

## РЕГУЛЯЦИЯ РЕДОКС-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Войнаровский В.В., Мартинович Г.Г.

Белорусский государственный университет

ул. Бобруйская, 5, г. Минск, Республика Беларусь; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0631

**Аннотация.** В представленной работе проведен анализ редокс-активности наночастиц диоксида церия (НДЦ) различных размеров и исследована их способность регулировать адаптационные механизмы эритроцитов в присутствии пероксида водорода. Наночастицы диоксида церия различных размеров синтезировали методом гомогенного осаждения в присутствии гексаметилентетрамина при температуре 60°C и различном времени синтеза. Редокс-свойства наночастиц диоксида церия оценивали спектрофлуориметрически на основе изменения скорости окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина пероксидом водорода. Показано, что из трех исследуемых размеров наибольшей стабильностью и агрегационной устойчивостью обладают наиболее крупные наночастицы. Методом электронной сканирующей микроскопии установлено, что данные наночастицы имеют преимущественно сферическую форму средним диаметром 50 нм и не содержат примесных атомов. В результате исследований в бесклеточных растворах обнаружено, что НДЦ проявляют антиоксидантные свойства и снижают скорость окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина пероксидом водорода. Предварительное инкубирование эритроцитов с пероксидом водорода при концентрации 100–300 мкМ позволяет снизить долю гемолизированных клеток при разрушении нитратом серебра. Применение наночастиц диоксида церия приводит к потенцированию защитного эффекта и сдвигу области гормезиса в сторону меньших концентраций пероксида водорода.

**Ключевые слова:** Наночастицы диоксида церия, эритроциты, пероксид водорода, адаптация.

### ВВЕДЕНИЕ

Основными участниками адаптационных механизмов клеток при патологии являются активные формы кислорода (АФК), которые выполняют роль сигнальных посредников при действии стрессовых факторов на организм. Ключевой молекулой группы АФК, осуществляющей передачу внутриклеточных регуляторных сигналов, является пероксид водорода, характеризующийся наибольшим временем жизни [1,2]. Сигналы, передаваемые пероксидом водорода, характеризуются своим концентрационным порогом активации и длительностью. В малых концентрациях пероксид водорода активирует компенсаторно-адаптационные механизмы, повышающие защитную способность клетки. При окислительном стрессе, когда пероксид водорода продуцируется в больших концентрациях, происходит повреждение биомолекул.

В качестве перспективных регуляторов биологических редокс-зависимых механизмов активно исследуются полупроводниковые наночастицы диоксида церия. Механизм действия НДЦ подобен механизму функционирования супероксиддисмутазы и каталазы и базируется на способности полупроводников обмениваться электронами с адсорбированными на их поверхности молекулами [3]. Ранее нами было показано, что пероксид водорода повышает структурную устойчивость эритроцитов при гемолизе наночастицами и нитратом серебра [4]. В настоящей работе исследовано влияние НДЦ на регуляцию адаптационных процессов эритроцитов пероксидом водорода.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали гексагидрат нитрата церия  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Across organics, США), пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  (РУП Белмедпрепараты, Республика Беларусь), 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (Sigma Aldrich), нитрат серебра  $\text{AgNO}_3$  (ЛенРеактив, Россия). Кровь здоровых доноров получали в ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». Эритроциты выделяли путём центрифугирования при 1500 об/мин в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) содержащем 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2,7 мМ  $\text{KCl}$ , 5 мМ D-глюкозы (рН 7,4).

Наночастицы диоксида церия синтезировали методом гомогенного осаждения из раствора нитрата церия (III) с применением гексаметилентетрамина (ГМТА) [5]. Данный метод позволяет получать наночастицы диоксида церия с контролируемым размером и шириной запрещенной зоны. В работе использовали наночастицы трех различных размеров (I, II и III). Для получения наночастиц разных размеров к 10 мМ раствору нитрата церия добавляли ГМТА в концентрации 30 мМ (I), 100 мМ (II) и 400 мМ (III) и инкубировали в течение соответственно 280, 60 и 20 минут при температуре 60°C. Окончание синтеза регистрировали по появлению пика поглощения на длине волны 250 – 300 нм, соответствующего электронному переходу между валентной зоной и зоной проводимости полупроводника [6]. Количественные изменения наночастиц в экспериментах выражали через концентрацию церия, необходимую для их синтеза. Полученные частицы стабилизировали цитратом натрия при

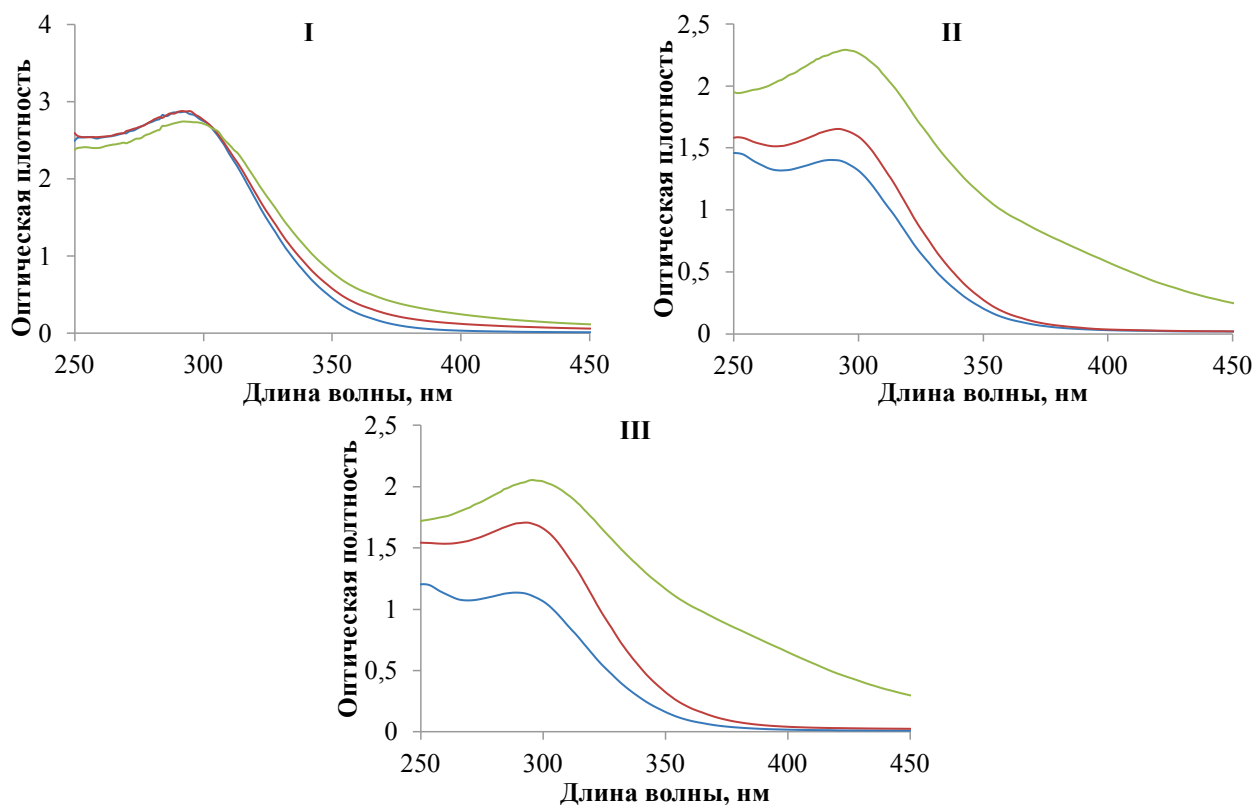
концентрации 10 мМ. Размеры наночастиц определяли с применением сканирующего электронного микроскопа LEO-1455 VP (Oxford Instruments, Германия). Оценка способности наночастиц катализировать разрушение пероксида водорода проводили на основе анализа изменения скорости окисления флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина ( $H_2DCF$ ). Измерение интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF), образующегося при окислении  $H_2DCF$ , проводили при длине волны возбуждения 488 нм и длине волны испускания 530 нм.

Гемолиз инициировали путем добавления нитрата серебра к суспензии эритроцитов. Кинетику гемолиза эритроцитов измеряли путем регистрации оптической плотности клеточной суспензии (30 млн./мл) на длине волны 680 нм при температуре 37°C. По окончании гемолиза, через 20 минут, измеряли спектры поглощения гемолизата. Изменение количества клеток оценивали по изменению оптической плотности суспензии эритроцитов на длине волны 680 нм. Для определения защитного эффекта клетки инкубировались с пероксидом водорода в течение 10 мин до введения гемолизирующего фактора. Защитный эффект определяли по уменьшению доли негемолизированных эритроцитов ( $N/N_0$ ; где  $N_0$  – начальное количество эритроцитов в суспензии,  $N$  – количество клеток после гемолиза) в присутствии окислителя. Результаты представлены как средние значения плюс–минус стандартное отклонение среднего для трёх–пяти независимых экспериментов. Достоверность значений определяли с помощью t-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований показано, что наночастицы (I), по сравнению с наночастицами (II) и (III), обладают наибольшей стабильностью. Спектры поглощения наночастиц (I) после синтеза и спустя 24 часа не различаются (рис. 1). Для наночастиц (II) и (III) после взаимодействия с пероксидом водорода наблюдается смещение спектра поглощения в сторону больших длин волн, что говорит об изменении внутренней электронной структуры. Увеличение доли трёхвалентных атомов церия внутренней структуры НДЦ может приводить к уменьшению ширины запрещённой зоны, что снижает энергию необходимую для перехода электрона в зону проводимости и изменяет спектр поглощения [7].

Методом электронной сканирующей микроскопии установлено, что наночастицы (I) имеют преимущественно сферическую форму средним диаметром 50 нм (рис. 2а), наночастицы (II) и (III) имеют меньшие размеры. На основе энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии показано, что НДЦ не содержат примесных атомов. На рисунке 2б представлен рентгеновский спектр выделенной области, содержащей наночастицы, и доля содержащихся в области атомов церия и кислорода в зависимости от положения.



**Рисунок 1.** Спектры поглощения раствора наночастиц I, II и III: после синтеза (синий), спустя 24 часа (красный), после взаимодействия с пероксидом водорода (зелёный)

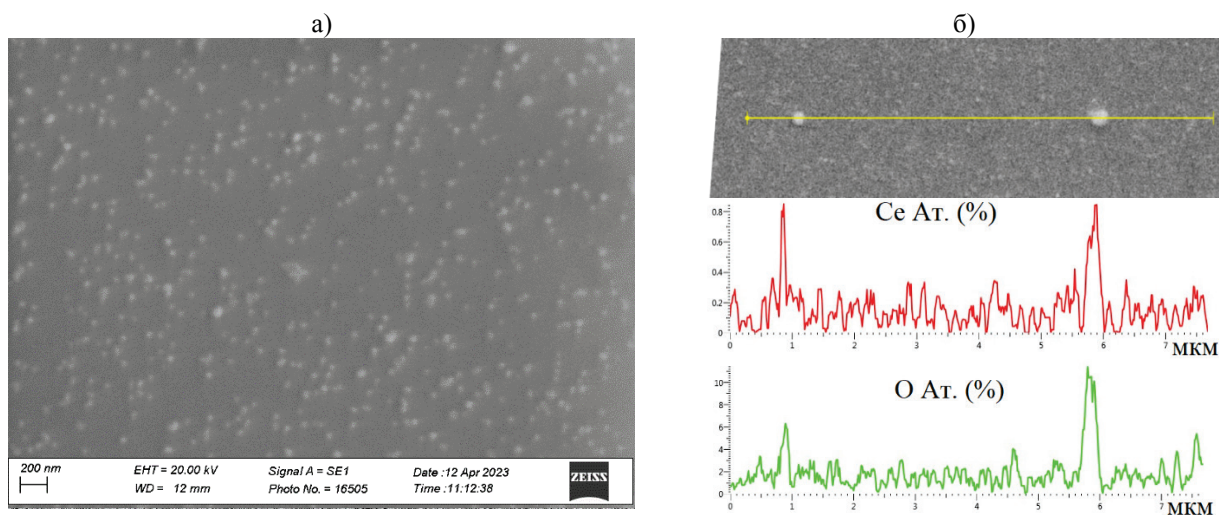


Рисунок 2. Изображение НДЦ (I), полученные методом сканирующей электронной микроскопии (а), и энергия эмиссии рентгеновского спектра соответствующего атомам церия и кислорода вдоль выделенной линии (б)

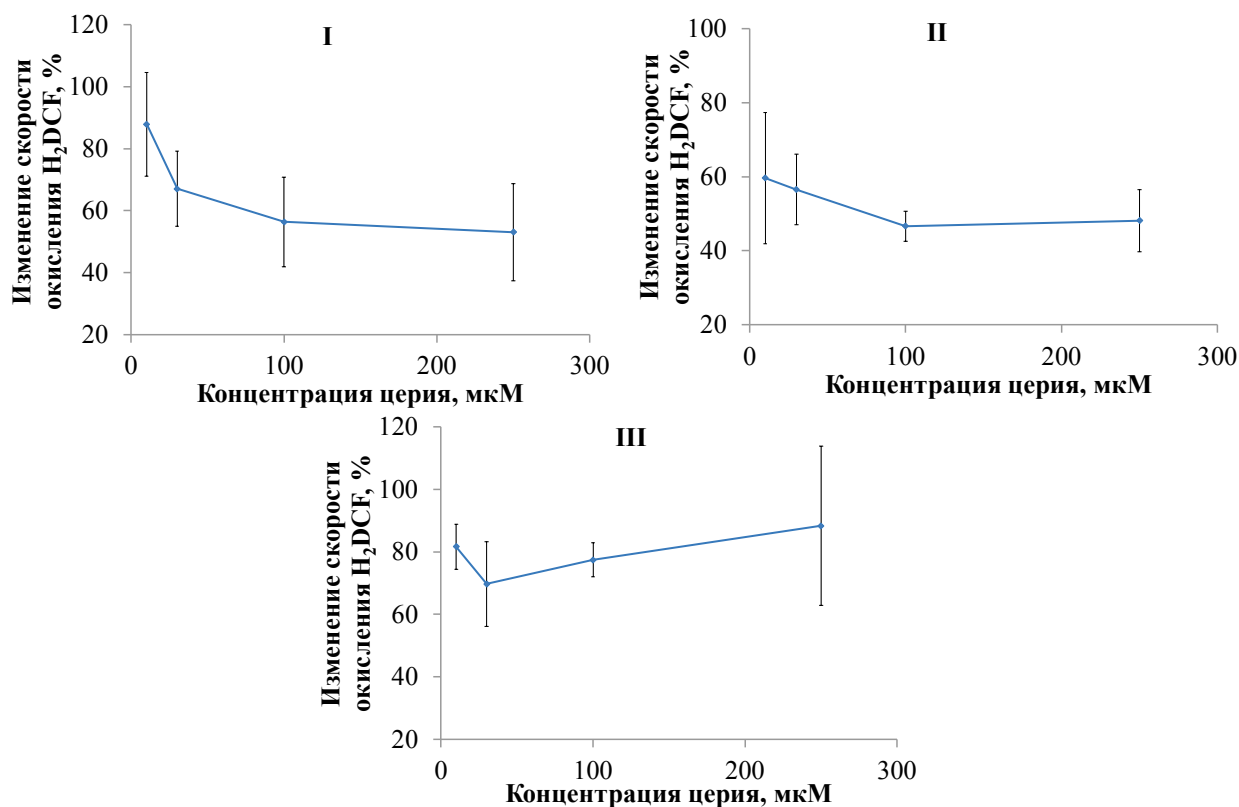
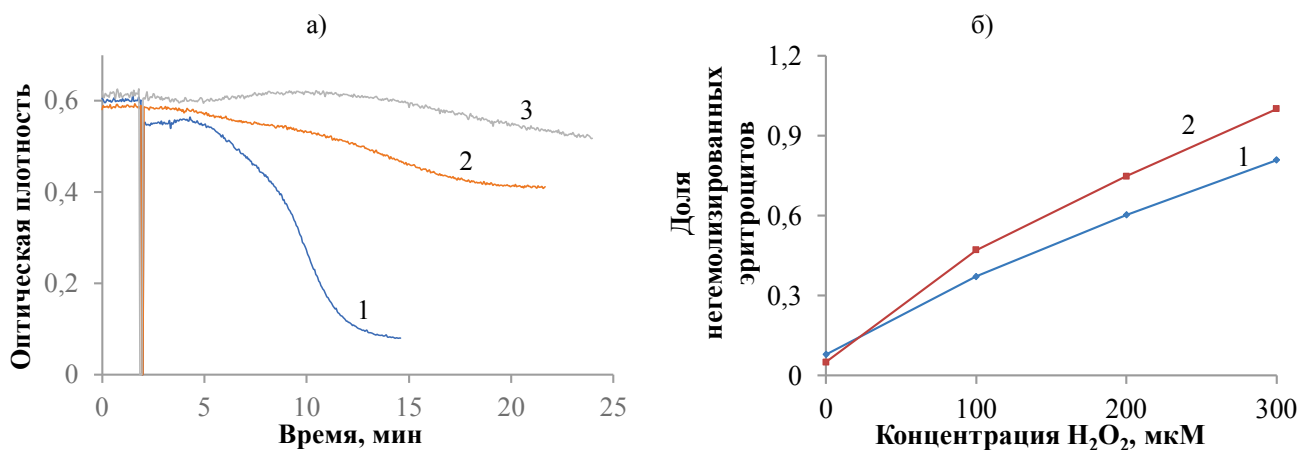


Рисунок 3. Зависимость изменения скорости окисления H<sub>2</sub>DCF пероксидом водорода от концентрации церия

Редокс-свойства наночастиц диоксида церия оценены на основе изменения скорости окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (H<sub>2</sub>DCF) пероксидом водорода в бесклеточных растворах. В результате исследований обнаружено, что НДЦ проявляют антиоксидантные свойства и снижают скорость окисления H<sub>2</sub>DCF. На рисунке 3 представлены зависимости изменений скоростей окисления зонда в присутствии наночастиц (I), (II) и (III) от концентрации диоксида церия. Наибольшей способностью при разрушении пероксида водорода обладают наночастицы (I) и (II), для которых величина скорости окисления зонда снижалась на 50% от скорости в отсутствие НДЦ при концентрации церия 100 мкМ. Для наночастиц (III) скорость окисления зонда уменьшалась на 30% от исходной при той же концентрации церия.

В экспериментах с эритроцитами НДЦ не изменяли скорости гемолиза клеток, индуцированного нитратом серебра. С другой стороны, предварительное инкубирование клеток с пероксидом водорода приводило к снижению доли гемолизированных клеток. На рисунке 4а представлены кинетики гемолиза эритроцитов нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода (300 мкМ) и наночастицами (I).



**Рисунок 4.** Кинетические кривые гемолiza эритроцитов нитратом серебра при предварительном инкубировании с пероксидом водорода и наночастицами (1) (1 – контроль, 2 – 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 – 300 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 5 мкМ НДЦ) и зависимости изменения доли негемолизированных клеток при различной концентрации пероксида водорода без НДЦ и в присутствии наночастиц (1 – контроль, 2 – в присутствии НДЦ) (б)

На рисунке 4б показаны зависимости изменения доли негемолизированных клеток при различной концентрации пероксида водорода без НДЦ и в присутствии наночастиц. Как видно из представленных данных применение НДЦ приводит к потенцированию защитного эффекта и сдвигу области гормезиса в сторону меньших концентраций пероксида водорода.

Ранее нами было показано, что обратимое связывание метгемоглобина с мембраной является адаптивным механизмом, направленным на стабилизацию эритроцитарной мембраны при действии пероксида водорода [8]. Вероятно, в результате действия НДЦ изменяется метаболизм пероксида водорода и количество метгемоглобина доступного для связывания с мембраной, что и обуславливает смещение области гормезиса при действии пероксида водорода.

#### Список литературы / References:

1. Мартинович Г.Г. *Активные формы кислорода в регуляции функций и свойств клеток: явления и механизмы*. Минск: БГУ, 2021, 239 с. [Martinovich G.G. *Reactive oxygen species in the regulation of cell functions and properties: phenomena and mechanisms*. Minsk: BSU, 2021, 239 p. (In Russ.).]
2. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2020, vol. 21, no. 3, pp. 1-21, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
3. Huang Y., Jinsong R., Xiaogang Q. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chem Rev*, 2019, vol. 119, no. 6, pp. 4357-4412, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00672.
4. Voinarovski V.V., Martinovich G.G. Protective effect of hydrogen peroxide during erythrocyte hemolysis by silver nanoparticles. *Biophysics*, 2022, vol. 67, no. 5, pp. 734-743, doi: 10.1134/S0006350922050220.
5. Щербаков А.Б., Иванова О.С., Спивак Н.Я., Козик В.В., Иванов В.К. *Синтез и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия*. Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2016, 474 с. [Scherbakov A.B., Ivanova O.S., Spivak N.J., Kozik V.V. *Synthesis and biomedical applications of nanosized cerium dioxide*. Tomsk: Publishing house of tomsk state university, 2016, 474 p. (In Russ.).]
6. Стрельцов Е.А., *Электрохимия полупроводников*. Минск: БГУ, 2012, 159 с. [Strelcov E.A. *Electrochemistry of semiconductors*. Minsk: BSU, 2012, 159 p. (In Russ.).]
7. Younis A., Chu D., Li S. Cerium Oxide Nanostructures and their Applications, *Functionalized Nanomaterials*, 2016, vol. 3, pp. 53-68, doi: 10.5772/65937.
8. Voinarovski V.V., Martinovich G.G. Regulation of the structural stability of erythrocytes by hydrogen peroxide: mathematical model and experiment. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. A.*, 2022. vol. 16, no. 1, pp. 91-105, doi: 10.1134/S1990747822010093.

**REGULATION OF THE REDOX-DEPENDENT MECHANISM OF ERYTHROCYTE ADAPTATION BY CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES****Voinarovski V.V., Martinovich G.G.**

Belarusian State University

*Bobruiskaya str. 5, Minsk, Republic of Belarus; e-mail: voynarovskiy197@mail.ru*

Received 28.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0631

**Abstract.** In the present work, were analyzed the redox activity of cerium dioxide (CDC) nanoparticles of various sizes and studied their ability to regulate the adaptive mechanisms of erythrocytes in the presence of hydrogen peroxide. Cerium dioxide nanoparticles of various sizes were synthesized by homogeneous precipitation in the presence of hexamethylenetetramine at a temperature of 60°C and various synthesis times. The redox properties of cerium dioxide nanoparticles were evaluated spectrofluorimetrically based on the change in the rate of oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein with hydrogen peroxide. It was shown that of the three sizes studied, the largest nanoparticles have the highest stability and aggregation resistance. Using the method of scanning electron microscopy, it was found that these nanoparticles have a predominantly spherical shape with an average diameter of 50 nm and do not contain impurity atoms. As a result of studies in cell-free solutions, it was found that NDC exhibit antioxidant properties and reduce the rate of oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by hydrogen peroxide. Preliminary incubation of erythrocytes with hydrogen peroxide at a concentration of 100–300 µM makes it possible to reduce the proportion of hemolyzed cells upon destruction by silver nitrate. The use of cerium dioxide nanoparticles leads to a potentiation of the protective effect and a shift in the hormesis region towards lower concentrations of hydrogen peroxide.

**Key words:** *Cerium dioxide nanoparticles, erythrocytes, hydrogen peroxide, adaptation*