) НДЦ функционализировали гепарином (примерное соотношение 130 молекул гепарина на частицу) через органосилоксановый линкер (3-аминопропилтриэтоксисилан, АПТЭС), рис. 6.17.

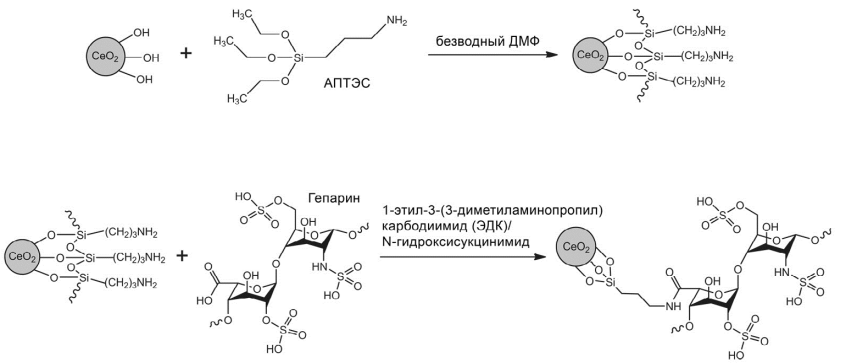


Рис. 6.17. Функционализация наночастиц диоксида церия гепарином [133]

Показано (рис. 6.17), что такой коньюгат более эффективно поглощается моноцитами человека (клеточная линия U937) и клетками U937, активированными 12-о-тетрадеканоил-форбол-13-ацетатом. Гепарин повышает способность НДЦ инактивировать АФК, тогда как наночастицы CeO_2 усиливают проникновение связанного гепарина в клетку по сравнению с несвязанным (чистым) гепарином. Полученный коньюгат разрушается в течение 48 ч после поглощения клеткой.

В работе [134] показано, что коньюгаты НДЦ с гепарином, содержащие 130 или 880 молекул гепарина на одну наночастицу CeO_2, эффективно снижают пролиферацию эндотелиальных клеток, что указывает на возможное использование таких частиц для контроля ангиогенеза при онкологических процессах (рис. 6.18).

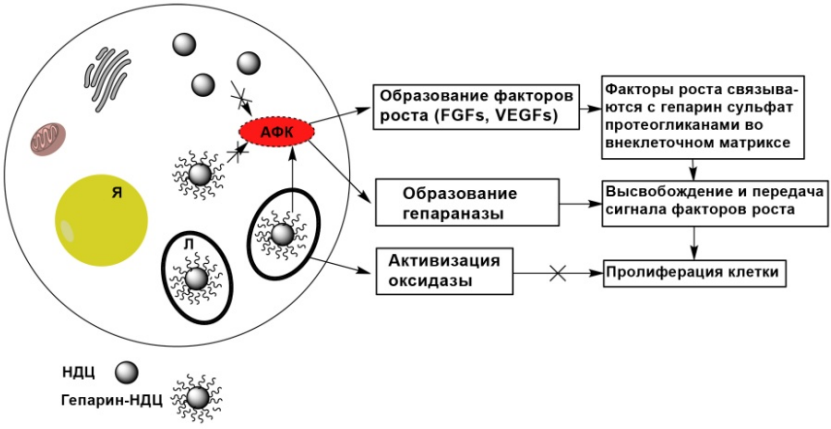


Рис 6.18. Схематический механизм взаимодействия НДЦ, гепарина и эндотелиальной клетки, предложенный в [134]. Л – лизосомы, Я – ядро

Нефункционализированный НДЦ локализовался преимущественно в цитоплазме, тогда как коньюгат НДЦ с гепарином был локализован и в цитоплазме, и в лизосомах.

6.9. Применение НДЦ в диагностике онкологических заболеваний

Для диагностики и лечения онкологических заболеваний необходимы надежные и чувствительные методы регистрации опухолевых маркеров. Благодаря своим уникальным редокс-свойствам НДЦ имеет значительные перспективы и в этом направлении [135]. Как показано в гл. 4, при низких значениях pH наночастицы диоксида церия проявляют свойства ферментов оксидазы и пероксидазы. Так, препарат CeO_2, стабилизированный декстраном, способен вызывать окисление органических красителей, традиционно используемых в иммунологических тестах совместно с пероксидазой хрена, в частности 3,3`,5,5`-тетраметилбензидина и 2,2-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) [136]. Ярко выраженная зависимость пероксидазоподобной активности CeO_2 от pH среды позволила использовать этот материал в качестве мягкого окислителя красителя Амплифлу (Ampliflu™ Red), применяемого в качестве флюорогенного субстрата в иммуноферментном анализе ELISA, и тем самым существенно повысить надежность последнего для выявления рецепторов фолата [137]. Интересно, что наночастицы диоксида церия в данном случае одновременно выполняют функции фермента и являются донором кислорода, исключая необходимость дополнительного введения в систему пероксида водорода. Использование ELISA на базе конъюгатов НДЦ с антителами позволит существенно повысить достоверность и чувствительность клеточных пробирных анализов в клинической практике (рис. 6.19) [136, 137].

Использование собственно НДЦ или модифицированных (в том числе допированных) наночастиц диоксида церия представляет большой интерес для визуальной диагностики в онкологии. Так, наночастицы CeO_2 могут быть использованы для визуализации макроглиальных клеток головного мозга и при этом (в отличие от визуализации с помощью квантовых точек или наночастиц оксида железа) не проявляют цитотоксичности [138, 139]. К сожалению, собственная люминесценция наночастиц диоксида церия невелика и не позволяет регистрировать накопление и распределение частиц CeO_2 в зоне опухоли.

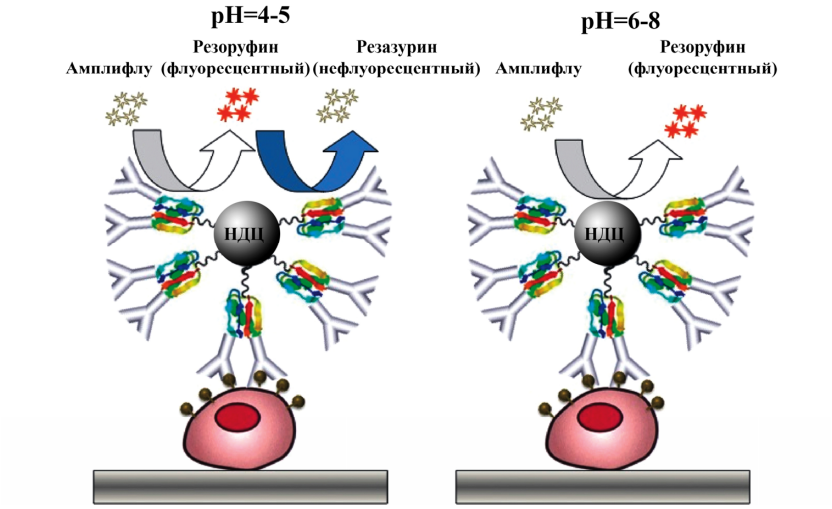


Рис. 6.19. В диапазоне pH 6–8 НДЦ окисляет краситель Амплифлу до флуоресцентного Резоруфина; в кислой среде pH 4–5 образуется нефлуоресцентный Резазурин. В системе пероксидаза хрена/H_2O_2 нефлуоресцентный Резазурин образуется в диапазоне pH 4–7. Способность НДЦ окислять Амплифлу с образованием флуоресцентных продуктов в биологическом диапазоне pH позволяет значительно упростить иммуноферментный анализ и повысить точность регистрации раковых клеток без использования H_2O_2 [137]

Для повышения интенсивности люминесценции CeO_2 допируют ионами других редкоземельных элементов, например европия [140] или эрбия [141]. Наночастицы CeO_2, допированные 15 % мол. Eu^{3+} демонстрируют яркую люминесценцию (возбуждение 466 нм, эмиссия 611 нм), при этом интенсивность люминесценции возрастает с повышением температуры отжига, а концентрация кислородных вакансий и трехвалентного церия при этом снижается [140]. На примере пероксида водорода продемонстрирована способность допированного эрбием CeO_2 (10 % мол. Er^{3+}) разрушать АФК. Показано, что такие наночастицы (возбуждение 405 нм, эмиссия 515 нм и 572,5 нм) могут быть визуализированы в клетке с помощью конфокального микроскопа, при этом, по сравнению с недопированным НДЦ, их антиоксидантные свойства не меняются или даже возрастают [141]. Биосовместимые наночастицы CeO_2, допированные иттрием и содопированные

эрбием, гольмием или тулием (CeO_2, 20% Yb, 5% Er, Ho или Tm), при возбуждении ИК-излучением люминесцируют в видимом диапазоне (up-conversion) и нетоксичны по отношению к эндотелиальным клеткам пупочной вены человека HUVEC и легочным фибробластам человека WI-38. При этом те же наночастицы вызывают апоптоз клеток рака легкого CRL-5803, демонстрируя, таким образом, потенциал использования в качестве клинических контрастных веществ для визуализации и в качестве терапевтического средства для лечения онкологических заболеваний [142].

Допирование НДЦ гадолинием не оказывает существенного влияния на биосовместимость и редокс-свойста наночастиц, но позволяет использовать их в качестве контрастирующего агента для МРТ [143–148], в том числе для исследования злокачественных новообразований. С помощью нетоксичных высокомолекулярных органических соединений такие наночастицы могут быть инкорпорированы в нанокомпозит, содержащий органические люминесцентные красители или нанофосфоры – квантовые точки или люминесцентные наночастицы ванадата иттрия, допированного европием, что обеспечит дополнительную визуализацию в клетке в условиях УФ-освещения [148] (рис. 6.20).

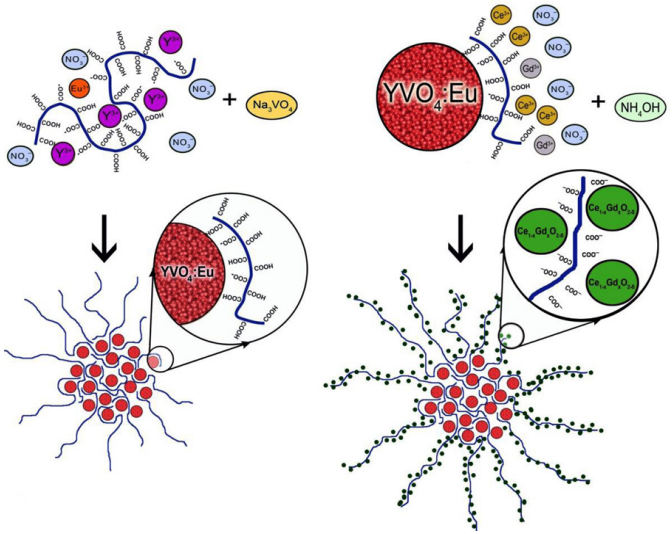


Рис. 6.20. Нанокомпозит НДЦ для тераностики опухолей [147]

В качестве контрастного вещества для однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) перспективны радиоактивные наночастицы диоксида церия – например, полученные на циклотроне облучением наночастиц оксида лантана протонами и содержащие радиоактивный изотоп ^{137m}Ce ($T_{1/2}$ = 34,4 ч, IT (99,22%), β+ (0,779%)) [149]. Такие наночастицы одновременно могут выступать в качестве радиоактивной метки *in vivo* (в том числе при диагностике опухолей) и радиопротектора биологических тканей (рис. 6.21). Либо сторонний радиоизотоп может быть закреплён на поверхности наночастицы диоксида церия – в обоих случаях НДЦ будет защищать ткани от разрушающего действия радиации. Второй подход описан в работе [150] (рис. 6.22).

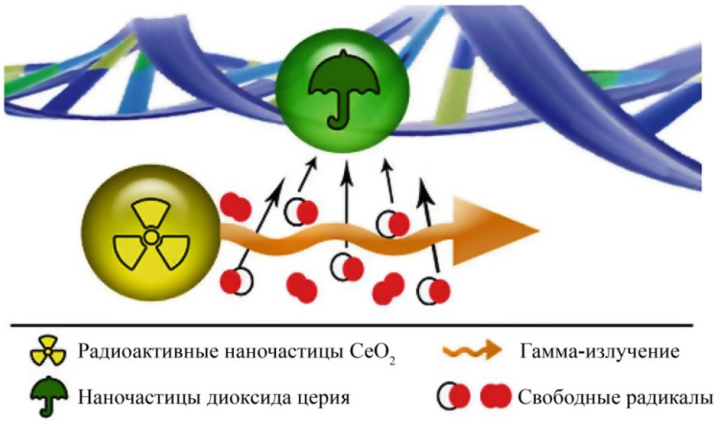


Рис. 6.21. Диагностика и защита от свободных радикалов
с помощью радиоактивных наночастиц диоксида церия [149]

Источники низкоуровневого ионизирующего излучения (например, радиоактивный технеций, ^{99m}Tc) потенциально опасны с точки зрения повреждения клеток и стимуляции онкологических новообразований. В качестве альтернативы авторы предлагают использовать наночастицы диоксида церия, функционализированные радиоизотопом и таргетным лигандом. При этом антиоксидантные свойства НДЦ позволят нивелировать риск побочных процессов, связанный с образованием активных форм кислорода и свободных радикалов. Такие коньюгаты перспективны для применения на пациентах, которые

нуждаются в частых исследованиях с использованием радиоактивных материалов – в частности, на детях, которые особенно чувствительны к ионизирующему излучению (рис. 6.22).

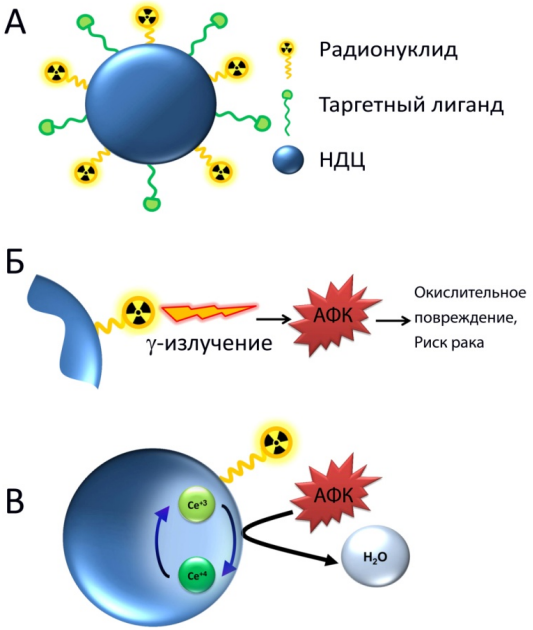


Рис. 6.22. Схема одновременной изотопной визуализации и защиты при использовании коньюгата, содержащего НДЦ, радиоизотоп и таргетный лиганд (*А*). В отсутствии НДЦ гамма-излучение изотопа способствует образованию АФК, которые вызывают окислительное повреждение тканей и повышают риск развития рака (*Б*). В присутствии НДЦ активные формы кислорода разрушаются с образованием нетоксичных соединений – кислорода и воды (*В*) [150]

В работе [151] цитотоксичность радиоактивных наночастиц диоксида церия проверяли на клеточных линиях COLO 205, KB 3-1, A549 и SK-OV-3 с целью анализа возможности использования НДЦ для ОФЭКТ. При использовании в качестве стабилизатора декстрана DT10 наночастицы CeO_2 в концентрации до 1 мкг/мл стимулировали рост клеток COLO 205 и KB 3-1, а 10 мкг/мл – клеток A549 и SK-OV-3.

Для всех клеточных линий наночастицы CeO_2 в концентрации до 120 мкг/мл оказались нетоксичными. При использовании в качестве стабилизатора полиакриловой кислоты клетки COLO 205 и KB 3-1 погибали при концентрации наночастиц 40 мкг/мл и выше, а в диапазоне концентраций 10–120 мкг/мл снижалась жизнеспособность клеток A549 и SK-OV-3. В рабочих концентрациях ОФЭКТ (1 мкг/мл *in vitro*) стабилизированные декстраном радиоактивные наночастицы диоксида церия оказались нетоксичны. ОФЭКТ изображение мыши после инъекции радиоактивных наночастиц диоксида церия представлено на рис. 6.23. На фотографиях также видна скорость выведения наночастиц из паренхиматозных органов.

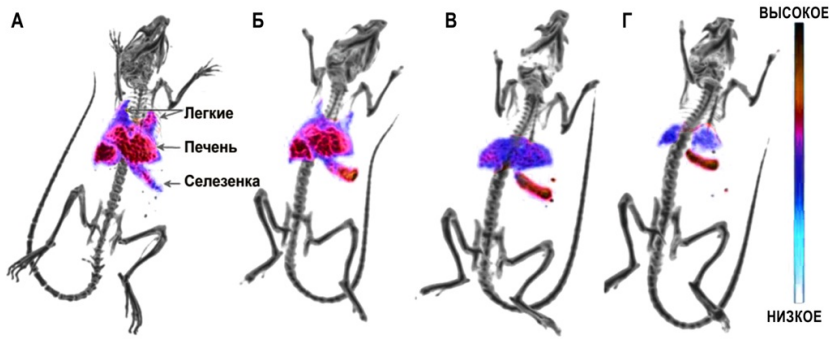


Рис. 6.23. *In vivo* однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ/КТ) голой мыши после введения радиоактивных наночастиц диоксида церия ^{141}Ce (~180 мкКи, 3,6 нМоль, 250 мл), стабилизированных декстраном DT10, через: *А* – 2 ч, *Б* – 24 ч, *В* – 72 ч и *Г* – 144 ч после инъекции [151] (инвертированное изображение)

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день данные свидетельствуют о том, что НДЦ представляет собой уникальный многофункциональный материал, на основе которого могут быть созданы разнообразные препараты, перспективные для применения в терапии и диагностике онкологических заболеваний [152]. Целый ряд практических применений диоксида церия основан на его способности защищать живые системы от окислительного стресса различной природы, выступая в роли искусственного аналога оксидоредуктаз, включая супероксиддисмутазу, пероксидазу, каталазу и др. Редокс-активность НДЦ в значительной степени зависит от размера частиц и состава

окружающей среды, что позволяет тонко регулировать антиоксидантные и прооксидантные свойства препаратов для редокс-терапии онкологических заболеваний. НДЦ перспективен для применения в условиях опухолевых процессов вирусной этиологии. Особый интерес представляет совместное использование гибридных материалов на основе НДЦ и белковых противоопухолевых препаратов для повышения эффективности терапевтического воздействия и уменьшения побочных токсических эффектов. Фотопротекторное и радиопротекторное действие НДЦ открывает широкие перспективы его применения в фотодинамической терапии и радиотерапии опухолей. pH-чувствительные свойства НДЦ предоставляют возможность для создания средств доставки «умных» лекарственных препаратов, например, противоопухолевых нанопрепаратов, высвобождающих лекарство в нужном месте в нужное время. Наконец, НДЦ, различные твердые растворы на основе CeO_2 (в том числе гадолинийсодержащие), а также наночастицы CeO_2, поверхность которых модифицирована различными лигандами, могут быть использованы для мультимодальной диагностики онкологических заболеваний, включая визуализацию малигнизированных клеток, МРТ- и ОФЭКТ-диагностику.

Литература

1. *Salata O.V.* Applications of nanoparticles in biology and medicine // Journal of nanobiotechnology. 2004. Vol. 2, № 1. P. 3.

2. *Monty L., Lu J., Kovochich M., Xia T., Ruehm S.G., Nel A.E., Tamanoi F., Zink J.I.* Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery // ACS nano. 2008. Vol. 2, № 5. P. 889–896.

3. *Agnihotri Sunil A., Nadagouda N. Mallikarjuna, Tejraj M. Aminabhavi*. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery // Journal of Controlled Release. 2004. Vol. 100, № 1. P. 5–28.

4. *Semenova A.A., Brazhe N.A., Parshina E.Y., Ivanov V.K., Maksimov G.V., Goodilin E.A.* Aqueous Diaminsilver Hydroxide as a Precursor of Pure Silver Nanoparticles for SERS Probing of Living Erythrocytes // Plasmonics. 2014. Vol. 9, № 2. P. 227–235.

5. *Semenova A.A., Goodilin E.A., Brazhe N.A., Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Lebedev V.A., Goldt A.E. et al.* Planar SERS nanostructures with stochastic silver ring morphology for biosensor chips. // Journal of Materials Chemistry. 2012. Vol. 22, № 47. P. 24530–24544.

6. *Veiseh O., Gunn J.W., Zhang M.* Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging // Advanced drug delivery reviews. 2010. Vol. 62, № 3. P. 284–304.

7. *Ghosh P., Han G., De M., Kim C.K., Rotello V.M.* Gold nanoparticles in delivery applications // Advanced drug delivery reviews. 2008. Vol. 60, № 11. P. 1307–1315.

8. *Chan W. C.W., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S.* Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging // Current opinion in biotechnology. 2002. Vol. 13, № 1. P. 40–46.

9. *Wang F., Tan W.B., Zhang Y., Fan X., Wang M.* Luminescent nanomaterials for biological labelling // Nanotechnology. 2006. Vol. 17, № 1. P. R1.

10. *Saha K., Agasti S.S., Kim C., Li X., Rotello V.M.* Gold nanoparticles in chemical and biological sensing // Chemical Reviews. 2012. Vol. 112, № 5. P. 2739–2779.

11. *Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H.* Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing // Nature materials. 2005. Vol. 4, № 6. P. 435–446.

12. National Cancer Institute, Cancer Nanotechnology: Going small for big advances. (NIH Publication No 04-5489, Jan 2004). P. 26.

13. National Cancer Institute/NIH: Cancer Nanotechnology Plan. Office of Cancer Nanotechnology, Research Center for Strategic Scientific Initiatives (CSSI). (NIH Publication No.11-7794, Nov 2010). P. 76.

14. *Brannon-Peppas L., Blanchette J.O.* Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy // Advanced drug delivery reviews. 2012. Vol. 64. P. 206–212.

15. *Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A.* Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles // Lasers in medical science. 2008. Vol. 23, № 3. P. 217–228.

16. *Melnikov O.V., Gorbenko O.Yu., Markelova M.N., Kaul A.R., Atsarkin V.A., Demidov V.V., Soto C., Roy E.J., Odintsov B.M.* Ag-doped manganite nanoparticles: New materials for temperature-controlled medical hyperthermia // Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2009. Vol. 91, № 4. P. 1048–1055.

17. *O'Neal D.P., Hirsch L.R., Halas N.J., Payne J.D., West J.L.* Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles // Cancer letters. 2004. Vol. 209, № 2. P. 171–176.

18. *Lee J.-H., Huh Y.-M., Jun Jo.-W., Seo J.-W., Jang J.-T., Song H.-T., Kim S. et al.* Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging // Nature medicine. 2006. Vol. 13, № 1. P. 95–99.

19. *Drbohlavova J., Chomoucka J., Adam V., Ryvolova M., Eckschlager T., Hubalek J., Kizek R.* Nanocarriers for anticancer drugs-new trends in nanomedicine // Current drug metabolism. 2013. Vol. 14, № 5. P. 547–564.

20. *Xu P., Van Kirk E.A., Murdoch W.J., Zhan Y., Isaak D.D., Radosz M., Shen Y.* Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles // Biomacromolecules. 2006. Vol. 7, № 3. P. 829–835.

21. *Cho E.C., Xie J., Wurm P.A., Xia Y.* Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I2/KI etchant // Nano letters. 2009. Vol. 9, № 3. P. 1080–1084.

22. *Swami A., Shi J., Gadde S., Votruba A.R., Kolishetti N., Farokhzad O.C.* Nanoparticles for targeted and temporally controlled drug delivery // In Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications. Springer US, 2012. P. 9–29.

23. *Hu C.-M.J., Aryal S., Zhang L.* Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment // Therapeutic delivery. 2010. Vol. 1, № 2. P. 323–334.

24. *Basuki J.S., Duong H.T.T., Macmillan A., Erlich R.B., Esser L., Akerfeldt M.C., Whan R.M., Kavallaris M., Boyer C., Davis T.P.* Using fluorescence lifetime imaging microscopy to monitor theranostic nanoparticle uptake and intracellular Doxorubicin release // ACS nano. 2013. Vol. 7, № 11. P. 10175–10189.

25. *Wang A.Z., Langer R., Farokhzad O.C.* Nanoparticle delivery of cancer drugs // Annual review of medicine. 2012. Vol. 63. P. 185–198.

26. *Davis M.E., Zuckerman J.E., Chung Hang J. Choi, Seligson D., Tolcher A., Alabi C.A., Yen Y., Heidel J.D., Ribas A.* Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles // Nature. 2010. Vol. 464, № 7291. P. 1067–1070.

27. *Park J.Y., Baek M.J., Choi E.S., Woo S., Kim J.H., Kim T.J., Jung J.C., Chae K.C., Chang Y., Lee G.H.* Paramagnetic ultrasmall gadolinium oxide nanoparticles as advanced T 1 MRI contrast agent: account for large longitudinal relaxivity, optimal particle diameter, and in vivo T 1 MR images // ACS nano. 2009. Vol. 3, № 11. P. 3663–3669.

28. *Oyewumi M.O., Yokel R.A., Jay M., Coakley T., Mumper R.J.* Comparison of cell uptake, biodistribution and tumor retention of folate-coated and PEG-coated gadolinium nanoparticles in tumor-bearing mice // Journal of Controlled Release. 2004. Vol. 95, № 3. P. 613–626.

29. *Na H.B., In Chan Song, Taeghwan Hyeon.* Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents // Advanced Materials. 2009. Vol. 21, № 21. P. 2133–2148.

30. *Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Focella T.M. et al.* Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent // Br. J. Radiol. 2006. Vol. 79. P. 248.

31. *Oh M.H., Lee N., Kim H., Park S.P., Piao Y., Lee J., Jun S.W., Woo Kyung Moon, Seung Hong Choi, Taeghwan Hyeon.* Large-scale synthesis of bioinert tantalum oxide nanoparticles for X-ray computed tomography imaging and bimodal image-guided sentinel lymph node mapping // Journal of the American Chemical Society. 2011. Vol. 133, № 14. P. 5508–5515.

32. *Hahn M.A., Singh A.K., Sharma P., Brown S.C., Moudgil B.M.* Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives // Analytical and bioanalytical chemistry. 2011. Vol. 399, № 1. P. 3–27.

33. *Santra S., Bagwe P.R., Dutta D., Stanley J.T., Walter G.A., Tan W., Moudgil B.M., Mericle R.A.* Synthesis and Characterization of Fluorescent, Radio-Opaque, and Paramagnetic Silica Nanoparticles for Multimodal Bioimaging Applications // Advanced Material. 2005. Vol. 17, № 18. P. 2165–2169.

34. *Xing H., Bu W., Zhang S., Zheng X., Li M., Chen F., He Q. et al.* Multifunctional nanoprobes for upconversion fluorescence, MR and CT trimodal imaging // Biomaterials. 2012. Vol. 33, № 4. P. 1079–1089.

35. *Sijl J., Dollet B., Overvelde M., Garbin V., Rozendal T., Jong N.D., Lohse D., Versluis M.* Subharmonic behavior of phospholipid-coated ultrasound contrast agent microbubbles // The Journal of the Acoustical Society of America. 2010. Vol. 128, № 5. P. 3239–3252.

36. *Rapoport N.Y., Kennedy A.M., Shea J.E., Scaife C.L., Nam Kweon-Ho.* Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles // Journal of Controlled Release. 2009. Vol. 138, № 3. P. 268–276.

37. *Ferrara K., Pollard R., Borden M.* Ultrasound microbubble contrast agents: fundamentals and application to gene and drug delivery // Biomedical Engineering. 2007. Vol. 9, № 415.

38. *Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A.* Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles // Lasers in medical science. 2008. Vol. 23, № 3. P. 217–228.

39. *Jang B., Park J.-Y., Tung C.-H., Kim I.-H., Choi Y.* Gold nanorod – photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo. // Acs Nano. 2011. Vol. 5, № 2. P. 1086–1094.

40. *Gamaleia N.F., Shishko E.D., Dolinsky G.A., Shcherbakov A.B., Usatenko A.V., Kholin V.V.* Photodynamic activity of hematoporphyrin conjugates with gold nanoparticles: experiments in vitro // Exp Oncol. 2010. Vol. 32. P. 44–7.

41. *Maggiorella L., Barouch G., Devaux C., Pottier A., Deutsch E., Bourhis J., Borghi E., Levy L.* Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles // Future Oncology. 2012. Vol. 8, № 9. P. 1167–1181.

42. *Mortensen M.W., Sørensen P.G., Björkdahl O., Jensen M.R., Hans Jørgen Gottlieb Gundersen, Bjørnholm T.* Preparation and characterization of Boron carbide nanoparticles for use as a novel agent in T cell-guided boron neutron capture therapy // Applied radiation and isotopes. 2006. Vol. 64, № 3. P. 315–324.

43. *Watanabe T., Ichikawa H., Fukumori Y.* Tumor accumulation of gadolinium in lipid-nanoparticles intravenously injected for neutron-capture therapy of cancer // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. 2002. Vol. 54, № 2. P. 119–124.

44. *Lewin C.* Über die Verwendung einer Cerium-Jodverbindung (Introcid) in der Therapie der Geschwulstbildungen // Med Klin. 1924. Vol. 20. P. 1319–1323.

45. *Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K.* Pharmacological properties of cerium compounds // Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Springer Berlin Heidelberg. 2005. P. 101–111.

46. *Xiao B., Ji Y., & Cui M.* Effects of lanthanum and cerium on malignant proliferation and expression of tumor-related gene. Zhonghua yu fang yi xue za zhi // Chinese journal of preventive medicine. 1997. Vol. 31(4). P. 228.

47. *Ji Y.J., Xiao B., Wang Z.H., Cui M.Z., & Lu Y.Y.* The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines // Biomedical and environmental sciences: BES. 2000. Vol. 13(4). P. 287.

48. *Dai Y., Li J., Li J., Yu L., Dai G., Hu A., Wen Z.* Effects of rare earth compounds on growth and apoptosis of leukemic cell lines // In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2002. Vol. 38(7). P. 373–375.

49. *Palizban A.A., Sadeghi-Aliabadi H., Abdollahpour F.* Effect of cerium lanthanide on HeLa and MCF-7 cancer cell growth in the presence of transferring // Research in pharmaceutical sciences. 2000. Vol. 5(2). P. 119.

50. Lanthanide-porphyrin complexes as anti-tumor agents. United States Patent Application 20100069345. Inventors: Che, Chi-ming (Hong Kong, HK) Wong, Suk-yu (Hong Kong, HK).

51. *Zhang G.Y., Zhao H.J., Xin Z.J., Qu J.L., Wang B.G., Wang H.* Effect of cytotoxicity on normal cells and anti-tumor activity on tumor cells of cerium nitrate in vitro // Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences). 2009. Vol. 6. P. 017.

52. *Zhao H.J., Zhang G.Y., Liu Y.* Study on anti-tumor activity of cerium nitrate in vivo and it's mechanism // Chinese Journal of Public Health. 2007. Vol. 5. P. 017.

53. *Essington M.E.* Soil and water chemistry: An integrative approach. CRC press. 2003, P. 534.

54. *Cotton F.A., Wilkinson G., Murillo C.A.* Advanced inorganic chemistry. 6th edition. New York, NY : John Wiley and Sons, Inc. P. 1125.

55. *Yu P., Hayes S.A., O'Keefe T.J., O'Keefe M., Stoffer J.O.* The phase stability of cerium species in aqueous systems: II. The Ce(III/IV)-H_2O-H_2O_2/O_2 systems. Equilibrium considerations and Pourbaix diagram calculations // J. Electrochem. Soc. 2006. Vol. 153, is. 1. P. C74–C79.

56. *Manda G., Nechifor M.T., Neagu T-M.* Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies // Curr. Chem. Biol. 2009. Vol. 3. P. 342–366.

57. *Wondrak G.T.* Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities //Antioxidants & redox signaling. 2009. Vol. 11(12). P. 3013–3069.

58. *Osinsky S., Vaupel P.* Tumor Microphysiology. Kiev : Naukova Dumka, 2009. P. 254.

59. *Song C.W., Griffin R., Park H.J.* Influence of tumor pH on therapeutic response // Cancer Drug Resistance / ed. by B.A. Teicher. New Jersey: Humana Press, 2006. P. 21–42.

60. *Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis A.* Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // Small. 2008. Vol. 4 (5). P. 552–556.

61. *Zholobak N.M., Shcherbakov A.B., Bogorad-Kobelska A.S., Ivanova O.S., Baranchikov A.Y., Spivak N.Y., Ivanov V.K.* Panthenol-stabilized cerium dioxide nanoparticles for cosmeceutic formulations against ROS-induced and UV-induced damage // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2004. Vol. 130. P. 102–108.

62. *Zhang L., Jiang H., Selke M., Wang X.* Selective Cytotoxicity Effect of Cerium Oxide Nanoparticles Under UV Irradiation // Journal of Biomedical Nanotechnology. 2014. Vol. 10(2). P. 278–286.

63. *Shcherbakov B., Ivanov V.K., Zholobak N.M. et al.* Method for preparing stabiliser-coated nanocrystalline cerium dioxide. RU Patent Application: 2012112921/15, (2012).

64. *Щербаков А.Б., Жолобак Н.М., Иванов В.К., Иванова О.С., Марчевский А.В., Баранчиков А.Е., Спивак Н.Я., Третьяков Ю.Д.*. Синтез и антиокси-

дантная активность биосовместимых водных золей нанокристал-лического диоксида церия, стабилизированных мальтодекстрином // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57, № 11. С.1499–1507.

65. *Mittal S., Pandey A.K.* Cerium Oxide Nanoparticles Induced Toxicity in Human Lung Cells: Role of ROS Mediated DNA Damage and Apoptosis // BioMed Research International. 2014.

66. *Kuchma M.H., Komanski C.B., Colon J., Teblum A., Masunov A.E., Alvarado B., Baker C.H.* Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2010. Vol. 6(6). P. 738–744.

67. *Dowding J.M., Das S., Kumar A., Dosani T., McCormack R., Gupta A., Sayle T. XT et al.* Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials // ACS nano. 2013. Vol. 7, № 6. P. 4855–4868.

68. *Berridge M.J.* Module 2: cell signalling pathways. Cell Signalling Biology. Biochemical Journal's Signal Knowledge Environment Portland Press Ltd., London, UK. 2009. URL: www. biochemj. org/csb/002/csb002. pdf.

69. *Baud V. and Karin M.* Is NF-κB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls // Nature reviews Drug discovery. 2009. Vol. 8, № 1. P. 33–40.

70. *Naugler W.E., Karin M.* NF-κB and cancer – identifying targets and mechanisms // Current opinion in genetics & development. 2008. Vol. 18, № 1. P. 19–26.

71. *Karin M.* NF-κB and cancer: Mechanisms and targets // Molecular carcinogenesis. 2006. Vol. 45, № 6. P. 355–361.

72. *Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U., Staudt L.M.* Constitutive nuclear factor κB activity is required for survival of activated B cell–like diffuse large B cell lymphoma cells // The Journal of experimental medicine. 2001. Vol. 194 (12). P. 1861–1874.

73. *Jung Y.-J., Isaacs J.S., Lee S., Trepel J., and Neckers L.* IL-1β-mediated up-regulation of HIF-1α via an NFκB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis // The FASEB journal. 2003. Vol. 17, № 14. P. 2115–2117.

74. *Fan Y., Dutta J., Gupta N., Gélinas C.* Molecular Basis of Oncogenesis by NF-κB. In NF-κB // Rel Transcription Factor Family. Springer US, 2006. P. 112–130.

75. *Fan Y., Dutta J., Gupta N., Fan G., Gélinas C.* Regulation of programmed cell death by NF-κB and its role in tumorigenesis and therapy // In Programmed cell death in cancer progression and therapy. Springer Netherlands, 2007. P. 223–250.

76. *Seton-Rogers Sarah*. Anticancer drugs: A clearer pathway view // Nature Reviews Drug Discovery. 2014. Vol. 13, № 3. P. 176–177.

77. *Dienstmann R., Rodon J., Serra V., Tabernero J.* Picking the Point of Inhibition: A Comparative Review of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors // Molecular cancer therapeutics. 2014. Vol. 13, № 5. P. 1021–1031.

78. *Gao T., Furnari F., Newton A.C.* PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth // Molecular cell. 2005. Vol. 18(1). P. 13–24.

79. *Chen W., Li Z., Bai L., Lin Y.* NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target // Frontiers in bioscience (Landmark edition). 2010. Vol. 16. P. 1172–1185.

80. *Tang X., Liu D., Shishodia S., Ozburn N., Behrens C., Lee J.J., Hong W.K., Aggarwal B.B., Wistuba I.I.* Nuclear factor-κB (nf-κB) is frequently expressed in lung cancer and preneoplastic lesions // Cancer. 2006. Vol. 107, № 11. P. 2637–2646.

81. *Niu J., Wang K., Kolattukudy P.E.* Cerium oxide nanoparticles inhibits oxidative stress and nuclear factor-κB activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2011. Vol. 338, № 1. P. 53–61.

82. *Nakanishi C., Toi M.* Nuclear factor-κB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs // Nature Reviews Cancer. 2005. Vol. 5, № 4. P. 297–309.

83. *Aggarwal B.B., Sethi G., Nair A., Ichikawa H.* Nuclear factor-κB: a holy grail in cancer prevention and therapy // Current Signal Transduction Therapy. 2006. Vol. 1, № 1. P. 25–52.

84. *Зильбер Л.А.* Вирусная теория происхождения злокачественных опухолей. М. : Медгиз, 1946. 72 с.

85. *Komano J., Sugiura M., Takada K.* Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata // Journal of virology. 1998. Vol. 72(11). P. 9150–9156.

86. *Mutirangura A., Pornthanakasem W., Theamboonlers A., Sriuranpong V., Lertsanguansinchi P., Yenrudi S., Poovorawan Y.* Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma // Clinical cancer research. 1998. Vol. 4(3). P. 665–669.

87. *Koyama A.H., Miwa Y.* Suppression of apoptotic DNA fragmentation in herpes simplex virus type 1-infected cells // Journal of virology. 1997. Vol. 71(3). P. 2567–2571.

88. *Aurelian L.* Herpes simplex virus type 2: unique biological properties include neoplastic potential mediated by the PK domain of the large subunit of ribonucleotide reductase // Front. Biosci. 1998. Vol. 3. P. 237–249.

89. *Cinatl Jr.J., Cinatl J., Vogel J.U., Rabenau H., Kornhuber B., Doerr H.W.* Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells // Intervirology. 1996. Vol. 39(4). P. 259–269.

90. *Nava V.E., Cheng E.H., Veliuona M., Zou S., Clem R.J., Mayer M.L., Hardwick J.M.* Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human bcl-2 oncogene // Journal of virology. 1997. Vol. 71(5). P. 4118–4122.

91. *Neyts J., Sadler R., De Clercq E., Raab-Traub N., Pagano J.S.* The antiviral agent cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) cytosine] has pronounced activity against nasopharyngeal carcinoma grown in nude mice // Cancer research. 1998. Vol. 58(3). P. 384–388.

92. *Martynov A., Farber B.S., Farber S.S.* Method of treatment of cancer. US Patients 20120195911 A1 2.VIII.2012.

93. *Zholobak N., Shcherbakov A., Ivanov V., Olevinskaya Z., Spivak N.* Antiviral effectivity of ceria colloid solutions // Antiviral Research. 2011. Vol. 90(2). P. A67.

94. *Zholobak N., Olevinskaia Z.M., Spivak N., Shcherbakov A.B., Ivanov V.K., Usatenko A.V.* Antiviral effect of cerium dioxide nanoparticles stabilized by low-molecular polyacrylic acid // Mikrobiolohichnyi zhurnal. 2009. Vol. 72(3). P. 42–47.

95. *Жолобак Н.М., Кривохатская Л.Д., Щербаков А.Б., Олевинская З.М., Богорад-Кобельская Е.С., Спивак Н.Я., Иванов В.К., Полежаева О.С., Баранчиков А.Е., Шапорев А.С., Третьяков Ю.Д.* Влияние нанокристаллического диоксида церия на активность препарата Лаферон-Фармбиотек™ // Нанотехнологии в онкологии. 2010. № 44.

96. *Lin W., Huang Y.W., Zhou X.D., Ma Y.* Toxicity of cerium oxide nanoparticles in human lung cancer cells // Int. J. Toxicol. 2006. Vol. 25(6). P. 451–457.

97. *Cheng G., Guo W., Han L., Chen E., Kong L., Wang L., Ai W., Song N., Li H., Chen H.* Cerium oxide nanoparticles induce cytotoxicity in human hepatoma SMMC-7721 cells via oxidative stress and the activation of MAPK signaling pathways // Toxicol. In Vitro. 2013. Vol. 27(3). P. 1082–1088.

98. *Renu G., Rani Divya V.V., Nair S.V., Subramanian K.R.V., Lakshmanan V.K.* Development of cerium oxide nanoparticles and its cytotoxicity in prostate cancer cells // Adv. Sci. Lett. 2012. Vol. 6. P. 17–25.

99. *Alili L., Sack M., von Montfort C., Giri S., Das S., Carroll K.S., Zanger K., Seal S., Brenneisen P.* Downregulation of tumor growth and invasion by redox-active nanoparticles // Antioxid Redox Signal. 2013. Vol. 19(8). P. 765–78.

100. *Giri S., Karakoti A., Graham R.P., Maguire J.L., Reilly C.M., Seal S., Rattan R., Shridhar V.* Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer // PLoS One. 2013. Vol. 8(1). P. e54578.

101. *Klump K.E., Cai X., Towner R., Seal S., Dyer M., McGinnis J.* Targeting retinoblastoma: therapeutic inhibition using catalytic antioxidant cerium oxide nanoparticles // The FASEB Journal. 2013. P. 1088–16.

102. *Jana S.K., Banerjee P., Das S., Seal S., Chaudhury K.* Redox-active nanoceria depolarize mitochondrial membrane of human colon cancer cells // Journal of Nanoparticle Research. 2014. Vol. 16, № 6. P. 1–9.

103. *Alili L., Sack M., Karakoti A.S., Teuber S., Puschmann K., Hirst S.M., Reilly C.M., Zanger K., Stahl W., Das S., Seal S., Brenneisen P.* Combined cytotoxic and anti-invasive properties of redox-active nanoparticles in tumor-stroma interactions // Biomaterials. 2011. Vol. 32(11). P. 2918–2929.

104. *Wondrak G.T.* Redox-directed cancer therapeutics: Molecular mechanisms and opportunities // Antioxid. Redox Signal. 2009. Vol. 11(12). P. 3015–3055.

105. *Mcginnis J.F., Wong L.L., Zhou X.* Inhibition of neovascularization by cerium oxide nanoparticles. United States Patent Application 20090269410. Publication Date: 10/29/2009.

106. *Wason M.S., Zhao J.* Cerium oxide nanoparticles: potential applications for cancer and other diseases // Am. J. Transl. Res. 2013. Vol. 5(2). P. 126–131.

107. *Wason M.S., Colon J., Das S., Seal S., Turkson J., Zhao J., Baker C.H.* Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013. Vol. 9(4). P. 558–569.

108. *Dev Kumar Chatterjee, Tatiana Wolfe, Jihyoun Lee, Aaron P Brown, Pankaj Kumar Singh, Shanta Raj Bhattarai, Parmeswaran Diagaradjane, Sunil Krishnan.* Convergence of nanotechnology with radiation therapy – insights and implications for clinical translation // Translational Cancer Research. 2013. Vol. 2, № 4. P. 256–268.

109. *Deep Kwatra, Anand Venugopal, Shrikant Anant* Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer // Transl. Cancer Res. 2013. Vol. 2 (4). P. 330–342.

110. *Wason M.S., Colon J., Das S., Seal S., Turkson J., Zhao J., Baker C.H.* Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2013. Vol. 9, № 4. P. 558–569.

111. *Baker C.H.* Radiation Protection with Nanoparticles. In: Nanomedicine in Health and Disease / eds. Hunter R.J., Preedy V.R. N.Y.: Science Publishers, 2011. P. 444.

112. *Colon J., Herrera L., Smith J. et al.* Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine. 2009. Vol. 5 (2). P. 225–231.

113. *Colon J., Herrera L., Patil S. et al.* Selective radioprotection of normal tissues with cerium oxide nanoparticles // Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 2008. Vol. 72 (1). P. S700–S701.

114. *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 // Nanomedicine. 2010. Vol. 6(5). P. 698–705.

115. *Madero-Visbal R.A., Alvarado B.E., Colon J.F., Baker C.H., Wason M.S., Isley B., Mañon, R.* Harnessing nanoparticles to improve toxicity after head and neck radiation // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2012. Vol. 8 (7). P. 1223–1231.

116. *Tarnuzzer R.W., Colon J., Patil S., Seal S.* Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage // Nano Lett. 2005. Vol. 5 (12). P. 2573–2577.

117. *Briggs A., Corde S., Oktaria S. et al.* Cerium oxide nanoparticles: Influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation // Nanomedicine. 2013. [Epub ahead of print].

118. *Ермак П.В., Штонь И.А., Усатенко А.В., Щербаков А.Б., Холин В.В.* Модулирующее действие наночастиц оксида церия при фотодинамической терапии перевивных опухолей // Материалы XXXVII Международной научно-практической конференции «Применение лазеров в медицине и биологии», 23–25 мая 2012 г. Харьков, 2012. С. 97–98.

119. *Єрмак П.В.* Підвищення фотодинамічної ефективності фотолону шляхом застосування нанокристалічного оксиду церію // Тези XI конф. молодих онкологів України за участю міжнародних спеціалістів «Сучасні проблеми експериментальної та клінічної онкології», 25–27 квітня. Київ, 2012. С. 107–108.

120. *Conklin K.A.* Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness // Integrative cancer therapies. 2004. Vol. 3(4). P. 294–300.

121. *Chen Y., Jungsuwadee P., Vore M., Butterfield D.A., St Clair D.K.* Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues // Molecular interventions. 2007. Vol. 7(3). P. 147.

122. *Nel A., Xia T., Mädler L., Li N.* Toxic potential of materials at the nanolevel // Science. 2006. Vol. 311 (5761). P. 622–627.

123. *Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W., Seal S.* Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential // Biomaterials. 2007. Vol. 28 (31). P. 4600–4607.

124. *Sawant R.M., Hurley J.P., Salmaso S., Kale A., Tolcheva E., Levchenko T.S., Torchilin V.P.* "SMART" drug delivery systems: double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers // Bioconjugate chemistry. 2006. Vol. 17(4). P. 943–949.

125. *Torchilin V.P.* Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers // Nature Reviews Drug Discovery. 2005. Vol. 4(2). P. 145–160.

126. *Langer R., Tirrell D.A.* Designing materials for biology and medicine // Nature. 2004. Vol. 428 (6982). P. 487–492.

127. *Xu C., Lin Y., Wang J., Wu L., Wei W., Ren J., Qu X.* Nanoceria-Triggered Synergetic Drug Release Based on CeO_2-Capped Mesoporous Silica Host–Guest Interactions and Switchable Enzymatic Activity and Cellular Effects of CeO_2 // Advanced healthcare materials. 2013. Vol. 2(12). P. 1591–1599.

128. *Asati A., Santra S., Kaittanis C., Perez J.M.* Surface-charge-dependent cell localization and cytotoxicity of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2010. Vol. 4(9). P. 5321–5331.

129. *Ishii H., Ito S., Nagao D., Konno M.* Ceria nanoparticle vesicles formed in sodium oleate aqueous solution with mesoporous silica coating // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2014. Vol. 441. P. 638–642.

130. *Sack M., Alili L., Karaman E., Das S., Gupta A., Seal S., Brenneisen P.* Combination of conventional chemotherapeutics with redox-active cerium oxide nanoparticles-a novel aspect in cancer therapy // Molecular cancer therapeutics. 2014: molcanther-0950; doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0950.

131. *Ivanov V.K.* Habil. Thesis. IGIC RAS of Moscow. 2011. P. 292 [in Russian].

132. *Khorana A.A., Sahni A., Altland O.D., and Francis C.W.* Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight // Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2003. Vol. 23, № 11. P. 2110–2115.

133. *Ting S.R., Whitelock J.M., Tomic R., Gunawan C., Teoh W.Y., Amal R., Lord M.S.* Cellular uptake and activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles in monocytes // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 17. P. 4377–4386.

134. *Lord M.S., Tsoi B., Gunawan C., Teoh W.Y., Amal R., Whitelock J.M.* Anti-angiogenic activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles // Biomaterials. 2013. Vol. 34. P. 8808–8818.

135. *Sahu T., Singh Bisht S., Ranjan Das K., Kerkar S.* Nanoceria: synthesis and biomedical applications // Current Nanoscience. 2013. Vol. 9(5). P. 588–593.

136. *Asati A., Kaittanis C., Santra S., Perez J.M.* Oxidase Activity of Polymer-Coated Cerium Oxide Nanoparticles // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2010. Vol. 48. P. 2308–2312.

137. *Asati A., Kaittanis C., Santra S., Perez J.M.* The pH-tunable Oxidase-like Activity of Cerium Oxide Nanoparticles Achieves Sensitive Fluorigenic Detection of Cancer Biomarkers at Neutral pH // Anal. Chem. 2012. Vol. 83. P. 2547–2553.

138. *Maysinger D., Behrendt M., Lalancette-He´Bert M., Kriz J.* Real-Time Imaging of Astrocyte Response to Quantum Dots: In vivo Screening Model System for Biocompatibility of Nanoparticles // Nano Letters. 2007. Vol. 7. P. 2513–2520.

139. *Karakoti A.S., Kuchibhatla S.V., Babu K.S., Seal S.* Direct synthesis of nanoceria in aqueous polyhydroxyl solutions // The Journal of Physical Chemistry C. 2007. Vol. 111 (46). P. 17232–17240.

140. *Kumar A., Babu S., Karakoti A.S., Schulte A., Seal S.* Luminescence properties of europium-doped cerium oxide nanoparticles: role of vacancy and oxidation states // Langmuir. 2009. Vol. 25 (18). P. 10998–11007.

141. *Woan K., Tsai Y.Y., Sigmund W.* Synthesis and characterization of luminescent cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine. 2010. Vol. 5 (2). P. 233–242.

142. *Babu S., Cho J-H., Dowding J.M., Heckert E., Komanski C., Das S., Colon J., Baker C.H., Bass M., Self W.T.* Multicolored Redox Active Upconverter Cerium Oxide Nanoparticle for Bio-imaging and Therapeutics // Chem. Comm. 2010. Vol. 46. P. 6915–6917.

143. *Иванова О.С., Гасымова Г.А., Щербаков А.Б., Иванов В.К., Баранчиков А.Е., Гиль Д.О., Третьяков Ю.Д.* Полиольный синтез нанокристал-лического диоксида церия, допированного неодимом, европием, гадолинием и иттербием // Докл. Акад. наук. 2012. Т. 443 (3). P. 317–320.

144. *Гасымова Г.А., Иванова О.С., Баранчиков А.Е., Щербаков А.Б., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д.* Синтез водных золей нанокристаллического диок-сида церия, допированного гадолинием // Наносистемы: физика, химия, математика. 2011. Т. 2 (3). P. 113–120.

145. *Долгополова Е.А., Иванова О.С., Иванов В.К., Шариков Ф.Ю., Баранчиков А.Е., Щербаков А.Б., Третьяков Ю.Д.* Гидротермально-микро-волновой синтез нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием, в присутствии гексаметилентетрамина // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57(10). P. 1387–1391.

146. *Иванов В.К., Иванова О.С., Щербаков А.Б., Гиль Д.О., Баранчиков А.Е., Третьяков Ю.Д., Жолобак Н.М., Спивак Н.Я.* Способ получения стабилизированного водного золя нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием. 2013. Патент РФ 2503620.

147. *Долгополова Е.А., Иванова О.С., Щербаков А.Б., Спивак Н.Я., Баранчиков А.Е., Иванов В.К.* Получение водных золей $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}$, $Y_{0.9}Eu_{0.1}VO_4$ и нанокомпозитов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-\delta}/Y_{0.9}Eu_{0.1}VO_4$, стабилизированных полиакриловой кислотой // Журн. неорган. химии. 2013. Т. 58(11). P. 1438–1445.

148. *Ivanova O.S., Shekunova T.O., Ivanov V.K. et al.* // In Doklady Chemistry. 2011. Vol. 437(2). P. 103.

149. *Bakht K.M., Sadeghi M., Tenreiro C.* A novel technique for simultaneous diagnosis and radioprotection by radioactive cerium oxide nanoparticles: study of cyclotron production of ^{137m}Ce // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2012. Vol. 292(1). P. 53–59.

150. *Bakht M.K., Hosseini V., Honarpisheh H.* Radiolabeled nanoceria probes may reduce oxidative damages and risk of cancer: A hypothesis for radioisotope-based imaging procedures // Medical hypotheses. 2013. Vol. 81, № 6. P. 1164–1168.

151. *Yang L., Sundaresan G., Sun M., Jose P., Hoffman D., McDonagh P.R., Lamichhane N., Cutler C.S., Perez J.M., Zweit J.* Intrinsically radiolabeled multifunctional cerium oxide nanoparticles for in vivo studies // J. Mater. Chem. B. 2013. Vol. 1. P. 1421–1431.

152. *Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Spivak N.Ya., Ivanov V.K.* Advances and Prospects of Using Nanocrystalline Ceria in Cancer Theranostics // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 59, № 13. P. 1–20.

7. ЗАЩИТНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ ОТ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

7.1. Фотокаталитические и фотопротекторные свойства НДЦ по отношению к органическим соединениям

Фундаментальные представления о фотоактивации полупроводника в упрощенном виде представлены на рис. 7.1.

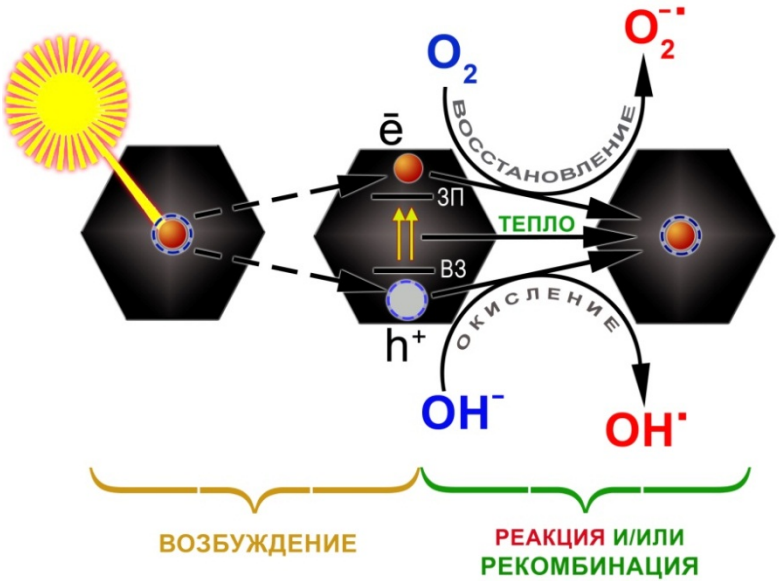


Рис. 7.1. Фотоактивирование полупроводника и первичные реакции, протекающие на его поверхности

Квант света, имеющий энергию больше ширины запрещённой зоны, переводит электрон из заполненной валентной зоны (ВЗ) в свободную зону проводимости (ЗП) (рис. 7.1). Следствием этого является

образование пары электрон ($\bar{e}$) – дырка (h^+). Пара возвращается в исходное (невозбужденное) состояние либо за счет химической реакции, либо за счет рекомбинации. При химическом пути релаксации носители заряда мигрируют на поверхность катализатора, где электрон участвует в процессах восстановления, а дырка – окисления. Как правило, первичные реакции окисления и восстановления проходят с участием кислорода и воды, при этом образуются активные формы кислорода (кислородные радикалы, АФК). Данные АФК и отвечают за дальнейшие процессы фотокаталитического окисления в системе. При рекомбинантном пути релаксации пара электрон и дырка не успевают вступить в реакцию (мигрировать на поверхность полупроводника) и взаимоуничтожаются с выделением тепла.

Сведения о фотокаталитической активности (ФКА) диоксида церия, приводимые в литературе, крайне противоречивы. Отмечается, что для НДЦ характерна быстрая рекомбинация фотовозбужденных носителей заряда и низкая ФКА [1–3]. Благодаря этому свойству, а также высокому коэффициенту поглощения ультрафиолетового излучения авторы [1–3] рекомендуют НДЦ в качестве компонента УФ-защитных покрытий. Проведенные нами [4] систематические исследования ФКА CeO_{2-x} позволили впервые установить, что в отличие от TiO_2 и ZnO ФКА CeO_{2-x} снижается с уменьшением размеров частиц.

Влияние размера частиц диоксида церия на его ФКА исследовали для образцов, полученных методом быстрого осаждения из 0,3 М раствора нитрата церия(III) и подвергнутых термической обработке при температурах 200, 400, 500, 600°С в течение 2 ч.

На рис. 7.2 приведены кинетические кривые разложения красителя в суспензиях, содержащих различные образцы CeO_2. В исследуемом временном интервале (60 мин) полученные кривые можно аппроксимировать линейной функцией $C = C_0 - K \cdot t$, соответствующей протеканию реакции по нулевому порядку.

Зависимость константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого от температуры предварительного термического отжига образцов CeO_2 приведена на рис. 7.3. Как видно из представленных данных, при увеличении температуры термической обработки диоксида церия с 200 до 600°С наблюдается рост константы скорости фотодеградации метилового оранжевого с 0,016 до 0,22 %/мин. С другой стороны, как следует из данных низкотемпературной адсорбции азота, при увеличении температуры термического отжига

порошков CeO_2 происходят уменьшение их удельной площади поверхности и увеличение размеров ОКР (табл. 7.1). Следовательно, увеличение фотокаталитической активности диоксида церия не может быть вызвано изменением морфологии частиц, а, по-видимому, объясняется изменением степени нестехиометрии диоксида церия, напрямую определяемой размерным фактором (см. табл. 7.1).

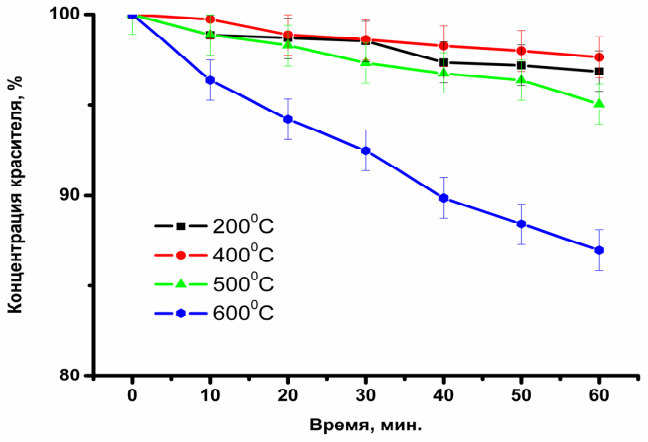


Рис. 7.2. Кинетические кривые фотодеградации метилового оранжевого в суспензиях диоксида церия, отожженного при различных температурах. Значения температуры отжига CeO_2 приведены на рисунке

Таблица 7.1

Характеристики образцов диоксида церия, для которых было проведено определение фотокаталитической активности

Название образца	Размер ОКР, нм	Размер частиц (ПЭМ), нм
Ce0.08-50	3±0.5	3±1
Ce0.08-200	3.4±0.5	4±1
Ce0.08-400	6±0.5	7±1
Ce0.08-500	8±0.5	9±1
Ce0.08-600	9±0.5	11±1
Ce0.3-50	5±0.5	5±1
Ce0.3-200	5.5±0.5	6±1
Ce0.3-400	8±0.5	9±1
Ce0.3-500	9±0.5	10±1
Ce0.3-600	11±0.5	12±1

Скорость фотодеградации красителя в суспензии, содержащей образец, отожженный при 600°С (т.е. имеющий наибольшую фотокаталитическую активность), почти в два раза меньше, чем скорость фотодеструкции в присутствии образца сравнения (Evonik AEROXIDE® TiO_2 P25). Также из рис. 7.3 можно видеть, что скорость фотодеградации красителя в контрольном эксперименте (в отсутствие фотокатализатора) выше, чем в присутствии образцов, отожженных при 200, 400 и 500°С. Данный факт может свидетельствовать о способности данных образцов диоксида церия замедлять процессы фотодеструкции метилового оранжевого преимущественно за счет протекания рекомбинационных процессов, а также экранирования молекул красителя наночастицами CeO_2.

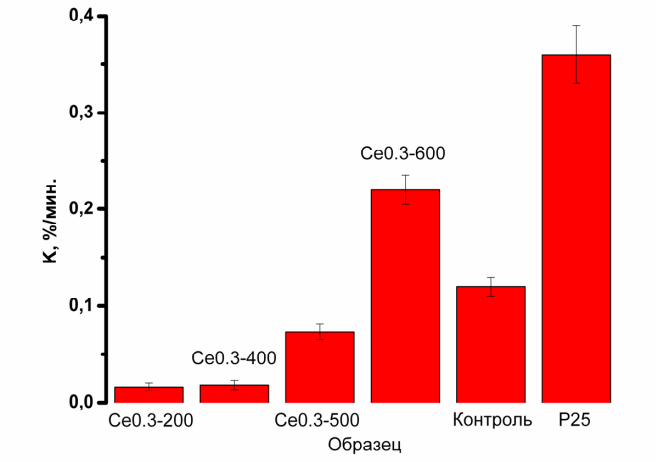


Рис. 7.3. Зависимость константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в водных суспензиях диоксида церия от температуры предварительной термической обработки CeO_2. Температура в ходе проведения экспериментов составляла 47°С

Отметим, что аналогичная способность нанокристаллического диоксида церия замедлять процессы фотодеструкции также отмечалась авторами [5] как для органических (родамин 6Ж), так и для металлорганических (гексагидрат трис(2,2'-бипиридил)дихлоррутения) красителей.

В дальнейшем нами было проведено исследование влияния концентрации исходного раствора нитрата церия(III) на фотокаталитиче-

скую активность осаждаемого из него нанокристаллического диоксида церия. Данную зависимость определяли для образцов, синтезированных из 0,08 и 0,3 М растворов $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ с последующей термической обработкой при температурах 200, 400, 500, 600°С в течение 2 ч.

Зависимость константы скорости реакции фотодеградации от концентрации исходного раствора нитрата церия(III), использованного для синтеза CeO_2, приведена на рис. 7.4. Также на данном рисунке показана зависимость константы скорости фотодеструкции красителя от температуры высокотемпературной обработки образцов, полученных из 0,08 и 0,3 М растворов нитрата церия(III).

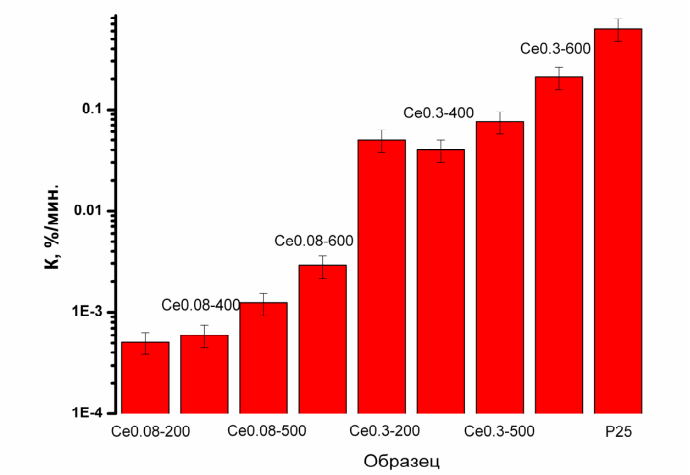


Рис. 7.4. Зависимость скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в водных суспензиях диоксида церия от условий синтеза образцов CeO_2. Температура в ходе проведения экспериментов составляла 37°С

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что константа скорости реакции фотодеградации в присутствии образцов, полученных из 0,08 М раствора нитрата церия(III), примерно на два порядка меньше, чем в присутствии аналогичных образцов CeO_2, полученных из 0,3 М раствора $Ce(NO_3)_3$ и отожженных в идентичных условиях (значения константы скорости реакции составляют $5.1 \cdot 10^{-4}$ и $5{,}0 \cdot 10^{-2}$ %/мин для образцов Ce0.08-200 и Ce0.3-200 соответственно). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при снижении концентрации исходной соли церия(III) происходит уменьше-

ние размера получаемых частиц и, как следствие, увеличивается кислородная нестехиометрия диоксида церия. Это в свою очередь приводит к увеличению концентрации дефектов структуры, играющих роль активных центров, на которых возможно протекание процессов рекомбинации носителей заряда.

Из данных, приведенных на рис. 7.4, также следует, что при увеличении температуры отжига диоксида церия с 200 до 600°С фотокаталитическая активность образцов диоксида церия увеличивается для каждой из серий. Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными авторами [4]. Важно также подчеркнуть, что фотокаталитическая активность образца Ce0.3-600, характеризующегося наибольшим размером частиц и наименьшим отклонением содержания кислорода от стехиометрического, почти вдвое меньше фотокаталитической активности образца сравнения (Evonik P25). Из полученных результатов следует, что для получения диоксида церия с наименьшей фотокаталитической активностью необходимо использовать относительно разбавленные растворы исходных солей церия, а полученные порошки отжигать при температурах не более 200°С.

Исследование зависимости константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в присутствии нанокристаллического CeO_2 от концентрации фотокатализатора проводили для суспензий, содержащих образцы CeO_2, полученные из 0,3 М раствора нитрата церия(III) и отожженные при 200, 400, 500 и 600°С, а также для суспензий, содержащих образец неотожженного диоксида церия. Концентрация фотокатализатора в ходе экспериментов составляла 1,5 и 3,0 мг/мл.

На рис. 7.5 представлена зависимость константы скорости фотодеградации метилового оранжевого в суспензиях, содержащих различные образцы диоксида церия (Ce0.3-50, Ce0.3-200, Ce0.3-400, Ce0.3-500, Ce0.3-600) от концентрации фотокатализатора.

Константа скорости фотодеструкции красителя закономерно возрастает с увеличением концентрации фотокатализатора, что может быть связано с ростом общего количества активных центров, на которых могут протекать процессы фотокаталитического разложения.

Исследование зависимости константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в присутствии нанокристаллического CeO_2 от температуры проведения эксперимента проводили для образцов CeO_2, полученных из 0,3 М раствора нитрата церия(III) и

отожженных при 200, 400, 500 и 600°С в течение 120 мин. Температура суспензий в ходе проведения измерений составляла 27, 37 и 47°С.

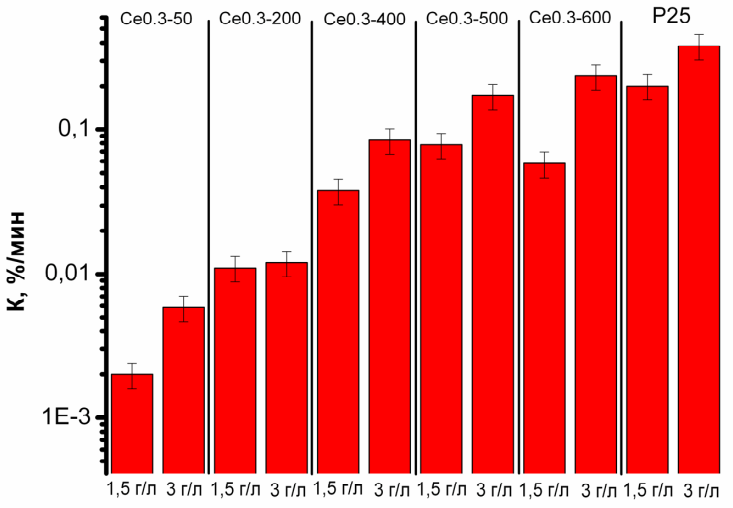


Рис. 7.5. Зависимость константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в суспензиях диоксида церия от концентрации фотокатализатора и от температуры его предварительной термической обработки.

Реакция фотодеградации метилового оранжевого в водных суспензиях в присутствии данных образцов CeO_2 может быть описана кинетическим уравнением нулевого порядка, что следует из сравнения значений коэффициентов парной корреляции для линейной и экспоненциальной аппроксимации экспериментальных данных. Константы скорости фотодеградации красителя в суспензиях, содержащих диоксид церия, при различных температурах приведены на рис. 7.6.

Видно (рис. 7.6), что для образца Ce0.3-600, характеризующегося наибольшим размером частиц (см. табл. 7.1) и наибольшей фотокаталитической активностью, с увеличением температуры проведения эксперимента от 27 до 47°С константа скорости фотодеструкции метилового оранжевого увеличивается с 0,045 до 0,22 %/мин. Такая же зависимость наблюдается и для образца сравнения (Evonik P25), однако его фотокаталитическая активность почти в два раза превышает

аналогичную величину для наиболее активного образца CeO_2, измеренную в идентичных условиях.

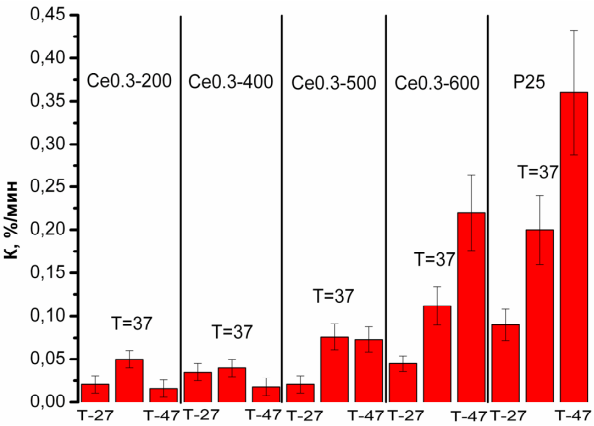


Рис. 7.6. Зависимость скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в водных суспензиях диоксида церия от температуры проведения эксперимента и от температуры термической обработки образцов CeO_2

Влияние pH среды на константу скорости фотодеструкции метилового оранжевого в водных суспензиях, содержащих CeO_2, исследовали при температуре эксперимента 37°C. Для проведения измерений использовали образцы диоксида церия, полученные методом быстрого осаждения из 0,08 М раствора нитрата церия(III) и впоследствии отожженные при 200, 400, 500, 600°C в течение 2 ч. Кроме того, измерения фотокаталитической активности были проведены и для неотожженного образца CeO_2. Кинетика реакции разложения метилового оранжевого в суспензиях диоксида церия при pH 5, 7 и 10 может быть удовлетворительно описана кинетическим уравнением нулевого порядка. Зависимость констант скорости фотодеструкции метилового оранжевого от значения pH суспензий и от условий получения образцов CeO_2 приведена на рис. 7.7.

Следует отметить, что при каждом значении pH зависимость фотокаталитической активности образцов диоксида церия от температуры термической обработки сохраняется: в частности, при увеличении температуры отжига фотокатализатора от 200 до 600°C константа скорости фотодеградации красителя увеличивается с 0,03 до

0,09 %/мин (для суспензий с pH 5). Данный факт хорошо согласуется с зависимостью фотокаталитической активности от температуры отжига образцов, полученной ранее.

Крайне важно подчеркнуть, что константы скорости фотодеградации красителя в суспензиях, содержащих образец сравнения Evonik P25, при каждом значении pH практически не различаются (0,18; 0,20; 0,22 %/мин для pH 5, 7, 10 соответственно). Данный факт может свидетельствовать об идентичности протекания процессов фотодеградации метилового оранжевого при каждом из значений pH. В то же время результаты анализа фотокаталитического разложения в присутствии образцов диоксида церия показывают, что при увеличении значения pH от 5 до 10 константа скорости фотодеградации красителя снижается практически на два порядка. Данный эффект, очевидно, связан с изменением баланса антиоксидантных/прооксидантных свойств диоксида церия при изменении pH среды (см. также гл. 4).

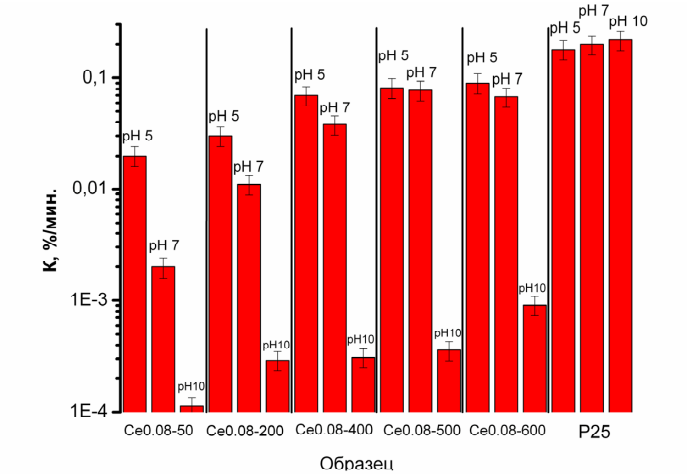


Рис. 7.7. Зависимость константы скорости реакции фотодеградации метилового оранжевого в суспензиях диоксида церия от pH суспензий и от температуры предварительной термической обработки образцов CeO_2

Необходимо подчеркнуть, что аналогичные нанокристаллическому диоксиду церия свойства проявляют и твердые растворы на его основе. Так, нами в работе [6] было впервые проведено детальное исследование фотокаталитических свойств нанокристаллических твердых

растворов состава $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$. Синтез твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$ (x = 0,10; 0,15; 0,20) проводили методом гидротермально-микроволновой (ГТМВ) обработки при температуре 180°С в течение 15, 30, 45 и 60 мин из смешанных водных растворов, содержащих гексанитратоцерат(IV) аммония, нитрат гадолиния и гексаметилентетрамин (ГМТА), при этом мольное соотношение реагентов составляло Ce:Gd:ГМТА = (1–x):x:2.5, а концентрация ГМТА составляла 0,0151–0,0153 М. Размеры частиц $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$, определенные по формуле Шеррера, составили 3,0–4,1 нм, что хорошо согласовалось с данными ПЭМ.

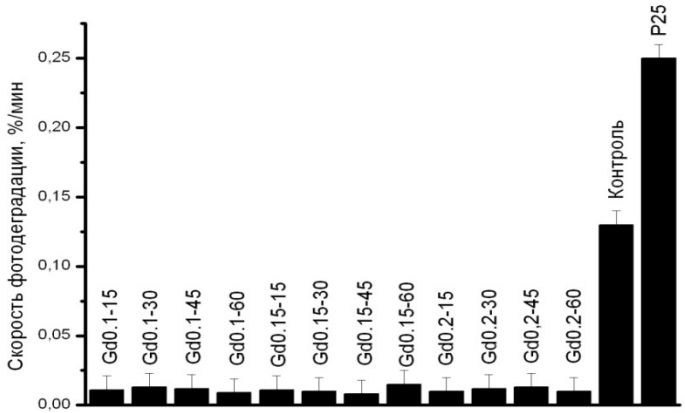


Рис. 7.8. Скорость фотодеградации красителя кристаллического фиолетового в суспензии, содержащей образцы $Ce_{1-x}Gd_xO_2$. Обозначения образцов приведены в табл. 7.2

Кинетические кривые реакции фотодеградации красителя кристаллического фиолетового в присутствии образцов твердых растворов соответствовали протеканию реакции по нулевому порядку. Зависимость константы скорости реакции фотодеградации от степени замещения, а также от продолжительности ГТМВ синтеза приведена на рис. 7.8. Анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что константы скорости реакции фотодеградации кристаллического фиолетового в присутствии всех синтезированных образцов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$ крайне малы. Вследствие крайне низкой фотокаталитической активности различных образцов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$ зависимость зна-

чений констант скорости фотодеструкции красителей от степени допирования и размеров частиц корректно установить невозможно. В то же время крайне важным выводом являлось то, что фотокаталитическая активность всех нанодисперсных твердых растворов, изученных в данной работе, намного меньше ФКА образца сравнения (Evonik AEROXIDE® TiO_2 P25).

Из рис. 7.8 следует также, что скорость фотодеградации красителя в контрольном эксперименте (в отсутствии фотокатализатора) выше, чем в присутствии исследуемых образцов. Данный факт может свидетельствовать о способности данных материалов замедлять процессы фотодеструкции красителя преимущественно за счет протекания рекомбинационных процессов, а также экранирования молекул красителя наночастицами $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$.

Таблица 7.2

Обозначения образцов твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_2$

Название образца	Продолжительность ГТМВ обработки, мин	Номинальная степень замещения (x)
Gd0.1-15	15	0,10
Gd0.1-30	30	0,10
Gd0.1-45	45	0,10
Gd0.1-60	60	0,10
Gd0.15-15	15	0,15
Gd0.15-30	30	0,15
Gd0.15-45	45	0,15
Gd0.15-60	60	0,15
Gd0.2-15	15	0,20
Gd0.2-30	30	0,20
Gd0.2-45	45	0,20
Gd0.2-60	60	0,20

Таким образом, нами в работе [6] было установлено, что скорость фотодеградации красителя кристаллического фиолетового в присутствии нанокристаллических твердых растворов $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-z}$ в несколько раз ниже, чем в присутствии диоксида титана, и значительно ниже, чем в контрольных экспериментах при УФ-облучении растворов красителя в отсутствие фотокатализатора.

В процессе оптических исследований биологических объектов при использовании в качестве люминесцентных меток органических красителей остро стоит вопрос разрушения красителя под действием

интенсивного облучения УФ-лампой. Для снижения фотодеструкции люминесцентных меток используют энзиматическую систему нейтрализации активных форм кислорода (Oxyrase®, OxyFluor® и т.п.). В работе [7] водные растворы родамина и функционализированные люминесцентным красителем образцы фибрина или коллагена были подвергнуты действию УФ-излучения. В качестве соединений, препятствующих фотообесцвечиванию, использовали нанодисперсные оксиды церия, лантана, железа (II), а также фирменный ингибитор OxyFluor®. В результате исследований показано, что наночастицы CeO_2 обеспечивают максимальный фотопротекторный эффект (как в водных растворах, так и в полимерном геле), превосходящий по степени защиты коммерчески доступный энзиматический комплекс, традиционно применяемый в биологических исследованиях (рис. 7.9).

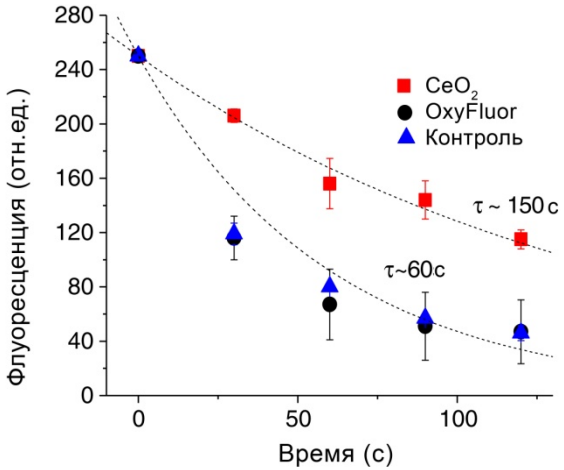


Рис. 7.9. Кинетика снижения интенсивности флуоресценции фибринового геля, содержащего в качестве флуоресцентной метки краситель AlexaFluor 488 (контроль), а также интенсивности флуоресценции того же геля, содержащего в качестве УФ-протектора наночастицы CeO_2 или OxyFluor. Интенсивность начальной эмиссии 250±7 отн. ед. Данные по интенсивности флуоресценции приведены к убывающей экспоненциальной функции $I = I_0 \exp(-\tau/t)$, где I_0 – начальная интенсивность флуоресценции, I – интенсивность флуоресценции в данное время t и τ – временная константа затухания [7]

Наночастицы диоксида церия (в том числе допированного кальцием) предложено использовать для повышения фотостойкости армидного волокна [8]. Покрытие волокна наночастицами не только обеспечивает его защиту от УФ-излучения, но также значительно повышает устойчивость к механическому и термическому повреждению.

В работе [9] исследовали УФ-протекторное действие и фотостабильность НДЦ, стабилизированного цитратом (размер частиц 8 нм, ζ-потенциал минус 40±5 мВ). Показано, что наночастицы диоксида церия обладают УФ-протекторным действием и разложение цитрата наблюдается только после 42 сут экспозиции при искусственном дневном свете (ультрафиолетовое облучение), при этом на 112-е сут в системе регистрировалось лишь незначительное количество цитрата рис. 7.10. Согласно экспериментам по светорассеянию, через 42 сут экспозиции в условиях УФ-облучения устойчивость золя падала (возрастал размер агрегатов) и ζ-потенциал менялся на положительный.

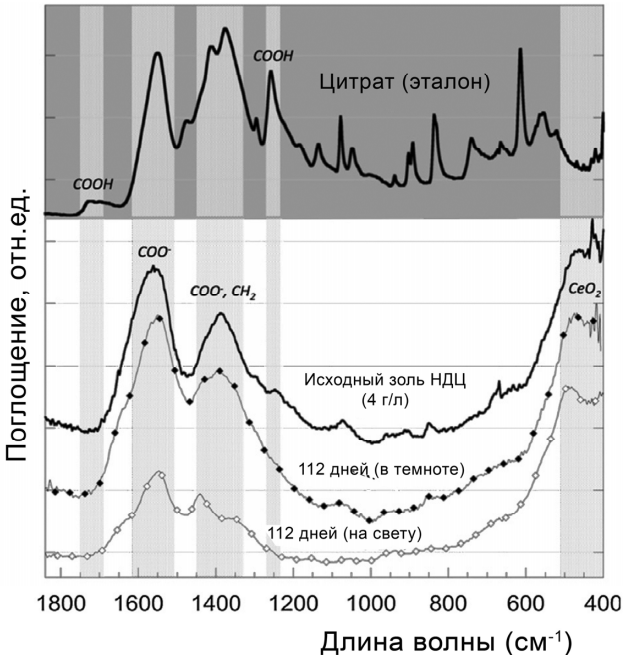


Рис. 7.10. Данные ИК-Фурье спектроскопии золя НДЦ, стабилизированного цитратом. Для сравнения приведён эталонный спектр цитрата [9]

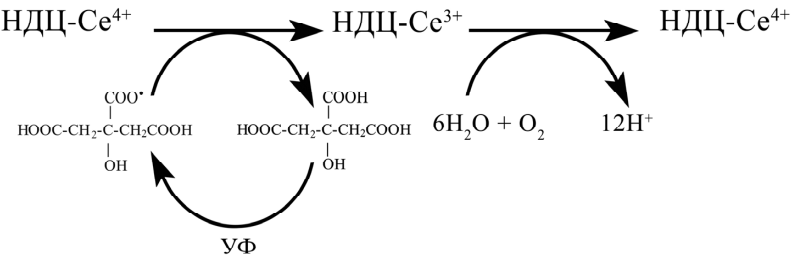


Рис. 7.11. Предполагаемый механизм защиты цитрата от разрушения под действием УФ-излучения наночастицами диоксида церия

Ранее в экспериментах с УФ-облучением золей НДЦ, стабилизированных цитратом, нами было зарегистрировано фотовосстановление ионов церия – непосредственно после облучения интенсивность полосы Ce^{4+} в УФ-спектрах CeO_2 снижалась и возрастала интенсивность полосы поглощения ионов Ce^{3+}. Через некоторое время выдержки в темноте спектр поглощения возвращался в исходное состояние. При этом после нескольких циклов освещения агрегативная устойчивость золя сохранялась, что свидетельствует о стабильности цитрата в условиях опыта. Вероятно, в данном случае фотопротекторное действие НДЦ можно изобразить в виде схемы (рис. 7.11).

7.2. Фотопротекторные свойства НДЦ по отношению к биологическим объектам

Электромагнитное излучение (ультрафиолетовое и рентгеновское излучение, гамма-лучи) способно повреждать биологические объекты. Основные механизмы действия ионизирующего излучения на клетку показаны на рис. 7.12.

Первичное (или прямое) повреждение происходит при непосредственном взаимодействии излучения с ДНК или другими ключевыми элементами клетки, ответственными за её выживание. Вторичное (или окислительное) повреждение ДНК происходит под действием активных форм кислорода (АКФ) и свободных радикалов, образовавшихся в клетке под действием излучения. Даже небольшие дозы радиации способны запустить каскад реакций радиолиза воды, в результате

чего генерируется пероксид водорода, свободные радикалы – пероксидный, супероксидный, гидроксильный и другие АФК [10]. Облученные клетки могут также передавать радиационные повреждения соседним или дочерним клеткам. Повреждение ДНК вызывает активацию сигнальных протеинкиназ ATM и ATR (рис. 7.12, *В*). Киназа ATM – основной медиатор отклика при разрыве двух нитей ДНК, который возникает под действием ионизирующего излучения. Киназа ATR играет вторичную роль, но её действие направлено преимущественно на распознавание повреждений при УФ-облучении.

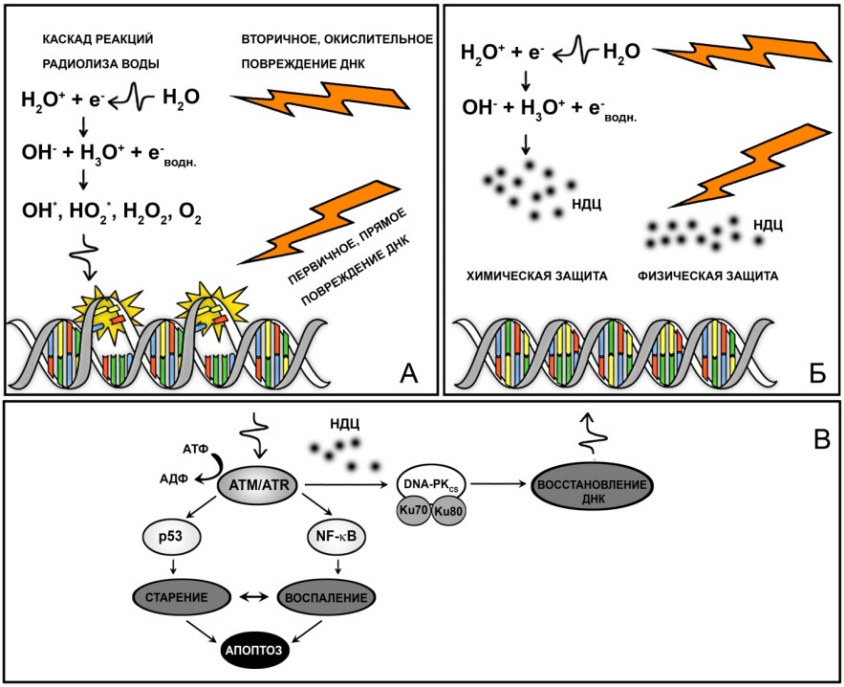


Рис. 7.12. Действие ионизирующего излучения на живую клетку и механизмы защитного действия нанодисперсного диоксида церия

В зависимости от степени повреждения ДНК протеинкиназы запускают механизмы воспалительного отклика, старения, остановки клеточного цикла, а при необратимых нарушениях структуры ДНК – и самоуничтожения клетки (апоптоза). Одновременно с помощью

протеинкиназы DNA-PK запускается механизм восстановления ДНК. Баланс процессов апоптоза и восстановления зависит от степени повреждения ДНК и активности соответствующих киназ. В свою очередь активность киназ определяется процессами фосфорилирования в клетке. Возможность включения того или иного механизма защиты клетки зависит от момента наступления неблагоприятного фактора и его продолжительности. Очевидно, что защита от прямого повреждения возможна только непосредственно в момент облучения. Защита от вторичного повреждения определяется временем жизни активных форм кислорода, образовавшихся при облучении. Основная часть АФК образуется в процессе облучения и быстро разрушается. Так, время жизни синглетного кислорода менее 3 мкс, $O_2^{\bullet -}$ – около 1 мкс; даже наиболее устойчивая форма АФК – пероксид водорода – существует в клетке около 1 мс [11]. Таким образом, максимальная защита от вторичного повреждения также может быть достигнута непосредственно в момент облучения. Время, требуемое для восстановления ДНК облученной клетки, составляет несколько часов и даже суток [12]. Вероятно, в этом случае защита клетки может быть обеспечена как непосредственно в момент облучения, так и через определённый промежуток времени.

Соответствующие исследования были впервые выполнены нами в работе [4]. Было показано, что нанокристаллический диоксид церия значительно повышает выживание клеток млекопитающих в условиях УФ-облучения. Мышиные фибробласты (L929) и фибробластоподобные клетки зеленой мартышки (VERO) обрабатывали растворами наночастиц CeO_2 ($\leq$ 2 нм, стабилизированы цитратом) и подвергали действию ультрафиолета. УФ-доза составила ~30 Дж/м^2, что соответствует 1 TLV (Threshold Limit Value for Ultraviolet Radiation).

С целью дифференцирования механизмов, представленных на рис. 7.12, клетки обрабатывали наночастицами за 60 и 30 мин до облучения, одновременно с облучением (за 5 мин), а также через 30 и 60 мин после облучения (профилактическая и терапевтическая схемы введения). Количество выживших клеток оценивали через 24 ч после облучения. Сводная гистограмма результатов для клеток VERO представлена на рис. 7.13. Из рисунка видно, что максимально эффективным оказалось внесение исследуемого золя CeO_2 за 5 мин до облучения: во всем диапазоне испытанных концентраций наблюдалась 100%-ная защита клеточного монослоя от негативного воздействия

УФ-облучения. Внесение золя в диапазоне концентраций CeO_2 от 2,8 до 0,35 мг/мл через 30 мин после облучения защищает от 100 до 70% клеток. Даже более позднее (через 60 мин после облучения) внесение золя CeO_2 в максимальной концентрации 2,8 мг/мл обеспечивает 100%-ное сохранение активности клеточного монослоя. Из анализа полученных данных видно, что предварительная обработка клеток, когда задействованы все возможные защитные механизмы, обеспечивает максимальное протекторное действие. Однако немаловажный вклад в процесс защиты вносит и восстановительный механизм, доминирующий при терапевтическом способе введения частиц.

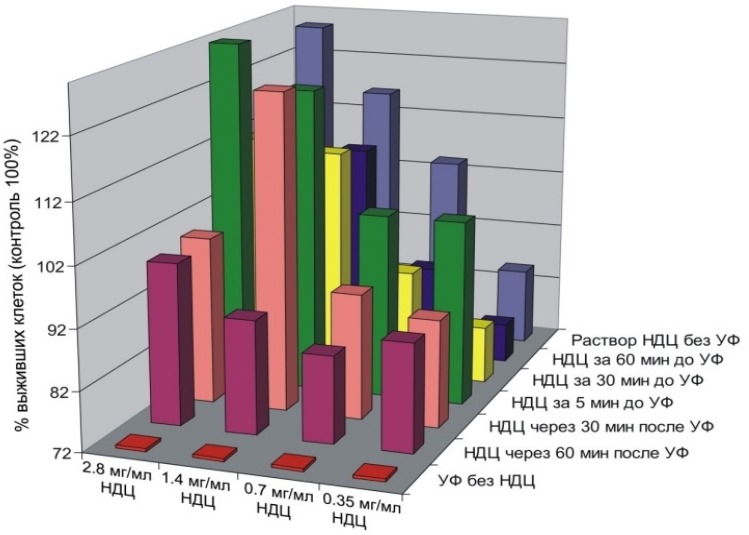


Рис. 7.13. Зависимость количества выживших клеток в культуре VERO от последовательности обработки и концентрации наночастиц диоксида церия при УФ-облучении, доза 1 TLV (~30 Дж/м^2)

На рис. 7.14 показан защитный эффект НДЦ при фотоповреждении клеток L929 (мышиных фибробластов). В клетках, подвергшихся УФ-облучению, наблюдаются характерные морфологические признаки апоптоза: сжатие и округление (a); вспенивание цитоплазмы (b); формирование ядерных пузырьков – стадия I (c); конденсация хроматина в компактные пятна (пикноз ядер) – стадия II (d); расщепление ядер-

ной оболочки и фрагментация ДНК (кариорексис) (e); расщепление ядра на несколько дискретных хроматиновых телец или нуклеосомных единиц – стадия III (f). Обработка клеток L929 НДЦ в концентрации 1,25 мМ не вызывала изменений в их морфологии. УФ-облученные клетки L929, обработанные НДЦ, не проявили никаких признаков апоптоза. Обработка НДЦ клеток L929 непосредственно перед облучением сопровождается несущественными изменениями в ядрах, а именно незначительными изменениями в интенсивности окрашивания или формы ядер (g). Размер клетки и структура цитоплазмы оставались неизменными. В случае обработки клеток L929 НДЦ через 30 мин после УФ-облучения ядра сохраняли овальную форму, не фиксировались нарушения структуры хроматина. Размер клеток немного увеличен. В некоторых клетках наблюдались небольшое вспенивание цитоплазмы (h) и присутствие окрашенных гранул (k).

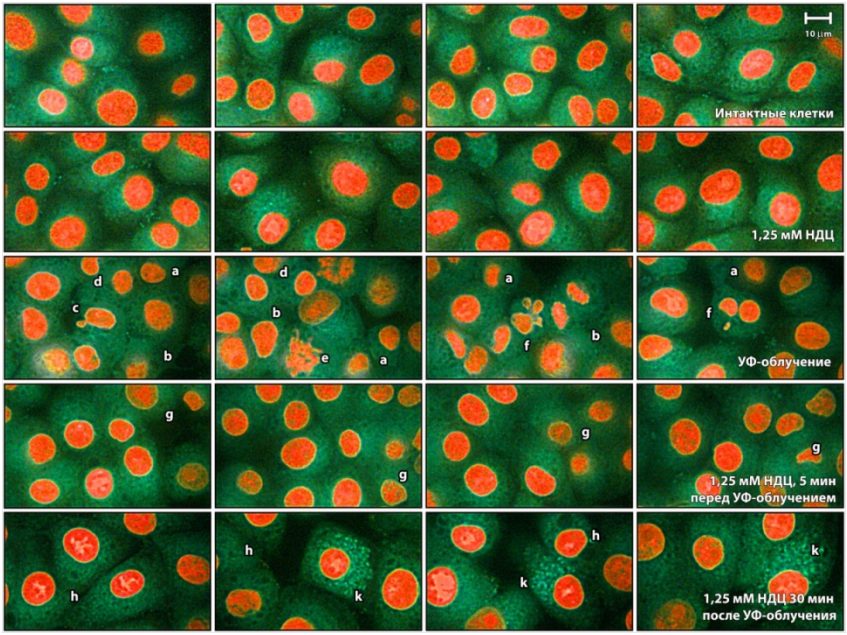


Рис. 7.14. Флуоресцентные микрофотографии необработанных (интактных), а также обработанных НДЦ и УФ-освещением клеток L929, окрашенных красителями Hoechst и Propidium iodide [4]

Авторы [13] подтвердили, что неорганические наночастицы CeO_2 эффективно замедляют окислительное повреждение ДНК, вызванное УФ-облучением. Степень УФ-зависимого повреждения ДНК оценивали методом анализа изменения концентрации 8-гидрокси-2-деоксигуанозина (8-OHdG), который является продуктом окисления гуанина (2-амино-6-оксипурина), входящего в состав основной цепочки ДНК. При УФ-облучении концентрация 8-OHdG возрастала пропорционально полученной дозе, однако в присутствии наночастиц НДЦ рост концентрации 8-OHdG существенно замедлялся (рис. 7.15). По мнению авторов, защитные свойства НДЦ связаны с химической деактивацией АФК и с экранированием излучения наночастицами полупроводника.

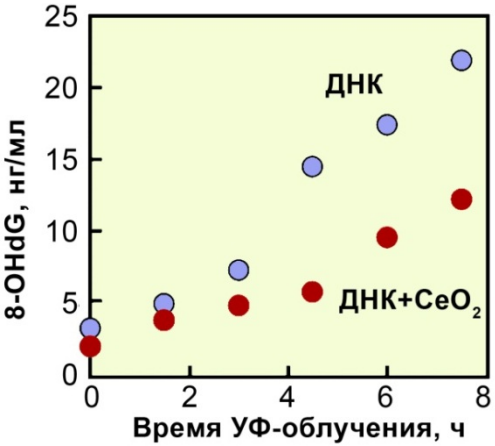


Рис. 7.15. Кинетика изменения концентрации 8-OHdG в растворе ДНК (2 мг/мл, pH 7.5) под действием УФ-облучения в присутствии и отсутствии наночастиц CeO_2 (12,0 нМ) [13]

В работе [14] авторы показали, что введение наночастиц диоксида церия в матрицу силикагеля, содержащую культуру *Chlorella vulgaris*, обеспечивает защиту водоросли от УФ-излучения (рис. 7.16), причем основное значение имеет физический (первичный) защитный механизм, однако химические защитные факторы также вносят определенный вклад.

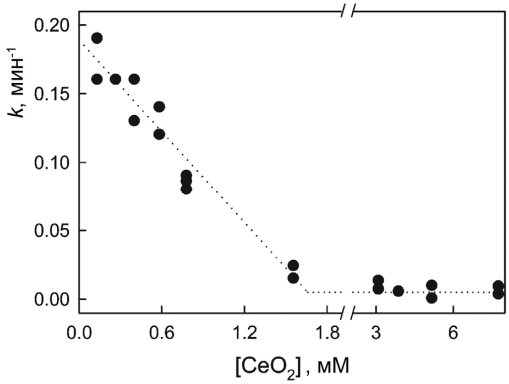


Рис. 7.16. Зависимость скорости обесцвечивания клеток *Chlorella vulgaris* в матрице силикагеля под действием УФ-излучения от содержания наночастиц диоксида церия [14]

Использование наночастиц CeO_2 позволило совершить прорыв в бионике («нанобионике» – по терминологии журнала Nature) растений [15]. Группа ученых Массачусетского технологического института «модифицировала» растения наночастицами. Целью первой серии экспериментов, проведённых *in vitro*, была разработка самовосстанавливающихся солнечных элементов, для чего предполагалось использовать природный аналог ячеек солнечных элементов – хлоропласты растений. В хлоропласты ввели углеродные нанотрубки, что резко увеличило способность хлоропластов поглощать солнечный свет практически во всем спектральном диапазоне – от ультрафиолета до ИК. К сожалению, такие модифицированные хлоропласты недолговечны, особенно в условиях яркого освещения. Они способны функционировать в течение нескольких часов, затем под воздействием кислорода и света разрушаются. Для того чтобы хлоропласты сохранялись в течение более длительного времени, ученые ввели в них наночастицы диоксида церия. Наночастицы CeO_2, покрытые полиакриловой кислотой (ПАК), легко проникают в хлоропласты и существенно снижают окислительный стресс (рис. 7.17). Благодаря этому резко сокращается концентрация АФК, разрушающих хлоропласты, и их продолжительность жизни возрастает.

На втором этапе ученые перешли к опытам на растениях *in vivo* (рис. 7.18). В результате экспериментов эффективность фотосинтеза возросла на 30%, дополнительно модифицированные растения приоб-

рели способность улавливать окислы азота из воздуха. Выяснилось, что они способны обнаруживать в атмосфере такие опасные вещества, как пероксид водорода, зарин и тринитротолуол.

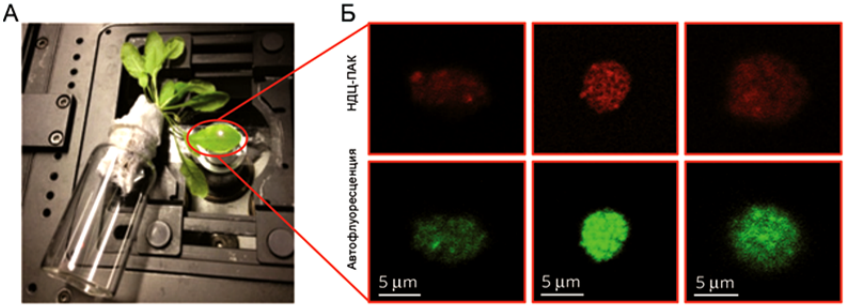


Рис. 7.17. *А* – Устройство для исследования растений *in vivo*, в листьях которых содержатся углеродные нанотрубки ss(AT)15–SWNTs с длиной волны возбуждения 785 нм флуоресцентным микроскопом. *Б* – конфокальное изображение хлоропластов, содержащих наночастицы диоксида церия, покрытые полиакриловой кислотой (НДЦ-ПАК): хлорофилл (зелёная автофлуоресценция) локализован там же, где и НДЦ-ПАК (помечен красным флуоресцентным красителем Alexa Fluor 405) [15]

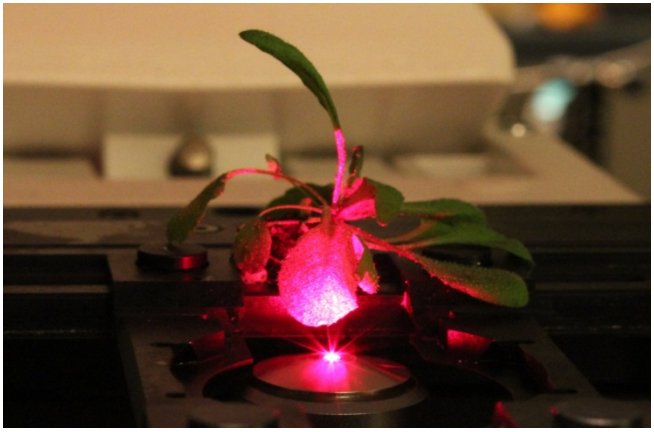


Рис. 7.18. Наноматериалы позволят создавать растения с новыми улучшенными характеристиками. Эта резуховидка Таля (Arabidopsis), в листьях которой содержатся углеродные нанотрубки и наночастицы диоксида церия, обладает способностью усваивать больше световой энергии и действует как квантовый биохимический детектор [16]

Глаз – основной биологический орган, в котором происходит взаимодействие излучения и вещества, и именно сетчатка глаза наиболее подвержена разрушению под действием излучения, прежде всего ультрафиолетового. Клетки зрительных рецепторов имеют самый высокий уровень кислородного метаболизма в теле и непрерывно подвергаются воздействию окислительного стресса [17].

Авторы [18–20] впервые продемонстрировали защитные свойства нанодисперсного диоксида церия по отношению к сетчатке глаза крысы в условиях облучения. В стекловидное тело глаза крысы впрыскивали 2 мкл физраствора либо наночастицы CeO_2 в физиологическом растворе (0,1, 0,3 или 1 мкМ). Через три дня крыс подвергали воздействию света (2700 лк) в течение 6 ч и возвращали в условия нормального освещения, в которых содержались крысы контрольной группы. Последующие исследования (начиная с седьмых суток) показали, что обработка диоксидом церия защищает фоторецепторные клетки от разрушения. Степень защиты зависела от дозы CeO_2: введение наночастиц в концентрации 1 мкМ обеспечивало полную защиту, и клетки зрительных рецепторов не отличались от необлученных в контрольной группе (рис. 7.19). Количественная гистологическая оценка продемонстрировала, что защитное действие наночастиц диоксида церия распространялось на всю сетчатку. Кроме того, с помощью иммуногистохимического *TUNEL*-метода (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) и электроретинографии (ЭРГ) было показано, что даже в самой низкой дозе наночастицы CeO_2 ингибируют появление *TUNEL*-позитивных клеток и сохраняют функцию сетчатки. Более того, в контрольной и испытуемой группах амплитуды ЭРГ были идентичны [18]. Этот факт демонстрирует, что наночастицы диоксида церия защищают клетки сетчатки не только по механизму экранирования излучения.

Мыши с видоизмененным геном *tub* (*tubby*-мыши) имеют врожденную склонность к дегенерации сетчатки [21]. К тому же за счет снижения мРНК и экспрессии тиоредоксина (Trx), тиоредоксин редуктазы (TrxR) и фактора транскрипции Nrf-2 (NF-E2-related factor-2) у *tubby*-мышей снижена способность к регенерации фоторецепторных клеток. Фактор Nrf-2 связан с другими важными клеточными медиаторами, такими как супрессорный белок p53 и транскрипционный фактор NF-κB (см. рис. 7.13), а также является регулятором процесса старения [22].

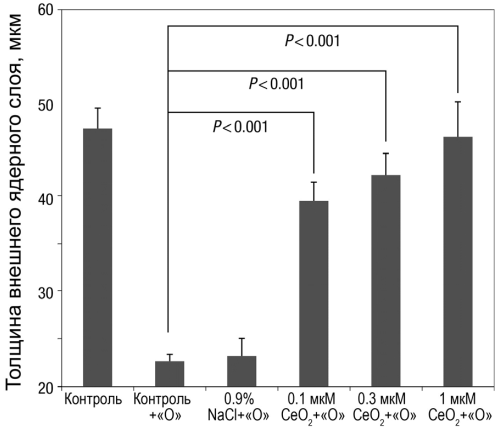


Рис. 7.19. Средняя толщина внешнего ядерного слоя фоторецепторных клеток наружной половины сетчатки. «O» – после облучения [18, 20]

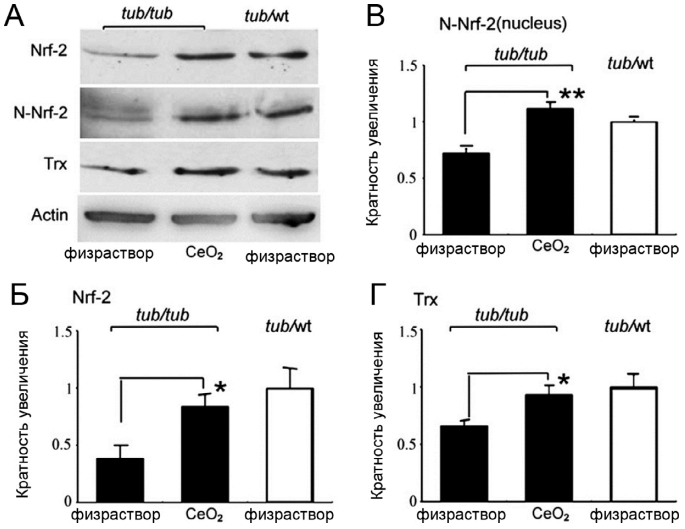


Рис. 7.20. Нанокристаллический диоксид церия увеличивает экспрессию антиоксидантных протеинов в сетчатке *tubby*-мышей. Данные вестерн-блоттинга (*А*) и денситометрический анализ демонстрируют, что обработка наночастицами CeO_2 увеличивает экспрессию Nrf-2 (*Б*), N-Nrf-2 (*В*) и Trx (*Г*) в сетчатке *tubby*-мышей (*tub/tub*) до уровня, эквивалентного контрольным группам (*tub/wt*) [23]

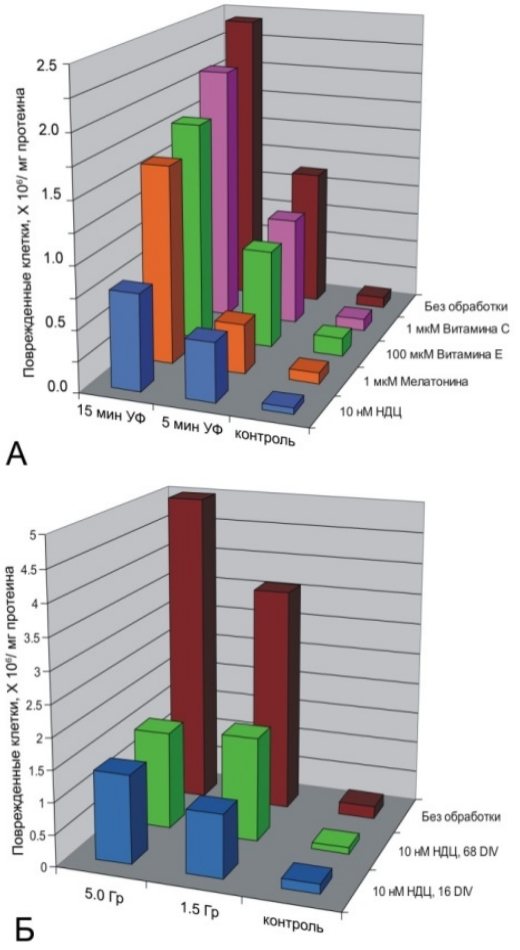


Рис. 7.21. *А* – Влияние предварительной обработки наночастицами диоксида церия и традиционными антиоксидантами на повреждение клеток под действием УФ-излучения. *Б* – Влияние предварительной обработки культуры клеток мозга наночастицами диоксида церия на гибель под действием гамма-облучения. Гистограммы построены по данным [24]

В работе [23] авторы показали, что применение нанокристаллического диоксида церия у *tubby*-мышей уменьшает фотодеградацию сетчатки и улучшает реакцию на свет. У мышей, получавших нано-

дисперсный диоксид церия, ЭРГ-амплитуда была увеличена на 85,7% (105,185±97,027 мкВ) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только физраствор (56,641±20,53 мкВ). Более того, авторы показали, что введение наночастиц диоксида церия влияет на регулирование клеточных сигнальных путей (рис. 7.20), в результате чего снижается апоптоз и увеличивается регенерация ретинальных клеток. При этом показатели для *tubby*-мышей достигают аналогичных значений для нормальных мышей. Совокупность представленных данных однозначно доказывает перспективу применения нанокристаллического диоксида церия для терапии дисфункций сетчатки – в том числе поражений, вызванных световым излучением.

Как показано авторами [24], защитная активность нанокристаллического диоксида церия против УФ-облучения в культуре клеток превосходит таковую для широко распространенных антиоксидантов (рис. 7.21).

Смешанные органотипические клетки мозга крысы обрабатывали 10 нМ раствором наночастиц CeO_2 на 10-й день культивирования *invitro*. Через 14–16 дней культуру подвергали УФ-облучению в течение 5 или 15 мин и оценивали ущерб, нанесенный свободными радикалами. Дополнительно на 68-й день культивирования обработанные клетки подвергали повторному УФ-облучению, чтобы определить, сохраняется ли защитный эффект в клетках со временем. Интересно, что на 68-й день культивирования все клетки, обработанные CeO_2, оставались живыми, хотя для смешанной культуры клеток мозга такая продолжительность жизни *in vitro* не характерна.

7.3. Радиопротекторное действие НДЦ по отношению к биологическим объектам

При аналогичных исследованиях в условиях рентгеновского облучения (1,5 или 5 Гр в течение 1 мин) авторы [24] показали, что и в этом случае нанодисперсный диоксид церия обладает выраженным защитным эффектом (см. рис. 7.18). При профилактическом внесении в культуру клеток *in vitro* единичной дозы 10 нМ наночастиц диоксида церия гибель клеток мозга мышей после облучения дозами 1, 3, и 5 Гр снизилась на 78, 62 и 48% соответственно. Эффект восстановления жизнеспособности клеток наблюдался, даже если наночастицы вводились в культуру через 3 ч после облучения. Исследователи об-

ращают внимание также на тот факт, что наночастицы диоксида церия имеют длительный «срок службы» и, таким образом, за счет введения единичной дозы можно обеспечить длительное последействие.

По мнению многих авторов, изучение и практическое применение радиопротекторных свойств наночастиц диоксида церия сегодня представляется крайне актуальным [25–28]. Как показано в гл. 6, особый интерес представляет использование CeO_2 в качестве профилактического средства при радиотерапии онкозаболеваний. В частности, радиопротекторные свойства CeO_2 по отношению к гастроинтестинальному эпителию исследованы в работе [25]. Одноразовая предварительная обработка (за 24 ч до облучения) диоксидом церия нормальных клеток толстой кишки человека (CRL 1541) обеспечивала защиту от лучевого повреждения, снижала продукцию АФК и увеличивала экспрессию супероксиддисмутазы-2 (СОД2) в пробе (пропорционально дозе CeO_2).

В работе [26] нормальные и опухолевые клетки человека (рак молочной железы, линия MCF-7) обрабатывали диоксидом церия (2–5 нм), выдерживали 24 ч, после чего клетки облучали стандартным способом и определяли количество выживших клеток. Обработка диоксидом церия обеспечивала почти 99%-ную защиту нормальных клеток от радиационной гибели, но практически не влияла на гибель клеток опухоли.

Как уже отмечалось выше, в зоне злокачественной опухоли значение pH среды понижено. Очевидно, механизм избирательной защиты нормальных клеток и угнетения малигнизированных аналогичен описанному в предыдущих разделах (см. гл. 6) и обусловлен pH-зависимой анти- и прооксидантной активностью диоксида церия (см. гл. 4 и 5) [29].

На примере опухолевых клеток рака молочной железы MCF-7, эпителиальных клеток молочной железы CRL 8798, нормальных фибробластов легких CCL 135 и слабодифференцированных клеток рака легкого A549 авторы [27] подтвердили эффект селективности *in vitro*. Также *in vivo* (голые бестимусные мыши) было показано, что по своим цитопротекторным свойствам нанокристаллический диоксид церия превосходит клинический препарат Амифостин, который традиционно применяется для купирования последствий разрушения ДНК, вызванного химио- или радиотерапией. После облучения, применения Амифостина, комбинирования «облучение+CeO_2» или «облуче-

ние+Амифостин» среднее время выживания мышей было соответственно 132, 119, 210 и 81 день.

Аналогичным образом в работе [28] авторы показали, что использование нанокристаллического диоксида церия (при внутрибрюшинном введении) позволяет снизить риск пневмонии, вызванной последствиями радиотерапии.

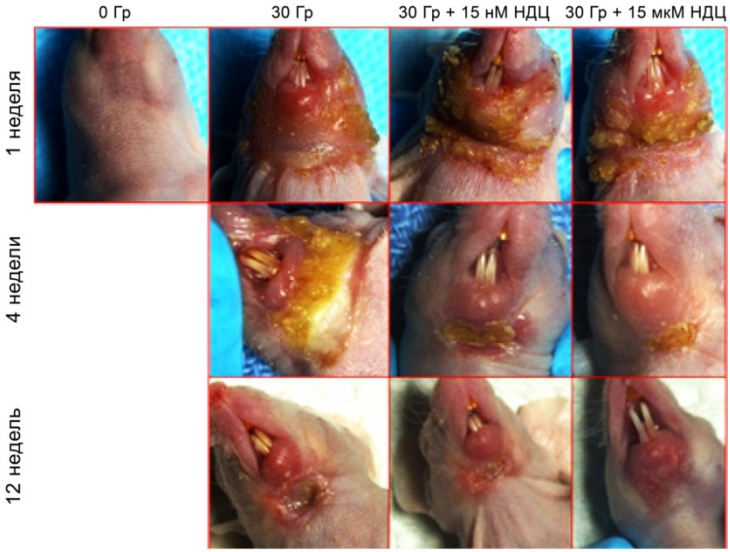


Рис. 7.22. Макроскопическая оценка развития радиационного дерматита бестимусных мышей, облученных рентгеновским излучением (30 Гр) в область головы и шеи. Наблюдается обратная корреляция между развитием радиационного дерматита 3-й степени и концентрацией наночастиц CeO_2. Через 12 недель после облучения животные, которые подверглись воздействию радиации в сочетании с 15 нМ или 15 мкМ наночастиц CeO_2, показали более быстрое восстановление по сравнению с контролем [30]

В работе [30] была показана обратная корреляция между развитием радиационного дерматита 3-й степени и терапевтической концентрацией наночастиц CeO_2. Количество животных с 3-й степенью дерматита через 1 неделю после облучения в группе, которая получала 15 мкМ (0,01 мг/кг) НДЦ, было значительно меньше по сравнению с контрольной группой, не получавшей наночастицы CeO_2 (10% против

100% заболеваемости дерматитом 3-й степени). В группе животных, которые получали 15 нМ (0,00001 мг/кг) НДЦ, данный эффект отмечен не был. Тем не менее в обеих группах животных, получавших НДЦ, наблюдали более быстрое дозозависимое восстановление по сравнению с контрольной группой. Например, через 12 недель после облучения в группе животных, которые перед облучением получили 15 мкМ НДЦ, полное заживление наблюдалось у 60%, по сравнению с 10% в контрольной группойе, которую облучали без использования НДЦ (см. рис. 7.22). В обзоре, посвященном радиопротекторным свойствам нанокристаллического диоксида церия [31], тот же автор обоснованно утверждает, что этот материал может найти применение в таких областях, как: 1) радиотерапия опухолей, 2) защита космонавтов от космического излучения и 3) защита военных и гражданских лиц от возможного последствия радиоактивного заражения местности при военных действиях, террористических актах или техногенных катастрофах.

Ещё одно интересное применение радиопротекторных свойств нанодисперсного диоксида церия предлагают авторы [32]: использовать наночастицы диоксида церия, содержащие радиоактивный изотоп ^{137m}Ce ($T_{1/2}$ = 34,4 ч, IT (99,22%), β+ (0,779%)), одновременно в качестве радиоактивной метки *in vivo* и радиопротектора биологических тканей (рис. 6.19). Наночастицы $^{137m}CeO_2$, полученные на циклотроне облучением наночастиц оксида лантана протонами, перспективны для диагностики с использованием однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

На примере радиационно устойчивых клеток глиосаркомы 9L авторы [33] показали, что высокоэнергетическое рентгеновское излучение генерирует активные формы кислорода, при этом наночастицы диоксида церия защищают клетки и повышают их жизнеспособность. Однако низкоэнергетическое рентгеновское излучение не только генерирует АФК, но и взаимодействует с CeO_2, формируя поток вторичных Оже-электронов; при этом защитный эффект наночастиц нивелируется и жизнеспособность клеток снижается (рис. 6.13). Вероятно, в условиях рентгеновского излучения следует отдавать предпочтение терапевтическому, а не профилактическому способу введения наночастиц – по крайней мере до полного выяснения процессов взаимодействия излучения и CeO_2 в биологических тканях.

В работе [34] автор выделяет пять различных типов радиационных повреждений биологических тканей, в рамках данной классификации

нанокристаллический диоксид церия попадает в группу А преимущественно в качестве инактиватора свободных радикалов. В работе [35] авторы впервые расчетным путем показали, что эффективное поглощение γ-излучения в диапазоне от 1 кэВ до 20 МэВ оксидами лантаноидов (в том числе диоксидом церия) позволяют рассматривать их как одни из лучших материалов для защиты от ионизирующего излучения в клинической радиобиологии и лечении рака. Таким образом, известные на сегодня данные свидетельствуют о высокой перспективности применения нанодисперсного диоксида церия для физической защиты от электромагнитного облучения.

7.4. Применение НДЦ в составе фильтров УФ-излучения

В работах [43–45] предложено использовать в качестве основного компонента УФ-фильтров нанодисперсные материалы на основе диоксида церия. В качестве преимуществ данных материалов отмечены способность эффективно поглощать УФ-излучение, прозрачность в видимой области спектра, а также желтоватая окраска, близкая к цвету кожи. Поскольку CeO_2, по данным авторов [43–45], всё-таки обладает определенной каталитической активностью в реакциях окисления органических соединений, что может препятствовать его применению в солнцезащитных составах, рекомендовано использовать не индивидуальный диоксид церия, а твердые растворы на его основе, включая $Ce_{1-x}Zn_xO_{2-x}$ и $Ce_{1-x}Ca_xO_{2-x}$. Подобное допирование практически не сказывается на оптических характеристиках материала, однако приводит к существенному снижению каталитической активности (что было продемонстрировано на примере реакции окисления касторового масла).

Сравнительное исследование каталитической активности образцов нанокристаллического диоксида церия, допированного Mg^{2+}, Ca^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Y^{3+}, La^{3+}, Nd^{3+}, Sm^{3+}, Eu^{3+} и Tb^{3+}, в реакции окисления касторового масла, а также в реакции разложения фенола [46] показало, что наиболее значительное снижение каталитической активности достигается при допировании CeO_2 кальцием и цинком, при этом существенно уменьшается средний размер частиц диоксида церия (вплоть до 2–4 нм).

Дополнительного снижения каталитической активности наночастиц $Ce_{1-x}M_xO_{2-x}$ можно достичь за счет нанесения на их поверхность

слоя аморфного кремнезема при гидролизе силиката натрия или тетраэтоксисилана [47–50]. Эти данные были дополнительно подтверждены при сравнительном изучении интенсивности хемилюминесценции нанокомпозитов на основе CeO_2 при УФ-облучении [47, 50].

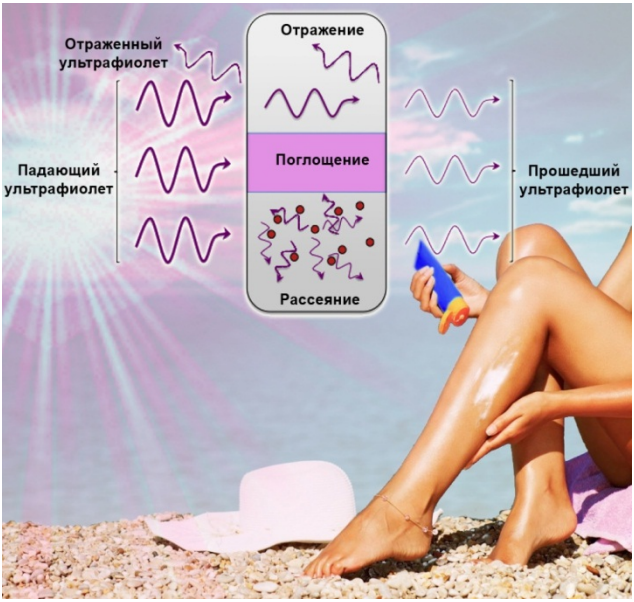


Рис. 7.23. Физическая защита от солнечного излучения с помощью УФ-фильтров

В работе [4] нами был выполнен сравнительный анализ солнцезащитных характеристик нанокристаллического диоксида церия (по отношению к диоксиду титана и оксиду цинка) в среднем (UVB) и ближнем (UVA) УФ-диапазоне.

Для оценки эффективности защиты кожи в UVB-диапазоне определяли солнцезащитный фактор (SPF) согласно [51]:

$$SPF = \frac{\sum_{290}^{400} EA(\lambda) \times SS(\lambda)}{\sum_{290}^{400} EA(\lambda) \times SS(\lambda) \times T(\lambda)},$$

где $EA(\lambda)$ – эритемальный спектр [52]; $SS(\lambda)$ – стандартный спектр солнца [53], $T(\lambda)$ – спектр пропускания соответствующего солнцеза-

щитного препарата в кювете толщиной 20 мкм (соответствует примерно 2 мг вещества на 1 см^2 кожи) в спектральном диапазоне от 290 до 400 нм; $EA(\lambda)\times SS(\lambda)$ – эффективный спектр (рис. 7.24).

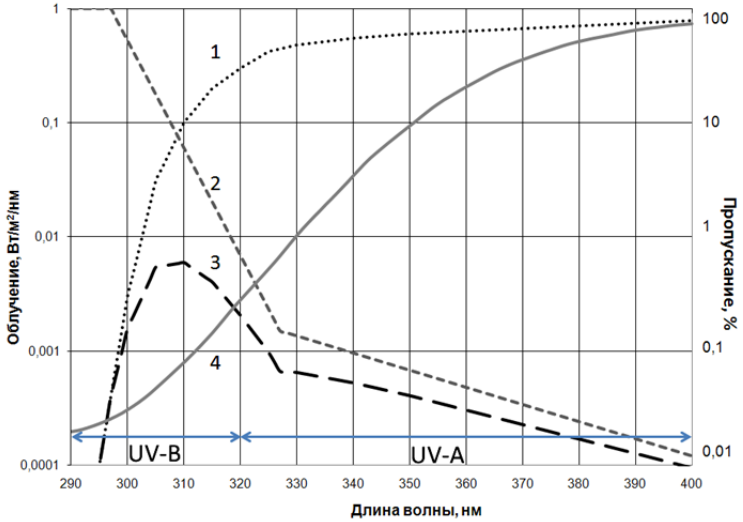


Рис. 7.24. Стандартный солнечный спектр (*1*), спектр эритемального действия (*2*), эффективный спектр (*3*) и спектр пропускания 5%-ного золя диоксида церия в слое 20 мкм (*4*). Пунктирные линии соответствуют левой оси ординат, сплошные линии – правой оси ординат [4]

Было установлено, что по способности экранирования ультрафиолетового излучения ближнего (UV-A) и среднего (UV-B) диапазона диоксид церия превосходит традиционные минеральные УФ-фильтры (ZnO и TiO_2), широко используемые в солнцезащитной косметике (рис. 7.25).

Расчет [54], проведенный для золей диоксида церия, а также нанокристаллического диоксида титана (15 нм) и оксида цинка (60 нм), показал, что перечисленные материалы при одинаковой концентрации характеризуются близкими величинами солнцезащитного фактора. Так, SPF = 30 (высокая степень защиты от УФ-облучения, согласно [55]) может быть получен при введении в солнцезащитную косметическую композицию 27% CeO_2, 19% TiO_2 или 42% ZnO.

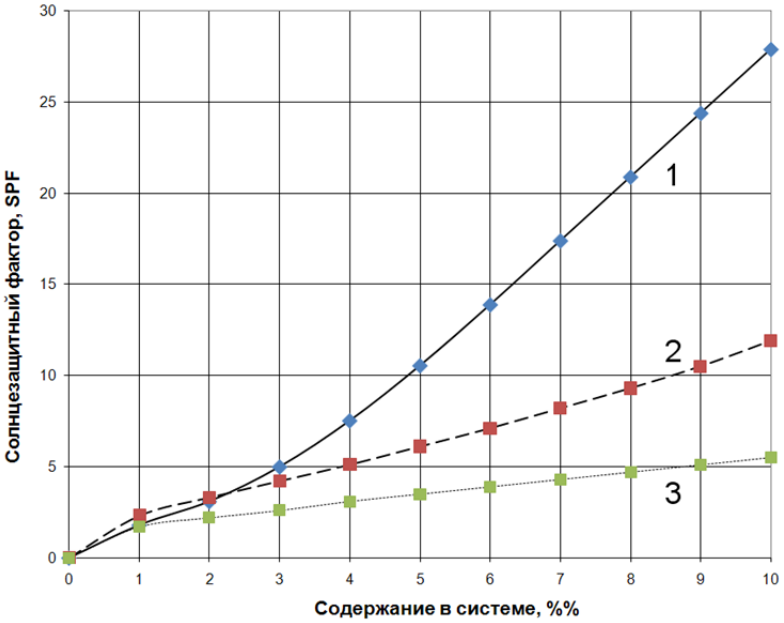


Рис. 7.25. Зависимость величины солнцезащитного фактора (SPF) от содержания нанодисперсных оксидов, введённых в композицию: *1* – CeO_2; *2* – TiO_2; *3* – ZnO

Эффективность фотопротекторного действия солнцезащитного препарата в диапазоне UVA обычно указывают в единицах так называемой критической длины волны поглощения (λ_c) [56]. Данная величина соответствует длине волны в спектральном диапазоне 290–400 нм, ниже которой препарат поглощает 90% излучения, и может быть рассчитана по следующему соотношению:

$$\int_{290}^{\lambda_c} \lg\left[1/T(\lambda)\right] d\lambda = 0,9 \int_{290}^{400} \lg\left[1/T(\lambda)\right] d\lambda .$$

Для золя, содержащего 1% диоксида церия, значение λ_c оказалось равным 355 нм, что соответствует «хорошим» солнцезащитным свойствам согласно классификации FDA и практически совпадает с аналогичным значением для золя диоксида титана (λ_c = 364 нм). Отметим, что оксид цинка показал «отличные» солнцезащитные свойства (λ_c = 379 нм).

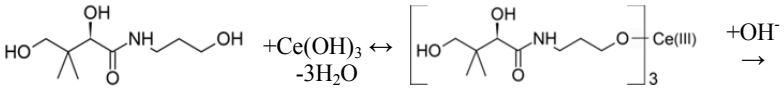
В качестве альтернативного метода оценки фотопротекторных свойств солнцезащитных препаратов в ближнем УФ-диапазоне FDA рекомендует использовать отношение UVA/UVB [55]:

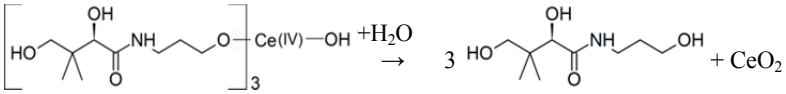
$$UVA/UVB = \frac{\int_{320}^{400} \lg\left[1/T(\lambda)\right] d\lambda \Big/ \int_{320}^{400} d\lambda}{\int_{290}^{320} \lg\left[1/T(\lambda)\right] d\lambda \Big/ \int_{290}^{320} d\lambda}.$$

Данный параметр представляет собой отношение средних значений поглощения в ближнем и среднем УФ-диапазонах. Для золя диоксида церия значение UVA/UVB составило 0,28, что соответствует средней фотопротекторной активности по классификации FDA. Близкое значение UVA/UVB показал 1%-ный золь диоксида титана (0,36), в то время как 1%-ный золь оксида цинка показал намного более высокие УФ-защитные свойства (0,86). Относительно низкие характеристики золя диоксида церия, вероятно, связаны с крайне малым размером частиц CeO_2. Как известно, фотопротекторные свойства оксидных материалов находятся в сильной зависимости от размера их частиц [57, 58]. Действительно, диоксид церия с большим размером частиц (3–4 нм), стабилизированный полиакриловой кислотой [59], за счет размерного эффекта характеризуется меньшим значением ширины запрещенной зоны (3,4 эВ по сравнению с 3,6 эВ для диоксида церия, стабилизированного цитрат-анионами), что приводит к смещению края полосы поглощения в длинноволновую область. Соответственно увеличение размера частиц диоксида церия приводит к заметному росту величины UVA/UVB (до 0,41) и критической длины волны поглощения (до 362 нм).

В дальнейшем нами было показано, что, используя в качестве стабилизатора биологически-активные соединения, можно синтезировать готовые полупродукты для создания солнцезащитных косметевтических рецептур. Например, перспективным стабилизатором и темплатом при синтезе НДЦ может выступать Д-пантенол [60].

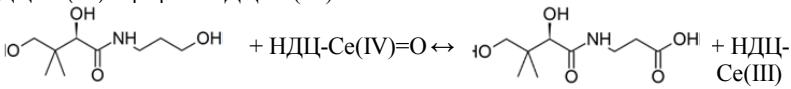
1. $CeCl_3 + 3NH_4OH \rightarrow Ce(OH)_3 + 3NH_4Cl$

2. 

3. 

Стабилизированные пантенолом наночастицы диоксида церия способны участвовать в окислительно-восстановительных реакциях и защищать живые системы от АФК. После стадии окисления церия в частице НДЦ пантенол может участвовать в регенерации частицы:

1. НДЦ-Ce(III) + [O] → НДЦ-Ce(IV)=O

2. 

Образующаяся при этом пантотеновая кислота относится к незаменимым витаминам ($Б_5$) и входит в состав кофермента А, который играет важную роль в процессах окисления.

По данным ПЭМ, в зависимости от соотношения концентрации пантенола и диоксида церия, размер наночастиц изменяется в пределах от 3 до 7 нм, при этом значительно меняются агрегированность частиц и прозрачность композиции (см. рис. 7.26). На рис. 7.27 приведены спектры поглощения полученных золей (и для сравнения чистого D-пантенола). Видно, что в отличие от D-пантенола все растворы НДЦ имеют высокую экстинкцию в области среднего ультрафиолета (290–320 нм, UVA) и значительную экстинкцию в районе ближнего ультрафиолета (320–400 нм, UVB). Наибольшая экстинкция в диапазоне UVA наблюдается у золей 3÷5 – очевидно, за счет повышенного светопоглощения. В то же время золи 1 и 2 обладают большей экстинкцией в районе UVB за счет повышенного светорассеяния. Таким образом, варьируя соотношение церий – пантенол, можно варьировать солнцезащитный фактор (SPF) и показатель «UVA/UVB-ratio». Данные композиции проявляют синергизм в защитном действии против АФК и УФ-излучения и значительно превосходят активность компонентов, взятых по отдельности [60].

Таким образом, нами [4, 60] было установлено, что фотопротекторные свойства диоксида церия сравнимы с аналогичными характеристиками для диоксида титана и оксида цинка, что позволяет рассматривать наноматериалы на основе CeO_2 в качестве основы неорганических фильтров УФ-излучения нового поколения. При этом наночастицы диоксида церия (в отличие от других минеральных УФ-фильтров) защищают биологические объекты не только от прямого

повреждения ультрафиолетовым излучением, но и от окислительного стресса, вызванного воздействием ультрафиолетового излучения. Данные результаты получили подтверждение в независимой лаборатории GEMATRIA Test Lab GmbH (Германия) [61].

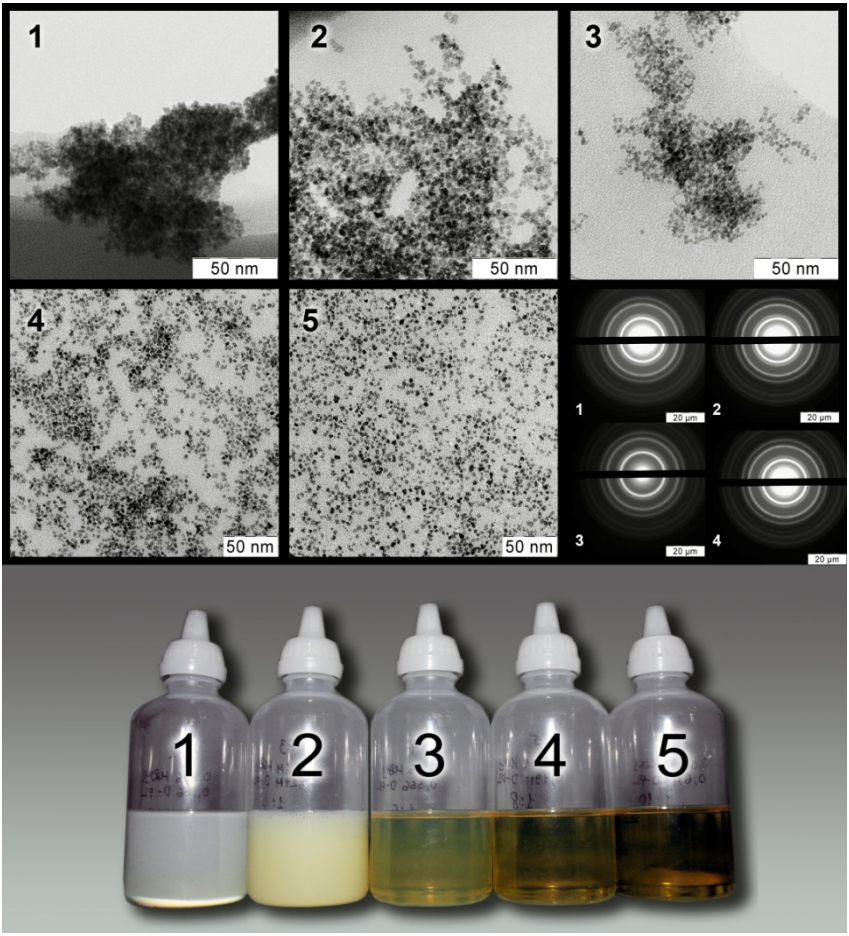


Рис. 7.26. Микрофотографии нанокомпозита НДЦ и D-пантенола (вверху). Внешний вид полученных золей (внизу). Соотношения концентраций пантенол:церий: *1* – 2:1, *2* – 4:1, *3* – 6:1, *4* – 8:1, *5* – 10:1. Образцы *1*, *2* – высокое рассеяние и умеренное поглощение, образец *3* – высокое поглощение и умеренное рассеяние, образцы *4*, *5* – высокое поглощение и слабое рассеяние

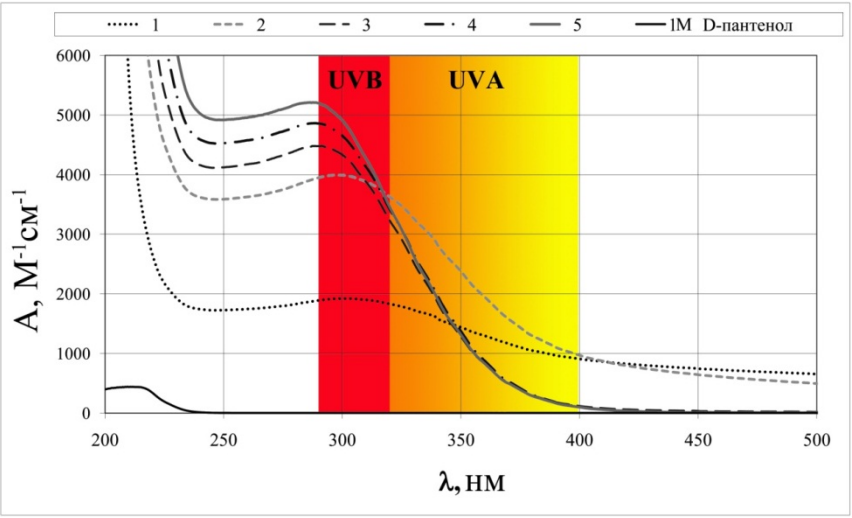


Рис. 7.27. Спектр поглощения нанокомпозитов НДЦ и Д-пантенола (в единицах молярной экстинкции). Для сравнения: спектр поглощения D-пантенола. Соотношения концентраций пантенол:церий: *1* – 2:1; *2* – 4:1; *3* – 6:1; *4* – 8:1; *5* – 10:1

В работе [62] нанопорошок диоксида церия синтезировали гидротермально-микроволновым методом. Показано, что эмульсия, содержащая синтезированные наночастицы CeO_2, защищает от UVB эффективнее, чем такая же эмульсия, содержащая в качестве УФ-фильтра окись цинка (ZnO). Исследования цитотоксичности на клеточной линии NCTC2544 *in vitro* показали, что все изученные солнцезащитные крема, содержащие оксид цинка, уменьшают жизнеспособность клеток, тогда как наночастицы диоксида церия не оказывают цитотоксического действия даже в самой высокой исследованной концентрации (80 мкг/мл). В качестве альтернативы стандартной комбинации диоксида титана и окиси цинка в солнцезащитной косметике авторы [63] предложили использовать смесь коммерческого диоксида титана и диоксида церия, допированного кальцием. Методами соосаждения и пиролиза синтезировали два варианта наночастиц диоксида церия, допированного кальцием, которые различались по гранулометрическому составу, но защищали от УФ-излучения эффективнее классических комбинаций TiO_2/ZnO во всех диапазонах – и

UVB, и UVA. По сравнению с комбинацией TiO_2/ZnO частицы диоксида церия, допированного кальцием, синтезированные соосаждением, показали увеличение солнцезащитного фактора SPF на 27%, а пиролизом – PF-UVA на 19%.

Литература

1. *Qureshi U., Dunnill C.W., Parkin I.P.* Nanoparticulate cerium dioxide and cerium dioxide–titanium dioxide composite thin films on glass by aerosol assisted chemical vapour deposition // Applied Surface Science. 2009. Vol. 256, № 3. P. 852–856.

2. *Saadat-Monfared A., Mohseni M., Hashemi Tabatabaei M.* Polyurethane nanocomposite films containing nano-cerium oxide as UV absorber. Part 1. Static and dynamic light scattering, small angle neutron scattering and optical studies // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2012. Vol. 408. P. 64–70.

3. *Saadat-Monfared A., Mohseni M.* Polyurethane nanocomposite films containing nano-cerium oxide as UV absorber; Part 2: Structural and mechanical studies upon UV exposure // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2014. Vol. 441. P. 752–757.

4. *Zholobak N.M., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B. et al.* UV-shielding property, photocatalytic activity and photocytotoxicity of ceria colloid solutions // J. Photochem. Photobiolog. B: Biology. 2011. Vol. 102. P. 32–38.

5. *Kar S., Patel C., Santra S.* Direct room temperature synthesis of valence state engineered ultra-small ceria nanoparticles: Investigation on the role of ethylenediamine as a capping agent // J. Phys. Chem. C. 2009. Vol. 113. P. 4862–4867.

6. *Гиль Д.О., Долгополова Е.А., Шекунова Т.О. и др.* Фотопротекторные свойства твердых растворов на основе диоксида церия // Наносистемы: физика, химия, математика. 2013. Т. 4, № 1. С. 78–82.

7. *Guha A., Basu A.* Role of Rare Earth Oxide Nanoparticles (CeO_2 and La_2O_3) in Suppressing the Photobleaching of Fluorescent Organic Dyes // Journal of fluorescence. 2014. Vol. 24, № 3. P. 683–687.

8. *Zhu X., Yuan L., Liang G., Gu A.* Unique UV-resistant and surface active aramid fibers with simultaneously enhanced mechanical and thermal properties by chemically coating $Ce_{0.8}Ca_{0.2}O_{1.8}$ having low photocatalystic activity // Journal of Materials Chemistry A. 2014.

9. *Auffan M., Masion A., Labille J., Diot M.-A., Liu W., Olivi L., Proux O., Ziarelli F., Chaurand P., Geantet C., Bottero J.-Y., Rose J.* Long-term aging of a CeO_2 based nanocomposite used for wood protection // Environmental Pollution. 2014. Vol. 188. P. 1–7.

10. *Dayal D., Martin S.M., Limoli C.L., Spitz D.R.* Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells // Biochem. J. 2008. Vol. 413(1). P. 185–191.

11. *Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M.* Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions // J. Botany. 2012. Vol. 2012. P. 1–26.

12. *Hamlet S.M., Lavin M.F., Jennings P.A.* Increased rate of repair of ultraviolet-induced DNA strand breaks in mitogen stimulated lymphocytes // Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med. 1982. Vol. 41(5). P. 483–491.

13. *Fujita N., Kamada K.* Protective effect of CeO2 nanoparticles on photo-induced oxidative damage of DNA // Journal of the Ceramic Society of Japan. 2014. Vol. 122, № 1422. P. 141–145.

14. *Sicard C., Perullini M., Spedalieri C. et al.* CeO_2 nanoparticles for the protection of photosynthetic organisms immobilized in silica gels // Chem. Mater. 2011. Vol. 23. P. 1374–1378.

15. *Giraldo J.P., Landry M.P., Faltermeier S.M., McNicholas T.P., Iverson N.M., Boghossian A.A., Reuel N.F. et al.* Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing // Nature materials. 2014. Vol. 13, № 4. P. 400–408.

16. Juan Pablo Giraldo. Bionic plants: Synthetic nanoparticles enhance photosynthetic activity of plants 16. URL: http://phys.org/news/2014-03-bionic-synthetic-nanoparticles-photosyn-thetic.html

17. *Thomson H., Lotery A.* The promise of nanomedicine for ocular disease // Nanomedicine. 2009. Vol. 4 (6). P. 599–604.

18. *Chen J., Patil S., Seal S., McGinnis J.F.* Rare earth nanoparticles prevent retinal degeneration induced by intracellular peroxides // Nature Nanotechnology. 2006. Vol. 11. P. 142–150.

19. *Cai X., Seal S., McGinnis J.F.* Cerium oxide nanoparticle reduction of oxidative damage in retina // Studies on Retinal and Choroidal Disorders. Series: Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice / eds. by R.D. Stratton, W.W. Hauswirth, T.W. Gardner. 2012. XVI. 641 p.

20. *Chen J., Patil S., Seal S., McGinnis J.F.* Nanoceria particles prevent ROI-induced blindness // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. Vol. 613. P. 53–59.

21. *Ohlemiller K.K., Hughes R.M., Mosinger-Ogilvie J. et al.* Cochlear and retinal degeneration in the tubby mouse // Neuroreport. 1995. Vol. 6(6). P. 845–849.

22. *Lewis K.N., Mele J., Hayes J.D., Buffenstein R.* Nrf2, a guardian of healthspan and gatekeeper of species longevity // Integr. Comp. Biol. 2010. Vol. 50(5). P. 829–843.

23. *Kong L., Cai X., Zhou X. et al*. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways // Neurobiol. Dis. 2011. Vol. 42 (3). P. 514–523.

24. *Rzigalinski B., Clark A., Ariane M.* Anti-inflammatory, radioprotective, and longevity enhancing capabilities of cerium oxide nanoparticles. WO/2007/002662. Publication Date: 04.01.2007.

25. *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 // Nanomedicine. 2010. Vol. 6 (5). P. 698–705.

26. *Tarnuzzer R.W., Colon J., Patil S., Seal S.* Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage // Nano Lett. 2005. Vol. 5 (12). P. 2573–2577.

27. *Colon J., Herrera L., Patil S. et al.* Selective radioprotection of normal tissues with cerium oxide nanoparticles // Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 2008. Vol. 72 (1). P. S700–S701.

28. *Colon J., Herrera L., Smith J. et al.* Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // Nanomedicine. 2009. Vol. 5 (2). P. 225–231.

29. *Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis A.* Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties // Small. 2009. Vol. 4 (5). P. 552–556.

30. *Baker C.H.* Harnessing cerium oxide nanoparticles to protect normal tissue from radiation damage // Translational Cancer Research. 2013. Vol. 2. № 4.

31. *Baker C.H.* Radiation Protection with Nanoparticles // Nanomedicine in Health and Disease. Science Publishers, 2011. P. 444.

32. B*akht K.M., Sadeghi M., Tenreiro C. A* novel technique for simultaneous diagnosis and radioprotection by radioactive cerium oxide nanoparticles: study of cyclotron production of ^{137m}Ce // J. Radioanal. Nucl. Chem. 2012. Vol. 292(1). P. 53–59.

33. *Briggs A., Corde S., Oktaria S. et al*. Cerium oxide nanoparticles: Influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation // Nanomedicine. 2013. [Epub ahead of print].

34. *Koukourakis M.I.* Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. 2014.

35. *Shantappa A., Hanagodimath S.M.* Effective Atomic Numbers of Lanthanides with Gamma Radiation for Photon Energy Absorption. 2014.

36. *Serpone N., Dondi D., Albini A.* Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products // Inorg. Chim. Acta. 2007. Vol. 360. P. 794–802.

37. *Linsebigler A.L., Lu G.Q., Yates J.T.* Photocatalysis on TiO_2 surfaces: principles, mechanisms, and selected results // Chem. Rev. 1995. Vol. 95. P. 735–738.

38. *Herrmann J.M.* Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants // Catal. Today. 1999. Vol. 53. P. 115–129.

39. *Dunford R., Salinaro A., Cai L. et al.* Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients // FEBS Lett. 1997. Vol. 418. P. 87–90.

40. *Wamer W.G., Yin J.J., Wei R.R.* Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide // Free Radical Biol. Med. 1997. Vol. 23. P. 851–858.

41. *Giri S., Karakoti A., Graham R.P. et al.* Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer // PLoS One. 2013. Vol. 8 (1). P. e54578.

42. *Faure B., Salazar-Alvarez G., Ahniyaz A., Villaluenga I., Berriozabal G., Miguel Y.R., and Bergström L.* Dispersion and surface functionalization of oxide nanoparticles for transparent photocatalytic and UV-protecting coatings and sunscreens // Science and Technology of Advanced Materials. 2014. Vol. 14, № 2. P. 023001.

43. *Li R., Yabe S., Yamashita M. et al.* UV-shielding properties of zinc oxide-doped ceria fine powders derived via soft solution chemical routes // Mat. Chem. Phys. 2002. Vol. 75. P. 39–44.

44. *Li R., Yabe S., Yamashita M. et al.* Synthesis and UV-shielding properties of ZnO- and CaO-doped CeO_2 via soft solution chemical process // Solid State Ionics. 2002. Vol. 151. P. 235–241.

45. *Yamashita M., Kameyama K., Yabe S. et al.* Synthesis and microstructure of calcia doped ceria as UV filters // J. Mat. Sci. 2002. Vol. 37. P. 683–687

46. *Yabe S., Sato T.* Cerium oxide for sunscreen cosmetics // J. Solid State Chem. 2003. Vol. 171. P. 7–11.

47. *Sato T., Katakura T., Yin S. et al.* Synthesis and UV-shielding properties of calcia-doped ceria nanoparticles coated with amorphous silica // Solid State Ionics. 2004. Vol. 172. P. 377–382.

48. *El-Toni A.M., Yin S., Hayasaka Y., Sato T.* Coating and photochemical properties of calcia-doped ceria with amorphous silica by a seeded polymerization technique // J. Mater. Chem. 2005. Vol. 15. P. 1293–1297.

49. *El-Toni A.M., Yin S., Yabe S., Sato T.* Coating of calcia-doped ceria with amorphous silica shell by seeded polymerization technique // Mat. Res. Bull. 2005. Vol. 40. P. 1059–1064.

50. *El-Toni A.M., Yin S., Hayasaka Y., Sato T.* Synthesis and UV-shielding properties of silica-coated calcia-doped ceria nanoparticles via soft solution processes // J. Electroceram. 2006. Vol. 17. P. 9–14.

51. *Sayre R.M., Agin P.P., LeVee G.J., Marlowe E. A* comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreening formulas // Photochem. Photobiol. 1979. Vol. 29. P. 559–566.

52. *McKinlay A.F., Diffey B.L.* A reference action spectrum for ultraviolet-induced erythema in human skin // CIE J. 1987. Vol. 6. P. 17–22.

53. *Diffey B.L., Robson J.* A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum // J. Soc. Cosmet. Chem. 1989. Vol. 40. P. 127–133.

54. *Herzog B.* Prediction of sun protection factors and UV-A parameters by calculation of uv transmissions through sunscreen films of inhomogenous surface structure // In: N. Shaath (Ed.), Sunscreens: Regulations and Commercial Development, Cosmetic Science and Technology Series, third ed.,Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL. 2005. Vol. 28. P. 881–900 (Chapter 44).

55. *Department* of Health and Human Services. Food and Drug Administration. 21 CFR Parts 347 and 352 [WDocket No. 1978N–0038] (formerly Docket No. 78N–0038) RIN 0910–AF43, Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Proposed Amendment of Final Monograph, Federal Register. 2007. Vol. 72(165). P. 49070–49122.

56. *Diffey B.L.* A method for broad spectrum classification of sunscreens // Int. J. Cosmet. Sci. 1994. Vol. 16. P. 47–52.

57. *Popov A.P., Priezzhev A.V., Lademann J., Myllyla R.* TiO_2 nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens // J. Phys. D. 2005. Vol. 38. P. 2564–2570.

58. *Cross S.E., Innes B., Roberts M.S. et al.* Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: In-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation // Skin Pharmacol. Physiol. 2007. Vol. 20 (3). P. 148–154.

59. *Иванов В.К., Полежаева О.С., Шапорев А.С. и др.* Синтез и исследование термической устойчивости золей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами // Журнал неорганической химии. 2010. Т. 55, № 3. С. 368–373.

60. *Zholobak N.M., Shcherbakov A.B., Bogorad-Kobelska A.S., Ivanova O.S., Baranchikov A.Ye., Spivak N. Ya., and Ivanov V.K.*. Panthenol-stabilized cerium dioxide nanoparticles for cosmeceutic formulations against ROS-induced and UV-induced damage // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2014. Vol. 130. P. 102–108.

61. *Herrling T., Seifert M., Jung K.* Cerium Dioxide: Future UV-filter in Sunscreen? // SOFW–Journal. 2013. Vol. 139, № 5. P. 10–14.

62. *Boutard T., Rousseau B., Couteau C., Tomasoni C., Simonnard C., Jacquot C., Roussakis* C. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO_2 // Materials Letters. 2013. Vol. 108. P. 13–16.

63. *Truffault L., Winton B., Choquenet B., Andreazza C., Simmonard C., Devers T., Coiffard L.J.* Cerium oxide based particles as possible alternative to ZnO in sunscreens: Effect of the synthesis method on the photoprotection results // Materials Letters. 2012. Vol. 68. P. 357–360.

8. ВЛИЯНИЕ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ

Население развитых стран быстро стареет. Это беспрецедентное демографическое изменение представляет собой одну из основных проблем нашего времени. Определяющим свойством процесса старения является заметное увеличение риска смертности и заболеваемости с возрастом. Заболеваемость раком, сердечно-сосудистыми и нейродегенеративными заболеваниями увеличивается нелинейно, иногда в геометрической прогрессии с возрастом. Одним из наиболее важных задач в биогеронтологии является разработка мероприятий, ведущих к продлению здоровой жизни (интервал здоровья), что требует лучшего понимания основных механизмов, лежащих в основе процесса старения и мероприятий, способных задержать или предотвратить многие возрастные патологии [1].

8.1. Активные формы кислорода и старение живых существ

Активные формы кислорода и свободные радикалы играют важную (если не определяющую) роль в процессах старения живых существ [1–5]. Образуясь внутри клетки в результате ее нормального или патологического метаболизма, свободные радикалы способны отрывать электроны от биологических макромолекул, тем самым нарушая их функциональность. Следует отметить, что реакции, идущие с участием свободных радикалов, зачастую являются самораспространяющимися. Свободные радикалы образуются в различных областях клеток, в первую очередь в митохондриях. Свободные радикалы формируются также нейтрофилами и макрофагами в очагах воспаления для уничтожения бактериальных инфекций. Наконец, образование свободных радикалов может быть следствием ряда ферментативных реакций.

Клеточные патологии, связанные с действием свободных радикалов, включают нарушения функций лизосом и протеасом, разрушение

липидных мембран, окисление оснований ДНК и другие повреждения ДНК, нарушение функций митохондрий и инициирование процессов гибели клеток. Аномальная выработка свободных радикалов поврежденными клетками может приводить к разрушению неповрежденной ткани как напрямую, так и в результате воспалительного отклика.

При болезни Альцгеймера чрезмерно высокая выработка свободных радикалов в поврежденных нейронах и воспалительная активация микроглиальных клеток приводят к свободно радикальному повреждению здоровых окружающих клеток. Схожие патологические процессы имеют место при атеросклерозе, артрите и других воспалительных заболеваниях, характерных для преклонного возраста [6, 7].

В настоящее время существует несколько различных теорий старения, среди которых наиболее обоснованной является свободно радикальная теория, согласно которой при старении любого здорового организма за счет снижения активности естественной антиоксидантной (ферментативной) системы может возникать возрастной окислительный стресс. Старение при этом обусловлено накоплением повреждений в липидных мембранах, митохондриях, белках и ДНК, вызываемых свободными радикалами и приводящих к дисфункциям и гибели клеток [4, 5, 8–10] (см. также рис. 8.1).

Рассматривая процесс старения, необходимо принимать во внимание не только продолжительность, но и качество жизни. Старение сопряжено с когнитивными нарушениями, дисфункциями нервной системы, атеросклерозом, онкологическими заболеваниями и разнообразными воспалительными процессами. В ряде работ (например, [131, 132, 2]) высказывается предположение, что вещества, способные выступать в роли антиоксидантов (в том числе наночастицы), могут оказаться полезными в профилактике и терапии возрастных заболеваний, способствуя тем самым улучшению качества жизни в преклонном возрасте (рис. 8.2).

Один из основных предполагаемых механизмов старения, связанный с повреждениями АФК, определяется возрастными нарушениями работы митохондрий. Митохондриальные дисфункции играют важную роль не только в процессе старения, но также в процессах апоптоза, онкологических, нейродегенеративных и других возрастных заболеваний. По мнению авторов [13], именно мутация митохондриальной ДНК (мтДНК) определяет скорость старения организма, при этом мтДНК в 10 раз чувствительнее к действию свободных радика-

лов, чем ядерная. Также митохондрии являются главными производителями свободных радикалов в клетке, поэтому мутации в их ДНК происходят чаще, чем в ядерной ДНК клеток.



Рис. 8.1. Схематическое представление механизмов действия АФК и окислительного стресса на процессы старения [3]. Содержание АФК на клеточном уровне зависит от большого количества экзогенных и эндогенных факторов. АФК активируют пути передачи сигнала, приводящие к изменениям в экспрессии генов, которые определяют функционирование и выживание клетки. В дополнение к этому повышение уровня АФК приводит к окислительным повреждениям на молекулярном уровне (ДНК, белки, липиды), если соответствующие защитные механизмы неэффективны. В результате происходит повреждение органелл, что приводит к нарушению ключевых клеточных реакций. В обоих сценариях (как при изменении экспрессии различных генов, так и при внутриклеточном повреждении макромолекул) последующие реакции на клеточном уровне (например, воспаление, пролиферация, апоптоз, некроз) могут стимулировать дополнительную генерацию эндогенных АФК. Вызванные АФК изменения на клеточном уровне приводят к множеству системных реакций, которые со временем выражаются в процессах старения, дисфункции органов и возрастных заболеваниях



Рис. 8.2. Основные возрастные патологии могут быть уменьшены за счет антиоксидантных наночастиц [2]

8.2. Увеличение продолжительности жизни клеточных культур и макроорганизмов в присутствии нанокристаллического диоксида церия

В обзоре [1] рассмотрены стратегии воздействия на митохондрии для снижения их окислительного повреждения с целью предотвращения или замедления возрастных изменений функций митохондрий, а также некоторые перспективы создания митохондриальных антиоксидантов – в том числе с применением возможностей нанотехнологий. Например, предлагается создание нанокомпозита для исследований *in vitro* с целью разработки антивозрастных митохондриальных препаратов (см. рис. 8.3). Б. Ржигалински с соавторами [14] предлагают использовать наночастицы диоксида церия для лечения митохондриальных болезней и заболеваний, связанных с повреждением митохондрий, а также нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, деменции при СПИДе, энцефалите, прогрессирующем супрануклеарном парезе взора, боковом амиотрофическом склерозе и пр. НДЦ также эффективно восстанавливает функции митохондрий, нарушенные специфическими митохондриальными токсинами, такими как ротенон, цианид, угарный газ, полихлорированные дифенилы и т.д. Для оценки влияния НДЦ на гибель клеток, связанную с дисфункцией митохондрий, авторы использовали ротенон [14]. Ротенон ингибирует митохондриальный комплекс I, а также прерывает окислительное фосфорилиро-

вание и поток электронов в транспортных цепях. Это уменьшает продукцию АТФ и нарушает митохондриальный мембранный потенциал (ММП). На 10-й день культивирования *in vitro* смешанную культуру органотипических клеток головного мозга крысы в течение 48 ч подвергали действию НДЦ (10 нМ) или физиологического раствора. На 14-й день культивирования *in vitro* в течение 24 ч культуру подвергали воздействию ротенона (1 мкМ) и гибель клеток определяли по окрашиванию Propidium iodide. Обработка НДЦ значительно снижает повреждение клеток, вызванное ротеноном.

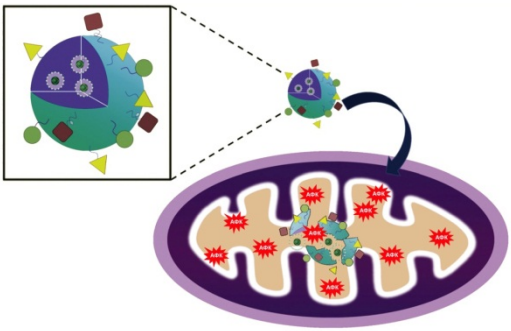


Рис. 8.3. Принцип создания нанокомпозита для исследований *in vitro* с целью разработки антивозрастных митохондриальных препаратов. Нанокомпозит может иметь на поверхности несколько функциональных групп (например, митохондриотропные, флуоресцентные и пр.) и антиоксиданты во внутреннем ядре [1]

Как показано на рис. 8.4, *А*, наночастицы диоксида церия повышают жизнеспособность смешанных органотипических клеток мозга после воздействия ротеноном, при этом предполагается, что НДЦ защищает клетки от повреждений, связанных с ингибированием активности митохондриального комплекса I. ММП является мерой способности митохондрий участвовать в окислительном фосфорилировании и производить АТФ. В случае дисфункции митохондрий и при некоторых заболеваниях (например, Альцгеймера, Паркинсона) ММП изменяется (обычно понижается). Для определения МПП клетки обрабатывали НДЦ или физиологическим раствором в течение 48 ч, как описано выше, с последующим воздействием ротенона (1 мкМ). ММП измеряли через 6 ч после воздействия ротенона по известной методике с использованием Родамина 123 (Rh123).

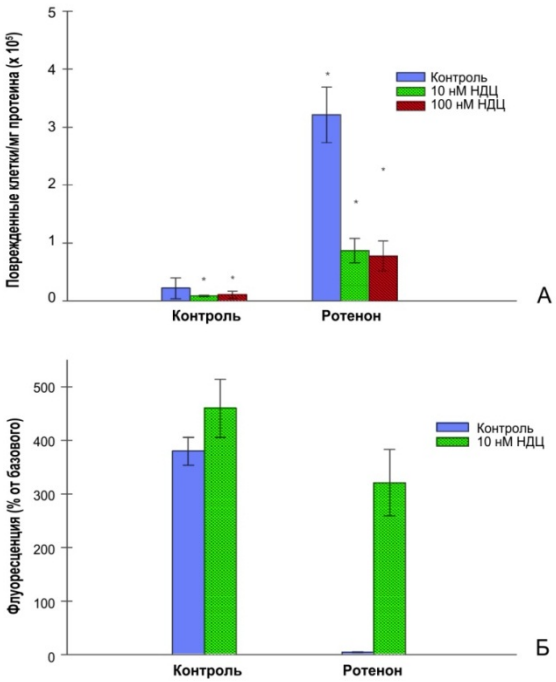


Рис. 8.4. *А* – НДЦ защищает смешанную органотипическую культуру клеток головного мозга от повреждений, вызванных ротеноном; *Б* – НДЦ способствуют сохранению митохондриального мембранного потенциала после обработки ротеноном [14]

Как показано на рис. 8.4 (*Б*), в случае обработки НДЦ значение ММР было несколько выше, чем в контрольной культуре (первые два столбца), однако разница была незначительной. Через 6 ч после воздействия ротенона ММП в контрольной культуре клеток упал практически до нуля. Напротив, в культуре, предварительно обработанной НДЦ, ММП сохранился практически на уровне необработанной ротеноном культуры. Таким образом, авторы показали, что НДЦ может быть использован в качестве эффективного препарата для лечения заболеваний, связанных с повреждением митохондрий или с их дисфункцией.

В работе [16] на примере первичных кортикальных клеток авторы исследовали в условиях окислительного стресса антиапоптическое

действие НДЦ. Культуру нейронов обрабатывали наночастицами CeO_2 (размер 7–10 нм, концентрация 25 нМ) и пероксидом водорода (50 мкМ) и регистрировали значение потенциала митохондриальной мембраны ($\Delta\psi m$). Было показано, что H_2O_2 нарушает $\Delta\psi m$, а применение НДЦ в условиях окислительного стресса поддерживает митохондриальный потенциал на уровне контроля. Известно, что митохондриальная дисфункция и нитрозативный стресс участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера. Амилоид бета (Аβ) и пероксинитрит вызывают фрагментацию митохондрий и гибель нейронных клеток за счет патологической активации динамин-подобного белка 1 (DRP1) – большой ГТФазы, которая регулирует митохондриальное деление. Точные механизмы митохондриальной фрагментации и повышенной активации DRP1 неизвестны; однако, вероятно, в данном процессе происходит фосфорилирование DRP1 серина 616 (S616). Несмотря на то что установлена роль вызванного пероксинитритом нитрозативного стресса в формировании болезни Альцгеймера, эффективный антиоксидант для терапии болезни отсутствует. Авторы [15] показали, что НДЦ интернализируется нейронами и накапливается на наружной митохондриальной мембране и внутренней клеточной мембране (рис. 8.5), снижая при этом уровень активных форм азота (АФА) и степень нитрования тирозина в нейронных белках, подвергнутых действию пероксинитрита. Показано, что НДЦ снижает уровень эндогенного пероксинитрита, митохондриальную фрагментацию и гиперфосфорилирование DRP1 S616, тем самым уменьшая гибель нервных клеток.

В § 5.2 уже отмечалось, что при культивировании клеток *in vitro* обработка НДЦ позволяет не только защитить культуру от АФК, но и продлить им жизнь. В работе [17] наночастицы диоксида церия (2,9 нм, ζ-потенциал –23,5 мВ) исследовали *in vivo* в модели иммунологического и свободнорадикального окислительного повреждения, приводящего к нейродегенеративной болезни. Частицы были стабилизированы цитратом / ЭДТА – такой стабилизатор меньше смывается с поверхности частиц в физиологических растворах, чем чистый цитрат, и частицы длительное время остаются неагрегированными в растворах высокой ионной силы (полупериод стабильности до 4 ч в плазме крови). Такие частицы меньше накапливаются в печени и селезёнке и легче пересекают ГЭБ, снижая уровень АФК в мозгу у грызунов с моделью рассеянного склероза.

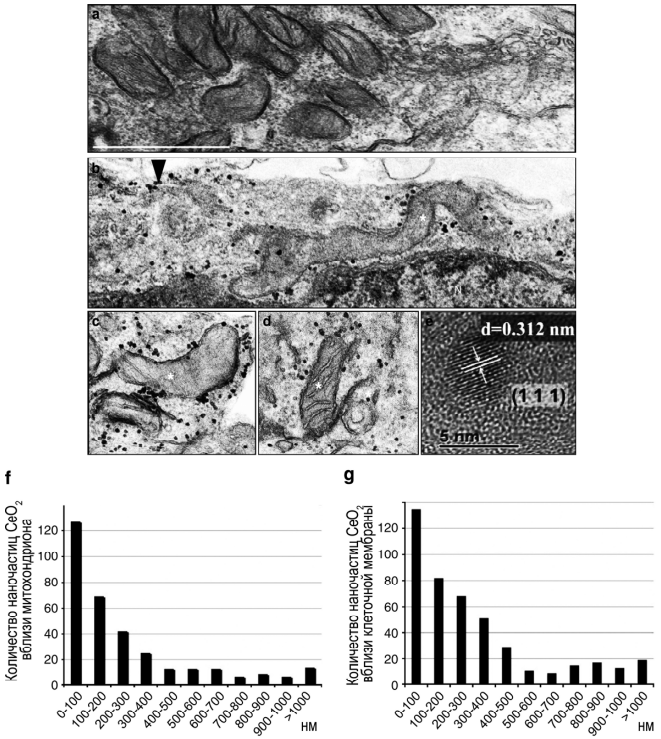


Рис. 8.5. В культивируемых нейронах коры головного мозга НДЦ накапливается на внутреннем бислое клеточной мембраны и внешнем липидном слое митохондрии. *a* – электронная микрофотография необработанного контрольного нейрона. Масштаб шкалы – 1 мм; *b* – электронная микрофотография нейрона, обработанного наночастицами CeO_2 (100 нМ) в течение 3 ч. Круглые контрастные частицы НДЦ концентрируются вокруг митохондрии (*) и клеточной мембраны (черная стрелка), но не возле ядра (N). (c) Электронная микрофотография нейрона, обработанного наночастицами CeO_2 (100 нМ) в течение 12 часов, митохондрион отмечен символом (*); на наружной митохондриальной мембране видны скопления частиц НДЦ; d – электронная микрофотография нейрона, обработанного наночастицами CeO_2 (100 нМ) в течение 3 ч, митохондрион отмечен символом (*); *e* – микрофотография высокого разрешения наночастицы диоксида церия; *f* и *g* – на гистограммах показано количество частиц НДЦ вблизи наружной митохондриальной мембраны (*f*) или внутреннего бислоя плазматической мембраны (*g*). По оси абсцисс – расстояние между частицами НДЦ и митохондрионом или клеточной мембраной с шагом 100 нм [15]

В обзоре «Плеотропные функции антиоксидантных наночастиц для продления жизни и в медицине» [2] авторы подтверждают, что использование наноматериалов представляет большой интерес для геронтологии (рис. 8.2), и важную роль в списке геронтологических препаратов авторы отводят наночастицам диоксида церия. Уже в первых работах, посвященных биологической активности нанодисперсного диоксида церия, отмечалось, что введение этого материала в клеточные культуры может значительно увеличивать продолжительность жизни клеток.

В патенте [18] были представлены результаты экспериментов по определению влияния нанодисперсного диоксида церия на максимальную продолжительность жизни органотипических клеток головного мозга крысы (нейронов, астроцитов, микроглии) в культуре. Было показано, что однократное введение диоксида церия в культуру клеток на 10-й день *in vitro* увеличивает продолжительность их жизни от 28 до 182 дней (6 мес.). Отмечается, что зависимость доза – отклик для исследуемой системы имеет куполообразный вид и максимальный эффект наблюдается при использовании CeO_2 в концентрациях 10–100 нМ. Уменьшение концентрации CeO_2 ниже 1 нМ, равно как и ее увеличение до 1 мкМ, приводит к уменьшению положительного эффекта, однако не оказывает токсического действия [19]. Интересно, что нарушений нейрональной кальциевой сигнализации у клеток, выдержанных в течение длительного времени в присутствии наночастиц CeO_2, не зафиксировано [19].

Приведенные в [20] данные также свидетельствуют о том, что введение нанодисперсного CeO_2 (размер частиц – 10 нм) значительно повышает жизнеспособность целого ряда клеток головного мозга, включая астроциты, нейроны, микроглиальные клетки и олигодендроциты (рис. 8.6). Было показано, что культуры указанных клеток в присутствии CeO_2 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 более крупнодисперсного (>20 нм) диоксида церия, а также нанокристаллических порошков диоксидов других металлов (включая празеодим, лантан, титан и рутений) не позволяет добиться подобного эффекта.

В работе [21] было впервые установлено, что нанодисперсный диоксид церия проявляет антиапоптическое действие. В частности, при

этом было показано, что наночастицы CeO_2 проявляют ярко выраженное антиоксидантное действие, снижая дозозависимым образом внутриклеточное содержание активных форм кислорода в опухолевых моноцитах человека (U937) и опухолевых Т-лимфоцитах человека (Jurkat), причем содержание активных форм кислорода дополнительно закономерно уменьшается во времени.

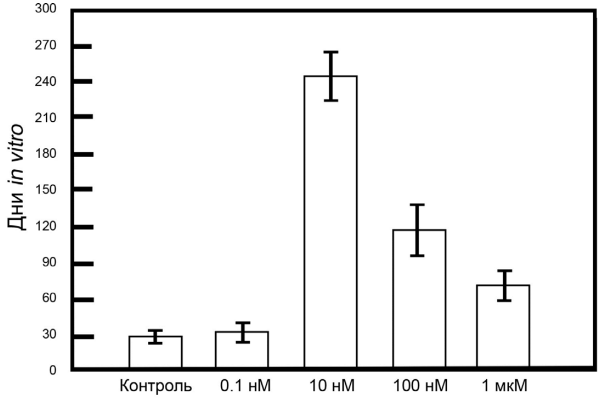


Рис. 8.6. Влияние наночастиц диоксида церия на максимальную продолжительность жизни смешанных нейронных клеток в культуре [20]

При индуцировании апоптоза тремя различными способами (введением пуромицина – ингибитора синтеза белка; пероксида водорода; этопозида – ингибитора топоизомеразы II, индуцирующего апоптоз вследствие повреждения ДНК) было зафиксировано, что в присутствии CeO_2 степень апоптоза также уменьшается дозозависимым образом, при этом наблюдается и уменьшение количества клеток с субдиплоидным набором ДНК (sub-G1), а также клеток с низким мембранным потенциалом митохондрий. Авторы [21] установили также, что нанодисперсный диоксид церия селективно ингибирует редокс-зависимый апоптоз, причем антиоксидантное и антиапоптическое действие CeO_2 коррелирует с содержанием в наночастицах Ce^{3+}. Вместе с тем, по нашему мнению, последняя гипотеза доказана не вполне корректным образом. Полученные авторами [21] данные могут свидетельствовать о возможности коррекции при помощи нанодисперсного CeO_2 возрастной дисрегуляции апоптоза.

С другой стороны, с возрастом в неделящихся клетках (например, в нейронах) накапливаются различные включения, замедляется метаболизм, ухудшается состояние митохондрий. Уничтожение таких клеток происходит за счет лизосомной деградации (аутофагии). Несбалансированная аутофагия вовлечена в развитие многих нервно-дегенеративных заболеваний (хорея Хантингтона, болезнь Паркинсона и Альцгеймера), миопатий и рака. Кроме адаптации клеток к измененным условиям, аутофагия является одним из механизмов врожденного и адаптивного иммунитета. Процессы, направленные на активацию аутофагии, могут снижать в клетках содержание «плохих» компонентов, тем самым проявляя омолаживающий эффект. Это направление является принципиально новым в лечении патологий, ассоциированных со старением. В успешном случае подобный подход должен, улучшая функции стареющих клеток, не только замедлять старение, но и вызывать реальное омоложение организма. В работе [22] показано, что наночастицы диоксида церия активируют систему лизосомной аутофагии в клетке и усиливают аутофаговый клиренс. При этом наблюдается активация фактора транскрипции EB (FTEB), основного регулятора лизосомальной функции и аутофагии, а также повышенная регуляция генов в системе аутофагии лизосом (рис. 8.7).

Согласно данным [19–20], введение наночастиц CeO_2 может способствовать увеличению срока жизни не только микро-, но и макроорганизмов; в частности, таким способом удалось добиться увеличения средней и максимальной продолжительности жизни дрозофил (*Drosophila melanogaster*) (рис. 8.8). При этом растворы солей Ce(IV) не только не увеличивают продолжительность жизни дрозофил, но токсичны и вызывают гибель плодовых мушек [23]).

Из представленных в [18–20] данных следует, что при введении наночастиц CeO_2 продолжительность жизни мушек значительно увеличивается. Обращает на себя внимание тот факт, что увеличивалась не только максимальная продолжительность жизни, но и время до 50% гибели колонии, которая употребляла с пищей наночастицы. Введение нанодисперсного диоксида церия также поддерживало у группы дрозофил нормальный геотаксис при старении. Показано, что дозы, в 100 раз превышающие необходимые для продления продолжительности жизни клеточной культуры, нетоксичны для дрозофил.

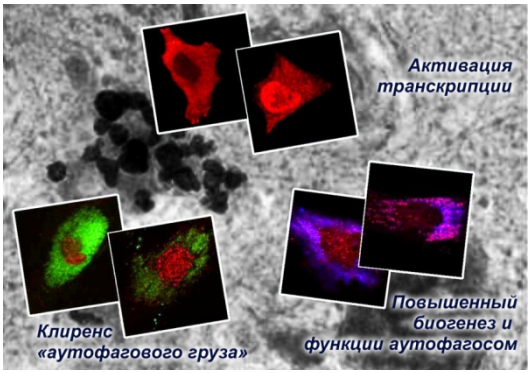


Рис. 8.7. НДЦ локализуется в цитоплазме и в аутофаговых везикулах клеток LICL и HeLa. Активация транскрипции: НДЦ усиливает активацию транскрипционного фактора TFEB и сети CLEA (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) в клетках HeLa/TFEB. Конфокальное изображение клеток (контрольных и обработанных 0,01% НДЦ) через 24 ч после обработки. Красное свечение – TFEB-3xFLAG. Клиренс «аутофагового груза»: НДЦ ускоряет клиренс цероидного люминесцентного липопигмента в фибробластах LINCL. Конфокальная микрофотография контрольных и обработанных НДЦ (0.,01%, 3 дня) фибробластов: зеленая флуоресценция – цероид, красная – TFEB. Повышенный биогенез и функции аутофагосом: НДЦ активирует аутофагию [22]

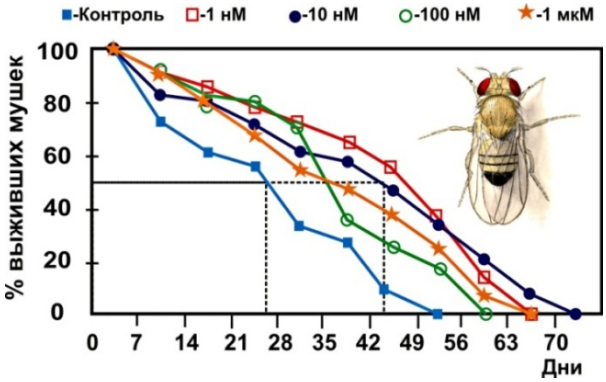


Рис. 8.8. Влияние наночастиц диоксида церия на продолжительность жизни мужских особей мушки *D. melanogaster* [18]

8.3. Влияние НДЦ на нейродегенеративные и другие заболевания стареющих млекопитающих

Ишемический инсульт является одной из основных причин смертности населения. Ключевым этапом ишемического каскада является развитие окислительного стресса, вызывающего гибель клеток, в частности по механизму апоптоза (рис. 8.9). Эффективные препараты для лечения последствий ишемического инсульта на данный момент отсутствуют.

Авторы [26] высказали предположение о том, что нанодисперсный диоксид церия, будучи эффективным антиоксидантом, может быть использован в качестве препарата для лечения последствий ишемического инсульта, и выполнили экспериментальную проверку этого предположения *in vivo* с использованием золя CeO_2 с размером частиц ~3 нм, синтезированного в обратных мицеллах. После индуцирования инсульта у крыс им вводили внутривенно различные дозы нанодисперсного CeO_2. Было установлено, что объем инфаркта у крыс, получивших от 0,5 до 0,7 мг/кг CeO_2, на 50–60% меньше, чем у особей контрольной группы (рис. 8.10). Уменьшение или увеличение дозировки CeO_2 приводит к исчезновению терапевтического эффекта.

Авторы [26] показали, что наночастицы CeO_2 неспособны преодолеть гематоэнцефалический барьер у здоровых особей крыс, однако обнаруживаются в значительной концентрации (превышающей таковую в почках и сердце) в мозгу крыс, перенесших ишемический инсульт. Более того, с использованием флюоресцентных меток было выявлено повышенное содержание наночастиц CeO_2 в периинфарктной зоне. Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что нанодисперсный диоксид церия может представлять интерес в качестве перспективного средства преодоления последствий инсульта. В работе [25] авторы рассматривают механизм формирования инсульта (рис. 8.9) и роль активных форм кислорода в его развитии. По мнению авторов, наночастицы диоксида церия могут иметь большую перспективу в терапии ишемических заболеваний.

Окислительный стресс является одним из основных действующих факторов в развитии сахарного диабета и его осложнений [27]. В связи с этим снижение уровня активных форм кислорода представляет собой перспективный путь лечения сахарного диабета. Авторы [28] установили, что в качестве эффективного антиоксиданта при сахарном диабете возможно использовать нанодисперсный диоксид церия, в том числе в сочетании с селенитом натрия.

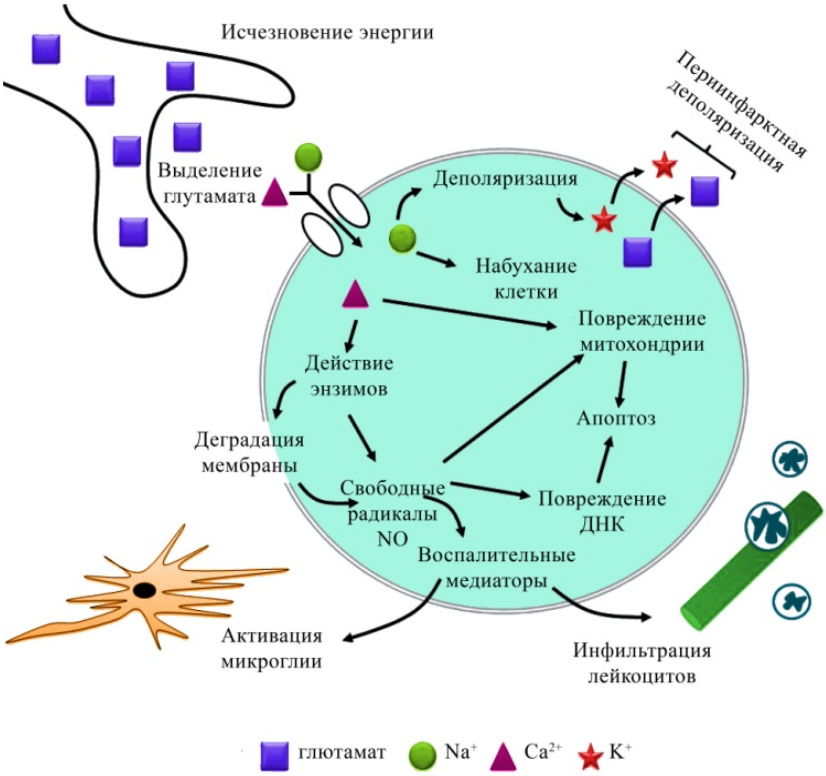


Рис. 8.9. Патофизиологические процессы в ишемическом очаге мозга. Недостаток энергии приводит к деполяризации нейронов. Активация специфических глутаматных рецепторов резко увеличивает уровень внутриклеточного кальция, натрия и хлорида, в то время как калий высвобождается во внеклеточное пространство. Диффузия глутамата и калия в межклеточное пространство может сопровождаться серией волн деполяризации (периинфарктой деполяризации). За счет осмотического градиента во внутриклеточное пространство проникает вода и клетки набухают (отек). Кальций, как универсальный внутриклеточный мессенджер, активирует ряд ферментов, таких как протеазы, липазы, эндонуклеазы и пр. Генерирующиися при этом свободные радикалы и оксиды азота повреждают мембраны, митохондрии, а также саму ДНК; все эти процессы могут запускать механизмы апоптоза. Высвобождаются воспалительные медиаторы, что активизирует иммунокомпетентные клетки, в частности клетки микроглии и воспалительные клетки крови [24, 25]

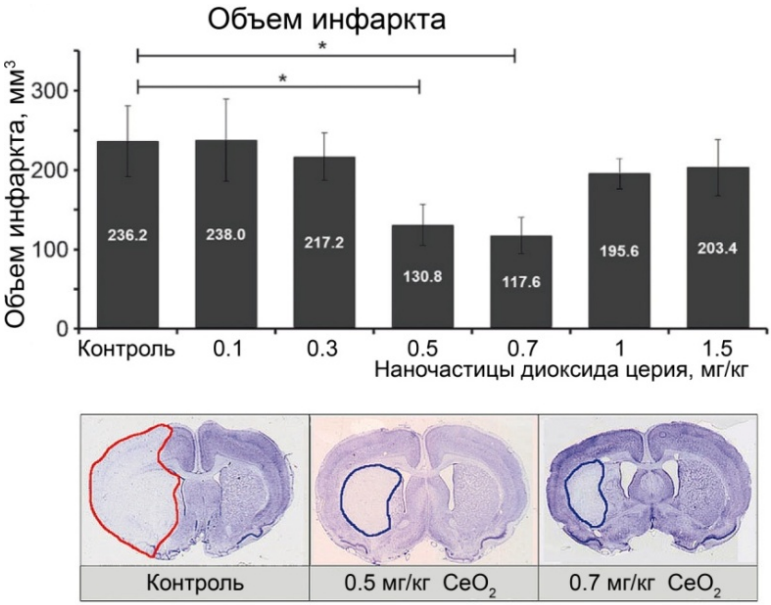


Рис. 8.10. Зависимость объема зоны инфаркта от концентрации наночастиц диоксида церия. Срезы мозга контрольных животных и обработанных оптимальными дозами наночастиц CeO_2 [24]

В частности, при индуцировании диабета у крыс путем однократной внутрибрюшинной инъекции стрептозотоцина и последующих инъекциях диоксида церия различной дисперсности наблюдалось значимое увеличение массы тела животных по сравнению с контрольной группой, не получавших инъекции CeO_2. Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (LPO) у крыс, получавших комбинацию диоксида церия и селенита натрия, также оказалась существенно меньшей по сравнению с контрольной группой, в то время как общая антиоксидантная емкость (TAC) и общее содержание тиольных групп (TTM), напротив, значимо возросли (табл. 8.1). Аналогичным образом каталазная и супероксиддисмутазная активность в плазме крови и печени у крыс с экспериментальным диабетом, получивших инъекции диоксида церия или его смеси с селенитом натрия, оказались выше, чем у контрольной группы крыс. По мнению авторов [28], полученные результаты свидетельствуют о перспективности

клинических испытаний препаратов на основе нанодисперсного диоксида церия/селенита натрия для лечения диабета. Аналогичного мнения придерживаются также авторы [29], предложившие использовать нанодисперсный диоксид церия при лечении диабетических язв.

Таблица 8.1

Влияние наночастиц диоксида церия и селенита натрия на каталазную и супероксиддисмутазную активность в плазме и печени крыс [28]

Группы	Каталазная активность		СОД активность	
	Плазма, ед./мл	Печень, ед./мг протеина	Плазма, ед./мл	Печень, ед./мг протеина
Контроль (здоровые крысы)	13,74 ± 0,26	76,25 ± 1,39	7,81 ± 3,98	16,22 ± 0,56
Контроль (крысы, больные диабетом)	5,39 ± 0,70	51,26 ± 1,67	6,30 ± 2,33	11,78 ± 0,91
Крупнокристаллический диоксид церия	6,50 ± 0,747	52,20 ± 2,70	6,18 ± 3,13	10,02± 0,577
Нанодисперсный диоксид церия	9,05 ± 0,51	66,38 ± 3,81	7,45 ± 1,99	12,37 ± 0,54
Селенит натрия	8,31 ± 0,73	63,09 ± 2,13	6,50 ± 1,51	11,78 ± 0,56
Нанодисперсный диоксид церия + селенит натрия	12,86 ± 0,44	72,75 ± 1,74	7,68 ± 2,55	15,55 ± 0,78

Авторы [30] отмечают, что при заболевании инсулинозависимым сахарным диабетом единственным надежным способом лечения является трансплантация панкреатических островков. Несмотря на значительные достижения в области соответствующих операций, в ходе трансплантации островков Лангерганса клетки подвергаются значительному окислительному стрессу, что приводит к снижению их жизнеспособности и функциональности. Свежепересаженные островки в значительной степени изолированы от кровеносной системы и, вследствие этого, подвержены гипоксически-ишемическому поражению, являющемуся причиной окислительного стресса. Кроме того, панкреатические островки характеризуются низкой антиоксидантной способностью и в силу этого особо чувствительны к окислительному стрессу. В работе [30] было впервые показано, что жизнеспособность клеток панкреатических островков крыс значительно возрастает при их обработке сочетанием нанокристаллического диоксида церия

(100 нмоль/л) и селенита натрия (30 нмоль/л) (рис. 8.11). Положительный (хотя и менее выраженный) эффект оказывает также обработка индивидуальным нанокристаллическим диоксидом церия. Установлено, что введение наночастиц CeO_2, селенита натрия или их сочетания приводит к значительному уменьшению содержания активных форм кислорода в панкреатических островках. Наконец, выработка инсулина клетками панкреатических островков в ответ на введение глюкозы (2,8 или 16,7 ммоль/л) значительно возрастала при условии предварительной обработки клеток сочетанием нанокристаллического диоксида церия и селенита натрия.

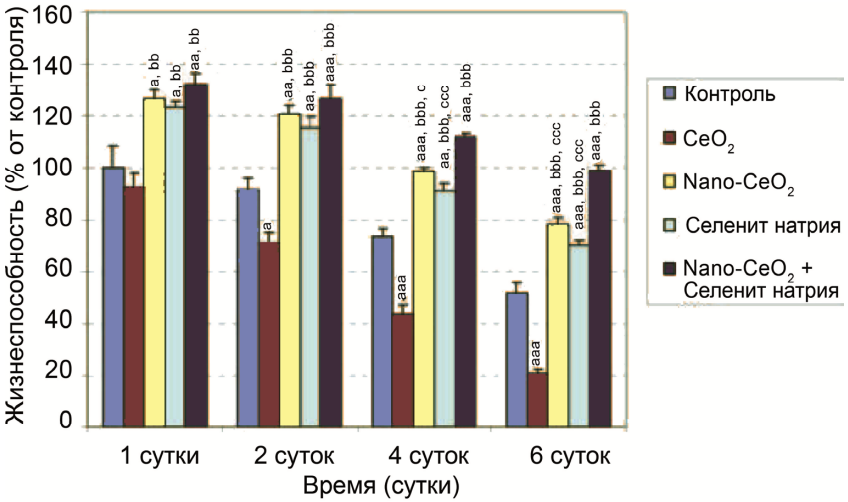


Рис. 8.11. Влияние макрокристаллического (CeO_2) и нанокристаллического (Nano-CeO_2) диоксида церия, а также селенита натрия и его сочетания с нанокристаллическим диоксидом церия на жизнеспособность клеток панкреатических островков [30]

В работе [31] была впервые продемонстрирована перспективность применения нанодисперсного диоксида церия в лечении болезни Альцгеймера. Как известно, болезнь Альцгеймера представляет собой дегенеративное заболевание центральной нервной системы, ведущее к прогрессирующему расстройству памяти. Развитие болезни Альцгеймера сопровождается увеличением выработки бета-амилоидного белка (Аβ) и отложением фибриллярных амилоидных бляшек. Со-

гласно [31] первичной причиной необратимой нейродегенерации является токсичность бета-амилоидного белка. Следует отметить, что бета-амилоидный белок способствует формированию пероксида водорода по реакции Фентона, а также образованию других активных форм кислорода [32, 33]. Авторы [34] с использованием клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y показали, что обработка клеток бета-амилоидным белком приводит к существенному снижению их жизнеспособности, однако введение нанодисперсного диоксида церия (в концентрации 100 мкг/мл) позволяет полностью предотвратить гибель клеток. Установлено, что нанодисперсный диоксид церия предохраняет клетки, обработанные бета-амилоидным белком, от негативных морфологических изменений, включая дистрофию аксонов. Интересно, что, по данным авторов, наночастицы CeO_2 действуют не только в качестве антиоксиданта, но и влияют, прямо или косвенно, на сигнальные пути, ответственные за гибель нейронов и нейропротекторное действие.

Проживание в зоне действия неблагоприятных факторов окружающей среды, в городских условиях (в том числе в условиях загрязнения воздуха продуктами сгорания моторного топлива автомобильных двигателей) повышает риск онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. В работе [35] авторы показали, что наночастицы диоксида церия снижают развитие атеросклероза у аполипопротеин Е – дефицитных мышей, выращенных на диете с повышенным содержанием жиров. Аэрозоль дизельного топлива значительно увеличивает количество склеротических бляшек в брахиоцефальных артериях, а введение в аэрозоль НДЦ снижает количество бляшек до значения ниже контроля (рис. 8.12). В обзоре [36] подчеркиваются значительные перспективы использования нанодисперсного диоксида церия в терапии различных возрастных нейродегенеративных заболеваний, обусловленных окислительным стрессом.

Помимо центральной нервной системы при болезни Альцгеймера поражаются периферические ткани [37], а также эритроциты [38, 39]. Косенко и др. [40] показали, что в эритроцитах при старении и деменции происходит усиление окислительного стресса, что проявляется в повышении концентрации H_2O_2 и органических гидропероксидов, снижении активности глутатионтрансферазы и отношения GSH/GSSG. В эритроцитах человека окислительный стресс играет ключевую роль в старении, гериатрических заболеваниях и деменции

[41]. Постоянное взаимодействие с кислородом вызывает окисление содержащегося в эритроцитах гемоглобина с образованием супероксидных радикалов ($O_2^{\bullet-}$), а также других ROS, главным образом перекиси водорода и гидроксильных радикалов ($OH^{\bullet}$) [42].

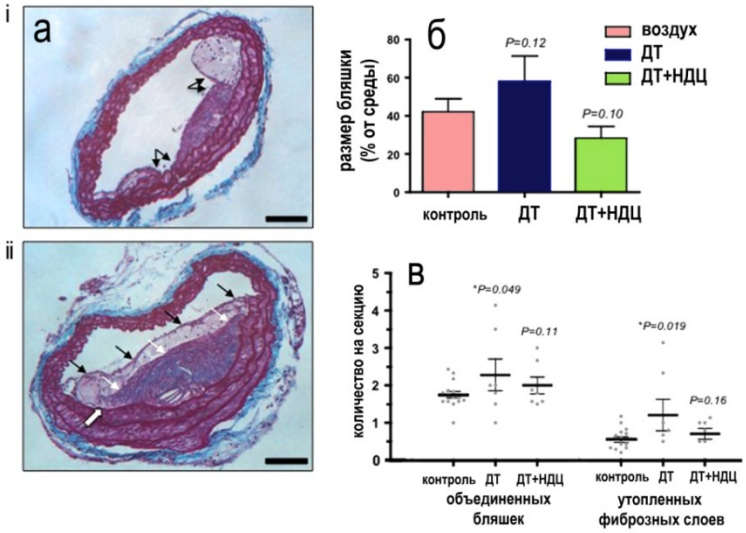


Рис. 8.12. Влияние выхлопных газов от дизельного топлива (ДТ) или дизельного топлива с наночастицами диоксида церия (ДТ+НДЦ) на атеросклеротические бляшки в брахиоцефальных артериях. *а* – размер бляшки, стандартизированный в виде процента от области среды; *б* – пример изображений, показывающих (I) три «смежные бляшки» (черные стрелки) и (II) «утопленный фиброзный слой» (тонкие белые стрелки) с перекрыванием вторичной бляшкой (тонкие черные стрелки). Толстая белая стрелка (с черным контуром) указывает на потенциальный участок ранее вылеченного разрыва бляшки. Окрашивание United States Trichrome. Черная полоска шкалы = 100 мкм; *в* – «сложность» бляшки оценивали по частоте соединенных бляшек или утопленных фиброзных слоев. Среднее ± S.E.M. ($n = 7-16$), * $p < 0{,}05$; непарные *t*-тесты, по сравнению с контролем

Избыточное образование продуктов перекисного окисления липидов оказывает цитотоксическое действие, что проявляется в повреждении мембран эритроцитов. Состояние мембраны можно оценить по устойчивости эритроцитов к гемолизу – разрушению под действием физических или химических факторов с выделением в плазму крови гемоглобина и АТФ. Одним из вариантов химического разрушения

эритроцитов является кислотный гемолиз, при котором разрыв мембраны инициируется проникновением протона (H^+) в цитозоль. Закисление среды в связи с нарушением тканевого дыхания (гипоксия, ишемия и др.) в организме является одним из наиболее распространенных повреждающих факторов для мембран эритроцитов, поэтому кислотная эритрограмма служит показательным тестом состояния эритроцитов, а кислотная резистентность характеризует целостность мембраны эритроцитов и степень ее повреждения при действии различных факторов в процессе старения.

В опытах *in vivo* и *in vitro* Коцуруба и др. [43] изучали действие нанодисперсного диоксида церия на устойчивость к кислотному гемолизу эритроцитов молодых и старых крыс. Опыты *in vitro* показали отсутствие прямого гемолитического действия CeO_2 в концентрациях 10^{-3}–10^{-12} М. Ранее также отмечалось, что после воздействия 0,17 и 1,7 нг/мл наночастиц оксида церия в течение 3 ч на эритроциты человека гемолиз не регистрируется, наночастицы оксида церия не вызывают разрыв мембран эритроцитов и, похоже, не влияют на их целостность [44], также наночастицы диоксида церия, допированные титаном, демонстрируют каталазоподобную активность и также не активируют гемолиз [45].

Авторы [43] проанализировали кинетические кривые кислотного гемолиза, вызываемого проникновением протонов в матрикс эритроцитов. Опыты *in vivo* проводили на 10 беспородных крысах-самцах в возрасте 6 мес. (взрослые) и 10 особях возрастом 24 мес. (старые). Старых крыс разделили на две группы по 5 животных в каждой (исследуемая группа и контроль). Взрослым крысам и контрольной группе старых крыс скармливали в течение 14 сут стандартный рацион вивария, а в питьевую воду добавляли только буферный раствор, тогда как животным исследуемой группы в питьевую воду добавляли суспензию CeO_2 (синтезирована аналогично описанной в [46], стабилизатор – цитрат, размер частиц <5 nm, ζ-потенциал –20 мВ) в буферном растворе из расчета 0,1 мг/кг веса животного. Через 14 сут животных декапитировали, отбирали кровь, из которой центрифугированием выделяли эритроциты. Суспензию эритроцитов крови взрослых, контрольных и опытных старых крыс в изотоническом растворе 0,14 М NaCl использовали для проведения кинетического анализа кислотного гемолиза с целью оценки мембраностабилизирующего действия наночастиц CeO_2. Суть метода заключается в определении

динамики изменения количества клеток, гемолизирующихся под действием слабой кислоты за определенный промежуток времени. В опытах *in vitro* кислотные эритрограммы взрослых крыс записывали для различных концентраций (10^{-3}–10^{-12} М) CeO_2. Устойчивость каждой фракции эритроцитов можно характеризовать по времени ее обнаружения на эритрограмме.

На рис. 8.13 представлены усредненные кислотные эритрограммы крыс разных исследованных групп. На основе индивидуальных эритрограмм рассчитывали параметры, средние значения которых представлены в табл. 8.2. Опыты *in vivo* показали, что у старых животных значительно снижен индекс устойчивости красных кровяных телец, уменьшено время их максимального и полного гемолиза, увеличена доля лабильных «старых» и, наоборот, снижена доля стабильных «молодых» эритроцитов. Введение *per os* в течение 14 сут в организм старых крыс 0,1 мг/кг CeO_2 полностью восстановило устойчивость их эритроцитов к кислотному гемолизу.

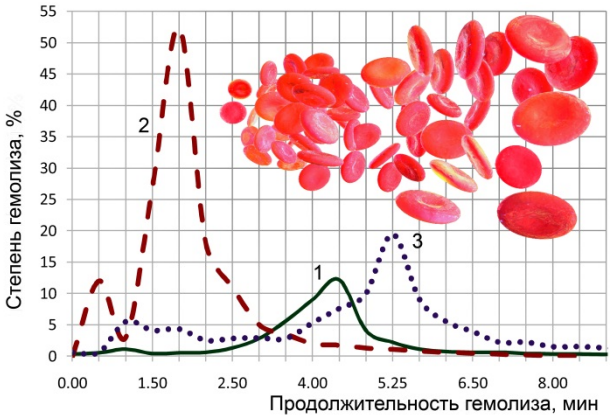


Рис. 8.13. Усредненные кислотные эритрограммы взрослых крыс (кривая *1*, n = 10), старых крыс (кривая *2*, n = 5) и старых крыс, получавших CeO_2 в течение 14 сут по 0,1 мг/кг, *per os* (кривая *3*, n = 5) [43]

Из табл. 8.2 видно, что у старых крыс доля лабильных («старых») эритроцитов, которые гемолизуются менее чем за 2,5 мин, составляет 63,3%, что более чем в 5 раз превышает показатель для взрослых особей (12,06%). Мембрана «старых» эритроцитов более проницаема для протонов (через анионный канал или за счет Са-протонного обмена в

результате «выхода» ионов Ca^{2+} из эритроцитов), они имеют более короткий жизненный цикл, быстрее разрушаются и выбрасывают наружу в неконтролируемом количестве гемоглобин и АТФ. Снижение количества «активных» эритроцитов, обеспечивающих ткани кислородом, может вызывать гипоксию и, соответственно, метаболический окислительный стресс. Кратковременное введение в организм старых крыс наночастиц диоксида церия полностью нормализует (уменьшает) долю лабильных «старых» эритроцитов в их крови. При этом 14-дневное введение в организм крыс CeO_2 значительно (более чем в 18 раз) увеличивает в крови долю стабильных «молодых» эритроцитов с малопроницаемой для протона мембраной.

Таблица 8.2

Параметры кинетических кислотных эритрограмм крыс исследованных групп (M ± m, n = 5–10) [43]

Параметры эритрограмм	Взрослые крысы, норма (n = 10)	Старые крысы, контроль (n = 5)	Старые крысы, получавшие CeO_2 (n = 5)
Начало гемолиза (t_o), мин	0,3 ± 0,04	0 ± 0	0,6 ± 0,08
Продолжительность гемолиза (Δt), мин	13,8 ± 1,6	8,3 ± 1,1	19,4 ± 3,1
$\%_{max}$, %	12,1 ± 1,44	52,41 ± 7,49	19,44 ± 1,84
t_{max}, мин	4,40 ± 0,46	1,70 ± 0,32	5,20 ± 0,07
Доля лабильных клеток (< 2,5 мин), %	12,06 ± 1,38	63,3 ± 12,94	7,17 ± 1,13
Доля стабильных клеток (> 7,5 мин), %	28,1 ± 3,1	1,51 ± 0,22	27,56 ± 3,64
Индекс устойчивости, у.е.	491,3 ± 38,6	190,1 ± 23,4	693,8 ± 74,7

Авторы [43] предполагают, что наночастицы CeO_2 либо существенно снижают протонную проницаемость плазматической мембраны «старых» лабильных эритроцитов, либо значительно стимулируют выброс в циркуляцию новых, «молодых» эритроцитов со стабильной мембраной, влияя таким образом на интенсивность эритропоэза. При этом наночастицы CeO_2 ингибируют процессы генерации активных форм кислорода и / или азота – как в самих эритроцитах, так и в окружающей их среде (плазме крови, белых кровяных тельцах, эндотелии сосудов и пр.). Таким образом, введение старым крысам 0,1 мг/кг наночастиц диоксида церия в течение 14 дней приводит к

значительному снижению в их крови доли «старых» лабильных эритроцитов и значительному увеличению доли «молодых» стабильных эритроцитов, что свидетельствует об ощутимом «омолаживающем» эффекте наночастиц CeO_2.

8.4. Влияние НДЦ на репродуктивные функции стареющих млекопитающих

Известно, что процесс старения организма сопровождается инволюционными изменениями органов половой системы и снижением их гормональной активности, а также снижением активности антиоксидантной системы и возрастанием концентрации АФК. При этом окислительный стресс оказывает существенное влияние на репродуктивную систему [48]. Выполненные нами исследования впервые продемонстрировали положительное влияние нанодисперсного диоксида церия на репродуктивные функции млекопитающих. В частности, было показано, что CeO_2 существенно повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс [49–51]. Так, у стареющих самцов крыс контрольной группы содержание тестостерона в плазме крови соответствовало возрастной норме и составляло 2,64±0,40 нМ, что примерно вдвое меньше, чем у молодых половозрелых животных (диапазон колебания содержания гормона от 5 до 6 нМ). При 10-дневном введении CeO_2 в дозе 100 мг/кг не отмечали существенных изменений уровня тестостерона в плазме крови животных (индивидуальные колебания 0,96–4,87 нмоль/л; среднее – 2.66 нмоль/л). В то же время использование меньшей дозы CeO_2 (1,0 мг/кг) приводило к двукратному повышению уровня гормона по сравнению с контрольными животными, а также животными, получавшими CeO_2 в дозе 100 мг/кг (табл. 8.3).

Таблица 8.3

Влияние 10-дневного введения золя CeO_2 на уровень тестостерона в плазме крови крыс (M±m, n = 6)

№ п/п	Группы животных	Уровень тестостерона, нмоль/л
1	Контроль	2,64±0,40 (1,90–4,60)
2	CeO_2 1 мг/кг	5,55±1,40 (1,52–12,10)
3	CeO_2 100 мг/кг	2,66±0,78 (0,96–4,87)

Примечание. В скобках указан диапазон колебаний индивидуальных значений.

При определении количества сперматозоидов в перфузатах эпидидимусов опытных и контрольных животных установлено, что 10-дневное введение CeO_2 в дозе 1 мг/кг приводило к значительному (достоверному) повышению их количества (на 25,5%) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В группе животных, получавших CeO_2 в дозе 100 мг/кг (табл. 8.4), достоверного увеличения количества сперматозоидов не зарегистрировано.

Таблица 8.4

Влияние 10-дневного введения золя CeO_2 на количество сперматозоидов (млн/мл) в перфузатах эпидидимусов стареющих самцов крыс (M±m, n=6)

№ п/п	Группы животных	Концентрация сперматозоидов, млн/мл
1	Контроль	71,3±3,5 (68–83)
2	CeO_2 1 мг/кг	89,5±6,8* (67–114)
3	CeO_2 100 мг/кг	83,5±5,1 (68–100)

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

Одним из информативных показателей морфологической оценки гормональной функции репродуктивной системы является активность гормонпродуцирующих клеток Лейдига семенников. Проведенные в работе гистологические исследования показали, что морфологическое строение семенников стареющих самцов контрольной группы отвечает общей картине их возрастных изменений (рис. 8.14, *А*): количество активированных клеток Лейдига значительно уменьшено, что свидетельствует о снижении секреторной активности семенников. Большинство клеток Лейдига имело цитоплазму среднего объема, нередко густую.

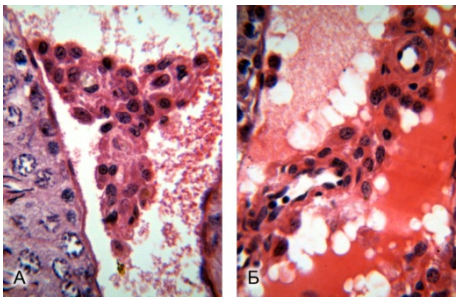


Рис. 8.14. Микрофотографии островков клеток Лейдига в интерстициальном пространстве семенников стареющих крыс: *А* – контроль; *Б* – нанокристаллический диоксид церия в дозе 1 мг/кг. Стрелка – клетка Лейдига с массивной цитоплазмой в островке. Окраска гематоксилин – эозин, ув. × 40 [49]

При введении 1 мг/кг НДЦ количество активированных гормонпродуцирующих клеток Лейдига увеличивалось (см. рис. 8.14, *Б*), что является наиболее вероятной причиной повышения гормональной активности семенников и, как результат, роста концентрации тестостерона в плазме крови (табл. 8.3). Об активации клеток Лейдига свидетельствует наличие больших по объему нормохромных ядер с четким ядрышком. Цитоплазма их также имеет больший объем, часто вакуолизирована по периферии.

Принимая во внимание тесную функциональную связь между семенниками и предстательной железой, было исследовано гистологическое строение последней. У крыс контрольной группы состояние вентральной доли предстательной железы можно охарактеризовать как гипофункциональное, что соответствует возрастной норме (рис. 8.15, А1, А2).

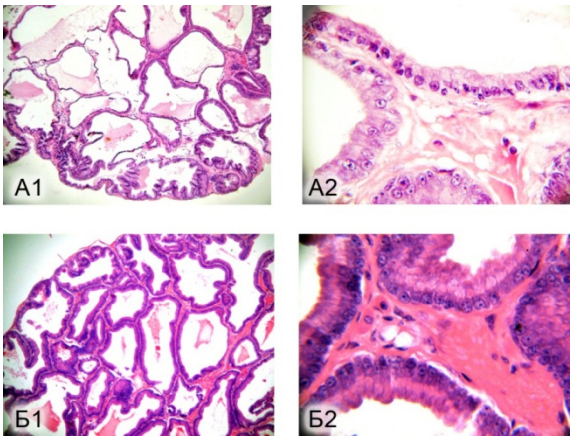


Рис. 8.15. Микрофотографии тканей вентральной доли предстательной железы стареющих крыс: *А*1 – контроль (общий вид), А2 – контроль (гиперхромные ядра в части эпителиальных клеток и отек стромы); *Б*1 – нанокристаллический диоксид церия в дозе 1 мг/кг (общий вид), *Б*2 – нанокристаллический диоксид церия в дозе 1 мг/кг (высокий цилиндрический эпителий с большим количеством базофильной зернистости в перинуклеарной части). Окраска гематоксилин – эозин. *А*1, *Б*1 – ув. × 4; *А*2, *Б*2 – ув. × 40 [49]

Во многих центрально расположенных ацинусах, которые имели повышенно извилистую форму, эпителий был плоский, атрофиче-

ский. Часть слоев соединительной ткани между ацинусами была расширена, имела признаки отека стромы. В них находили активированные тканевые базофилы, лейкоциты и гистиоцитарные клетки. Под влиянием НДЦ в дозе 1 мг/кг в предстательной железе стареющих крыс наблюдалась активация секреторных и пролиферативных процессов. Об этом свидетельствуют резкий рост базофильной зернистости цитоплазмы в перинуклеарной и апикальной частях эпителиальных клеток и увеличение количества рибосом и полисом, а также наличие в слое эпителия клеток на разных стадиях митотического деления (см. рис. 8.15, Б1, Б2). Это согласуется с данными о вероятном увеличении относительной массы предстательной железы (135,6±6,0 мг/100 г) относительно контроля (107,2 ± 10,6 мг/100 г, $p < 0,05$).

При исследовании сперматогенной функции семенников следует отметить, что количество сперматозоидов в смывах эпидидимисов после 10-суточного применения НДЦ в дозе 1 мг/кг достоверно увеличивалась ($p < 0,05$), а в дозе 100 мг/кг имела тенденцию к повышению по сравнению с контролем (табл. 8.4, рис. 8.16).

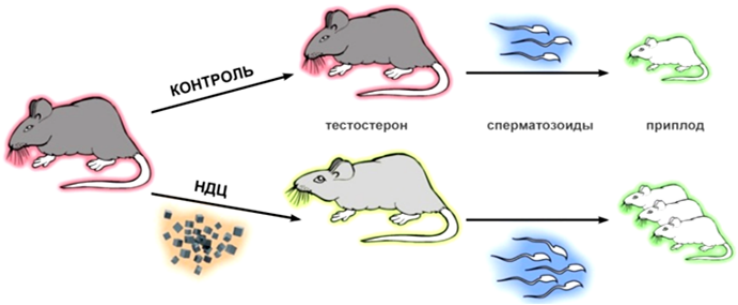


Рис. 8.16. Нанокристаллический диоксид церия повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс [49]

При морфологическом анализе сперматозоидов самцов крыс опытных и контрольной групп (в среднем по 200 сперматозоидов в каждом мазке) не отмечали патологии головок сперматозоидов, редко (1,35–2,1%) встречалась патология шейки (неправильный угол соединения с головкой или отрыв головки от шейки) и хвоста (3,9–

12,4%). При определении оплодотворяющей способности стареющих самцов, которые получали CeO_2 в дозе 1 мг/кг на протяжении 10 дней, установлено, что беременность у подсаженных к ним интактных самок протекала нормально и составила 22 сут, потомство рождалось живым, летальность в первые 2 недели после рождения (время наблюдения) отсутствовала.

У самок, которых спаривали с самцами контрольной группы, в среднем рождалось по 5 животных в приплоде. В то же время у самок, оплодотворенных стареющими самцами опытной группы (доза CeO_2 – 1 мг/кг), рождалось в среднем по 10 животных, что вдвое больше, чем у самок контрольной группы (рис. 8.15). При этом следует отметить, что в контрольной и опытной группах разделение по полу (самцы:самки) было соответственно 1,9:1 и 1,3:1. То есть самцов в потомстве опытной группы (n = 17) было почти в 1,5 раза меньше, чем в контрольной (n = 25). Что же касается физического развития потомства в контрольной и опытной группах, то оказалось, что животные, которые были рождены в опытной группе, в среднем имели меньшую массу тела при рождении. Очевидно, это обусловлено тем, что в приплоде рождалось в 2 раза больше животных. В то же время все остальные параметры физического и полового развития потомства самок, которых оплодотворяли самцы контрольной и опытной групп (отхождение ушных раковин, открытие глаз, прорезывание резцов, появление волосяного покрова, опускание семенников у самцов и открытие вагины у самок), практически не отличались.

Аналогичные исследования на стареющих самках мышей Balb/c и CBA [50] позволили установить, что введение наночастиц CeO_2 на протяжении 3 дней в дозе 45 мг/кг оказывало положительное воздействие на репродуктивную систему животных (рис. 8.17). Количество живых гранулезных клеток у мышей Balb/c возрастало от 33,08±0,19 до 73,25±0,86%, количество некротических и апоптических клеток уменьшалось от 12,58±0,19 и 54,33±0,92 до 0,50±0,23 и 26,25±0,92% соответственно. Количество ооцитов в фолликулах также увеличивалось; при этом возрастало количество ооцитов в метафазе I и метафазе II. Интересно, что аналогичная обработка молодых особей мышей не приводила к значимому изменению соответствующих показателей. Увеличение кратности обработки мышей приводило к снижению эффективности воздействия CeO_2. Сходные результаты были получены и на мышах линии CBA.

Интересно, что, по данным [52], нанодисперсный диоксид церия обеспечивает защиту ооцитов мышей от негативных эффектов, связанных с эндометриозом, тем самым повышая вероятность успешной беременности. Авторы [52] также связывают положительное воздействие CeO_2 со способностью этого материала выполнять функции антиоксиданта и проявлять противовоспалительные и антиангиогенные свойства. Показательно, что нанокристаллический диоксид церия увеличивает количество здоровых ооцитов, причем эффект от однократного введения CeO_2 превышает эффект от терапии, основанной на использовании традиционного антиоксидантного препарата N-ацетилцистеина. Полученные в [52] экспериментальные данные приведены в табл. 8.5.

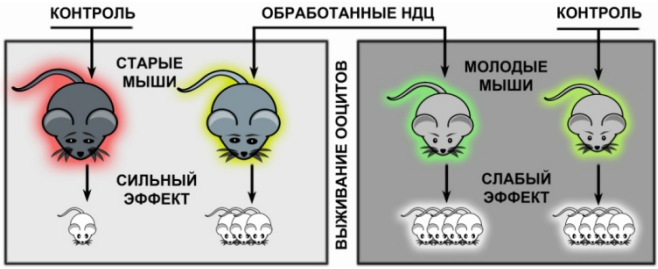


Рис. 8.17. Нанокристаллический диоксид церия повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самок мышей [50]

Таблица 8.5

Характеристика ооцитов [52]

Параметры ооцитов	Группа А1	Группа А2	Группа А3	Группа Б
Количество ооцитов MII	75,80% (30/62)	79,45% (58/73)	92,50% (74/80)	66,66% (48/72)
Количество ооцитов с веретеном деления	33,33% (10/30)	72,41% (42/58)	79,72% (59/74)	41,66% (20/48)
Количество веретен деления, расположенных под 0° к полярному тельцу	10% (1/10)	69,04% (29/42)	72,88% (43/59)	20% (4/20)

Примечание. Группа А – мыши с искусственно вызванным эндометриозом. Группа А1 – инъекция 100 мкл 0,9% NaCl (n = 10); группа А2 – инъекция N-ацетилцистеина (250 мг/кг массы тела) трижды в неделю в течение 15 дней (n = 10); группа А3 – однократная инъекция наночастиц диоксида церия, 0,5 мг/кг массы тела (n = 10); группа Б – контроль, мыши без эндометриоза.

Следует отметить, что про- и антиоксидантная активность НДЦ (в том числе и по отношению к ооцитам) в значительной мере определяется физико-химическими свойствами самой частицы. Так, данные, представленные в гл. 4 (рис. 4.24), демонстрируют, что свойства НДЦ зависят от стехиометрии даже в условиях подобных биологических экспериментов (при одном значении pH). Например, авторы [53] обнаружили, что наночастицы CeO_2 практически того же размера (~3 нм) являются прооксидантами по отношению к мышиным ооцитам и вызывают окислительное повреждение ДНК. В нашем случае наночастицы были получены из солей церия (III) в «мягких условиях» [46] и содержали более 15% Ce^{3+} [54]; во втором случае наночастицы (Rhodia) были синтезированы из солей церия (IV) и практически не содержали Ce^{3+} (менее, чем 0,04% [55]).

8.5. Влияние НДЦ на состояние желудочно-кишечного тракта стареющих млекопитающих

В работах [56, 57] выполнены исследования влияния нанокристаллического диоксида церия на состояние желудочно-кишечного тракта крыс в условиях возрастных изменений – в частности, концентрацию продуктов перекисного окисления липидов, а также моторику желудка и кишечного тракта у молодых и стареющих животных. Изучение антиоксидантной системы желудочно-кишечного тракта проводили на 80 белых нелинейных крысах двух возрастных групп: 3 месяца (масса 130–160 г, $n = 40$) и 22–24 месяца (масса 390–450 г, $n = 40$). Каждую возрастную группу делили следующим образом: I – интактные животные, II – группа животных, которым вводили 2,9 мл деионизированной воды, III – группа крыс, которым вводили раствор стабилизатора (цитрата) в объеме 2,9 мл/кг и IV – группа животных, которым вводили НДЦ (1 ммоль/мл) в растворе стабилизатора объемом 2,9 мл/кг. I, II и III группы животных были контрольными. Все вещества вводили течение 10 дней, один раз в день внутрижелудочно. Золь НДЦ 0,1 М (в пересчете на церий) с частицами размером 2–7 нм, стабилизированный цитратом, ζ-потенциал минус 20 мВ, синтезированный по методике [46]. Для работы использовали разведения исходного золя стерильной деионизированной водой. Установлено, что с возрастом в слизистой оболочке желудка увеличивается содержание продуктов перекисного окисления липидов: диеновые конъюгаты – на 30,2±7,5% ($p < 0,05$), ТБК-активные продукты – на 285,7±9,1%

($p < 0,05$) и Шиффовы основания – на 181,9±7,1% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы крыс трехмесячного возраста.

В группе животных 24-месячного возраста, которым вводили НДЦ, содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке желудка уменьшалось: для диеновых конъюгатов – на 43,4±9,1% ($p < 0,05$), для ТБК-активных продуктов – на 51,2±9,4% ($p < 0,05$) и для оснований Шиффа – на 44,9±6,3% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы крыс соответствующего возраста (табл. 8.6). Супероксиддисмутазная и каталазная активность с возрастом животных понижается на 43,7±4,1% ($p < 0,05$) и 24,6±3,7% ($p < 0,05$) соответственно. При этом влияния НДЦ на антиоксидантную систему, а именно активность каталазы и супероксиддисмутазы, не было обнаружено (табл. 8.7).

Таблица 8.6

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке желудка крыс

Параметр / Группа животных	Диеновые конъюгаты, нмоль×мг белка$^{-1}$	ТБК-активные продукты, нмоль×мг белка$^{-1}$	Шиффовы основания, у.е×мг белка$^{-1}$
Контроль, 3 мес.	244,12±18,33	65,14±5,99	5,91±0,42
НДЦ, 3 мес.	231,12±12,04	60,19±4,81	5,11±0,37
Контроль, 24 мес.	317,89±22,74$^{\#}$	250,85±20,02$^{\#}$	16,66±1,40$^{\#}$
НДЦ, 24 мес.	180,03±16,42*	122,31±11,56*	9,17±0,86*

Примечание. # – $p < 0,05$ по сравнению с 3-месячным контролем; * – $p < 0,05$ по сравнению с 24-месячным контролем.

Таблица 8.7

Активность ферментов антиоксидантной защиты в слизистой оболочке желудка крыс

Параметр / Група животных	Супероксиддисмутазная активность, у.е.×мин$^{-1}$×мг белка$^{-1}$	Каталазная активность, нмоль×мин$^{-1}$× мг белка$^{-1}$
Контроль, 3 мес.	0,16±0,011	6,49±0,42
НДЦ, 3 мес.	0,15±0,02	5,94±0,40
Контроль, 24 мес.	0,09±0,008*	4,89±0,41*
НДЦ, 24 мес.	0,07±0,007	4,18±0,37

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с 24-месячным контролем.

По результатам наших исследований также были выявлены возрастные изменения в слизистой оболочке толстой кишки. У старых

крыс возрастало содержание диеновых конъюгатов на 40,8±7,1% ($p < 0,05$), ТБК-активных продуктов и Шиффовых оснований на 114,7±7,6% ($p < 0,05$) и 132,0±5,8% ($p < 0,05$) соответственно. В группе животных 24-месячного возраста, которым вводили НДЦ, в слизистой оболочке толстой кишки наблюдается снижение содержания промежуточных и конечных продуктов перекисного окисления липидов: ТБК-активных продуктов – на 69,5±4,5% ($p < 0,05$) и Шиффовых оснований – на 40,5±6,3% ($p < 0,05$) относительно контрольной группы крыс соответствующего возраста (табл. 8.8). Содержание диеновых конъюгатов снижалось лишь на 6,2±0,9% ($p > 0,05$). Влияние НДЦ на концентрацию ферментов каталазы и супероксиддисмутазы в слизистой оболочке желудка молодых и стареющих крыс (как и в случае слизистой оболочки кишечника) было незначительным. Таким образом, показано, что введение НДЦ снижает окислительный стресс в желудочно-кишечном тракте, причем максимальный защитный эффект наблюдался именно для стареющих животных.

Таблица 8.8

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в слизистой оболочке толстой кишки крыс

Параметр / Группа животных	Диеновые конъюгаты, нмоль×мг белка$^{-1}$	ТБК-активные продукты, нмоль×мг белка$^{-1}$	Шиффовы основания, у.е×мг белка$^{-1}$
Контроль, 3 мес.	255,39±22,01	130,48±11,60	8,47±0,75
НДЦ, 3 мес.	234,54±18,50	121,16±9,86	8,15±0,51
Контроль, 24 мес.	359,80±24,78$^{\#}$	280,08±21,26$^{\#}$	19,65±1,15$^{\#}$
НДЦ, 24 мес.	337,54±26,75	194,53±15,77*	7,95±0,59*

Примечание. # – $p < 0,05$ по сравнению с 3-месячным контролем; * – $p < 0,05$ по сравнению с 24-месячным контролем

Изучение влияния НДЦ на моторные функции желудка и кишечника молодых и стареющих животных проводили на 40 крысах в возрасте 3 и 24 месяца, которые были рандомизированно разделены на две группы. Первой группе, которая служила контролем, в течение 10 дней внутрижелудочно (в/ж) вводили 3 мл водопроводной дехлорированной воды. Второй группе крыс в течение 10 дней вводили в/ж 3 мл водного раствора НДЦ с концентрацией 1 мМ. Через сутки после последнего введения веществ у крыс регистрировали моторную активность желудка и толстой кишки с помощью баллонографического метода [58]. В течение суток перед экспериментом крысы содержа-

лись без пищи со свободным доступом к воде. Животных анальгезировали уретаном (Sigma, USA) (1,1 г/кг живого веса, внутрибрюшинно (в/б)). Выполняли трахеотомию, после чего в фундальный отдел желудка и толстую кишку вводили катетеры с латексным баллончиком, который заполняли водой с температурой 37°С. Молодым животным вводили в желудок 1 мл воды, в толстую кишку – 0,5 мл. Старым крысам вводили 1,5 и 0,7 соответственно. Давление, созданное после введения жидкости, был одинаково во всех экспериментах – 17 см вод. ст. После 20-минутного эквилибрационного периода у животных всех групп в течение 120 мин регистрировали спонтанную моторную активность. После записи спонтанной моторной активности животным вводили стандартный стимулятор моторики карбахолин и проводили дальнейшую запись. Для характеристики моторной функции желудочно-кишечного тракта использовали амплитуду, частоту сокращений и индекс сократительной активности (ИСА) за 1 мин.

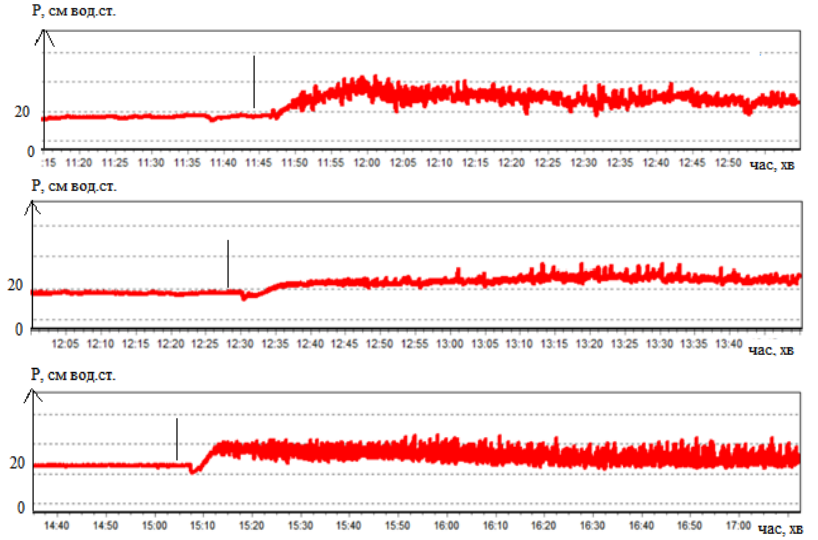


Рис. 8.18. Запись моторной активности желудка у крыс: *а* – 3-месячные крысы; *б* – 24-месячные крысы; *в* – 24-месячные крысы после 10-дневного введения НДЦ; | – введение карбахолина в дозе 0,01 мг/кг внутрибрюшинно

В результате проведенных контрольных исследований было показано, что частота сокращений пустого фундального отдела желудка у

крыс в возрасте 3 и 24 месяца составляла 3,5±0,5 и 3,5±0,25 (p = 0,056; n = 10) сокращений в минуту соответственно (рис. 8.18). Средняя амплитуда сокращения желудка крыс 3-месячного возраста составляла 1,5±0,5 см вод. ст., тогда как у крыс старческого возраста она была меньше и составляла 1,1±0,2 см вод. ст. (p = 0,035; n = 10).

Введение крысам карбахолина не меняло частоту сокращений пустого фундального отдела желудка у крыс обеих возрастных групп. Среднее значение максимальной амплитуды сокращений, стимулированных карбахолином в желудке молодых крыс, составляло 14,0±2,0 см вод. ст., старых – 10,0±2,0 см вод. ст., что было на 28,6±1,4% меньше, чем у молодых крыс (p = 0,0093; n = 10) (рис. 8.19).

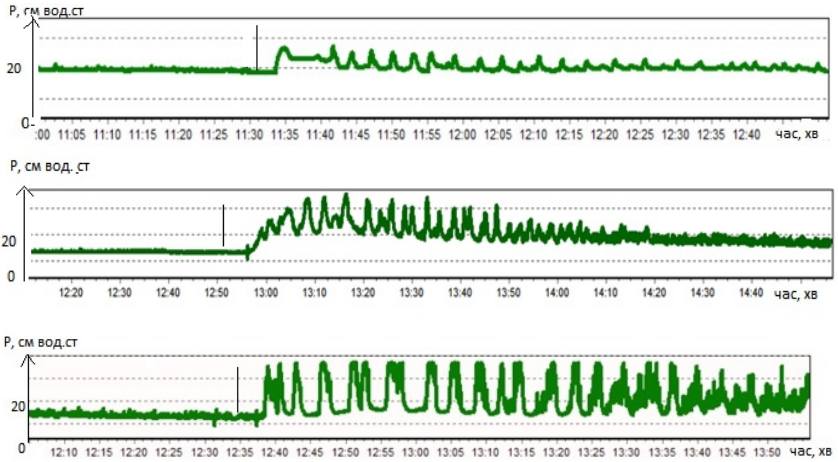


Рис. 8.19. Запись моторной активности толстой кишки у крыс: *а* – 3-месячные крысы; *б* – 24-месячные крысы; *в* – 24-месячные крысы после 10-дневного введения НДЦ; | – введение карбахолина в дозе 0,01 мг/кг внутрибрюшинно

Анализ полученных данных показал, что в контрольной группе крыс 3-месячного возраста ИСА в желудке в условиях спонтанной моторики составил 1111,6 ± 16,6 см вод. ст./мин, тогда как в группе старых – 892,9±21,4 см вод. ст./мин, что было на 21,1±1,1% (p = 0,0003; n = 10) меньше. ИСА в ответ на введение карбахолин у старых крыс также был меньше, чем у молодых на 14,5±1,1% (p = 0,025; n = 10). Через сутки после последнего введения НДЦ у крыс молодого возраста частота и амплитуда спонтанных и стимули-

рованных сокращений в желудке были такими же, как и в соответствующем контроле (рис. 8.20). В то же время у старых крыс, получавших НДЦ, амплитуда спонтанных и стимулированных сокращений возрастала на 37,2±2,4% (p = 0,045; n = 10) и 57,9±2,9% (p = 0,005; n = 10) соответственно, по сравнению с контрольной группой старых крыс. Различия в частоте сокращений при этом были статистически незначимы.

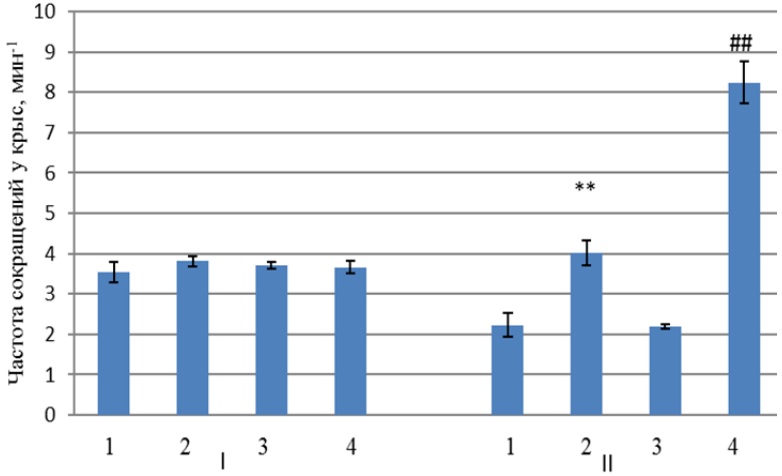


Рис. 8.20. Влияние НДЦ на частоту сокращения желудка (I) и толстой кишки (II) у 24-месячных крыс: *1* – контроль; *2* – НДЦ; *3* – карбахолин; *4* – НДЦ+карбахолин. ** – $p < 0,01$ относительно контроля, ## – $p < 0,01$ относительно карбахолина

10-дневное введение НДЦ также увеличило ИСА у крыс обеих возрастных групп. У молодых крыс ИСА спонтанных и стимулированных сокращений увеличился на 9,3±0,9% (p = 0,033; n = 10) и 8,2±1,0% (p = 0,025; n = 10), соответственно. У старых крыс ИСА спонтанных сокращений увеличился на 19,8±1,4% (p = 0,0001; n = 10), тогда как стимулированной моторики – на 14,5±9,0% (p = 0,035; n = 10) (рис. 8.21).

Согласно полученным данным, частота спонтанных сокращений толстой кишки у крыс в возрасте 3 и 24 месяца, соответственно, составляла 3,0±0,5 и 2,23±0,29 сокращений в минуту, т.е. у старых крыс частота спонтанных сокращений была на 25,6±1,1% (p = 0,044; n = 10) меньше, чем у молодых. В толстой кишке амплитуда спонтанных

сокращений у молодых крыс равнялась 2,33±0,37 см вод. ст. (n = 10), а у крыс старческого возраста она была на 34,3±1,7% (p = 0,035; n = 10) меньше и составляла 1,53±0,42 см вод. ст. (рис. 8.22).

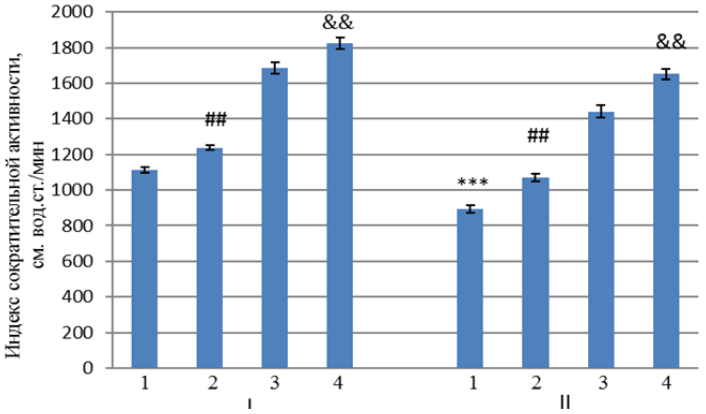


Рис. 8.21. Влияние НДЦ на индекс сократительной активности желудка у 3-месячных (I) и 24-месячных крыс (II): *1* – контроль; *2* – НДЦ; *3* – карбахолин; *4* – НДЦ+карбахолин. *** $p < 0{,}001$ относительно с 3-месячного контроля; ## – $p < 0{,}01$ относительно соответствующего контроля; && – $p < 0{,}01$относительно карбахолина

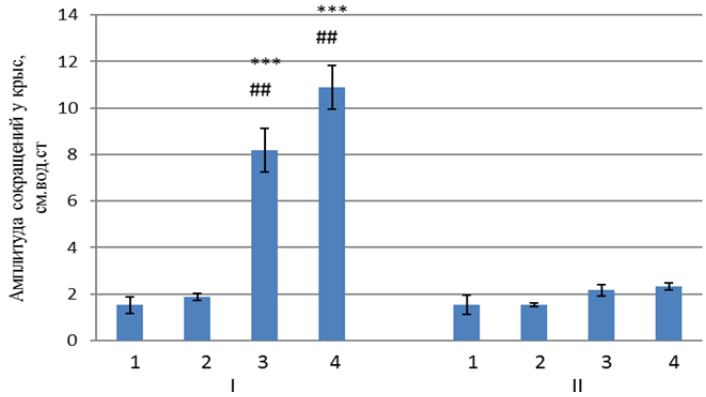


Рис. 8.22. Влияние НДЦ на амплитуду сокращений желудка (I) и толстой кишки (II) у 24-месячных крыс: *1* – контроль; *2* – НДЦ; *3* – карбахолин; *4* – НДЦ+карбахолин. *** – $p < 0{,}001$ относительно контроля; ### – $p < 0{,}001$ относительно группы крыс, которым вводили НДЦ

Введение карбахолина не меняло частоту сокращений толстой кишки у крыс обеих возрастных групп, однако через 3–5 мин (латентный период реакции) наблюдалось постепенное увеличение амплитуды сокращений, которая была максимальной через 40–50 мин после введения карбахолина. В толстой кишке молодых крыс НДЦ не оказывал влияния на частоту и амплитуду сокращений. Однако у старых крыс НДЦ вызвал увеличение частоты спонтанных и стимулированных сокращений на 80,3±7,5% (p = 0,0091; n = 10) и 274,0±22,9% (p = 0,0087; n = 10соответственно (рис. 8.23). Аналогично росла и амплитуда как спонтанных, так и стимулированных сокращений: на 33,3±2,1% (p = 0,031; n = 10) и 230,4±5,6% (p = 0,0071; n = 10) соответственно (рис. 8.23). У старых крыс ИСА толстой кишки был ниже, чем у молодых, а именно – на 14,1% (p = 0,0082; n = 10). После 10-дневного введения НДЦ мы наблюдали улучшение спонтанной двигательной активности как у молодых, так и у старых крыс (рис. 6). У молодых крыс ИСА возрос на 13,4% (p = 0,005; n = 10), а у старых – на 14,3% (p = 0,0011; n = 10).

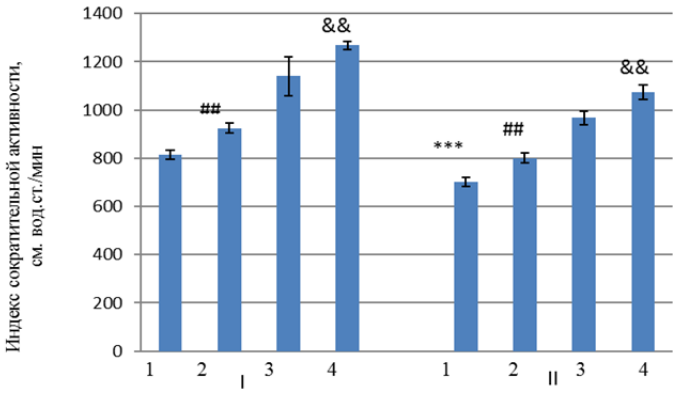


Рис. 8.23. Влияние НДЦ на индекс моторной активности толстой кишки 3-месячных (I) и 24-месячных (II) крыс: *1* – контроль; *2* – НДЦ; *3* – карбахолин; *4* – НДЦ+карбахолин. *** – $p < 0,001$ относительно 3-месячного контроля; ## – $p < 0,01$ относительно соответстующего контроля; && – $p < 0,01$ относительно карбахолина

Поскольку возрастные изменения в моторной функции пищеварительного тракта обусловлены морфологическими изменениями в пищеварительной трубке [59], следующим этапом было исследование

морфологические изменения слизистой оболочки толстой кишки в условиях действия НДЦ. В результате проведенного анализа было установлено, что у контрольной группы 24-месячных (старых) крыс в слизистой оболочке толстой кишки возникала диффузная инфильтрация из лимфоцитов, гистиоцитов, плазматических клеток и происходило увеличение количества и размеров бокаловидных клеток, переполненных слизью (рис. 8.24).

В экспериментальной группе старых животных длительное введение НДЦ улучшало морфофункциональное состояние слизистой толстой кишки (по сравнению с контрольными старыми животными), при этом не наблюдалось патологических изменений; отмечены одиночные инфильтраты из лимфоцитов, гистиоцитов в строме слизистой, что находится в пределах гистологической нормы. Аналогичные изменения были зарегистрированы и в желудке – у старых крыс, получавших нанокристаллический диоксид церия, отмечается положительная динамика восстановления возрастных изменений, в частности процессов пролиферации и дифференцировки клеток эпителия желез, обеспечивающих нормализацию функционального состояния.

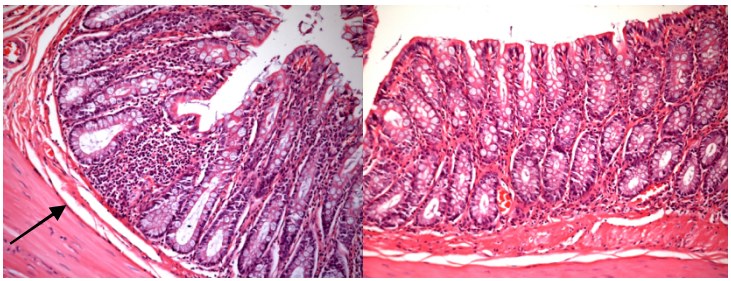


Рис. 8.24. Влияние НДЦ на морфофункциональное состояние слизистой стенки толстой кишки у крыс. Окрашено гематоксилином – эозином, увеличение ×200. Слева – состояние слизистой у 24-месячных крыс I группы: ↑ – диффузная инфильтрация лимфоцитов; справа – состояние слизистой у крыс, которым внутрижелудочно вводили НДЦ

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что НДЦ способен стимулировать моторику желудочно-кишечного тракта за счет увеличения частоты и амплитуды, восстанавливать индекс моторной активности спонтанной и стимулированной моторики в желудке и в толстой кишке – особенно в условиях стареющего организма. При этом морфологическое состояние слизистой оболочки

толстой кишки и желудка восстанавливается, что открывает перспективу для применения НДЦ для лечения дисфункций ЖКТ – например, запоров, которыми постоянно или периодически в разных странах страдает каждый третий-четвертый взрослый человек, причем резкое увеличение их частоты наблюдается после 65 лет. Преимуществами исследуемого препарата перед существующими аналогами является тот факт, что при этом открывается перспектива замены нескольких препаратов (прокинетики, пребиотики, антиоксиданты) одним. Сегодня препараты с таким спектром действия отсутствуют.

Возрастным патологиям желудочно-кишечного тракта способствуют неблагоприятные факторы (неправильный образ жизни, вредные привычки – курение, алкоголь). Как уже отмечалось в гл. 5, наночастицы диоксида церия защищают от токсинов, содержащихся в табачном дыме. В работе [60] исследовано *in vivo* влияние наночастиц диоксида церия на патогенез язвенной болезни желудка, вызванной действием алкоголя. Самок крыс Sprague-Dawley разделили на четыре группы. Первая (отрицательный контроль) получала перорально дистиллированную воду, остальные – 90%-ный этанол. Вторую группу никак дополнительно не обрабатывали (положительный контроль), третья группа за 45 мин до введения этанола получала перорально 50 мг/кг ранитидина (референтный препарат), четвертая группа за 45 мин до введения этанола получала перорально 1 мг/кг наночастиц диоксида церия в физрастворе. Через 1 ч крыс усыпляли и исследовали состояние желудка, а также уровень каталазы и СОД. Результаты представлены в табл. 8.9 и на рис. 8.25.

Таблица 8.9

Влияние введения золя CeO_2 на развитие язвы желудка у крыс Sprague-Dawley под действием этанола [60]

Группа	Обработка	Индекс язвы желудка	% защиты	СОД	Каталаза
1	Дистиллированная вода	–	–	112,42±0,36	95,19±0,94
2	Алкоголь	18,2± 0,3	–	85,18±0,24	66,48±0,71
3	Алкоголь + 50 мг/кг ранитидин	2,2±0,4	87,9%	109,18±0,50	93,38±1,04
4	Алкоголь + 1 мг/кг наночастицы CeO_2	3,6±0,3	80,2%	103,18±0,42	85,88±0,61

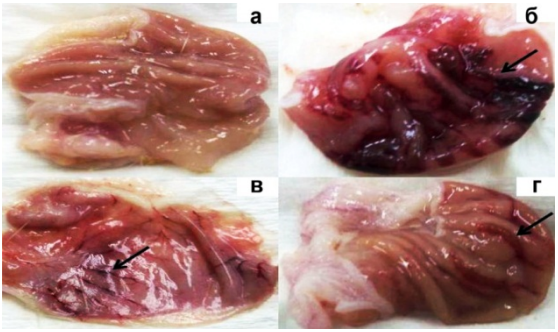


Рис. 8.25. Фотографии слизистой оболочки желудка: *а* – отрицательный контроль (вода); *б* – положительный контроль (этанол); *в* – алкоголь и наночастицы CeO_2; *г* – алкоголь и ранитидин. Стрелками показаны поврежденные участки [60]

Полученные данные свидетельствуют, что защитное действие наночастиц диоксида церия против разрушающего действия алкоголя находится на уровне препарата сравнения, традиционно используемого для терапии язвы желудка. При этом терапевтическая концентрация наночастиц CeO_2 на порядок ниже, чем концентрация ранитидина.

8.6. НДЦ в терапии возрастного ожирения

Ещё одно возрастное изменение, которое широко проявляется в современном обществе – это ожирение. Клетки жировой ткани (адипоциты) обновляются в течение всей жизни человека, но их число возрастает у пожилых людей и к концу репродуктивного периода масса жировой ткани человека достигает максимального значения (возрастное ожирение) [61]. Согласно современным представлениям, АФК усиливают образование жировой ткани [62–70]. Данный факт показан на модели адипоцитов 3T3-L1 (в [55, 56] источник АФК – NADPH оксидаза, в [67] – митохондрии); на мышиных мезенхимальных стволовых клетках (МСК) [68] (источник АФК – NADPH оксидаза), на МСК человека [69] (источник АФК – митохондрии), на преадипоцитах крыс [70] (источник АФК – NO-синтаза).

В свою очередь, многие биологически активные вещества жировой ткани (адипокины) выполняют воспалительную функцию и сами производят АФК, вызывая окислительный стресс, поэтому жировую ткань

считают независимым фактором генерации системных АФК [62]. Таким образом, ожирение запускает *circulus vitiosus*, при котором концентрация АФК лавинообразно нарастает и вызывает формирование жировой ткани – а также сопутствующих возрастных заболеваний, включающих различные деменции, диабет II типа, атеросклероз и пр.

В ряде работ было показано, что соединения церия способны ингибировать адипогенез [71, 72], но максимально данный эффект проявляется для наночастиц диоксида церия. Авторы [73] исследовали применение НДЦ с целью торможения адипогенной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) *in vitro*, используемых как модель адипогенеза (рис. 8.26–8.29).

По мнению авторов [73], уже предварительные результаты исследований настолько перспективны, что представляют собой важный шаг к потенциальному фармацевтическому применению НДЦ при лечении ожирения, в том числе возрастного. Последующие исследования *in vivo* подтвердили перспективы использования нанокристаллического диоксида церия в качестве нового препарата против ожирения [74]: интраперитонеальное введение наночастиц крысам Вистар не вызывало заметных токсических эффектов, но эффективно способствовало снижению веса, а также снижению уровня инсулина, лептина, глюкозы и триглицеридов в плазме (рис. 8.30).

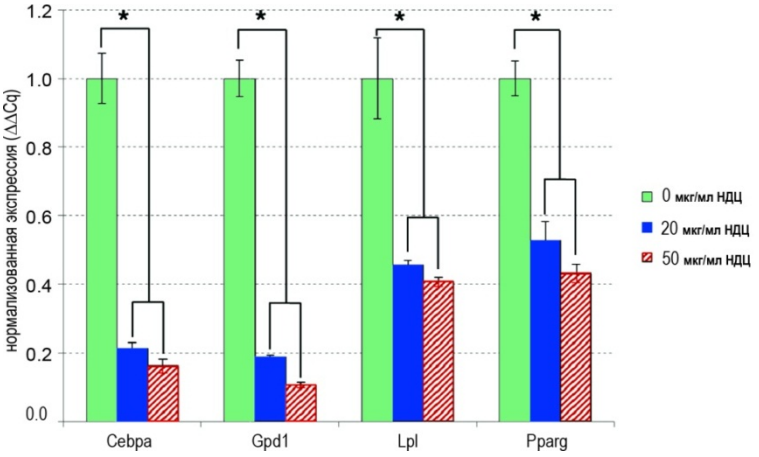


Рис. 8.26. Количественное отображение обратной транскриптаза-полимеразной цепной реакции в реальном времени (qRT-PCR) генов, участвующих в адипогенезе, через 14 дней после обработки НДЦ; $*p < 0{,}05$ [73]

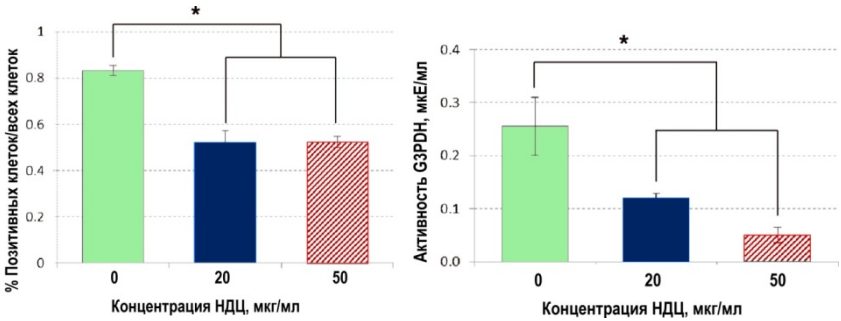


Рис. 8.27. Количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с жировыми каплями, определенное с помощью красителя Adipored™ (вверху). Активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (G3PDH) в МСК, обработанных НДЦ с разной концентрацией, через 14 дней после обработки (внизу). *$p < 0{,}05$ [73]

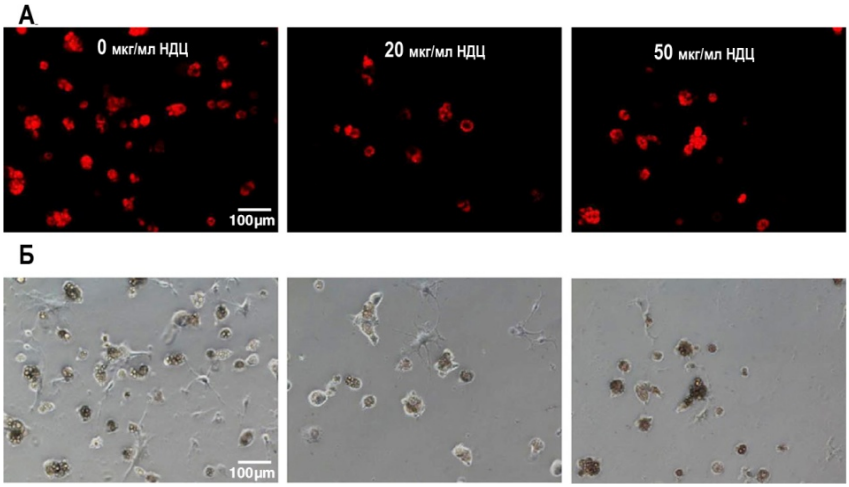


Рис. 8.28. Клетки МСК, окрашенные Adipored™ (цветовая реакция на жировые включения), через 14 дней после дифференциации. Липидные везикулы – красная флуоресценция (*А*) и соответствующее светлопольное изображение (*Б*) [73]

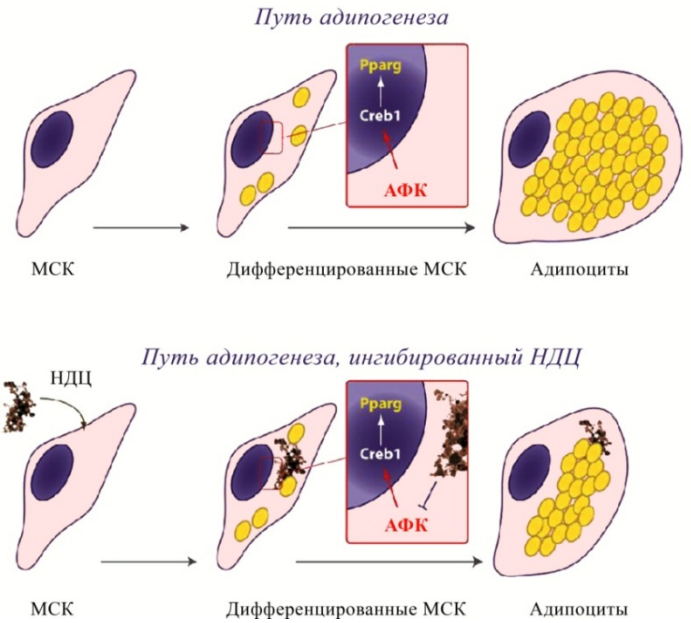


Рис. 8.29. Схематическое изображение предположительного механизма ингибирования адипогенеза, вызванного НДЦ [73]

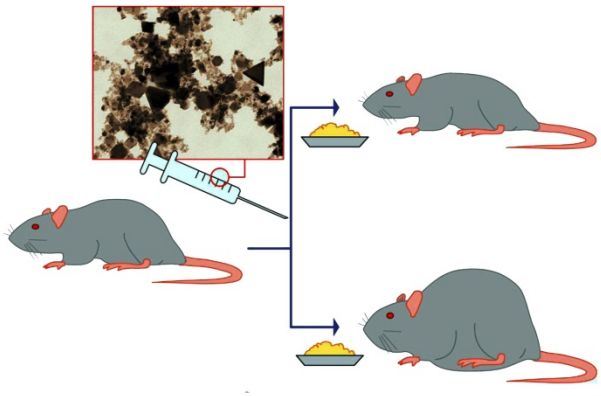


Рис. 8.30. Пилотные исследования показали перспективы использования наночастиц диоксида церия в терапии ожирения [74]

Таким образом, совокупность приведенных в настоящем разделе экспериментальных данных свидетельствует о том, что уже сегодня препараты на основе нанодисперсного диоксида церия могут рассматриваться в качестве перспективных для увеличения продолжительности и качества жизни в преклонном возрасте. Вместе с тем количество работ соответствующей направленности крайне мало, при этом вопросы дозировки и побочного действия таких препаратов практически не исследованы.

Литература

1. *Gruber J., Fong S., Chen C.B., Yoong S., Pastorin G., Schaffer S., Cheah I., Halliwell B.* Mitochondria-targeted antioxidants and metabolic modulators as pharmacological interventions to slow ageing // Biotechnology advances. 2013. Vol. 31, № 5. P. 563–592.

2. *Narayanan K.B., Park H.H.* Pleiotropic functions of antioxidant nanoparticles for longevity and medicine // Advances in colloid and interface science. 2013. Vol. 201. P. 30–42.

3. *Kregel K.C., Zhang H.J.* An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations // American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2007. Vol. 292(1). P. R18–R36.

4. *Harman D.* Role of free radicals in mutation, cancer, aging, and the maintenance of life // Radiat. Res. 1962. Vol. 16. P. 753–763.

5. *Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // J. Gerontol. 1956. Vol. 11(3). P. 298–300.

6. *Butterfield D.A., Drake J., Pocernich C., Castegna A.* Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: Central role for amyloid beta-peptide // Trends Mol. Med. 2001. Vol. 7. P. 548–554.

7. *Hadley E.C., Lakatta E.G., Morrison-Bogorad M. et al*. The future of aging therapies // Cell. 2005. Vol. 129. P. 557–567.

8. *Harman D.* Aging: Overview // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 928. P. 1–21.

9. *Papa S., Skulachev V.P.* Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging // Mol. Cell. Biochem. 1997. Vol. 174. P. 305–319.

10. *Toescu E.C., Verkhratsky A.* Neuronal aging from an intraneuronal perspective: Role of endoplasmic reticulum and mitochondria // Cell Ca. 2005. P. 311–323.

11. *Salvemini D., Ripley D.P., Cuzzocrea S.* SOD mimetics are coming of age // Nat. Rev. Drug Discov. 2002. Vol. 1. P. 367–374.

12. *Leker R.R., Sholami E.* Cerebral ischemia and trauma – different ethiologies yet similar mechanisms: Neuroprotective opportunities // Brain Res. Brain Res. Rev. 2002. Vol. 39. P. 55–73.

13. *Ross J.M., Stewart J.B., Hagström E., Brené S., Mourier A., Coppotelli G., Freyer C. et al*. Germline mitochondrial DNA mutations aggravate ageing and can impair brain development // Nature. 2013. Vol. 501, № 7467. P. 412–415.

14. *Rzigalinski B.A., Singh N., Cohen C.A.* Cerium Oxide Nanoparticles for Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Disorders Associated with Free Radical Production and/or Mitochondrial Dysfunction. United States Patent Application 20090092671, 04/09/2009.

15. *Dowding J.M., Song W., Bossy K., Karakoti A., Kumar A., Kim A., Bossy B. et al.* Cerium oxide nanoparticles protect against Aβ-induced mitochondrial fragmentation and neuronal cell death // Cell Death & Differentiation. 2014.

16. *Arya A., Sethy N.K., Das M., Singh S.K., Das A., Ujjain S.K., Sharma R.K., Sharma M., Bhargava K.* Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential // Free radical research. 2014. Vol. 48. P. 784–793.

17. *Heckman K.L., DeCoteau W., Estevez A., Reed K.J., Costanzo W., Sanford D., Leiter J.C. et al.* Custom Cerium Oxide Nanoparticles Protect against a Free Radical Mediated Autoimmune Degenerative Disease in the Brain // ACS nano. 2013. Vol. 7, № 12. P. 10582–10596.

18. *Rzigalinski B., Clark A., Ariane M.* Anti-inflammatory, radioprotective, and longevity enhancing capabilities of cerium oxide nanoparticles. WO/2007/002662. Publication Date: 04.01.2007.

19. *Singh N., Cohen C.A., Rzigalinski B.A.* Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007. Vol. 1122. P. 219–230.

20. *Rzigalinski B.A.* Nanoparticles and cell longevity // Tech. Cancer Res. Treatment. 2005. Vol. 4. P. 651–659.

21. *Celardo I., De Nicola M., Mandoli C. et al.* Ce^{3+} ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles // ACS Nano. 2011. Vol. 5 (6). P. 4537–4549.

22. *Song W., Lee S.S., Savini M., Popp L., Colvin V.L., Segatori L.* Ceria Nanoparticles Stabilized by Organic Surface Coatings Activate the Lysosome-Autophagy System and Enhance Autophagic Clearance // ACS Nano. 2014.

23. *Huang S.-F., Li Z.-Y., Wang X.-Q., Hu F.-F.* Cerium caused life span shortening and oxidative stress resistance in Drosophila Melanogaster // Ecotoxicol. Environm. Safety. 2010. Vol. 73. P. 89–93.

24. *Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A.* Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view // Trends in neurosciences. 1999. Vol. 22. № 9. P. 391–397.

25. *Kyle S., Saha S.* Nanotechnology for the Detection and Therapy of Stroke // Advanced healthcare materials. 2014.

26. *Kim C.K., Kim T., Choi I.-Y. et al.* Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke // Angew. Chem. Int. Ed. 2012. Vol. 51. P. 11039–11043.

27. *Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M.* A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications // Biomed. Pharmacother. 2005. Vol. 59. P. 365–373.

28. *Pourkhalili N., Hosseini A., Nili-Ahmadabadi A. et al*. Biochemical and cellular evidence of the benefit of a combination of cerium oxide nanoparticles and selenium to diabetic rats // World J. Diabetes. 2011. Vol. 2 (11). P. 204–210.

29. *Mohammad G., Mishra V.K., Pandey H.P.* Antioxidant properties of some nanoparticle may enhance wound healing in T2DM patient // Digest J. Nanomater. Biostruct. 2008. Vol. 3. P. 159–162.

30. *Pourkhalili N., Hosseini A., Nili-Ahmadabadi A. et al.* Improvement of isolated rat pancreatic islet function by combination of cerium oxide nanoparticles/sodium selenite through reduction of oxidative stress // Toxicol. Mechan. Meth. 2012. Vol. 22. P. 476–482.

31. *D'Angelo B., Santucci S., Benedetti E. et al.* Cerium oxide nanoparticles trigger neuronal survival in a human Alzheimer disease model by modulating BDNF pathway // Curr. Nanosci. 2009. Vol. 5. P. 167–176.

32. *Selkoe D.J.* Alzheimer's disease is a synaptic failure // Science. 2002. Vol. 298. P. 789–791.

33. *Hensley K., Carney J.M., Mattson M.P. et al.* A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994. Vol. 91. P. 3270–3274.

34. *Sayre L.M., Zagorski M.G., Surewicz W.K. et al*. Mechanisms of neurotoxicity associated with amyloid beta deposition and the role of free radicals in the pathogenesis of Alzheimer's disease: a critical appraisal // Chem. Res. Toxicol. 1997. Vol. 10. P. 518–526.

35. *Lung S., Cassee F.R., Gosens I., Campbell A*. Brain suppression of AP-1 by inhaled diesel exhaust and reversal by cerium oxide nanoparticles // Inhalation Toxicology. 2014. Vol. 26, № 10. P. 636–641.

36. *Estevez A.Y., Erlichman J.S.* Cerium oxide nanoparticles for the treatment of neurological oxidative stress diseases // Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy / eds. S. Andreescu, M. Hepel. ACS Symposium Series. 2011. DOI: 10.1021/bk-2011-1083.

37. *Etcheberrigaray R., Ibarreta D.* [Ionic channels and second messenger alterations in Alzheimer's disease. Relevance of studies in nonneuronal cells] // Revista de neurologia. 2000. Vol. 33 (8). P. 740–749.

38. *Blass J.P., Hanin I., Barclay L., Kopp U., Reding M.J.* Red blood cell abnormalities in Alzheimer disease // Journal of the American Geriatrics Society. 1985. Vol. 33 (6). P. 401–405.

39. *Markesbery W.R., Leung P.K., Butterfield D.A.* Spin label and biochemical studies of erythrocyte membranes in Alzheimer's disease // Journal of the neurological sciences. 1980. Vol. 45 (2). P. 323–330.

40. *Kosenko E.A., Tikhonova L.A., Poghosyan A.C. et al.*, Antioxidants in erythrocytes in aging and dementia // Biomeditsinskaya khimiya. 2013. Vol. 59. P. 443 [in Russian].

41. *Çimen M.B.* Free radical metabolism in human erythrocytes // Clinica Chimica Acta. 2008. Vol. 390 (1). P. 1–11.

42. *Pandey K.B., Rizvi S.I.* Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans // Oxidative medicine and cellular longevity. 2010. Vol. 3 (1). P. 2–12.

43. *Kotsuruba A.V., Kopjak B.S., Sagach V.F. et al.* Restoration of erythrocytes stability to acid hemolysis by cerium oxide nanoparticles in old rats // Fiziologichnyj Zhurnal. 2014. Vol. 60 (6). P. 3–9 [in Ukrainian].

44. *Clark A., Zhu A., Sun K., Petty H.R.* Cerium oxide and platinum nanoparticles protect cells from oxidant-mediated apoptosis // Journal of Nanoparticle Research. 2011. Vol. 13 (10). P. 5547–5555.

45. *Clark A., Zhu A., Petty H.R.* Titanium-doped cerium oxide nanoparticles protect cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis // Journal of nanoparticle research. 2013. Vol. 15 (12). P. 1–9.

46. *Иванова О.С., Шекунова Т.О., Иванов В.К., Щербаков А.Б., Попов А.Л., Давыдова Г.А.* Одностадийный синтез коллоидных растворов диоксида церия для биомедицинского применения // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 437 (5). P. 638–41.

47. *Da Silva F., Marques A., Chaveiro A.* Reactive oxygen species: a double-edged sword in reproduction // Open Veterinary Science Journal. 2010. Vol. 4. P. 127–133.

48. *Спивак Н.Я., Носенко Н.Д., Жолобак Н.М. и др.* Нанокристаллический диоксид церия существенно повышает функциональную активность репродуктивной системы стареющих самцов крыс // Наносистемы: физика, химия, математика. 2013. Т. 4, № 1. С. 72–77.

49. *Nosenko N.D., Zholobak N.M., Poliakova L.I., Sinitsyn P.V., Lymarieva A.A., Shcherbakov O.V., Spivak M.Ia., Reznikov O.H.* Morphofunctional state of reproductive system of ageing male rats in case of using nanocerium // Fiziol Zh. 2014. Vol. 60(1). P. 11–7 [Article in Ukrainian].

50. *Spivak N.Ya., Shepel E.A., Zholobak N.M. et al.* Ceria nanoparticles boost activity of aged murine oocytes // Nano Biomed. Eng. 2012. Vol. 4. P. 188–194.

51. *Kobyliak N.M., Falalyeyeva T.M., Kuryk O.G., Beregova T.V., Bodnar P.M., Zholobak N.M. et al.* Antioxidative effects of cerium dioxide nanoparticles ameliorate age-related male infertility: optimistic results in rats and the review of clinical clues for integrative concept of men health and fertility // EPMA Journal. 2015. Vol. 6 (1). P. 1–22.

52. *Chaudhury K., Babu N., Singh A.K. et al.* Mitigation of endometriosis unsing regenerative cerium oxide nanoparticles // Nanomed.: Nanotech. Biol. Med. 2012. doi: 10.1016/j.nano.2012.08.001. [In Press].

53. *Courbiere B., Auffan M., Rollais R., Tassistro V., Bonnefoy A., Botta A., Rose J., Orsière T., Perrin J.* Ultrastructural Interactions and Genotoxicity Assay of Cerium Dioxide Nanoparticles on Mouse Oocytes // International Journal of Molecular Sciences. 2013. Vol. 14, № 11. P. 21613–21628.

54. *Stoyanov A.O., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Stoyanova I.V., Chivireva N.A., Antonovich V.P.* Determination of Cerium(III) and Cerium(IV) in Nanodisperse Ceria by Chemical Methods // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2014. Vol. 59, № 2. P. 15–23.

55. *Chane-ching J.-Y.* Cerium IV Compound And Method For Its Preparation. European Patent No. EP 0208580. 17 Jan. 1990.

56. *Yefimenko O.Y., Savchenko Y.O., Falalyeyeva T.M. et al.* Nanocrystalline cerium dioxide efficacy for gastrointestinal motility: potential for prokinetic treatment and prevention in elderly // EPMA Journal. 2015. Vol. 6, № 1. P. 6.

57. *Iefimenko O.Iu., Savchenko Iu.O, Falalieieva T.M., et al*., The comparative action of the modern prokinetics and nanocrystalline cerium dioxide on the motor function of the digestive tract in the rats of ifferent ages // Fiziologichnyi Zhurnal. 2015. Vol. 61, № 1. [in Ukrainian].

58. *Zádori Z.S., Fehér Á., Al-Khrasani M., Lackó E.,Tóth V.E., Brancati S.B.et al*. Imidazoline versus alpha$_2$-adrenoceptors in the control of gastricmotility in mice // Eur. J. Pharmacol. 2013. Vol. 705(1–3). P. 61–67.

59. *Breuer C., Oh J., Molderings G.J., Schemann M*. Therapy-refractory gastrointestinal motility disorder in a child with c-kitmutations // World J Gastroenterol. 2010. Vol. 16 (34). P. 4363–66

60. *Prasad R.G.S.V., Revathy D., Jothi S., Phani A.R., Raju D.B*. Cerium Oxide Nanoparticles Protects Gastrointestinal Mucosa From Ethanol induced Gastric Ulcers in In-vivo Animal Model // Nano Biomedicine and Engineering. 2013. Vol. 5, № 1. P. 46–49.

61. *Chumlea W.C., Rhyne R.J., Garry P.J., Hunt W.C*. Changes in anthropometric indices of body composition with age in a healthy elderly population // Am. J. Human. Biol. 1989. Vol. 1. P. 457–462.

62. *Fernández-Sánchez A., Madrigal-Santillán E., Bautista M., Esquivel-Soto J., Morales-González A., Esquivel-Chirino C., Durante-Montiel I., Sánchez-Rivera G., Valadez-Vega C., Morales-González J.A.*. Inflammation, oxidative stress, and obesity // International journal of molecular sciences. 2011. Vol. 12, № 5. P. 3117–3132.

63. *Liu G.-S., Chan E.C., Higuchi M., Dusting G.J., Jiang F*. Redox mechanisms in regulation of adipocyte differentiation: beyond a general stress response // Cells 1. 2012. Vol. 4 P. 976–993.

64. *Lee H., Lee Y.J., Choi H., Ko E.H., Kim J.-W*. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion // J. of Biological Chemistry. 2009. Vol. 284, № 16. P. 10601–10609.

65. *Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura, I*. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome // J. Clin. Invest. 2004. Vol. 114. P. 1752–1761.

66. *Schroder K., Wandzioch K., Helmcke I., Brandes R.P*. Nox4 acts as a switch between differentiation and proliferation in preadipocytes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2009. Vol. 29. P. 239–245.

67. *Carriere A., Fernandez Y., Rigoulet M., Penicaud L., Casteilla L.* Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species // FEBS Lett. 2003. Vol. 550. P. 163–167.

68. *Kanda Y., Hinata T., Kang S.W., Watanabe Y.* Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells // Life Sci. 2011. Vol. 89. P. 250–258.

69. *Tormos K.V., Anso E., Hamanaka R.B., Eisenbart J., Joseph J., Kalyanaraman B., Chandel N.S*. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation // Cell. Metab. 2011. Vol. 14. P. 537–544.

70. *Yan H., Aziz E., Shillabeer G., Wong A., Shanghavi D., Kermouni A., Abdel-Hafez M., Lau D.C.* Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture // J. Lipid. Res. 2002. Vol. 43. P. 2123–2129.

71. *Liu D.-D., Zhang J.-C., Zhang Q., Wang S.-X., Yang M.-S.* TGF-β/BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells // Journal of cellular biochemistry. 2013. Vol. 114, № 5. P. 1105–1114.

72. *Hou C.-C., Feng M., Wang K., Yang X.-G.* Lanthanides inhibit adipogenesis with promotion of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes // Metallomics. 2013. Vol. 5, № 6. P. 715–722.

73. *Rocca A., Mattoli V., Mazzolai B., Ciofani G.* Cerium Oxide Nanoparticles Inhibit Adipogenesis in Rat Mesenchymal Stem Cells: Potential Therapeutic Implications // Pharmaceutical research. 2014. P. 1–11.

74. *Rocca A., Moscato S., Ronca F., Nitti S., Mattoli V., Giorgi M., Ciofani G.* Pilot in vivo investigation of cerium oxide nanoparticles as a novel anti-obesity pharmaceutical formulation // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2015. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.05.001

9. АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

9.1. Соединения церия в антибактериальной медицине

Бактериостатические эффекты нитрата и других солей церия(III) были обнаружены в конце девятнадцатого столетия [1], что быстро привело к их использованию в качестве кожных антисептиков в медицине и ветеринарии [2–4].

Первый систематический анализ антимикробной активности соединений церия был выполнен в 40-х годах прошлого века [5] на примере 39 бактериальных штаммов (включая *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*). Нитрат церия показал себя как хороший бактериостатик; наибольшей чувствительностью к ионам церия обладали псевдомонады, для которых минимальная ингибирующая концентрация (МИК) находилась в диапазоне 0,001÷0,004 М Ce^{3+}. Для родов *Escherichia* и *Salmonella* значение МИК находилось на уровне 0,005 М, а для *S. aureus* МИК была в два раза выше. Через двадцать лет Собек и др. [6] исследовали действие нитрата церия на морфологию и клеточные функции *Escherichia coli*. Ионы церия легко проникали в цитоплазму кишечной палочки (в отличие от клеток млекопитающих), ингибируя при этом клеточное дыхание (поглощение кислорода) и метаболизм глюкозы. Клеточная оболочка в морфологическом отношении оставалась интактной, но при исследовании с применением электронной микроскопии было выявлено, что на ней развивались выпячивания (‘knob-like protrusions’), которые авторы связывали с возможным разрушением мембраны [7]. В 70-х годах прошлого столетия было впервые показано [8], что нитрат церия имеет мощный антисептический эффект при терапии ожоговых ран, особенно в отношении грамм-негативных бактерий и грибов. В случае применения соединений церия ни у одного пациента не развивалась некротическая инфекция раны; использование нитрата церия привело к уменьшению ожидаемого показателя смертности почти на 50%. Нитрат церия был назван «многообещающим новым кожным анти-

септиком» для обработки ожогов [9], особенно в комбинации с сульфадиазином серебра [10]. С этого времени препараты, содержащие сульфадиазин серебра и нитрат церия (торговая марка Flammacerium®), стали традиционно использоваться при лечении ран, в первую очередь ожоговых.

В работе [11] для оценки действия ионов Ce(III) на рост *Escherichia coli* использовали микрокалориметрическую методику, основанную на теплотворной способности бактерий. Авторы показали, что присутствие ионов церия в концентрациях ниже 350 мгк/мл имеет стимулирующий эффект на рост *E. coli*, тогда как при концентрации 400 мкг/мл и выше может наблюдаться ингибирующее действие. Было обнаружено [12], что комплекс церия с гуминовой кислотой обладает бактериостатическим потенциалом. Согласно экспериментальным данным, такой комплекс существенно замедлял рост ряда бактериальных штаммов, диаметр бактериостатических кругов составлял более 30 мм. Минимальная ингибирующая концентрация для *E. coli* и *Bacillus pyocyaneus* составила 0,001 М, для *S. aureus* и *Leuconostoc* – 0,002 М, для *Streptococcus faecalis* – 0,01 М.

В работе [13] методом формования изготавливали церий(III)-желатиновые волокна, обладающие высоким сопротивлением на разрыв и хорошей антибактериальной активностью по отношению к *E coli* и *S. aureus*. Действие нитрата церия против биопленок тестировали на модели инфекции инородного тела у мышей с использованием сегментов полиуретановых катетеров [14]; показано, что в субингибирующих концентрациях нитрат церия значительно тормозит образование биопленки *C. albicans*. Результаты свидетельствуют, что соли церия имеют перспективу для покрытия венозных катетеров.

Авторы [15] отмечают, что соединения церия(III) проявляют заметное антибактериальное действие *in vitro*, при этом характерный желто-зеленый цвет струпа на ранах, обработанных нитратом церия, свидетельствует об окислении ионов трехвалентного церия до Ce(IV). Как показано в гл. 6 (раздел 6.2), водорастворимые соли Ce(III) в биологических средах легко гидролизуются и окисляются с образованием наночастиц диоксида церия [16–18]. Приведенные расчеты позволяют предположить, что биологическую активность соединений церия в значительной степени определяют именно наночастицы CeO_2 – в том числе по отношению к патогенным микроорганизмам.

9.2. Антивирусная и антимикробная наномедицина

Перспективы использования наноматериалов в медицине (в том числе в антимикробной и антивирусной терапии) достаточно высоки [19–23]. При целевом создании наноматериалов (рис. 9.1) основное внимание уделяют составу и свойствам самих частиц (что определяет требуемые терапевтические и/или диагностические характеристики), а также составу и свойствам функциональных групп или лигандов на их поверхности (что определяет поведение в биологической системе).



Рис. 9.1. Наночастицы для антивирусной и антимикробной наномедицины

Наночастицы различных типов широко используются для **доставки** лекарственных препаратов при терапии микробных и вирусных заболеваний [22–25]. Для уничтожения или ингибирования роста микроорганизмов разработано много антимикробных препаратов. Однако даже для препаратов с доказанной высокой терапевтической эффективностью нецелевая доставка может приводить к снижению терапевтического индекса, а также местным или системным побочным эффектам, включая уничтожение полезной микрофлоры. Наноструктурированные биоматериалы вообще и наночастицы в частности имеют уникальные физико-химические свойства, такие как крайне малый размер, большую удельную площадь поверхности и её строение, допускающее возможность функционализации, а также высокую реакционную способность. Эти свойства могут быть использованы для увеличения эффективности применения антимикробных лекарств, что позволит преодолеть некоторые ограничения традиционной антимикробной терапии [24]. При этом лекарственный препарат (например, антибиотик) может размещаться как внутри наночастицы (например, липосомы [25] или дендримеры [26]), так и на ее поверхности (например, наночастицы золота [27]). В первом случае такая «нанокапсула» должна саморазрушаться в зоне терапии (в бактериальной клетке), высвобождая лекарство, во втором случае лекарственный препарат выступает в роли еще одного поверхностного лиганда (дополнительно к стабилизирующему и таргетному лигандам). Сама наночастица при этом либо является инертным носителем, либо выполняет дополнительные функции, например контрастного вещества или активного компонента фотодинамической / фототермальной терапии [27]. Лекарство на поверхности наночастицы может быть дополнительно инкапсулировано – например, в полость молекулы циклодекстрина [28]. В качестве хороших кандидатов на роль средства доставки антибактериальных агентов были предложены наночастицы оксидов металлов. Например, биосовместимый Fe_3O_4 повышает эффективность доставки амоксициллина, усиливая, таким образом, действие антибиотика против грамположительных и грамотрицательных бактерий [29]. Созданные наноструктуры значительно понижают минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) активного вещества.

Значительный интерес представляют наночастицы для **диагностики** бактериальных процессов. Современные методы бактериальной

диагностики малоэффективны, так как имеют малую скорость и низкую чувствительность. Диагностика – направление, в котором нанопрепараты могли бы играть определяющую роль, и разработка новых инновационных материалов видится крайне перспективным направлением [30]. Создание диагностических наночастиц (например, конъюгатов, содержащих люминесцентную или другую визуальную метку, а также специфический сенсор и/или антимикробные антитела) позволит упростить процесс диагностики вплоть до создания «полевых тест-наборов» для проведения прецизионных высокоточных исследований в любых условиях.

С диагностикой и доставкой препаратов непосредственно связана **терапия** бактериальных и вирусных процессов. Наночастицы для терапии способны выполнять одновременно несколько функций. В качестве примера здесь можно привести уже упоминавшиеся наночастицы золота, которые выступают не только в качестве носителя для адресной доставки и контрастирующего агента, но и в качестве основных или вспомогательных фотосенсибилизаторов при фототермальной или фотодинамической терапии (ФДТ), например ФДТ локализованных инфекций [31]. В процессе ФДТ в результате оптического возбуждения сенсибилизатора (как правило, под действием ИК-лазера) генерируются активные формы кислорода (АФК) – синглетный кислород, гидроксидный и супероксидный радикалы, – которые разрушают бактерии. Наночастицы могут также иметь антибактериальные или антивирусные свойства (например, содержать в своем составе активный препарат).

На протяжении многих лет ведется разработка **медицинской техники и изделий** с антимикробными свойствами, которые могли бы хорошо интегрироваться с клетками организма человека и при этом предотвращать любую бактериальную адгезию или образование биопленки. Большинство соответствующих исследований сосредотачивалось на противомикробном действии металлов (в частности, Ag) [19]. Тем не менее в ряде случаев наночастицы серебра непригодны – например, для придания антимикробных свойств оптическим устройствам. Антимикробное стекло, легированное серебром, является светочувствительным и темнеет при ярком освещении; стекла с антимикробными свойствами, легированные церием, лишены этого недостатка. Несколько биологически активных стекол, содержащих наночастицы диоксида церия, были синтезированы из хлоридного прекур-

сора с использованием золь-гель метода [32]. Было показано, что НДЦ является перспективным кандидатом для придания стеклу антибактериальных свойств против кишечной палочки, а соответсвующие материалы и могут быть использованы в качестве подложки или частей изделий медицинского назначения. В работе [33] синтезировали легированное НДЦ волокно путем создания композита полиуретана с двумя биополимерами – ацетатом целлюлозы и зеином. Антибактериальную активность такого материала испытывали по отношению к наиболее распространенным патогенным бактериям, таким как *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*. Волокно, легированное НДЦ, показало дозозависимую антибактериальную активность в отношении как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактериальных штаммов. Такое композиционное нановолокно представляется перспективным для антибактериальной терапии и может быть использовано в качестве «умного материала» для биомедицинского или промышленного применения – например, в составе матов или перевязочных средств.

Нановакцины нацелены на лечение болезней и предотвращение распространения инфекций с помощью иммунной системы организма [34, 35]. Один из известных типов искусственных вирусоподобных нановакцин состоит из наноразмерных частиц биоразлагаемого полимера, в которых инкапсулирован антиген – например, белок патогенного микроорганизма или иной активный ингредиент. Другие нановакцины содержат наночастицы в качестве адъювантов, которые стимулируют и увеличивают иммунный ответ на антигены. Активность третьих повышена за счет взаимодействия между неорганическими наночастицами и бактериальными или вирусными белками. Нановакцины имеют ряд преимуществ, включая сайт-специфичную доставку антигенов, повышенную биодоступность антигенов и сниженный побочный эффект [35]. Они более термостабильны и зачастую не требуют пониженных температур для хранения; могут использоваться различные способы введения (в том числе перорально) и пр.

9.3. Антибактериальная активность наночастиц диоксида церия

В общем виде механизмы взаимодействия неорганических наночастиц с наружной мембраной и цитоплазмой бактерий представлены

на рис. 9.2 [36]. Антимикробный эффект при этом наблюдается как минимум по двум основным причинам. В случае прямого контакта частицы и мембраны происходит повреждение липидного бислоя, целостность бактериальной клетки нарушается, происходят лизис содержимого и гибель микроорганизма. В отсутствие прямого контакта повреждающее действие оказывают продукты взаимодействия наночастицы с окружающей средой (межклеточным пространством) – ионы, активные формы кислорода и пр. Наночастицы диоксида церия способны воздействовать на бактериальную клетку по обоим механизмам, но благодаря редокс-свойствам CeO_2 генерация активных форм кислорода должна вносить наиболее существенный вклад в совокупное бактерицидное действие НДЦ (рис. 9.2).

Непрямой механизм особенно важен для микроорганизмов, покрытых оболочкой из полисахаридов или формирующих биопленки – когда прямой доступ наночастицы к мембране невозможен. На примере *E. coli* и *Synechocystis* sp. авторы [37] показали вклад «прямого» и «непрямого» механизмов токсического действия наночастиц диоксида церия на микроорганизмы. В случае «прямого» механизма важную роль играют размеры частиц и физико-химические характеристики золя CeO_2 (ζ-потенциал, агрегированность частиц, стерический фактор и т.п.). Для цианобактерий *Synechocystis* sp., когда частица и мембрана отделены внеклеточными полимерными образованиями (экзополисахаридами), работает «непрямой» механизм токсичности. При этом основную роль играют ионы церия, образующиеся в процессе растворения наночастиц, а также активные формы кислорода, образующиеся на поверхности наночастиц и мигрирующие через бактериальную мембрану.

Из рис. 9.3 видно, что в случае разных микроорганизмов наночастицы диоксида церия по-разному накапливаются вблизи бактериальной клетки [38]: если в случае *E. coli* наночастицы локализуются непосредственно на мембране, то *C. albicans* в условиях стресса формирует слой экзополисахаридов [39], который препятствует прямому контакту частицы и клетки. При нарушении целостности мембраны на поверхности кишечной палочки регистрируются характерные выпячивания [7].

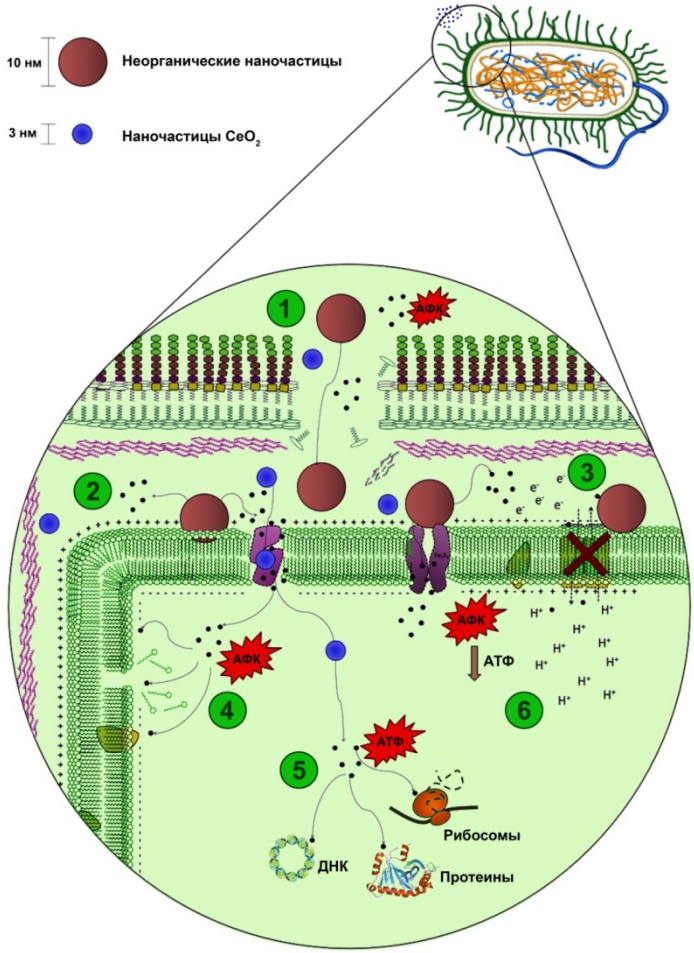


Рис. 9.2. Изученные и возможные эффекты неорганических наночастиц (в том числе наночастиц диоксида церия) по отношению к двойному липидному слою и цитоплазме бактерий. *1* – повреждение клеточной оболочки и пептидогликанового слоя, вызванное прямым контактом с наночастицами; *2* – выделение токсичных ионов; *3* – нарушение механизма протонной помпы с изменением pH и модификацией заряда мембраны; *4* – генерация активных форм кислорода (АФК), которые могут повреждать биологические системы (разрушать клеточную оболочку); *5* – разрушение ДНК и протеинов АФК, возможное нарушение синтеза белков; *6* – снижение продукции АТФ из-за закисления цитоплазмы (механизм 3) и наличия АФК (механизмы 4 и 5) [36]

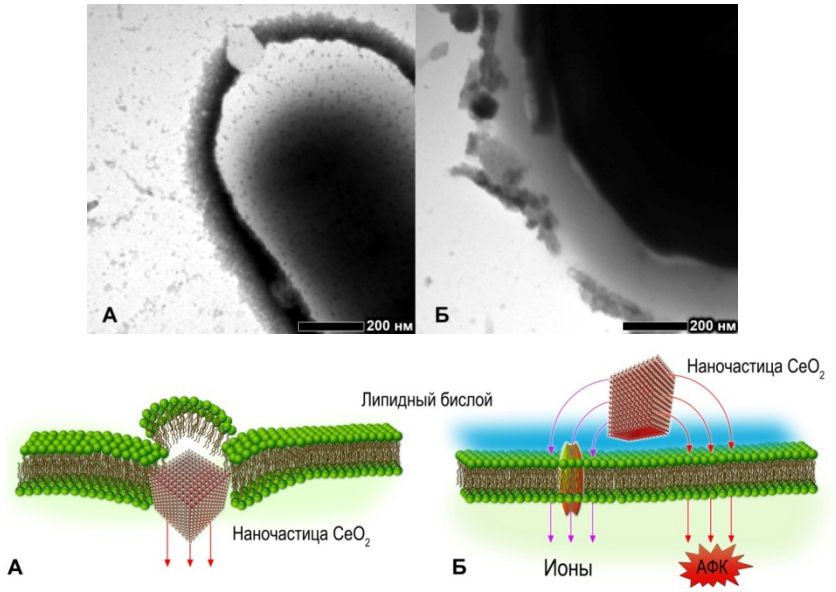


Рис. 9.3. Взаимодействие наночастиц диоксида церия с клетками *E. coli* (*А*) и *C. Albicans* (*Б*) [38]. Внизу – модель взаимодействия наночастицы и мембраны клетки и механизм токсичности в обоих случаях

Наночастицы диоксида церия также влияют на транспорт электронов и работу протонной помпы клетки, что сказывается на заряде мембраны и приводит к дисбалансу pH в сторону закисления цитоплазмы. В кислой среде НДЦ выступает в роли прооксиданта (см. главу 4), при этом образуются токсичные АФК, которые разрушают бактериальную мембрану, ДНК и протеины, а также могут нарушать синтез белков [36].

На примере бактерий кишечной палочки *E. coli* авторы [40] провели сравнительный анализ антимикробной активности частиц диоксида церия разной дисперсности. Наночастицы CeO_2 размером 7 и 25 нм получали гидролизом солей церия в присутствии гексаметилентетрамина, в качестве крупнодисперсного использовали коммерческий препарат CeO_2 (Sigma-Aldrich). Все образцы диоксида церия демонстрировали антибактериальную активность, при этом наночастицы оказались более токсичными, чем крупнодисперсный образец. Наночастицы размером 25 нм превосходили по ингибирующему действию частицы размером 7 нм.

Антибактериальное действие частиц CeO_2 авторы объясняют нарушением целостности мембраны бактериальной клетки, сопровождающимся повышением уровня внутриклеточных активных форм кислорода. Любопытно, что авторы [41] не зафиксировали токсичности наночастиц диоксида церия (8,5±1,5 нм; ζ-потенциал +45,6 мВ), полученных в аналогичных условиях, по отношению к *E. coli* в концентрации до 100 нМ даже при длительной экспозиции (7 ч). При этом уровень активных форм кислорода в контрольных и обработанных клетках не отличался. Полученные результаты авторы объясняют нейтрализацией токсичного действия частиц средой культивирования.

В опытах [42] с использованием бактерий генно-инженерного штамма *E. coli TG1* (сенсор Эколюм-9) показано, что интенсивность их биолюминесценции в присутствии наночастиц CeO_2, синтезированных из растворов $Ce(NO_3)_3$ (0,025 и 0,1 М) и лимонной кислоты (0,025 и 0,1 М), соответственно (2,8–3,5 нм; ζ-потенциал около –15 мВ) приблизительно в 2 раза выше, чем в дистиллированной воде. При этом интенсивность биолюминесценции *E. coli* в растворе стабилизатора (цитрат аммония) в первые 2,5–3 ч значительно ниже, чем в дистиллированной воде. В работе [43] аналогичный результат был получен с наночастицами диоксида церия, полученными гидролизом нитрата церия в водно-спиртовой среде с последующей очисткой и термообработкой. Частицы, имеющие разный размер и предысторию, демонстрировали усиление люминесценции кишечной палочки (рис. 9.4).

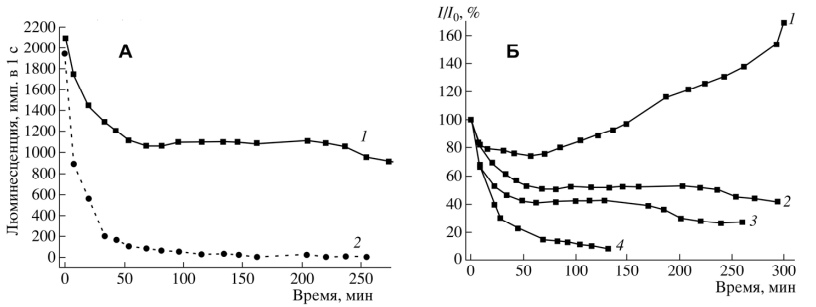


Рис. 9.4. Интенсивность биолюминесценции *E. coli* в присутствии наночастиц CeO_2 размером 5 нм (*1*) и в дистиллированной воде (*2*) (*А*). Относительная интенсивность биолюминесценции *E. coli* в присутствии суспензий нанокристаллического диоксида с различными размерами частиц: *1* – <5 нм; *2* – 5 нм; *3* – 6 нм; *4* – 8 нм (*Б*) [43]

Авторы работы [44] гидротермальным методом синтезировали наночастицы диоксида церия разного размера (6,0±3,5; 15,0±4,3; 22,0±5,7 и 40,0±10,0 нм) и изучили их влияние на грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* и *Shewanella oneidensis* (металлредуцирующий микроорганизм) и грамположительные бактерии *Bacillus subtilis*. Для *E. coli* и *B. subtilis* показано дозозависимое ингибирование, тогда как *S. oneidensis* оказался нечувствителен к наночастицам диоксида церия. Зависимость степени ингибирования от размера частиц была разной для различных микроорганизмов (рис. 9.5); любопытно, что и в этом случае для *E. coli* самые мелкие частицы имеют минимальную токсичность.

Наночастицы коммерческого препарата диоксида церия (7 нм, ζ-потенциал положительный), стабилизированные нитрат-ионом, также проявляют выраженную токсичность по отношению к *E. Coli* [45]. По мнению авторов, токсичность обусловлена сильным электростатическим взаимодействием положительно заряженных частиц и отрицательно заряженной мембраны бактерии. Влияние наночастиц диоксида церия на жизнеспособность *E. coli* (клинический штамм UCM B-930) изучали также авторы [38], но при этом использовали частицы CeO_2 с отрицательным зарядом поверхности. Помимо кишечной палочки, в работе [38] были исследованы и другие оппортунистические микроорганизмы – *Staphylococcus aureus* (штамм 8325-4, устойчивый к гентамицину) и *Candida albicans* (клинический штамм UCM Y-690). Частицы CeO_2 (~4,2 нм, ζ-потенциал –18 мВ) получали методом «мягкой химии», в качестве стабилизатора использовали цитрат аммония. Было установлено, что диоксид церия ингибирует жизнедеятельность всех трех микроорганизмов, *E. coli* оказалась наименее чувствительной к действию CeO_2, а *C. albicans* – наиболее чувствительной (инкубация *C. albicans* в 1,0 мМ растворе наночастиц CeO_2 полностью подавляла жизнедеятельность). При этом концентрирование CeO_2 на поверхности микроорганизмов происходило поразному (см. рис. 9.3). В работе [46] также показано, что наночастицы диоксида церия (размером 37,6 нм, полученные осаждением гидроксида аммония из хлорида церия(III)), демонстрируют дозозависимое ингибирование *S. aureus*.

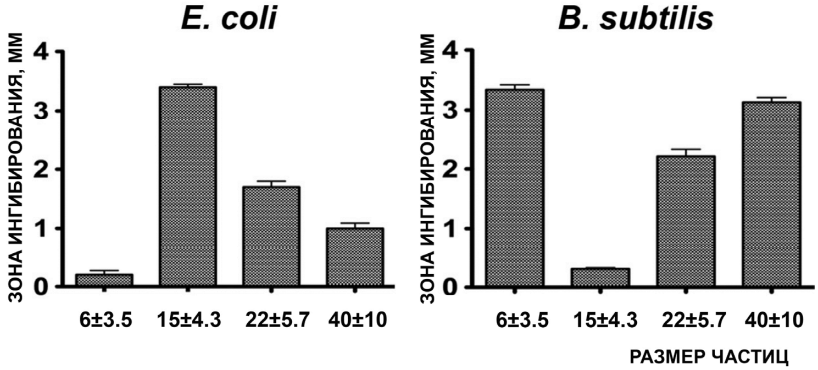


Рис. 9.5. Зависимость диаметра зоны задержки роста бактерий *E. coli* и *B. subtilis* от размера частиц диоксида церия [44]

Помимо размера, важную роль в бактерицидной способности НДЦ играет форма частиц. Так, по мнению авторов [47], наночастицы кубической формы имеют наибольшую активность против грамм-положительных и грамм-отрицательных микроорганизмов. Такие частицы CeO_2 синтезировали сонохимически из солей церия(III) и гидроксида натрия, тщательно отмывали от прекурсоров и обрабатывали при 250°C. Антимикробное действие определяли по ферментативной активности β-галактозидазы в реакции гидролиза о-нитрофенол-β-д-галактопиранозида. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) кубических наночастиц CeO_2 для патогенных бактерий была следующая: 16 мкг/мл (*Escherichia coli*), 8 мкг/мл (*Salmonella typhimurium* и *Enterococcus faecalis*) и 4 мкг/мл (*Bacillus subtilis*). При этом МИК традиционного антибактериального препарата канамицина была гораздо выше: 64 мкг/мл (*Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*) и 128 мкг/мл (*Enterococcus faecalis* и *Bacillus subtilis*). По мнению авторов, данные результаты открывают новые горизонты в создании материалов с антибактериальными свойствами для лечения ран и упаковки продуктов.

На бактерицидную активность наночастиц диоксида церия существенное влияние оказывает поверхностно-активное вещество (ПАВ), используемое в качестве стабилизатора. Так, авторы [48] синтезировали наночастицы диоксида церия, стабилизированные полиакрилатом (размер 3–4 нм, гидрадинамический диаметр 5 нм, $\zeta = -45$ мВ) и

декстраном (размер 3–4 нм, гидродинамический диаметр 14 нм, $\zeta = -2$ мВ). Показано, что по сравнению с контролем (фосфатный буфер) уже через 6 ч экспозиции оба вида частиц ингибируют рост *P. aeruginosa* на 20%, хотя ингибирующие концентрации для частиц с разным стабилизатором отличаются – НДЦ, стабилизированный декстраном, эффективнее полиакрилатного почти в два раза. В работе [49] антибактериальную активность НДЦ по отношению к *Escherichia coli* оценивали в присутствии трёх неионных ПАВ: Тритон X-114, поливинилпирролидон (ПВП) и Твин 80 в концентрации 0,001% об. Изначально агломерированный крупнодисперсный порошок диоксида церия не проявлял антимикробной активности (табл. 9.1). После обработки ультразвуком суспензия НДЦ состояла из частиц размером примерно 100 нм и имела определённую антимикробную активность. Введение ПАВ усиливало эффект: наибольшее влияние оказывал Твин 80, в его присутствии МИК наночастиц диоксида церия снижалась почти в 20 раз – с 3 мг/л (НДЦ без ПАВ) до 0,15 мг/л.

Таблица 9.1

Диаметр зоны задержки роста E. coli в присутствии различных смесей наночастиц CeO_2 и неионных ПАВ [49]

Бумажный диск	Диаметр ингибирования, мм
CeO_2 без обработки	0
CeO_2 ультразвуковая обработка 60 мин/pH = 7	9
CeO_2 ультразвуковая обработка 60 мин/pH = 7 плюс Tween 80	15
CeO_2 ультразвуковая обработка 60 мин/pH = 7 плюс PVP	14
CeO_2 ультразвуковая обработка 60 мин/pH = 7 плюс Triton-X114	13
Tween 80	0
ПВП	0
Triton X-114	0

С целью практического применения НДЦ авторы [50] предложили наносить нанокристаллический диоксид церия на волокна натурального шелка (*Bombyx mori*) для создания антимикробных тканей. Для этих целей сначала из солей Ce(III) осаждением с помощью гидроокиси натрия получали наночастицы диоксида церия. Затем кипячением в содовом растворе из шелковых нитей удаляли серицин, после про-

мывки на них методом погружения в раствор осаждали наночастицы CeO_2. Для этого нити окунали в золь CeO_2 на 3 мин, затем сушили при комнатной температуре в течение 20 мин и фиксировали при 170°C в течение 3 мин. Процесс повторяли один, два или три раза для получения волокон с разным содержанием НДЦ. Обработанные таким образом нити не только были способны ингибировать ряд патогенных микроорганизмов, но и приобретали дополнительные свойства – например, термо- и светостойкость, дополнительную механическую прочность (рис. 9.6).

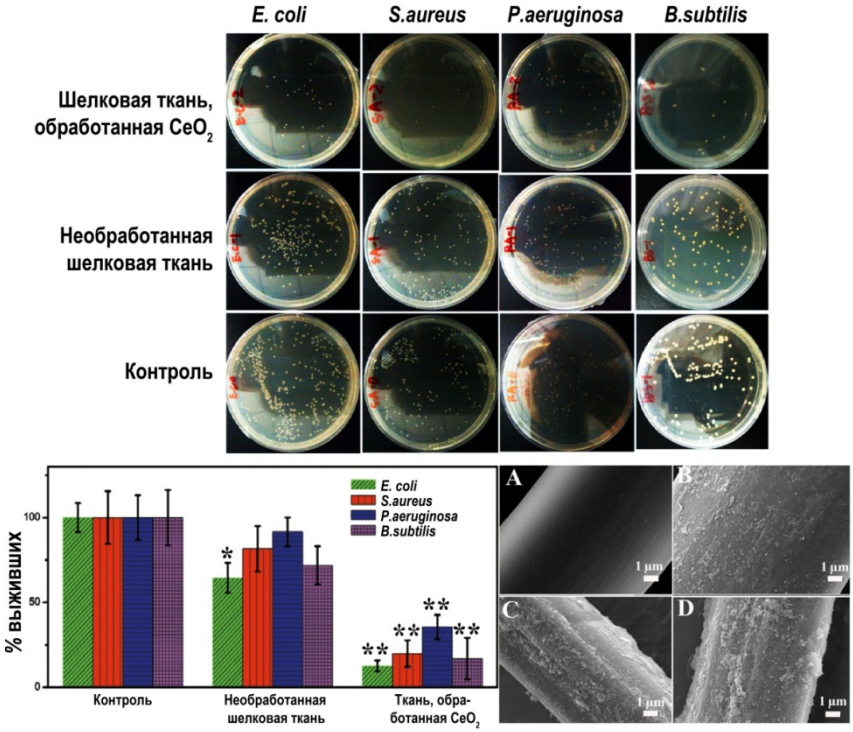


Рис. 9.6. Антибактериальный эффект необработанной и покрытой наночастицами диоксида церия шелковой ткани. Внизу справа – микрофотография шелковых волокон: *A* – шелковая нить без обработки; *B* – однократная обработка НДЦ, *C* – двукратная обработка НДЦ; *D* – трёхкратная обработка НДЦ [50]

Тяжелый сепсис является сложным заболеванием мультифакторной этиологии, которое характеризуется системным быстропрогрес-

сирующим воспалением, сопровождающимся дисфункцией многих органов, летальным исходом. Хотя большинство смертей от сепсиса связано с высвобождением воспалительных медиаторов, на сегодняшний день лечение в значительной степени ориентировано на введение антибиотиков, нестероидных противовоспалительных препаратов и вазопрессоров. В исследовании [51] у самцов крыс *Sprague Dawley* формировали полимикробный сепсис, а потом вводили внутривенно наночастицы CeO_2 в дозе 0,5 мг/кг. Предварительные данные показали, что введение НДЦ повысило выживание животных и привело к снижению температуры тела. Изменения в живучести и терморегуляции на фоне сепсиса были связаны с ингибированием наночастицами диоксида церия продукции β2-микроглобулина, цистатина, глутатион-s-трансферазы-α, глутатион-s-трансферазы-μ, молекулы повреждения почек-1, остеопонтина и снижения общих сывороточных АФК. Гистологический анализ показал, что наночастицы снижали индуцированную сепсисом дилатацию проксимальных канальцев и потерю определяемой границы щеточной каемки. Совокупность данных позволила авторам предложить НДЦ для лечения почечной недостаточности и предупреждения смерти, вызванных сепсисом.

Как уже отмечалось, наночастицы CeO_2 проявляют сравнительно низкую токсичность по отношению к эукариотическим клеткам теплокровных животных – при этом для клеток низших организмов (бактерий и грибов) они имеют гораздо более высокую токсичность. С учетом того, что в последнее время в клинической практике выявляется все больше бактериальных штаммов, устойчивых к традиционным антибиотикам, применение новых препаратов на основе наноматериалов может иметь большой прикладной интерес [52]. Так, в работе [38] доказана чувствительность антибиотикорезистентного штамма золотистого стафилококка к антибактериальному действию стабилизированных цитратом наночастиц диоксида церия (~4,2 нм).

Отдельно необходимо отметить, что микробицидная активность имеет и отрицательные стороны, поскольку является важной составляющей экотоксичности материала. В качестве примера полезных микроорганизмов окружающей среды можно привести почвенные бактерии, клубеньковые симбиоты растений и компоненты активного ила очистных сооружений. В работе [53] исследовали токсичность ряда промышленных наночастиц оксидов металлов (CeO_2,

Fe_3O_4, SnO_2) по отношению к почвенной биомассе. Наночастицы вносили в количестве 0,10 и 100 мг/кг сухой почвы и инкубировали 7 и 60 дней при 25°C и 60%-ной влажности, после чего регистрировали содержание углерода и азота. Обнаружено значительное увеличение метаболического показателя (qCO_2), что свидетельствует о микробиальном стрессе или изменении соотношения бактерий и грибков в биомассе. Влияние наночастиц оксидов (CeO_2 и TiO_2) и металлов (Ag и Au) на биоценоз микроорганизмов, используемых для обработки сточных вод, изучали в работе [54]. Наночастицы CeO_2 размером 12 нм получали гидролизом нитрата церия в присутствии гексаметилентетрамина, который также использовали в качестве стабилизатора частиц. Наночастицы золота и диоксида титана практически не влияли на микроорганизмы, наночастицы серебра снижали активность биомассы на 33–50%, при этом диоксид церия вызывал наибольшее ингибирование – образование биогаза снижалось почти на 100%. Тем не менее следует отметить, что гексаметилентетрамин сам по себе является прекурсором формальдегида и биоцидом, поэтому данный эксперимент не является полностью корректным. Для оценки влияния компонентов среды на токсичность наночастиц диоксида церия (8–10 нм, стабилизатор – декстран) по отношению к *E. coli* авторы [55] провели многопараметрический эксперимент с привлечением регрессионной модели. Было показано, что токсичность наночастиц зависит от солевого фона ($MgSO_4$, $CaCl_2$, KCl), органической нагрузки и концентрации фруктозы, а также их сочетания. Отмечено, что в некоторых случаях наночастицы диоксида церия могут даже защищать бактериальные клетки от токсического действия солей магния и калия. Имеются также сообщения, что добавление наночастиц CeO_2 к антибиотику широкого спектра действия Ципрофлоксацину практически полностью нивелирует его антибактериальную активность [56].

9.4. Антивирусная активность наночастиц диоксида церия

Основные пути развития вирусной инфекции в клетке представлены в гл. 6 (см. рис. 6.8). При взаимодействии клетки и вируса может происходить гибель клетки, возникать затяжная инфекция, а также осуществляется опухолевая трансформация нормальной клетки. Ан-

тивирусная активность наноматериалов на сегодняшний день изучена крайне слабо, данные об антивирусной активности нанокристаллического диоксида церия практически отсутствуют.

В работе [57] Н.М. Жолобак с соавт. впервые было показано ингибирующее влияние золей диоксида церия, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой, на развитие цитопатического действия (ЦПД) тест-вируса везикулярного стоматита (ВВС, семейство *Rhabdoviridae*) при условии 24-часового предварительного контакта с культурой референтной клеточной линии фибробластов мышей (L929) и эпителиальных клеток тестикул эмбрионов поросят (ЕРТ). Оказалось, что профилактическая обработка обеих клеточных культур золями CeO_2 в концентрации 2,0–10,0 мкг/мл вызывала формирование противовирусной резистентности клеток.

Следует отметить, что растворы наночастиц, полученные с использованием в качестве прекурсора солей Ce^{4+}, характеризовались более высокой антивирусной активностью. При внесении CeO_2, синтезированного из солей Ce^{3+}, в культуру фибробластов мышей через 30 мин после инфицирования (терапевтическая обработка) наблюдался 100%-ный защитный эффект. В последующих исследованиях впервые было показано, что стабилизированные цитратом наночастицы CeO_2 также оказывали ингибирующее действие на развитие ЦПД тест-вируса ВВС [58]. В условиях *in vitro* формирование 100%-ной противовирусной резистентности наблюдалось как в профилактической, так и лечебной схемах.

Авторами также обнаружено, что CeO_2 существенно угнетает репродукцию вирусов в модельных системах L929/ВВС и RF/ВПГ-1 [59]: снижение титра вируса составило 2,6–4,8 lg. Полученные данные представляют большой практический интерес, однако в этих пионерских работах не раскрыт возможный механизм антивирусной активности наночастиц CeO_2.

Упрощенная схема репликации ретровируса и возможные точки направления действия препаратов на основе нанодисперсного диоксида церия представлены на рис. 9.7. Внеклеточные вирионы (*1*) попадают в клетку-хозяина главным образом с помощью вирусных белков слияния, взаимодействующих с рецепторами плазматической мембраны (*2*). После адсорбции вируса на поверхности клетки оболочечные вирусы проникают в клетку двумя путями. В первом случае (*I*) вирусы проникают в клетку путем слияния оболочки с плазма-

тической мембраной и наследственный материал оказывается к клетке (характерно для вирусов герпеса). Во втором случае (*II*) в результате эндоцитоза в клетку проникают везикулы, содержащие вирион. В таком состоянии вирус упакован в дополнительную оболочку, образованную клеточной мембраной. От второй оболочки он освобождается при слиянии везикулы с эндосомой, в которой кислая среда активирует белки слияния и тем самым способствует объединению мембраны вириона с эндосомальной мембраной, после чего в цитоплазму высвобождается наследственный материал. Данный путь наиболее распространен и характерен для многих сложных вирусов, например вируса гриппа. После удаления оболочки геномная РНК вируса транскрибируется в двуцепочечную ДНК-копию (*3*), которая импортируется в ядро (*4*). В ядре вирусный геном ДНК интегрируется в хромосому клетки-хозяина (*5*) и выполняет роль матрицы для синтеза вирусных мРНК (*6*). Затем вирусные мРНК транспортируются в цитоплазму, где происходит синтез вирусных GAG-полипротеинов и гликопротеинов оболочки (*7*). Далее происходит сборка частицы вируса (*8*), после чего вирусная частица достигает плазматической (*9а*) или эндосомальной (*9б*) мембраны и использует её для формирования нового вириона (*10*), который способен участвовать в следующем инфекционном цикле.

Проникновение вируса в клетку вызывает образование активных форм кислорода (АФК). С одной стороны, АФК играют позитивную роль в уничтожении вирусов, поскольку именно клеточные пероксисомы (наряду с митохондриями) являются одним из важнейших звеньев развития каскада антивирусных реакций врожденного иммунитета. С другой стороны, АФК поддерживают воспалительный процесс, вызывают деструктивные изменения в клетках и тканях, в некоторых случаях необратимого характера. Они же инициируют процесс перекисного окисления липидов клеточных мембран, в результате чего утрачивается их барьерная функция, в тканях и органах возникает структурно-функциональное нарушение. Например, при контакте нейтрофилов в легочной ткани с вирусом гриппа образуются супероксидный анион-радикал, пероксид водорода и гипохлорит-анион, определяющие тяжесть инфекционного процесса. При церебральной вирусной инфекции именно АФК способствуют клиренсу патогенов и повреждению нейронов мозга [60].

АФК, накапливающиеся при инвазии вирусов, активируют транскрипционный фактор NF-κB, что приводит к индукции ряда цитокинов и ускорению транскрипции вирусной нуклеиновой кислоты в ядро клетки. В работе [61] предложена оригинальная методика регистрации образования АФК с помощью комплекса НДЦ – кальцеин и визуальным образом подтверждено образование активных форм кислорода при вирусной инфекции в клетке (см. главу 5, рис. 5.21).

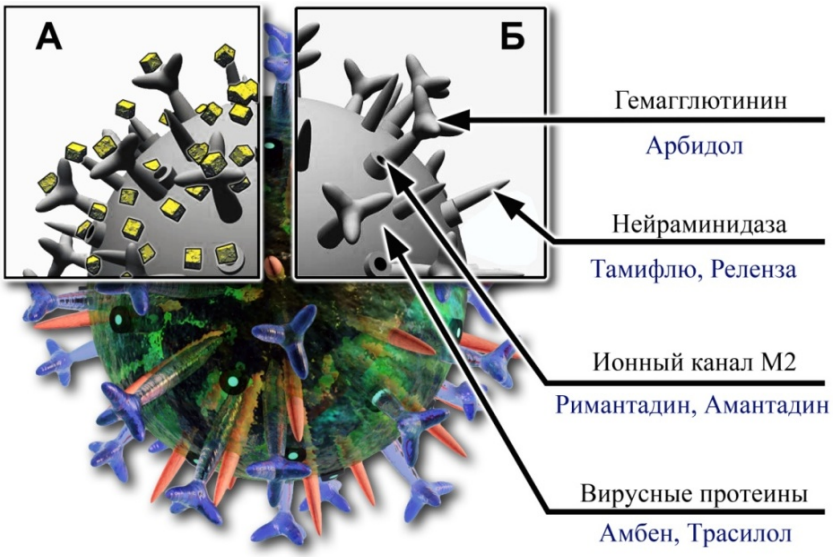


Рис. 9.7. Мишени действия неспецифических (*А*) и специфических (*Б*) вирусных блокаторов. Предполагаемая схема антивирусного действия нанокристаллического диоксида церия по механизму НДЦ-1 (см. рис. 9.8). Для визуализации соотношение размеров наночастиц CeO_2 (~4 нм) и вируса гриппа (100 нм) сохранено

Как правило, существующие противовирусные препараты направлены на ингибирование определенных стадий вирусной инфекции (рис. 9.7). Так, ряд препаратов (например, оксолин) блокируют внеклеточные вирионы. Другие препараты (ремантадин, арбидол, тамифлю) препятствуют адсорбции, проникновению и удалению оболочки вирусов. Третьи ингибируют синтез вирусных РНК/ДНК (азоазины, олигонуклеотиды, рибавирин) или вирусных белков (ин-

терфероны и его индукторы, ингибиторы протеаз). Ряд препаратов является ингибиторами сборки или препятствует выходу вирионов потомства (интерфероны, озельтамивир, занамивир) [62].

До недавнего времени наноматериалы рассматривали только в качестве средства доставки биологически активных молекул в очаг вирусной инфекции [63]. В последние годы появились сообщения о самостоятельной антивирусной активности наночастиц без предварительной модификации специальными структурами. В этом случае предполагается, что наночастицы, адсорбируясь на элементах капсида, выступают в роли неспецифических вирусных блокаторов (рис. 9.7). Так, показана активность наночастиц диоксида титана (с размером частиц 4–5 нм) по отношению к вирусу гриппа А (H3N2). По данным электронной микроскопии уже через 15 мин после добавления наночастиц TiO_2 в вирусосодержащую жидкость они адсорбируются на внешней оболочке вирусов и вызывают локальные разрушения, что, в свою очередь, приводит к потере инфекционной активности вирусов [64]. Кроме того, имеются данные об антивирусной активности наночастиц Cu довольно крупных размеров (~160 нм) по отношению к вирусу гриппа А (H1N1) [65]. Авторы работы предполагают, что антивирусная активность таких наночастиц связана с генерацией наночастицами гидроксильных радикалов, которые блокируют акцепторы N-ацетилцистеина.

Анализ механизмов биологической активности нанокристаллического диоксида церия (см. разд. 4.1) позволяет предположить, что его антивирусное действие должно иметь более универсальный характер и может быть направлено на разные мишени в цикле репродукции вирусов (рис. 9.8). Так, за счет адсорбции на вирусных протеинах (НДЦ-1) или рецепторах клетки (НДЦ-2) наночастицы могут блокировать внеклеточные вирионы и препятствовать их адсорбции на клеточных мембранах. Вирусы, проникающие в клетку с помощью эндоцитоза (например, вирус гриппа), для агглютинации и высвобождения наследственного материала снижают pH содержимого везикул. Так, гемагглютинин вируса гриппа при pH = 7 неактивен, пептид слияния меняет конформацию только в кислой среде (при pH≤5). При этом значении pH нанокристаллический диоксид церия проявляет выраженные прооксидантные свойства и может повреждать нуклеиновые кислоты вириона (НДЦ-3). Для вирусов, проникающих в клетку методом слияния (например, вирус герпеса), значение pH на высвобожде-

ние нуклеиновых кислот не влияет, и данный механизм неэффективен. Следующий механизм антивирусной активности наночастиц диоксида церия связан с ингибированием транскрипции вирусной РНК и является общим для большинства типов вирусов (НДЦ-4). Ингибирование обеспечивается влиянием на активность соответствующих киназ – за счет участия в процессе фосфорилирования и изменения уровня АФК. Уменьшение концентрации активных форм кислорода уменьшает повреждение элементов клетки и разрушение клеточных мембран (НДЦ-5), что затрудняет выход вирионов потомства (НДЦ-6), а также купирует общий воспалительный процесс. Вероятно, регулирование концентрации АФК в клетке является основным механизмом противовирусной активности наночастиц диоксида церия.

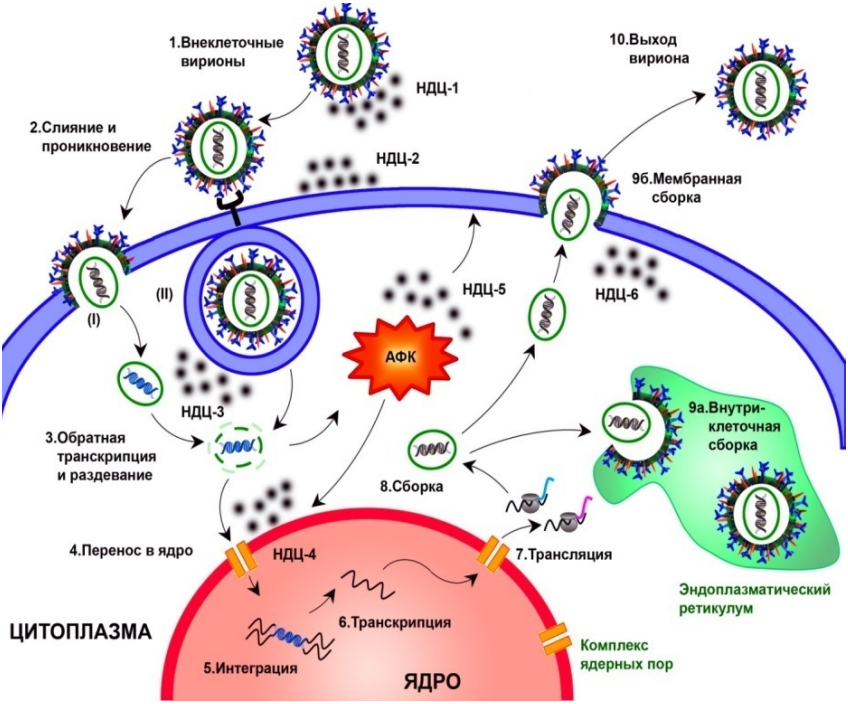


Рис. 9.8. Механизм репликации вируса и возможные мишени препаратов нанодисперсного диоксида церия

С целью выяснения возможных механизмов действия нанокристаллического диоксида церия была исследована его антивирусная активность в отношении вирусов гриппа A/FM/1/47 (H1N1) и вируса герпеса простого типа 2 (ВПГ-2). Несмотря на то что действие CeO_2 по механизму НДЦ-3 для них должно существенно различаться, экспериментальные данные показывают, что нанокристаллический диоксид церия активен в отношении обоих вирусов.

Проведенные исследования [66] демонстрируют, что с физико-химической точки зрения наночастицы диоксида церия могут неспецифически адсорбироваться на поверхности обоих вирусов и обеспечивать блокировку по механизму НДЦ-1. Размеры вируса позволяют рассматривать его как объект физики ближнего поля [67]. Если вблизи вируса будет располагаться наночастица с размерами порядка/меньше линейных размеров вируса, то между вирусом и частицей может возникнуть взаимодействие, обусловленное флуктуационными полями (аналог сил Ван-дер-Ваальса). Можно надеяться, что такое взаимодействие приведет к необратимым превращениям в системе. Например, могут разрушиться слабые химические связи, что является составляющей образования рецепторов на вирусном капсиде. За счет флуктуаций электромагнитного поля взаимодействие между наночастицами с достаточно большими значениями нелинейной поляризованности приводит к формированию потенциала, который на больших расстояниях имеет характер притяжения, а на расстояниях порядка размеров частиц – отталкивания с образованием достаточно глубокой потенциальной ямы (рис. 9.9):

$$U(d) = \sum_{n=2,3} \left[\frac{A_n}{d^{6n}} - \frac{B_n}{d^{3n}} \right], \qquad (9.1)$$

где A_n и B_n – коэффициенты, которые зависят от размеров, формы и материала частиц. Нелинейное взаимодействие этих дипольных моментов и приводит к образованию потенциала *U(d)* (4.7). Графически такой потенциал показан на рис. 9.9. Характерной особенностью такого потенциала является то, что его минимум формируется на расстояниях порядка размера частиц.

Оценки энергии взаимодействия для вирусной частицы размером ~100 нм и наночастицы размером ~ 2–10 нм дают величину от 0,1 до нескольких kT. Этой энергии должно быть достаточно для разру-

шения молекул-рецепторов на поверхности вирусной оболочки, при этом патогенность вируса будет резко уменьшаться [68].

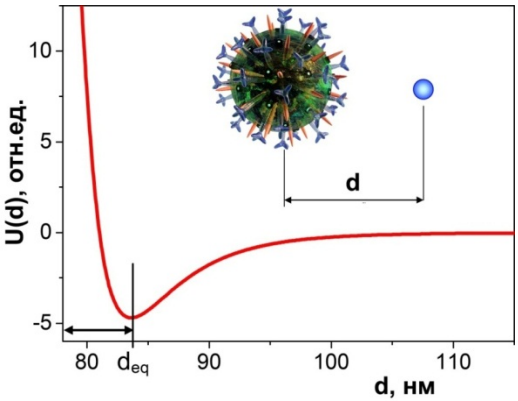


Рис. 9.9. Схема взаимодействия системы «вирус – наночастица» [67]

При этом рассмотренный механизм допускает два способа снижения вирусной активности. С одной стороны, адсорбция частиц препятствует проникновению вируса внутрь живой клетки. Во-первых, благодаря достаточно стабильному образованию «вирус – наночастица» можно считать, что такая система имеет геометрические характеристики, отличающиеся от характеристик вируса. Поскольку проницаемость вируса через клеточную мембрану в значительной степени определяется геометрическим фактором, вирус с присоединенными наночастицами в основном теряет возможность проникновения внутрь клетки. Во-вторых, благодаря действию локального поля на рецепторы, находящиеся на поверхности вируса, молекулярные группы рецепторов могут модифицироваться вплоть до их разрушения. Действительно, из-за того, что тензор эффективной восприимчивости может иметь достаточно большие значения, локальное поле на вирусной частице значительно усиливается [68]. Поскольку рецепторы вируса взаимодействуют с соответствующим образованием на клеточной оболочке по принципу комплементарности (взаимодействие типа «ключ – замок»), то любое повреждение рецептора приводит к невозможности проникновения вируса внутрь клетки. В-третьих, локальное поле может оказывать на вирусную частицу термическое действие. За счет локального нагрева вирусного капсида последний может терять свои свойства и активность вируса также будет снижаться.

С другой стороны, можно предполагать, что после адсорбции наночастиц некоторым вирусам удается проникнуть внутрь клетки и инфицировать ее. Это может происходить по нескольким причинам. Во-первых, наночастицы могут локализоваться далеко не у всех проникших в организм вирусов. Во-вторых, благодаря статистической природе флуктуационных взаимодействий, не на каждой системе «вирус – наночастица» может формироваться достаточно сильное локальное поле или выделяться достаточное количество теплоты. Таким образом, вирус, который проник внутрь клетки, может начать процесс самовоспроизведения благодаря взаимодействию вирусной ДНК(РНК) с клеточными органеллами. В этом случае наночастицы могут взаимодействовать с вирусом непосредственно в клетке, блокируя процессы репликации ДНК, или препятствовать выходу потомства вируса из инфицированной клетки.

В экспериментах *in vitro* нами было показано, что нанокристаллический диоксид церия (0,1 М водный коллоидный раствор CeO_2 с размером частиц 3–5 нм, стабилизированный цитратом натрия, имеющий ζ-потенциал около минус 20 мВ, полученный по методике [69]) эффективно ингибирует репродукцию вируса гриппа в перевиваемой культуре клеток почки собаки (МДСК) в дозе 1,25 мМ. В качестве препаратов сравнения использовали тамифлю (Hoffman La Rosh США) и римантадин (Россия). При изучении механизма действия наночастиц диоксида церия на репродукцию вируса гриппа было установлено, что препарат в высоких концентрациях ингибирует нейраминидазную активность, а в более низких – влияет на гемагглютинирующую активность вируса гриппа.

При внесении от 20 до 0,31 мМ препарата наночастиц CeO_2 к клеткам МДСК установлено, что диоксид церия не вызывает дегенерации монослоя клеток во всем диапазоне исследованных концентраций. Следовательно, CD_{50} препарата CeO_2 не ниже 20 мМ. Эффективная доза (ED_{50}) представляет собой минимальное количество препарата, тормозящее развитие вирусспецифического цитопатического действия на 50%. Результаты исследования показаноли, что ED_{50} отвечает концентрации 1,25 мМ (рис. 9.10), а индекс селективности ≥16,0, что позволяет отнести нанокристаллический диоксид церия к активным антивирусным препаратам. Сравнительные данные для референс-препаратов: у римантадина CD_{50} – 62,5 мкг/мл, ED_{50} –

0,36 мкг/мл, индекс селективности – 173,0; у тамифлю CD_{50} – 2500 мкг/мл, ED_{50} – 0,72 мкг/мл, индекс селективности – 347,0.

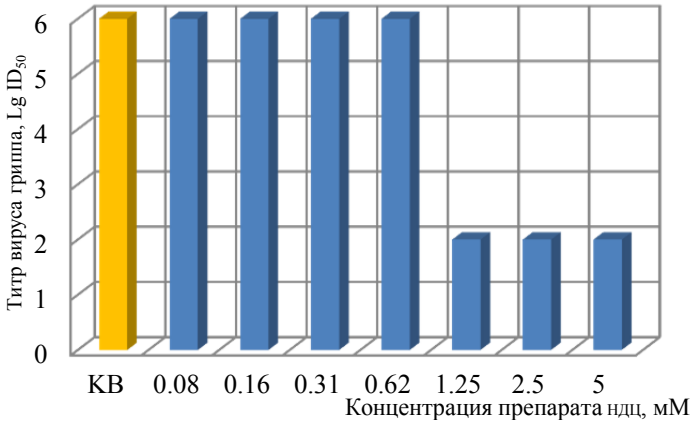


Рис. 9.10. Зависимость титра вируса гриппа A/FM/1/47 (H1N1) от концентрации препарата наночастиц диоксида церия (НДЦ). КВ – контроль вируса

Для уточнения механизма действия наночастиц диоксида церия были проведены исследования по определению его влияния на нейраминидазную и гемагглютинирующую активность вируса гриппа. Результаты исследования представлены в табл. 9.2.

Таблица 9.2

Влияние препарата нанокристаллического диоксида церия на гемагглютинирующую и нейраминидазную активность вируса гриппа A/FM/1/47 (H1N1)

Концентрация препарата CeO_2, мМ	Гемагглютинирующая активность		Нейраминидазная активность	
	Гемагглютинирующие единицы	Кратность ингибирования	Показатель оптической плотности	Процент ингибирования
10,0	80	2	0,092	100
5,0	80	2	0,100	100
2,5	80	2	0,450	50
1,25	20	8	0,600	33
0,625	40	4	0,800	–
0,312	40	4	0,895	–
Контроль вируса гриппа	160	–	0,900	–

Полученные результаты свидетельствуют о том, что гемагглютинирующая активность вируса гриппа A/FM/1/47 (H1N1) статистически достоверно уменьшалась в 4–8 раз при концентрациях CeO_2 от 2,5 до 0,31 мМ. Ингибирование нейраминидазной активности вируса гриппа наблюдалось при более высоких концентрациях препарата CeO_2 – от 10 до 2,5 мМ. Таким образом, можно предположить, что одним из основных механизмов ингибирования репродукции вируса гриппа является неспецифическое блокирование гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа нанокристалическим диоксидом церия (механизм НДЦ-1, рис. 9.8), что отражается на этапах адсорбции и слияния вируса с мембраной клетки и выхода вируса из клетки с освобождением вирусных частиц от клеточных мембран после их почкования и диссеминации инфекции. Вероятно, блокада активности поверхностных антигенов гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа происходит за счет встраивания наночастиц в гликопротеиновую структуру поверхностных антигенов вируса гриппа и изменения их конформации либо вследствие экранирования наночастицами рецепторов гемагглютинина и активного центра нейраминидазы от взаимодействия с субстратом или эритроцитами.

Исследования антивирусной активности аналогичных наночастиц диоксида церия против вируса герпеса простого типа 2 (ВПГ-2), штамм ВН, проводили как *in vitro* (перевиваемые клетки почки кролика RK-13), так и *in vivo* (морские свинки). В качестве препарата сравнения использовали антигерпетический препарат виролекс (KRKA, Словения), содержащий 3% ацикловира. Для определения цитотоксической дозы (CD_{50}) препарат наночастиц диоксида церия вносили в культуру клеток в концентрациях от 20 до 0,31 мМ в пересчете на CeO_2. Микроскопические исследования показали, что монослой клеток оставался неповрежденным во всех пробах. Таким образом, CD_{50} препарата CeO_2 была не менее 20 мМ. Для определения эффективной дозы (ED_{50}) препарата НДЦ тест-вирус в дозе 100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл вносили в культуру клеток RK13 и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После адсорбции вируса на клетках их промывали питательной средой RPMI-1640, после чего добавляли поддерживающую среду с НДЦ в концентрациях 5,0; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16; 0,08 мМ в пересчете на CeO_2. Разница инфекционного титра в опыте в сравнении с контролем вируса герпеса позволила установить ED_{50} препарата (рис. 9.11). Согласно полученным результатам ED_{50} препарата CeO_2 соответствует

концентрации 1,25 мМ, а индекс селективности ≥16,0, что позволяет отнести CeO_2 к активным антигерпетическим препаратам.

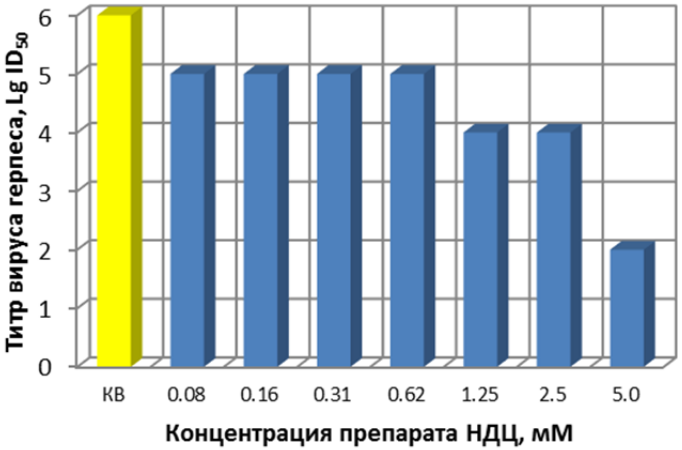


Рис. 9.11. Зависимость титра вируса герпеса простого типа 2 (ВПГ-2), штамм ВН, от концентрации препарата НДЦ.
КВ – контроль вируса

При исследовании эффективности раствора CeO_2 на модели генитального герпеса морских свинок получены результаты, представленные в табл. 9.3, рис. 9.12.

Таблица 9.3

Эффективность препарата CeO_2 на модели генитального герпеса у морских свинок

Номер группы животных	Препарат	Длительность заболевания, сут	p	СИВЗ, баллы	ИЛД, %
1	Контроль заражения	15,0 ± 3,2		80,0	–
2	Virolex®	9,75 ± 2,86	<0,05	22,0	56,0
3	р-р CeO_2 (1,25 мМ) профилактически-лечебное	10,0 ± 0,39	<0,001	29,0	63,8
4	р-р CeO_2 (1,25 мМ) лечебное	8,0 ± 1,3	<0,05	31,0	61,3

Примечание. СИВЗ – средняя интенсивность выраженности заболевания в баллах; ИЛД – индекс лечебного действия.

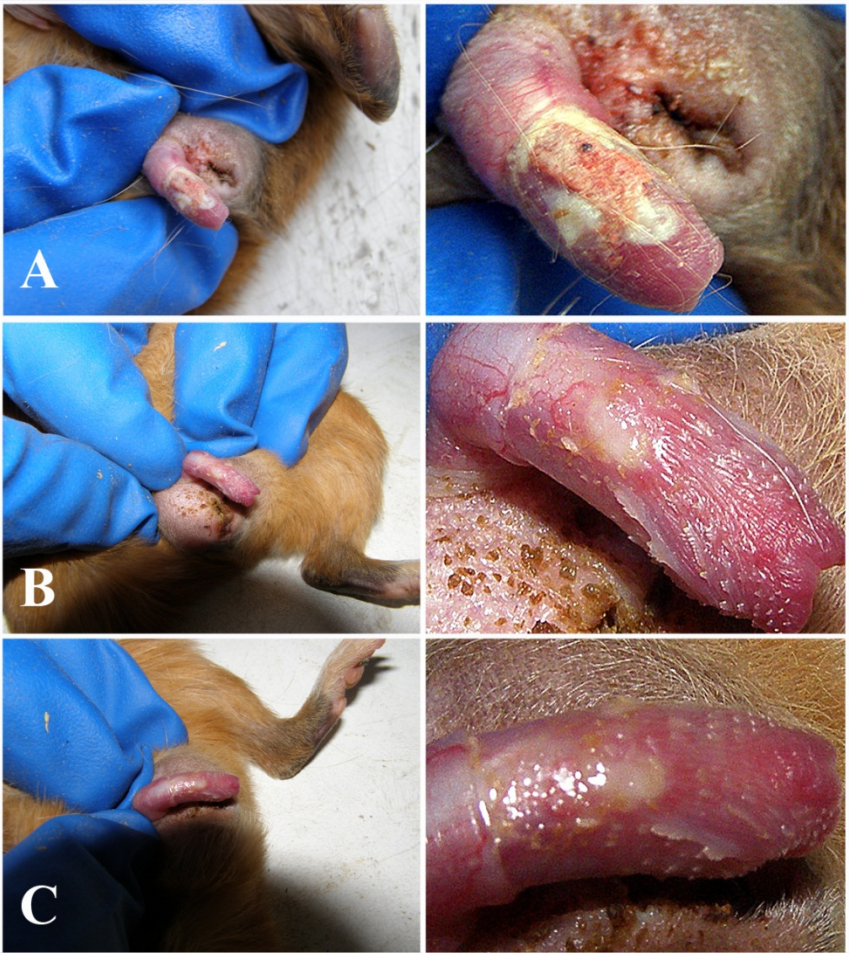


Рис. 9.12. Модель генитального герпеса, морские свинки, 5-й день терапии. *A* – контроль (без обработки); *B* – лечение с использованием Viralex® (ацикловир); *C* – лечение с использованием наночастиц диоксида церия

Было показано, что профилактически-лечебное использование препарата CeO_2 снижало выраженность симптоматики до 29,0 балла, что соответствует терапевтическому эффекту на уровне 63,8% ($p < 0,05$), и достоверно сокращало продолжительность заболевания. При лечебной схеме применения CeO_2 наблюдалось снижение симптоматики до уровня

31 балла, терапевтический эффект составил 61,3%, продолжительность заболевания у животных была 8 дней, что статистически достоверно по всем параметрам отличается от контроля вируса герпеса и указывает на эффективность препарата в данной дозе.

Аналогичные результаты получены при лечении опоясывающего лишая (герпеса зостера человека) с использованием наночастиц диоксида церия (рис. 9.13). Как правило, терапевтический эффект наблюдался уже после первого нанесения НДЦ, полное симптоматическое излечение наступало на четвертый-пятый день.



Рис. 9.13. Герпес зостера человека (опоясывающий лишай). Терапия волонтера с использованием наночастиц диоксида церия. *A* – начальная стадия; *B* – 2-й день терапии; *C* – 4-й день терапии

Следует отметить, что индексы лечебного действия нанокристаллического диоксида церия при профилактически-лечебной и лечебной схемах применения отличаются незначительно (~4%). При лечебной схеме препарат CeO_2 вводился после инфицирования, и очевидно, что механизмы НДЦ-1 и НДЦ-2 (см. рис. 9.8) в данном случае не являются доминирующими. Как было сказано выше, для вируса герпеса неэффективна также и схема НДЦ-3. В то же время эффект от применения препарата НДЦ превышает эффект от применения хорошо себя зарекомендовавшего препарата ацикловир (2-амино-1,9-дигидро-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-6Н-пурин-6-он). Противовирусная активность ацикловира основана на том, что вирус герпеса использует для репликации молекулярные компоненты инфицированной клетки. Вместе с тем для репликации вирус адаптирует также и молекулярные механизмы клетки – сигнальные пути и факторы транскрипции. Так, ВПГ активирует киназу IKK, при этом фосфорилирование ингибиторного белка IκB вызывает активацию транскрипционного нуклеарного фактора NF-κB; в свою очередь, активация NF-κB увеличивает экспрессию вирусного гена [71].

Ацикловир не влияет на каскад реакций IKK; в то же время использование простагландина A1, снижающего активность IKK, позволяет уменьшить репликацию вируса более чем в 3 000 раз [72]. Разработка и введение в клиническую практику препаратов, ингибирующих процесс фосфорилирования IκB, позволит открыть новое направление в терапии герпетических инфекций (механизм НДЦ-4, см. рис. 9.8). Как было показано выше, наночастицы CeO_2 способны гидролизовать эфирофосфатные связи в биологических молекулах и тормозить фосфорилирование IκB, снижая активность NF-κB при вирусной репликации (рис. 9.14).

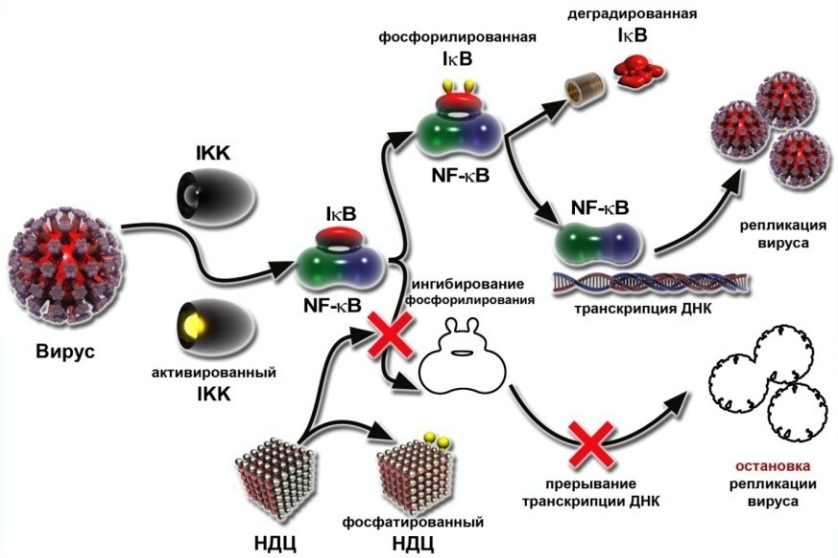


Рис. 9.14. Предполагаемая схема антивирусного действия нанокристаллического диоксида церия против вируса герпеса по механизму НДЦ-4 (см. рис. 9.8)

Механизмы обнаруженного нами антивирусного действия нанодисперсного CeO_2 представляют особый интерес и подлежат дальнейшему исследованию, поскольку открывают перспективу использования CeO_2 в профилактике и терапии широкого круга вирусных заболеваний.

Литература

1. *Drossbach G.P.* Ueber den Einfluss der Elemente der Cer- und Zircongruppe auf das Wachstum von Bakterien // Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskrankh Abt. 1897. Vol. 1 (21). P. 57–58.

2. *Buchanan R. Earle and Ellis I. Fulmer.* Physiology and Biochemistry of Bacteria. Volume II.-Effects of Environment upon Microorganisms // Physiology and Biochemistry of Bacteria. Vol. II: Effects of Environment upon Microorganisms. 1930. Xvii. P. 709.

3. *Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K.* Pharmacological properties of cerium compunds // In Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Springer Berlin Heidelberg, 2005. P. 101–111.

4. *Garner J.P., Heppell P.S.J.* Cerium nitrate in the management of burns // Burns. 2005. Vol. 31 (5). P. 539–547.

5. *Burkes S., McCleskey C.S.* The bacteriostatic activity of cerium, lanthanum and thallium // J. Bacteriol. 1947. Vol. 54. P. 417–24.

6. *Sobek J.M., Talburt D.E.* The effects of rare earth cerium on Escherichia coli // J. Bacteriol. 1968. Vol. 95. P. 47–51.

7. *Talburt D.E., Johnson G.T.* Some effects of rare earth elements and ytrrium on microbial growth // Mycologia. 1967. Vol. 59. P. 492–503.

8. *Monafo W.W., Tandon S.N., Ayvazian V.H., Tuchschmidt J., Skinner A.M., Deitz F.* Cerium nitrate: a new topical antiseptic for extensive burns // Surger. 1976. Vol. 80 (4). P. 465–473.

9. *Monafo W.W.* Water-soluble cerium (cerous) salts in burn therapy. U.S. Patent 4,088,754. Is. May 9. 1978.

10. *Fox Jr Ch.L.* Cerium sulfadiazine for treating burns. U.S. Patent 4,078,058. Is. March 7. 1978.

11. *Zhao Ruming, Yi Liu, Zhixiong Xie, Ping Shen, Sonsheng Qu.* Microcalorimetric study of the action of Ce (III) ions on the growth of E. coli // Biological trace element research. 2002. Vol. 86 (2). P. 167–175.

12. *Zhang Hui, Jia Feng, Weifang Zhu, Congqiang Liu, Jianghong Gu.* Bacteriostatic effects of cerium-humic acid complex // Biological trace element research. 2000. Vol. 73 (1). P. 29–36.

13. *Yin Ruixian, Yaqin Huang, Chongjun Huang, Yuanjian Tong, Na.* Tian Preparation and characterization of novel gelatin/cerium (III) fiber with antibacterial activity // Materials Letters. 2009. Vol. 63 (15). P. 1335–1337.

14. *Cobrado L., Silva-Dias A., Azevedo M. M., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G.* In vivo antibiofilm effect of cerium, chitosan and hamamelitannin against usual agents of catheter-related bloodstream infections // J. of Antimicrobial Chemotherapy. 2013. Vol. 68 (1). P. 126–130.

15. *Fox Jr C.L., Monafo Jr W.W., Ayvazian V.H., Skinner A.M., Modak S., Stanford J., Condict C.* Topical chemotherapy for burns using cerium salts and silver sulfadiazine // Surgery, gynecology & obstetrics. 1977. Vol. 144 (5). P. 668–672.

16. *Essington M.E.* Soil and water chemistry: An integrative approach. CRC press, 2003. P. 534.

17. *Cotton F.A., Wilkinson G., Murillo C.A.* Advanced inorganic chemistry. 6th edition. New York, NY : John Wiley and Sons, Inc., 1999. P. 1125.

18. *Yu P., Hayes S.A., O'Keefe T.J., O'Keefe M., Stoffer J.O.* The phase stability of cerium species in aqueous systems: II. the Ce(III/IV)-H_2O-H_2O_2/O_2 systems. Equilibrium considerations and Pourbaix diagram calculations // J. Electrochem. Soc. 2006. Vol. 153 (1). P. C74–C79.

19. *Zhu Xi, Aleksandar F. Radovic-Moreno, Jun Wu, Robert Langer, Jinjun Shi.* Nanomedicine in the management of microbial infection – Overview and perspectives // Nano Today. 2014.

20. *Singh Ravina, Hari Singh Nalwa.* Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs // J. of biomedical nanotechnology. 2011. Vol. 7(4). P. 489–503.

21. *Yacoby Iftach, Itai Benhar.* Antibacterial nanomedicine. 2008. P. 329–341.

22. *Lembo David, Roberta Cavalli.* Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs // Antivir Chem Chemother. 2010. Vol. 21 (5).

23. *Mehendale Rujuta, Medha Joshi, Vandana B. Patravale.* Nanomedicines for treatment of viral diseases // Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems. 2013. Vol. 30 (1).

24. *Zhang L., Pornpattananangkul D., C-MJ Hu, Huang C.-M.* Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery // Current medicinal chemistry. 2010. Vol. 17 (6). P. 585–594.

25. *Pinto-Alphandary Huguette, Antoine Andremont, Patrick Couvreur.* Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications // International journal of antimicrobial agents. 2000. Vol. 13 (3). P. 155–168.

26. *Cloninger M. J.* Biological applications of dendrimers // Current opinion in chemical biology. 2002. Vol. 6 (6). P. 742–748.

27. *Pissuwan, Dakrong, Takuro Niidome, Michael B. Cortie.* The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems // J. of controlled release. 2011. Vol. 149 (1). P. 65–71.

28. *Challa Rajeswari, Alka Ahuja Javed Ali, Khar R.K.* Cyclodextrins in drug delivery: an updated review // Aaps Pharmscitech. 2005. Vol. 6 (2). P. E329–E357.

29. *Grumezescu Alexandru Mihai, Monica Cartelle Gestal, Alina Maria Holban, Valentina Grumezescu, Bogdan Ștefan Vasile, Laurențiu Mogoantă, Florin Iordache, Coralia Bleotu, and George Dan Mogoșanu.* Biocompatible Fe_3O_4 Increases the Efficacy of Amoxicillin Delivery against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria // Molecules. 2014. Vol. 19 (4). P. 5013–5027.

30. *Matthews Liam, Rupinder K. Kanwar, Shufeng Zhou, Vasu Punj, Jagat R. Kanwar.* Applications of nanomedicine in antibacterial medical therapeutics and diagnostics // The Open Tropical Medicine Journal. 2010. Vol. 3. P. 1–9.

31. *Perni Stefano, P. Prokopovich, Jonathan Pratten, Ivan P. Parkin, Michael Wilson.* Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy // Photochemical & Photobiological Sciences. 2011. Vol. 10 (5). P. 712–720.

32. *Goh Yi-Fan, Ammar Z. Alshemary, Muhammad Akram, Mohammed Rafiq Abdul Kadir, Rafaqat Hussain.* In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria // Ceramics International. 2014. Vol. 40 (1). P. 729–737.

33. *Unnithan Afeesh Rajan, Arathyram Ramachandra Kurup Sasikala, Yesupatham Sathishkumar, Yang Soo Lee, Chan Hee Park, Cheol Sang Kim.* Nanoceria doped electrospun antibacterial composite mats for potential biomedical applications // Ceramics International. 2014.

34. *Nandedkar Tarala D.* Nanovaccines: recent developments in vaccination // Journal of biosciences. 2009. Vol. 34 (6). P. 995–1003.

35. *Zaman, Mehfuz, Michael F. Good, Istvan Toth.* Nanovaccines and their mode of action // Methods. 2013. Vol. 60 (3). P. 226–231.

36. *Santos C.L., Albuquerque A.J.R., Sampaio F.C., Keyson D.* Nanomaterials with Antimicrobial Properties: Applications in Health Sciences // Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Publisher: Formatex Research Center / ed. by A. Méndez-Vilas. 2013. Vol. 1. P. 143–154.

37. *Zeyons O., Thill A., Chauvat F. et al*. Direct and indirect CeO_2 nanoparticles toxicity for *Escherichia coli* and *Synechocystis* // Nanotoxicology. 2009. Vol. 3 (4). P. 284–295.

38. *Babenko L.P., Zholobak N.M., Shcherbakov A.B. et al*. Antibacterial activity of cerium colloids against opportunistic microorganisms in vitro // Mikrobiol Z. 2012. Vol. 74 (3). P. 54–62.

39. *Lal P., Sharma D., Pruthi P., Pruthi V.* Exopolysaccharide analysis of biofilm-forming Candida albicans // Journal of applied microbiology. 2010. Vol. 109 (1). P. 128–136.

40. *Kuang Y., He X., Zhang Z. et al*. Comparison study on the antibacterial activity of nano- or bulk-cerium oxide // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. Vol. 11 (5). P. 4103–4108.

41. *Zhang H.F.Z.H.F., He X.A., Zhang Z.Y. et al*. Nano-CeO_2 exhibits adverse effects at environmental relevant concentrations // Environ. Sci. Technol. 2011. Vol. 45. P. 3725–3730.

42. *Шекунова Т.О., Гиль Д.О., Иванова О.С. и др.* Синтез, биологическая и фотокаталитическая активность золей диоксида церия, стабилизированных цитрат-ионом // Наносистемы: Физика. Химия. Математика. 2013. Т. 4, № 1. С. 83–89.

43. *Иванов В.К., Федотов Г.Н., Никулина М.В. и др*. Биологическая активность нанокристаллического диоксида церия // Доклады Академии наук. 2008. Т. 420, № 5. С. 628–631.

44. *Pelletier D.A., Suresh A.K., Holton G.A. et al.* Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Vol. 76 (24). P. 7981–7989.

45. *Thill A., Zeyons O., Spalla O. et al.* Cytotoxixity of CeO_2 nanoparticles for *E. coli*. Physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism // Environ. Sci. Technol. 2006. Vol. 40. P. 6151–6156.

46. *Negahdary M., Mohseni G., Fazilati M., Parsania S., Rahimi G., Rad S., Rezaei-Zarchi S.* The Antibacterial effect of cerium oxide nanoparticles on Staphylococcus aureus bacteria // Ann Biol Res. 2012. Vol. 3. P. 3671–3678.

47. *Krishnamoorthy K., Veerapandian M., Zhang L.H., Yun K., Kim S.J.* Surface chemistry of cerium oxide nanocubes: Toxicity against pathogenic bacteria and their mechanistic study // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2013. DOI: 10.1016/j.jiec.2013.12.043

48. *Wang Q., Perez J.M., Webster T.J.* Inhibited growth of Pseudomonas aeruginosa by dextran-and polyacrylic acid-coated ceria nanoparticles // International journal of nanomedicine. 2013. Vol. 8. P. 3395.

49. *Cuahtecontzi-Delint R., Mendez-Rojas M.A., Bandala E.R., Quiroz M.A., Recillas S., Sanchez-Salas J.L.* Enhanced Antibacterial Activity of CeO_2 Nanoparticles by Surfactants // International Journal of Chemical Reactor Engineering. 2013. Vol. 11(2). P. 781–785.

50. *Lu Z., Mao C., Meng M., Liu S., Tian Y., Yu L., Li C.M.* Fabrication of CeO_2 Nanoparticle-modified Silk for UV Protection and Antibacterial Applications. Journal of colloid and interface science. 2014. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.08.015

51. *Manne Nandini, Ravikumar Arvapalli, Niraj Nepal, Geeta Nandyala, Kevin Rice, Asano Shinichi, Eric Blough.* Therapeutic efficacy of cerium oxide nanoparticles in treatment of sepsis induced renal failure (LB608). The FASEB Journal 28, no. 1 Supplement (2014): LB608.

52. *Gokulakrishnan R., Ravikumar S., Anandha Raj J. In vitro* antibacterial potential of metal oxide nanoparticles against antibiotic resistant bacterial pathogens // Asian Pacific J. Tropical Disease. 2012. Vol. 2(5). P. 411–413.

53. *Antisari L.V., Carbone S., Gatti A. et al*. Toxicity of metal oxide (CeO_2, Fe_3O_4, SnO_2) engineered nanoparticles on soil microbial biomass and their distribution in soil // Soil Biology and Biochemistry. 2013. Vol. 60. P. 87–94.

54. *García A., Delgado L., Torà J.A. et al*. Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment // J. Hazard. Mater. 2012. Vol. 199–200. P. 64–72.

55. *Shah V., Shah S., Shah H. et al.* Antibacterial activity of polymer coated cerium oxide nanoparticles // PLoS One. 2012. Vol. 7 (10). P. e47827

56. *Masadeh Majed M., Ghadah A. Karasneh, Mohammad A. Al-Akhras, Borhan A. Albiss, Khaled M. Aljarah, Sayer I. Al-azzam, Karem H. Alzoubi.* Cerium oxide and iron oxide nanoparticles abolish the antibacterial activity of ciprofloxacin against gram positive and gram negative biofilm bacteria // Cytotechnology. 2014. P. 1–9.

57. *Жолобак Н.М., Олевинская З.М., Спивак Н.Я. и др.* Антивирусное действие наночастиц оксида церия, стабилизированных низкомолекулярной полиакриловой кислотой // Мікробіол. журн. 2010. Т. 72, № 3. С. 42–47.

58. *Zholobak N.M., Shcherbakov A.B., Ivanov V.K. et al.* VI-th International conference «Bioresources and viruses», 14–17 september 2010, Kyiv. P. 39–40.

59. *Zholobak N., Shcherbakov A., Ivanov V. et al*. Antiviral effectivity of ceria colloid solutions // Antiviral Research. 2011. Vol. 90 (2). P. A67.

60. *Hu S., Sheng W.S., Schachtele S.J., Lokensgard J.R.* Reactive oxygen species drive herpes simplex virus (HSV)-1-induced proinflammatory cytokine production by murine microglia // J. Neuroinflammation. 2011. Vol. 8. P. 123.

61. *Zholobak N., Shcherbakov A., Vitukova E., Yegorova A., Scripinets Y., Leonenko I., Ivanov V.* Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells // RSC Advances. 2014. DOI: 10.1039/C4RA08292C.

62. *Ершов Ф.И., Касьянова Н.В.* Современные средства терапии наиболее распространенных вирусных инфекций // Consilium medicum. 2004. Т. 6, № 1. С. 51–57.

63. *Lembo D., Cavalli R.* Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs // Antivir. Chem. Chemother. 2010. Vol. 21 (2). P. 53–70.

64. *Mazurkova N.A., Spitsyna Yu.E., Shikina N.V. et al*. Interaction of titanium dioxide nanoparticles with influenza virus // Nanotechnologies in Russia. 2010. Vol. 5 (5–6). P. 417–420.

65. *Fujimori Y., Sato T., Hayata T. et al.* Novel characteristics of nanosized cooper (I) iodide partieles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus // Apl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78 (4). P. 951–955.

66. *Lozovski V., Lysenko V., Piatnytsia V. et al.* Physical point of view for antiviral effect caused by the interaction between the viruses and nanoparticles // J. Bionanosci. 2012. Vol. 6 (2). P. 109–112.

67. *Girard C., Joachim C., Gauthier S.* The physics of the near-field // Rep. Prog. Phys. 2000. Vol. 63. P. 893–938.

68. *Lozovski V., Lysenko V., Pyatnitsia V., Spivak N.* Can nanoparticles be useful for antiviral therapy // Semicond. Phys., Quantum Electr. Optoelectr. 2011. Vol. 14 (4). P. 489–491.

69. *Ivanov V.K., Polezhaeva O.S., Shaporev A.S., Baranchikov A.E., Shcherbakov A.B., Usatenko A.V.* Synthesis and thermal stability of nanocrystalline ceria sols stabilized by citric and polyacrylic acids // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2010. Vol. 55 (3). P. 328–332.

70. *Ivanov V.K., Polezhaeva O.S., Shcherbakov A.B., Tret'yakov Y.D.* Microwave-hydrothermal synthesis of stable nanocrystalline ceria sols for biomedical uses // Russian Journal of Inorganic Chemistry. 2010. 55 (1). P. 1–5.

71. *Gregory D., Hargett D., Holmes D. et al.* Efficient replication by herpes simplex virus type 1 involves activation of the IκB kinase-IκB-p65 pathway // J. Virol. 2004. Vol. 78 (24). P. 13582–13590.

72. *Amici C., Belardo G., Rossi A., Santoro M.G.* Activation of Iκb kinase by herpes simplex virus type 1. A novel target for anti-herpetic therapy // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 28759–28766.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 3

1. Методы получения нанодисперсного диоксида церия 5
1.1. Получение нанокристаллического диоксида церия методом быстрого осаждения 6
1.2. Получение нанокристаллического диоксида церия методами гомогенного осаждения 13
1.3. Основные закономерности роста наночастиц диоксида церия в гидротермальных условиях 28
1.4. Особенности высокотемпературного роста наночастиц диоксида церия 48
1.5. Коллоидные растворы нанокристаллического диоксида церия 60
1.6. Золи нанодисперсного диоксида церия для биомедицинского применения 71
Литература 97

2. Структура и свойства нанодисперсного диоксида церия 108
Литература 140

3. Токсичность нанодисперсного диоксида церия 145
3.1. Накопление в организме и токсичность солей церия 145
3.2. Общие сведения о факторах, определяющих токсичность наноматериалов 147
3.3. Сравнительный анализ токсичности нанокристаллического диоксида церия 152
3.4. Факторы, влияющие на токсичность нанодисперсного диоксида церия 158
3.4.1. Размерные эффекты 158
3.4.2. Предыстория образования частиц 172
3.4.3. Заряд поверхности 173
3.5. Токсичность нанодисперсного диоксида церия, выпускаемого в промышленных масштабах 177

3.5.1. Результаты исследований токсичности нанодисперсного диоксида церия, входящего в состав катализаторов дожига моторных топлив 178
3.5.2. Результаты исследований токсичности других промышленных образцов нанодисперсного диоксида церия 184
3.5.3. Экотоксикологические характеристики нанодисперсного диоксида церия 185
3.6. Накопление в организме и клиренс НДЦ, применяемого в биологических исследованиях и при терапии 189
Литература 196

4. Энзимоподобная активность нанокристаллического диоксида церия 206
Литература 252

5. Нанокристаллический диоксид церия как средство защиты от окислительного стресса 258
5.1. Окислительный стресс за счет введения экзогенных АФК 265
5.2. Окислительный стресс при культивировании клеток *in vitro* ... 270
5.3. Окислительный стресс, возникающий при введении экзогенных токсичных веществ 274
5.4. Окислительный стресс при повреждении тканей 277
5.5. Возможность прямого мониторинга инактивации АФК с помощью НДЦ в клетке *in vitro* 288
Литература 290

6. Нанокристаллический диоксид церия в тераностике онкологических заболеваний 295
6.1. Наночастицы в онкологии 295
6.2. Соединения церия в терапии онкологических заболеваний 300
6.3. Редокс-активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний 301
6.4. Фосфатазоподобная активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний 305

6.5. Противовирусная активность НДЦ и перспективы ее использования в терапии онкологических заболеваний 308
6.6. Примеры применения НДЦ в онкологии 311
6.7. НДЦ в радиотерапии опухолей 317
6.8. НДЦ как активное средство доставки лекарственных препаратов 323
6.9. Применение НДЦ в диагностике онкологических заболеваний 328
Литература 334

7. Защитное действие нанокристаллического диоксида церия от электромагнитного излучения 346
7.1. Фотокаталитические и фотопротекторные свойства НДЦ по отношению к органическим соединениям 346
7.2. Фотопротекторные свойства НДЦ по отношению к биологическим объектам 359
7.3. Радиопротекторное действие НДЦ по отношению к биологическим объектам 370
7.4. Применение НДЦ в составе фильтров УФ-излучения 374
Литература 382

8. Влияние нанодисперсного диоксида церия на продолжительность и качество жизни 387
8.1. Активные формы кислорода и старение живых существ 387
8.2. Увеличение продолжительности жизни клеточных культур и макроорганизмов в присутствии нанокристаллического диоксида церия 390
8.3. Влияние НДЦ на нейродегенеративные и другие заболевания стареющих млекопитающих 399
8.4. Влияние НДЦ на репродуктивные функции стареющих млекопитающих 409
8.5. Влияние НДЦ на состояние желудочно-кишечного тракта стареющих млекопитающих 415
8.6. НДЦ в терапии возрастного ожирения 425
Литература 429

9. Антибактериальная и антивирусная активность нанокристаллического диоксида церия 435
9.1. Соединения церия в антибактериальной медицине 435
9.2. Антивирусная и антимикробная наномедицина 437
9.3. Антибактериальная активность наночастиц диоксида церия 440
9.4. Антивирусная активность наночастиц диоксида церия 450
Литература 465

Научное издание

Александр Борисович **Щербаков**
Ольга Сергеевна **Иванова**
Николай Яковлевич **Спивак**
Владимир Васильевич **Козик**
Владимир Константинович **Иванов**

СИНТЕЗ И БИОМЕДИЦИНСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОДИСПЕРСНОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Редактор К.В. Полькина
Компьютерная верстка А.И. Лелоюр
Дизайн обложки Л.Д. Кривцовой

Подписано к печати 25.12.2015 г. Формат $60\times84^{1}/_{16}$.
Бумага для офисной техники. Гарнитура Times.
Усл. печ. л. 27,5.
Тираж 250 экз. Заказ № 896.

Отпечатано на оборудовании
Издательского Дома
Томского государственного университета
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36
Тел. 8+(382-2)–53-15-28
Сайт: http://publish.tsu.ru
E-mail: rio.tsu@mail.ru

ISBN 978-5-94621-508-4

