

## БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕОРГАНИЧЕСКИХ И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 546.655.4-31

DOI: 10.17223/24135542/8/6

А.Л. Попов<sup>1</sup>, О.Г. Татарникова<sup>2</sup>, Т.О. Шекунова<sup>1</sup>, Н.Р. Попова<sup>1</sup>,  
А.Е. Баранчиков<sup>3</sup>, В.К. Иванов<sup>3,4</sup>, В.В. Козик<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пущино, Россия)

<sup>2</sup> Институт биофизики клетки РАН (г. Пущино, Россия)

<sup>3</sup> Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова (г. Москва, Россия)

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет (г. Томск, Россия)

### Исследование воздействия нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием ( $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$ ), на функциональное состояние и жизнеспособность клеток линии NCTC clone L929

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы  
№ 15-34-70019 «мол\_а\_мос» и гранта РФФИ № 16-34-60248 мол\_а\_дк.

*Впервые проанализированы коллоидная стабильность наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  в различных биологических средах и их влияние на функциональное состояние мышечных фибробластов линии NCTC clone L929. Определена локализация наночастиц в клетках. В широком диапазоне концентраций  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  не проявляет цитотоксичности и не вызывает увеличения уровня активных форм кислорода в клетках. При концентрациях  $10^{-4}$  М  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  снижает уровень дегидрогеназной активности, что, однако, не приводит к гибели клеток.*

**Ключевые слова:** нанокристаллический диоксид церия; гадолиний; цитотоксичность; активные формы кислорода; МТТ-тест.

### Введение

Диоксид церия находит широкое применение во многих промышленных приложениях, в том числе в составе абразивов [1], катализаторов [2] и топливных элементов [3]. Высокий уровень кислородной нестехиометрии и связанная с этим редокс-активность, а также низкая токсичность и биосовместимость делают нанокристаллический диоксид церия весьма перспективным материалом и для биомедицинских приложений. Показано, что наночастицы диоксида церия обладают антиоксидантными [4], кардиопротекторными [5], гепатопротекторными [6], геропротекторными [7], генопротекторными [8], радиопротекторными [9] свойствами, способны

выступать в качестве эффективных УФ-фильтров [10] и стимулировать пролиферацию клеток *in vitro* [11–12]. Допирование диоксида церия различными металлами, в частности гадолинием, приводит к изменению физико-химических характеристик наночастиц и придает им новые функциональные свойства. Как известно, ион  $Gd^{3+}$  имеет 7 неспаренных электронов ( $^8S_{7/2}$ ) и обладает высоким магнитным моментом (7,94  $\mu B$ ), что позволяет использовать гадолинийсодержащие соединения в качестве контрастирующих агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Оксид гадолиния в нанокристаллическом состоянии является одним из перспективных контрастирующих агентов для МРТ, поскольку он характеризуется более высоким значением констант продольной релаксации по сравнению с хелатными комплексами  $Gd^{3+}$  [13]. Следует отметить, что оксид гадолиния существенно менее токсичен, чем соли гадолиния [14–15]. Допирование диоксида церия ионами  $Gd^{3+}$  позволяет повысить его кислородную нестехиометрию [16], а следовательно, и антиоксидантную активность, что открывает новые направления использования данного соединения в биомедицинских целях. В связи с этим возникает необходимость комплексного исследования влияния диоксида церия, допированного гадолинием, на функциональное состояние и жизнеспособность клеток. В настоящей работе было впервые проведено исследование влияния стабилизированных водных золей наночастиц  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  на функциональное состояние мышинных фибробластов линии NCTC clone L929.

### **Экспериментальная часть**

Синтез золя  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  ( $x = 0,2$ ) был выполнен по методике, описанной ранее [17], включающей дополнительную стабилизацию цитратом аммония. Для очистки от примесей 1 мл золя (0,01 М) смешали с 2 мл изопропилового спирта (70%) и нагревали в течение 30 мин при температуре  $\sim 80^\circ C$  при перемешивании. Далее раствор центрифугировали при 9 000  $g$  в течение 10 мин при  $20^\circ C$  и полученный осадок редиспергировали в 500 мкл изопропилового спирта (99,9%). Эту процедуру повторили трижды. Полученный осадок высушили в сушильном шкафу при  $50^\circ C$ , а затем редиспергировали в 500 мкл деионизованной воды. Золь довели до pH 7.2 10%-ным водным раствором аммиака.

Определение гидродинамического диаметра наночастиц в золях проводили методом динамического светорассеяния на анализаторе N5 Submicron Particle Size Analyser «Beckman Coulter». Оценку проводили для дисперсий на основе деионизованной воды, культуральной среды F12 (HEPES) и культуральной среды F12 (HEPES), содержащей 5%-ную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС).  $\zeta$ -потенциал золей измеряли с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK).

Спектры поглощения водного золя наночастиц  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  регистрировали с использованием УФ-спектрофотометра Lambda-45 (Perkin Elmer, USA).

Анализ цитотоксичности проводили на линии клеток из коллекции клеточных культур Института биофизики клетки РАН: NCTC clone L929 – фибробласты, полученные из клеток подкожной соединительной ткани мышей C3H/An (Flow Laboratories, Великобритания, J. Nat.Cancer Inst. 1948, 9, 229). Клетки высевали в 96-луночные планшеты в плотности 20 тыс/см<sup>2</sup> в среде ДЕМЕМ/F12 (1:1) с добавлением 5%-ной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина и культивировали в условиях 5%-ной СО<sub>2</sub> и температуре 37°C.

Уровень дегидрогеназной активности клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 и 72 ч в атмосфере, содержащей 5% СО<sub>2</sub> при 37°C. Через 6 ч после посева клеток среда заменялась на среду, содержащую наночастицы Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> в концентрациях 10<sup>-4</sup>–10<sup>-9</sup> М. В качестве контроля использовали клетки со средой, но без добавления Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub>. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с клетками, в которые вносили 10% ДМСО (10 мкл). Через 24 и 72 ч после внесения наночастиц Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> среду во всех лунках заменяли на среду, содержащую 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразол (5 мкг/мл), а затем проводили МТТ-тест по стандартной методике [18]. Оптическую плотность определяли на длине волны  $\lambda = 540$  нм с использованием фотокolorиметра «BIO-RAD model 680».

Концентрацию свободной лактатдегидрогеназы, которая обнаруживается в культуральной среде в случае повреждения клеточной мембраны, оценивали колориметрически. Клетки высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч в атмосфере, содержащей 5% СО<sub>2</sub> при 37°C. Через 6 ч после посева клеток среду заменяли на среду, содержащую наночастицы Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> в концентрациях 10<sup>-4</sup>–10<sup>-9</sup> М. В качестве положительного контроля использовали клетки со средой, но без добавления Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub>. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с клетками, в которые вносили Тритон X-100 (10 мкл). Через 24 ч после внесения наночастиц Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> определяли уровень лактатдегидрогеназы в культуральной среде в соответствии с протоколом производителя (The Thermo Scientific™ Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit). Оптическую плотность растворов определяли на длине волны  $\lambda = 490$  нм и  $\lambda = 640$  нм с использованием фотокolorиметра Microplate Reader Thermo Multiskan Ascent 96 & 384 (Thermo Fisher Scientific, United Kingdom).

Анализ уровня АФК проводили с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата – красителя, который диффундирует через липидную мембрану в клетку и впоследствии окисляется внутриклеточными АФК, образуя сильнофлуоресцирующий дихлорфлуоресцеин. Клетки предынкубировали с наночастицами Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> в различных концентрациях в течение 24 ч в 96-луночном планшете, после чего среду заменяли на раствор Хэнкса, содержащий 2,7-DCFH-DA (100 мкМ) (Sigma, USA). В качестве отрицательного контроля использовали 1 мМ раствор перекиси водорода (Sigma, USA). Анализ проводили по окрашиванию клеток специфическим флуо-

ресцентным красителем дигидроэтидиумом (60 мкМ) (Sigma, USA). Интенсивность флуоресценции детектировали с использованием планшетного ридера FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH (Offenburg, Germany) при 485 нм/520 нм для 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетата и 370 нм/420 нм для дигидроэтидиума.

Конфокальную микроскопию проводили с использованием микроскопа LSM 510 META (Zeiss, Германия). Клетки высевали в чашки Петри  $\mu$ -35 mm (Ibidi, Germany) при плотности 25 тыс/см<sup>2</sup>. Через 24 ч после посева в культуру клеток вносили золь наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  в концентрации  $10^{-6}$  М путем замены культуральной среды. После 6 ч инкубации клеток с наночастицами проводили микрофотосъемку, перед этим трижды промыв клетки фосфатно-солевым буфером.

Для оценки соотношения живых и мертвых клеток в культуре использовали набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen), содержащий красители SYTO 9 (окрашивает все клетки,  $\lambda = 485/498$  нм), и пропидий йодид (окрашивает ядра мертвых клеток,  $\lambda = 535/617$  нм). Окраску клеток осуществляли путем замены культуральной среды DMEM/F12 с 5% ЭТС на среду, содержащую смесь красителей в концентрации 1 мкл/мл. Наблюдение за морфологией и флуоресцентной окраской проводили на инвертированном микроскопе LSM-510 (Carl Zeiss). Микрофотосъемку осуществляли с использованием цифрового фотоаппарата Power Shot A620 (Canon). Подсчет окрашенных клеток проводили с использованием программы Image J.

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики. Определяли среднее значение величин и среднеквадратичное отклонение от среднего значения. Достоверность различий между группами оценивали по *U*-критерию Манна–Уитни.

## **Результаты и обсуждение**

Перспективы использования наночастиц диоксида церия в биомедицинских приложениях определяются его особыми физико-химическими характеристиками, в первую очередь высоким уровнем кислородной нестехиометрии, что обуславливает активность данного соединения в окислительно-восстановительных реакциях в клетке [19]. При этом, в отличие от классических антиоксидантов, наночастицы диоксида церия через определенный промежуток времени после взаимодействия с субстратом способны восстанавливать степень своей кислородной нестехиометрии, что позволяет им многократно участвовать во внутриклеточных редокс-процессах, инактивируя широкий спектр свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) [20, 21].

Редокс-активность наночастиц  $\text{CeO}_2$  определяется многочисленными факторами: методом синтеза, природой использованных прекурсоров и поверхностно-активных веществ и т.д. Существует ряд работ, демонстрирующих в определенных условиях токсические эффекты наночастиц диок-

сида церия в моделях *in vitro* и *in vivo*, что связывает с их способностью генерировать АФК [22, 23]. Поведение  $\text{CeO}_2$  в живых системах определяется такими физико-химическими характеристиками, как размер частиц, заряд их поверхности, присутствие на поверхности тех или иных лигандов [24]. В частности, взаимодействие наночастиц диоксида церия с компонентами культуральной среды может кардинально влиять на процессы проникновения частиц в клетку и дальнейшие биологические эффекты внутри клетки [25].

Из-за своего небольшого размера наночастицы имеют высокое соотношение поверхности к объему, что придает им большую адсорбционную емкость в отношении молекул, таких как аминокислоты, белки, сахара, присутствующих в биологических средах. Вполне возможно, что взаимодействие с этими молекулами может блокировать участки на поверхности наночастиц. Как показали Сингх и соавт. [26], каталитическая активность наночастиц диоксида церия сильно зависит от состава культуральной среды или используемых буферов. Так, использование фосфатного буфера для диспергирования наночастиц диоксида церия приводит к значительному снижению СОД-миметической активности и дозозависимому возрастанию каталазоподобной активности наночастиц диоксида церия. При этом использование сульфатных и карбонатных буферов не оказывает влияния на энзимоподобную активность наночастиц диоксида церия.

Из-за большого соотношения площади поверхности к объему наночастицы склонны к агрегации, особенно в биологических средах. Это нередко приводит к изменению физико-химических характеристик и биологической активности наночастиц. Для оценки влияния состава среды на коллоидно-химические характеристики зольей (гидродинамический диаметр, распределение по размерам и агрегативная устойчивость) в настоящей работе были приготовлены суспензии наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  в деионизованной воде, культуральной среде F12, а также в культуральной среде F12, содержащей 5%-ную эмбриональную телячью сыворотку. Было установлено, что в деионизованной воде (рН 7.2) гидродинамический диаметр частиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  составляет 3,2 нм (88,9% в пробе) и 11,1 нм (6,4% в пробе).  $\zeta$ -потенциал зольей  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  составил около  $-55$  мВ (рис. 1, з), что указывает на их высокую стабильность. Использование в качестве растворителя культуральной среды F-12 приводит к некоторому увеличению гидродинамического диаметра частиц (до  $\sim 6-7$  нм), а также к появлению в пробе небольшого количества агрегатов размером от 45 до 60 нм, при этом их процентное содержание весьма незначительно: 1–2% (рис. 1, а–в).

Альбумин, являющийся основным белковым компонентом сыворотки, предположительно адсорбируется на поверхности наночастиц диоксида церия и формирует так называемую «белковую корону». Другие компоненты культуральной среды также вносят свой вклад в агрегативную устойчивость наночастиц допированного диоксида церия.

МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий) тест использовали для анализа жизнеспособности клеточной линии NCTC clone L929

в присутствии наночастиц  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$ . Данный анализ основан на восстановлении в живых клетках митохондриальными дегидрогеназами растворимого желтого тетразолия с образованием нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана. Таким образом, скорость образования кристаллов формазана прямо пропорциональна числу жизнеспособных клеток.

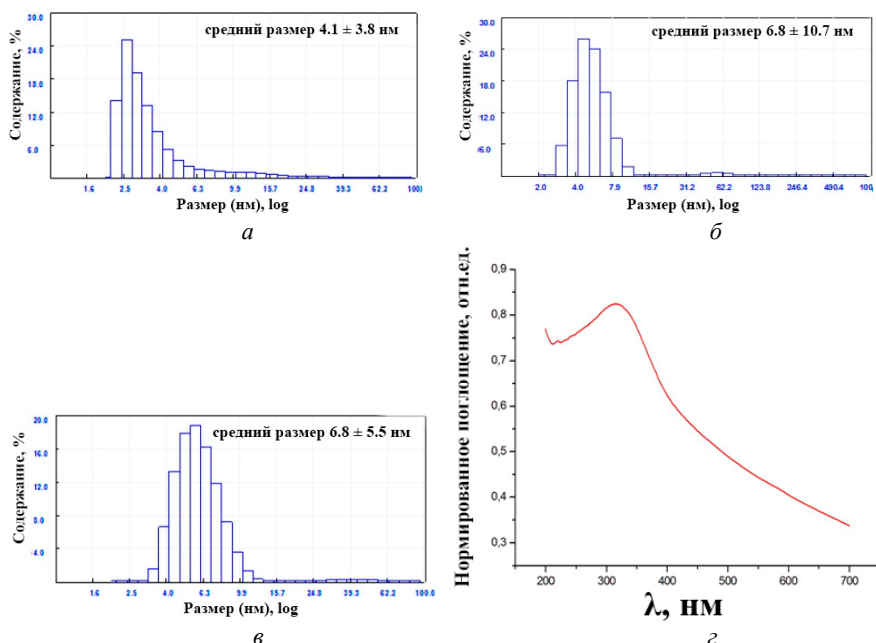


Рис. 1. Распределения частиц по размерам (а, б, в) и спектр поглощения в УФ-видимой области (г) для золя наночастиц  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  (0,001 M): (а) в  $H_2O$  MQ (pH = 7.2), (б) в среде F12 (HEPES), (в) в среде F12 (HEPES) + 5% FBS

Нами показано, что наночастицы допированного диоксида церия в диапазоне концентраций  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  M незначительно снижают уровень дегидрогеназной активности клеток после 24 ч культивирования, при этом максимальная концентрация ( $10^{-4}$  M) приводит к достоверному 20%-ному снижению уровня дегидрогеназной активности по результатам МТТ-теста. Отметим, что многочисленные публикации [27, 28] свидетельствуют о том, что позитивное воздействие на живые системы оказывают малые (микро- и наномолярные) концентрации наночастиц диоксида церия.

Из рис. 2, б видно, что инкубация клеток с наночастицами  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  в течение 72 ч только в концентрации  $10^{-4}$  M приводит к достоверному снижению уровня дегидрогеназной активности по сравнению с контролем. Это показывает, что наночастицы  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  в высоких концентрациях ( $10^{-4}$  M) при длительном культивировании способны вызывать некоторые токсические эффекты и влиять на внутриклеточный метаболизм. Цитотоксический эффект при высоких концентрациях может быть связан с агрега-

цией наночастиц в крупные агломераты. Можно также выдвинуть предположение о том, что снижение митохондриальной метаболической активности связано с разобщением дыхательной цепи и нарушением ее функционирования. Вместе с тем не происходит нарушения целостности митохондриальной мембраны и падения уровня митохондриального потенциала, что подтверждается отсутствием апоптотических процессов в клетке. При этом более низкие концентрации наночастиц ( $10^{-6}$ – $10^{-9}$  М) не вызывают токсического эффекта, а напротив, обладают стимулирующим эффектом, что подтверждается увеличением количества клеток при анализе ростовой кривой (рис. 2, в).

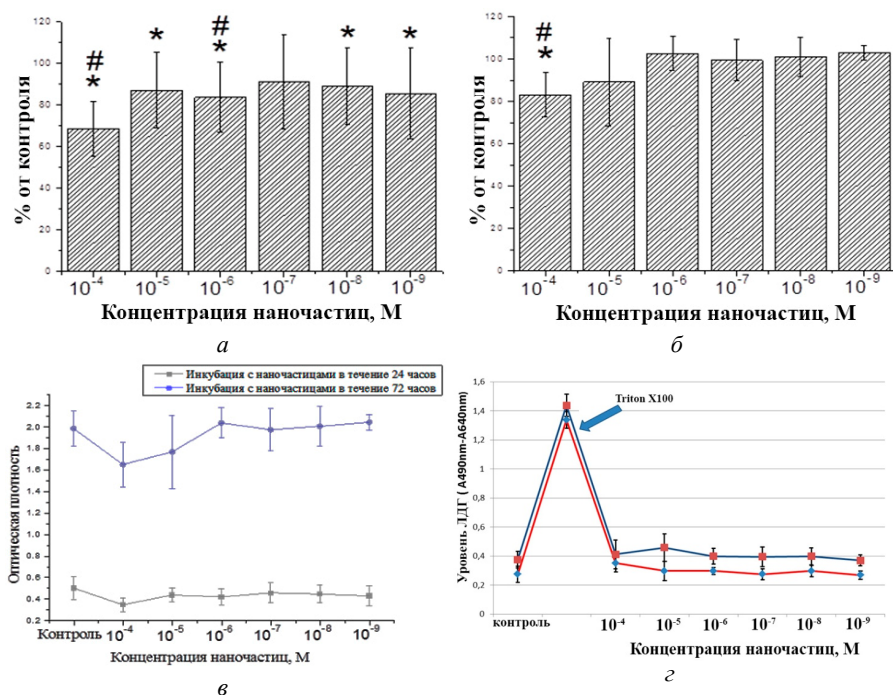


Рис. 2. Зависимость количества жизнеспособных клеток NCTC clone L 929 (в % от контроля) в МТТ-тесте от концентраций наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М) через 24 ч (а) и 72 ч (б) после добавления наночастиц; в – зависимость оптической плотности клеток линии NCTC clone L 929 в МТТ-тесте от концентраций наночастиц ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М) через 24 и 72 ч после добавления наночастиц; г – уровень лактатдегидрогеназы через 24 (красный цвет) и 72 (синий цвет) ч инкубации с наночастицами  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М). (\* – статистически достоверные различия по *t*-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ); # – статистически достоверные различия по *U*-критерию Манна–Уитни ( $p < 0,05$ ))

Дополнительные исследования показали, что культивирование клеток с наночастицами  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  во всем диапазоне исследованных концентраций ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М) не приводит к увеличению уровня лактатдегидрогеназы

в культуральной среде (см. рис. 2, з), что подтверждает отсутствие нарушений целостности клеточных мембран.

Высокие уровни дегидрогеназной активности и увеличение количества клеток в лунках, содержащих наночастицы  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$ , подтверждают более активную пролиферацию клеток, что может быть связано с косвенным влиянием наночастиц диоксида церия на внутриклеточные сигнальные пути. Действительно, недавние публикации показывают, что наночастицы диоксида церия способны ускорять пролиферацию клеток в культуре. Предположительно, один из механизмов, лежащих в основе стимуляции пролиферативной активности, заключается в способности наночастиц диоксида церия выступать в качестве эффективного антиоксиданта и снижать базовый уровень АФК в клетке.

Хорошо известно, что высокий уровень АФК в процессе клеточного роста препятствует активной пролиферации клеток [29]. При этом нестехиометричный диоксид церия способен регулировать уровень АФК, стимулируя пролиферативную функцию, что может быть использовано в разработке технологий эффективного культивирования МСК для клеточной терапии. С другой стороны, имеются сведения, подтверждающие способность наночастиц диоксида церия эффективно адсорбировать ионы  $\text{Ca}^{2+}$  [30].

$\text{Ca}^{2+}$  является важным элементом внутриклеточных сигнальных путей, а также определяет активность некоторых ферментативных систем, и поэтому уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  очень жестко регулируется внутриклеточными органоидами. В нормальных здоровых клетках концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме остается очень низкой. Приток  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточных источников и/или его высвобождение из эндоплазматического ретикулума имеют значительные физиологические эффекты. Показано, что активация кальпаина, кальций-зависимой цистеиновой протеазы, может происходить при попадании в цитоплазму наночастиц диоксида церия.

Существуют два предположения о возможных механизмах адсорбции ионов кальция на наночастицах  $\text{CeO}_2$ : первый механизм связан с непосредственной адсорбцией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на поверхности наночастиц, второй – с адсорбцией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  на сывороточном альбумине, являющемся кальций-связывающим белком. Известно, что наночастицы диоксида церия активно адсорбируют на своей поверхности сывороточный альбумин [31], поэтому действительно способны вносить ионы  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазму клетки, тем самым активируя кальций-зависимые киназы и запуская некоторые внутриклеточные процессы.

Для оценки соотношения количества мертвых и живых клеток в культуре использовали метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания (рис. 3, табл. 1), используя набор L-7007 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen). Метод дифференцированного флуоресцентного окрашивания основан на мониторинге жизнеспособных клеток в зависимости от целостности их мембраны. Краситель SYTO 9 окрашивает все клетки в культуре (зеленое окрашивание), в то время как нарушение целостности мембраны обеспечивает ее проницаемость для селективного ДНК-красителя пропидия иодида (красное окрашивание ядра).



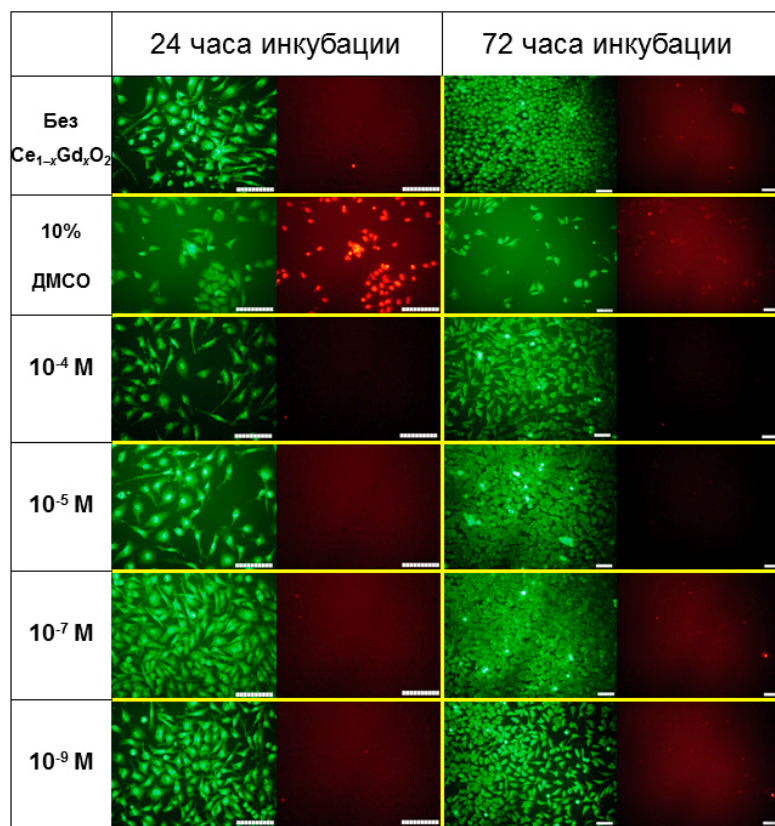


Рис. 3. Микрофотографии клеток линии NCTC clone L929 при культивировании с различными концентрациями наночастиц  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М) в течение 24 и 72 ч. Флуоресцентное окрашивание набором L-7007 LIVE/DEAD

**Результаты подсчета количества мертвых клеток (положительно окрашенных на пропидий иодид) по микрофотографиям**

Показатель	Общее кол-во клеток		Количество мертвых		Процентное соотношение мертвых клеток	
	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч
Контроль	1 000	1 000	28	39	2,8	3,9
ДМСО	1 100	1 100	1012	—*	92	—*
$10^{-4}$ М	1 000	1 000	29	36	2,9	3,6
$10^{-5}$ М	1 000	1 000	26	32	2,6	3,2
$10^{-7}$ М	1 200	1 100	27	37	2,7	3,7
$10^{-9}$ М	1 200	1 200	24	35	2,4	3,5

\* Структуры клеток разрушены и лизированы. Отсутствие яркой структурированной окраски ядер не позволяет произвести точный подсчет количества мертвых клеток.

Показано, что обработка клеток 10%-ным ДМСО в качестве положительного контроля приводит к 100%-ной гибели клеток через 24 ч инкубации, при этом через 72 ч инкубации интенсивность окрашивания ядер зна-

чительно снижается, это связано с тем, что структуры клетки к этому моменту полностью лизированы и разрушены. Наночастицы  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  во всем диапазоне исследованных концентраций не вызывают появления клеток, окрашенных пропидий иодидом; аналогичный результат наблюдается для лунок, в которые не вносили наночастицы допированного диоксида церия. Подсчет количества живых/мертвых клеток показал отсутствие цитотоксического эффекта наночастиц диоксида церия, допированного гадолинием, во всем диапазоне исследованных концентраций ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М).

Одним из основных видов цитотоксического действия наноматериалов является их способность индуцировать развитие окислительного стресса в клетке [32]. Физико-химические свойства наночастиц, включая размер, форму, структуру, заряд поверхности, являются ключевыми факторами, определяющими способность генерировать АФК и свободные радикалы, вызывая повреждение внутриклеточных структур клетки [33]. Механизмы токсического действия наночастиц включают в себя прямую генерацию активных форм кислорода и свободных радикалов (в основном по механизму реакции Фентона) или же косвенную, через нарушение нормального функционирования митохондриального комплекса и разобщение дыхательной цепи. При этом активные формы кислорода также играют важную роль во многих физиологических процессах в клетке, которые включают в себя внутриклеточную передачу сигналов, экспрессию генов и регуляцию активности белков. Изменение концентрации внутриклеточных АФК способно активировать редокс-чувствительные транскрипционные факторы, такие как NRF2 или NFκB, что приводит к развитию каскада киназных реакций и активации экспрессии большого количества генов [34].

Нами проведено исследование уровней внутриклеточных активных форм кислорода и свободных радикалов при культивировании клеток с наночастицами допированного диоксида церия. Показано, что в диапазоне использованных концентраций ( $10^{-5}$ – $10^{-9}$  М) наночастицы  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  не вызывают повышение уровней внутриклеточных АФК (рис. 4) и супероксид-анион радикала (рис. 5). Эти данные согласуются с результатами оценки уровня лактатдегидрогеназы при инкубации с наночастицами диоксида церия (см. рис. 2, з). Низкие значения уровней АФК и лактатдегидрогеназы, а также отсутствие положительно окрашенных на пропидий иодид клеток подтверждают, что наночастицы  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  не участвуют в процессах перекисного окисления липидов, не вызывают повреждений мембран клеток и не приводят к развитию апоптотических процессов в клетке.

Методом конфокальной микроскопии показано, что наночастицы диоксида церия проникают в клетку, при этом подтверждена их цитоплазматическая и лизосомальная локализация (рис. 6). Показано, что наночастицы не проникают в ядро, что подтверждает отсутствие генотоксического эффекта и способности вызывать повреждения ДНК.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало, что наночастицы диоксида церия, допированного гадолинием, проникают в клетку и имеют цитоплазматическую и лизосомальную локализацию.

Культивирование клеток линии NCTC clone с наночастицами  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  в диапазоне концентраций  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  М не приводит к увеличению доли мертвых клеток и уровня лактатдегидрогеназы по сравнению с контролем, что свидетельствует об отсутствии цитотоксического действия. Отклонение результата МТТ-теста при концентрации  $10^{-4}$  М не является критическим, так как это не приводит к увеличению количества мертвых клеток или развитию апоптотических процессов в культуре.

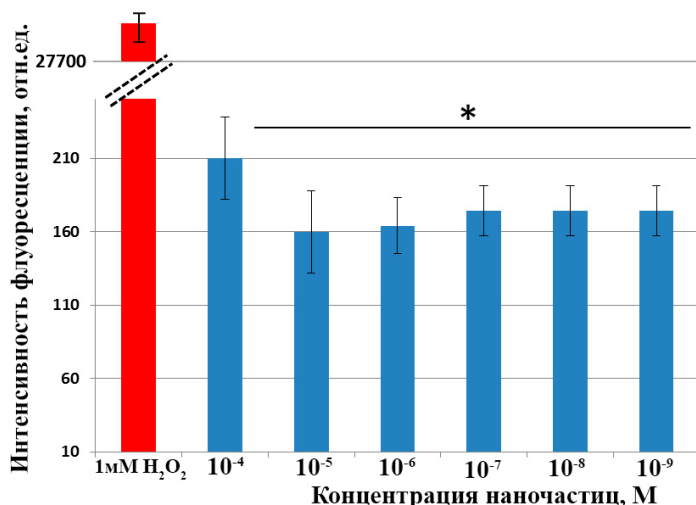


Рис. 4. Уровень внутриклеточных АФК в культуре клеток линии NCTC clone L929 при культивировании с различными концентрациями наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М). Окрашивание 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетатом. Клетки культивировали с наночастицами в течение 24 ч. 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  – положительный контроль.  
\* Достоверные различия с контролем по U-критерию Манна–Уитни,  $p < 0,05$

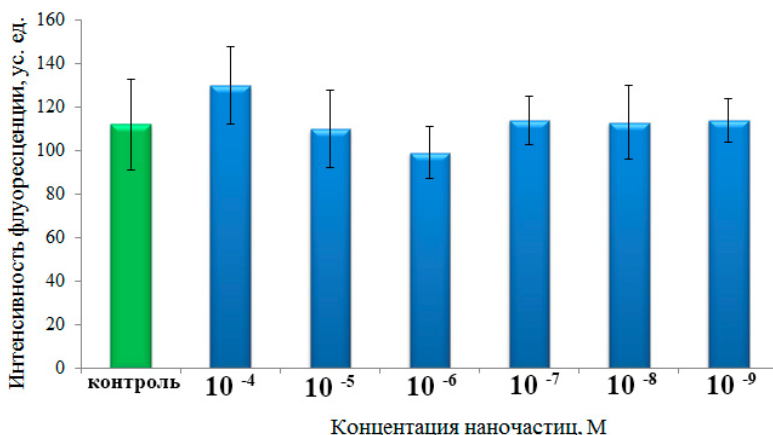


Рис. 5. Уровень супероксид анион-радикала в культуре клеток линии NCTC clone L929 при культивировании с различными концентрациями наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М). Окрашивание дигидроэтидином (60 мкМ). Клетки культивировали с наночастицами в течение 24 ч. Контроль – клетки без добавления наночастиц

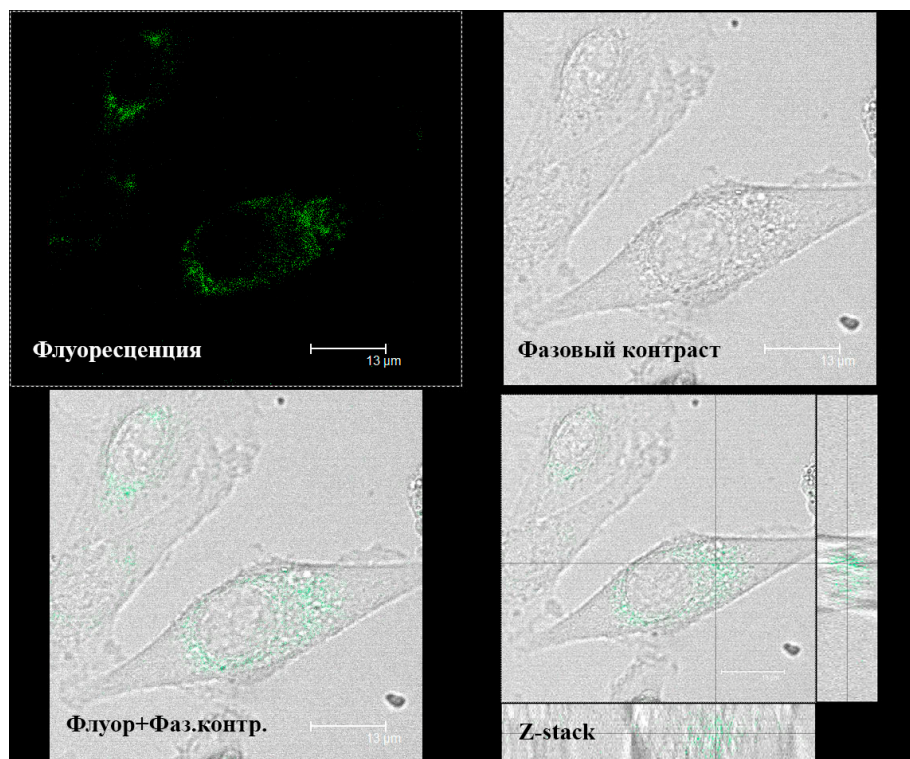


Рис. 6. Микрофотографии клеток линии NCTC clone L929 после 6 ч культивирования с наночастицами  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  ( $10^{-6}$  M)

Неорганические наноматериалы все чаще используются в терапии широкого круга социально значимых заболеваний, начиная от заболеваний опорно-двигательного аппарата и заканчивая онкологическими заболеваниями [35, 36]. Публикации последнего десятилетия дают возможность говорить о больших перспективах использования нанокристаллического диоксида церия в ряде биомедицинских применений. Уникальные редокс-свойства, низкая токсичность и высокая биосовместимость обеспечивают высокую эффективность в предотвращении развития состояния окислительного стресса в клетке.

Выбор методики синтеза и использование различных прекурсоров в значительной степени определяют направление биомедицинского использования наночастиц диоксида церия. Допирование нанокристаллического диоксида церия ионами гадолиния позволяет значительно изменить физико-химические характеристики  $\text{CeO}_2$ , в частности кислородную нестехиометрию, которая в свою очередь играет основную роль при участии во внутриклеточных окислительно-восстановительных реакциях. Именно это обуславливает необходимость проведения комплексного тестирования влияния данного наноматериала на биологические объекты. Отметим, что

существуют две основные парадигмы токсического влияния наноматериалов на клеточные структуры и организм в целом [37]. Первая парадигма учитывает окислительное действие наноматериалов и их способность генерировать АФК [38]. Повреждения, вызываемые наночастицами, могут быть результатом и других физико-химических процессов [39]. Одним из примеров является способность наночастиц адсорбировать на своей поверхности белки и образовывать так называемую «белковую корону», формирование которой зависит от размера, формы и поверхностных характеристик наночастиц: заряда, природы функциональных групп, а также избыточной свободной энергии [40, 41]. Негативные эффекты могут возникать вследствие нарушения структуры белков, их фибрилляции, тиол-сшивания и потери ферментативной активности. Таким образом, токсичность наночастиц может зависеть от состава окружающей среды и адсорбированных на их поверхности молекул и ионов, а также способности самих наночастиц генерировать АФК напрямую или опосредованно, через нарушения митохондриальной электрон-транспортной сети.

### Заключение

Таким образом, в настоящей работе впервые проведен комплексный анализ цитотоксического действия наночастиц диоксида церия, допированного гадолинием. Нами показано, что гидродинамический диаметр наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$ , диспергированных в культуральной среде, содержащей эмбриональную сыворотку, составляет 6–7 нм. Подтверждена внутриклеточная цитоплазматическая и лизосомальная локализации наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$ . Оценка уровней АФК при культивировании клеток с наночастицами  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$  выявила отсутствие достоверных различий с контрольными значениями во всем исследованном диапазоне концентраций наночастиц ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  М). В диапазоне концентраций  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  М наночастицы диоксида церия, допированного гадолинием, не вызывают снижения уровня дегидрогеназной активности в клетках линии NCTC clone L929 после 24 и 72 ч культивирования. Наночастицы в концентрации  $10^{-4}$  М после 24 ч культивирования снижают уровень дегидрогеназной активности, однако дальнейший анализ методом дифференциального флуоресцентного окрашивания и оценка уровня лактатдегидрогеназы не выявили достоверных различий с контролем по количеству мертвых и поврежденных клеток. Проведенный предварительный анализ позволяет сделать вывод об отсутствии острого токсического эффекта у наночастиц  $\text{Ce}_{1-x}\text{Gd}_x\text{O}_{2-y}$ , однако перспективы их биомедицинского применения могут быть определены только после комплексного их исследования в моделях *in vitro* и *in vivo*.

### Литература

1. Killbourn B.T. Cerium: a guide to its role in chemical technology. NY : Molycorp, 1992.
2. Антонова А.А., Жилина О.В., Каграманов Г.Г., Киенская К.И., Назаров В.В., Петропавловский И.А., Фанасюткина И.Е. Синтез и некоторые свойства гидрозолей диоксида церия // Коллоидный журнал. 2001. Т. 63, № 6. С. 728–734.

3. Dewage H., Wu B., Tsoi A., Yufit V., Offer G., Brandona N. A novel regenerative hydrogen cerium fuel cell for energy storage applications // J. Mater. Chem. A. 2015. Vol. 3. P. 9446–9450.
4. Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Baranchikov A.E., Ryabova A.V., Ivanov V.K. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress // Mater. Sci. Eng. C. 2015. Vol. 50. P. 151–159.
5. Niu J., Azfer A., Rogers L., Wang X., Kolattukudy P. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy // Cardiovasc Res. 2007. Vol. 7 (3). P. 549–559.
6. 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.
7. Kong L., Cai X., Zhou X., Wong L., Karakoti A., Seal S., McGinnis J. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways // Neurobiol. Dis. 2011. Vol. 42 (3). P. 514–523.
8. Rubio L., Annangi B., Vila L., Hernández A., Marcos R. Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system // Arch. Toxicol. 2016. Vol. 90 (2). P. 269–278.
9. Popov A., Zaichkina S., Popova N., Rozanova O., Romanchenko S., Smirnov A., Ivanova O., Mironova E., Selezneva I., Ivanov V. Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles *in vitro* and *in vivo* // RSC Adv. 2016. Vol. 6. P. 106141–106149.
10. Zholobak N., Shcherbakov A., Vitukova E., Yegorova A., Scripinets Y., Leonenko I., Baranchikov A., Antonovich V., Ivanov V. Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells // RSC Adv. 2014. Vol. 4. P. 51703–51710.
11. Popov A., Ermakov A., Savintseva I., Selezneva I., Poltavtseva R., Zarskiy E., Poltavtsev A., Stepanov A., Ivanov V., Sukhikh G. Citrate-stabilized nanoparticles of CeO<sub>2</sub> stimulate proliferation of human mesenchymal stem cells *in vitro* // Int. J. Nanomech. Sci. Tech. 2016. Vol. 7. P. 1–12.
12. Popov A.L., Popova N.R., Selezneva I.I., Akkizov A.Y., Ivanov V.K. Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts *in vitro* // Mater. Sci. Eng. C. 2016. Vol. 68. P. 406–413.
13. Estelrich J., Sánchez-Martín M., Busquets M. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents // Int. J. Nanomedicine. 2015. Vol. 10. P. 1727–1741.
14. Louis C., Bazzi R., Marquette C.A., Bridot J., Roux S., Ledoux G., Mercier B., Blum L., Perriat P., Tillement O. Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling // Chem. Mater. 2005. Vol. 17. P. 1673–1682.
15. Bridot J., Faure A., Laurent S., Riviere C., Billotey C., Hiba B., Janier M., Josserand V., Coll J., Elst L.V., Muller R., Roux S., Perriat P., Tillement O. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for *in vivo* imaging // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129. P. 5076–5084.
16. Гиль Д.О., Долгополова Е.А., Шекунова Т.О., Садовников А.А., Иванова О.С., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д. Фотопротекторные свойства твердых растворов на основе диоксида церия // Наносистемы: физика, химия, математика. 2013. Т. 4 (1). С. 78–82.
17. Гасимова Г.А., Иванова О.С., Баранчиков А.Е., Щербаков А.Б., Иванов В.К., Третьяков Ю.Д. Синтез водных золей нанокристаллического диоксида церия, допированного гадолинием // Наносистемы: физика, химия, математика. 2011. Т. 2 (3). С. 113–120.
18. Черепович В.С., Шахлевич Е.В., Антоненко Е.В., Лоткова Е.С., Романовская Т.В., Гринев В.В. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной цитотоксичности // Белорусский медицинский журнал. 2006. № 2 (16). С. 106–108.

19. Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Polezhaeva O.S., Kopitsa G.P., Tret'yakov Yu.D. Oxygen Nonstoichiometry of Nanocrystalline Ceria // *Russ. J. Inorg. Chem.* 2010. Vol. 55(3). P. 325–327.
20. Dowding J., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self W. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical ( $\cdot\text{NO}$ ) // *Chem. Commun.* 2012. Vol. 48. P. 4896–4898.
21. Xue Y., Luan Q., Yang D., Yao X., Zhou K. Direct Evidence for Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Cerium Oxide Nanoparticles // *Phys. Chem. C.* 2011. Vol. 115 (11). P. 4433–4438.
22. Park B., Donaldson K., Duffin R., Tran L., Kelly F., Mudway I., Morin J., Guest R., Jenkinson P., Samarasinghe 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 (6). P. 547–566.
23. Kumari M., Kumari S., Grover P. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration // *Mutagenesis.* 2014. Vol. 29 (6). P. 467–479.
24. Ould-Moussa N., Safi M., Guedeau-Boudeville M., Montero D., Conjeaud H., Berret J. *In vitro* toxicity of nanocerium: effect of coating and stability in biofluids // *Nanotoxicology.* 2014. Vol. 8. P. 799–811.
25. Maiorano G., Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M., Cingolani R., Pompa P. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response // *ACS Nano.* 2010. Vol. 4. P. 7481–7491.
26. Singh S., Dosani T., Karakoti A., Kumar A., Seal S., Self W. A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32 (28). P. 6745–6753.
27. Colon J., Herrera L., Smith J., Patil S., Komanski C., Kupelian P., Seal S., Jenkins W., Baker C. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2009. Vol. 5. P. 225–231.
28. Zholobak N., Sherbakov O., Babenko L., Bogorad-Kobelska O., Bubnov R., Spivak M., Ivanov V. The perspectives of biomedical application of the nanocerium // *EPMA J.* 2014. Vol. 5 (Suppl 1). P. A136.
29. Muller F., Lustgarten M., Jang Y., Richardson A., van Remmen H. Trends in oxidative aging theories // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. P. 477.
30. Horie M., Nishio K., Kato H., Fujita K., Endoh S., Nakamura A., Miyauchi A., Kinugasa S., Yamamoto K., Niki E., Yoshida Y., Hagihara Y., Iwahashi H. Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells // *J. Biochem.* 2011. Vol. 150 (4). P. 461–471.
31. 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.
32. Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtès C., L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells // *Part. Fibre Toxicol.* 2011. Vol. 8. P. 10.
33. Quinteros M., Cano Aristizábal V., Dalmasso P., Paraje M., Pérez P. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity // *Toxicol. In Vitro.* 2016. Vol. 36. P. 216–223.
34. Selvaraj V., Nepal N., Rogers S., Manne N., Arvapalli R., Rice K., Asano S., Fankhanel E., Ma J., Shokuhfar T., Maheshwari M., Blough E. Inhibition of MAP kinase/NF- $\kappa$ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles // *Biomaterials.* 2015. Vol. 59. P. 160–171.
35. Leonavičienė L., Kirdaitė G., Bradūnaitė R., Vaitkienė D., Vasiliauskas A., Zabulytė D., Ramanavičienė A., Ramanavičius A., Ašmenavičius T., Mackiewicz Z. Effect of Gold Nanoparticles in the Treatment of Established Collagen Arthritis in Rats // *Medicina (Kaunas).* 2012. Vol. 48 (2). P. 91–101.

36. Gao Y., Chen K., Ma J., Gao F. Cerium oxide nanoparticles in cancer // *Onco. Targets Ther.* 2014. Vol. 7. P. 835–840.
37. Xia T., Kovoichich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J., Zink J., Nel A. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties // *ACS Nano*. 2008. Vol. 2 (10). P. 2121–2134.
38. Colvin V. The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 1166–1170.
39. Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K., Linse S. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104. P. 2050–2055.
40. Chen M., von Mikecz A. Formation of Nucleoplasmic Protein Aggregates Impairs Nuclear Function in Response to SiO<sub>2</sub> Nanoparticles // *Exp. Cell Res.* 2005. Vol. 305. P. 51–62.
41. Linse S., Cabaleiro-Lago C., Xue W., Lynch I., Lindman S., Thulin E., Radford S., Dawson K. Nucleation of Protein Fibrillation by Nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. Vol. 104. P. 8691–8696.

**Авторский коллектив:**

**Попов Антон Леонидович**, младший научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пушкино, Россия). E-mail: antonpopovleonid@gmail.com

**Татарникова Ольга Геннадьевна**, младший научный сотрудник лаборатории роста клеток и тканей Института биофизики клетки РАН (г. Пушкино, Россия). E-mail: knopka1606@list.ru

**Шекунова Таисия Олеговна**, аспирант Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (г. Москва, Россия). E-mail: tasiok@mail.ru

**Попова Нелли Рустамовна**, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории изотопных исследований Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пушкино, Россия). E-mail: nellipopovaran@gmail.com

**Баранчиков Александр Евгеньевич**, канд. хим. наук, зав. лабораторией синтеза функциональных материалов и переработки минерального сырья Института общей и неорганической химии РАН им. Н.С. Курнакова (г. Москва, Россия). E-mail: a.baranchikov@yandex.ru

**Иванов Владимир Константинович**, чл.-кор. РАН, директор Института общей и неорганической химии РАН им. Н.С. Курнакова (г. Москва, Россия). E-mail: van@igic.ras.ru

**Козик Владимир Васильевич**, д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой неорганической химии Томского государственного университета (г. Томск, Россия). E-mail: vkozik@mail.ru

---

*Tomsk State University Journal of Chemistry*, 2017, 8, 68-87. DOI: 10.17223/24135542/8/6

---

**A.L. Popov<sup>1</sup>, O.G. Tatarnikova<sup>2</sup>, T.O. Shekunova<sup>1</sup>, N.R. Popova<sup>1</sup>,  
A.E. Baranchikov<sup>3</sup>, V.K. Ivanov<sup>3,4</sup>, V.V. Kozik<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russian Federation)*

<sup>2</sup> *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russian Federation)*

<sup>3</sup> *Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation)*

<sup>4</sup> *National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation)*

**The influence of nanocrystalline gadolinium-doped ceria (Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub>) on the functional status and viability of NCTC clone L929 cells**

*In the present study, the effect of citrate-stabilized nanocrystalline Ce<sub>1-x</sub>Gd<sub>x</sub>O<sub>2-y</sub> aqueous sols on the functional status of NCTC clone L929 murine fibroblasts was studied for the first time.*



The hydrodynamic diameter of  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  nanoparticles in the deionized water (pH 7.2) was 3.2 nm (88.9% in the sample) and 11.1 nm (6.4% in the sample), and  $\zeta$ -potential was about  $-55$  mV, which indicates very high stability of the sol. In the F-12 culture medium,  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  particle size increased to  $\sim 6-7$  nm, and a certain number of aggregates ranging from 45 to 60 nm appeared, while their percentage was very small, 1–2%.

Nanoparticles of gadolinium-doped ceria in the concentration range of  $10^{-5}$ – $10^{-9}$  M slightly reduced the level of dehydrogenase activity in the cells after 24 h of cultivation. The use of maximum concentration ( $10^{-4}$  M) resulted in a significant (20%) decrease in the level of dehydrogenase activity compared to the control. Thus, high concentrations of  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  nanoparticles can cause some toxic effects and affect intracellular metabolism upon their cultivation. Meanwhile, the deviation of the MTT assay result at  $10^{-4}$  M concentration was not critical, since the administration of the nanoparticles did not lead to an increase in the number of dead cells or to the development of apoptotic processes in the cell culture. Lower concentrations of nanoparticles ( $10^{-6}$ – $10^{-9}$  M) did not cause a toxic effect, but on the contrary, exhibited a stimulating effect, which led to an increase in the number of cells. Cultivation of cells with  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  nanoparticles in the entire range of concentrations ( $10^{-4}$ – $10^{-9}$  M) did not lead to an increase in the level of lactate dehydrogenase in the culture medium. This confirmed that there was no damage to the cell membranes.

We studied the influence of  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  nanoparticles ( $10^{-5}$ – $10^{-9}$  M) on the levels of intracellular reactive oxygen species and free radicals in the cells. It was shown that in this range of concentrations, gadolinium-doped ceria did not provoke an increase in the levels of intracellular ROS and superoxide anion-radical.

Confocal microscopy showed that cerium dioxide nanoparticles penetrated the cells, and their cytoplasmic and lysosomal localization was confirmed. It was shown that the nanoparticles did not penetrate the nucleus, which confirmed the absence of genotoxic effect and DNA damage.

Thus, our preliminary analysis allowed concluding that  $Ce_{1-x}Gd_xO_{2-y}$  nanoparticles did not possess any acute toxic effect; however, the prospects of their biomedical application can be determined only after a complex study *in vitro* and *in vivo*.

**Keywords:** nanocrystalline ceria; gadolinium; cytotoxicity; reactive oxygen species; MTT assay.

## References

1. Killbourn B.T. Cerium: a guide to its role in chemical technology. NY: Molycorp, 1992.
2. A.A. Antonova, O.V. Zhilina, G.G. Kagramanov, K.I. Kienskaya, V.V. Nazarov, I.A. Petropavlovskii, I.E. Fanasyutkina Synthesis and Some Properties of Cerium Dioxide Hydrosols. *Coll. J.* 2001, 63(6), 662–667.
3. Dewage H., Wu B., Tsoi A., Yufit V., Offer G., Brandona N. A novel regenerative hydrogen cerium fuel cell for energy storage applications. *J. Mater. Chem. A.* 2015, 3, 9446–9450.
4. Shcherbakov A.B., Zholobak N.M., Baranchikov A.E., Ryabova A.V., Ivanov V.K. Cerium fluoride nanoparticles protect cells against oxidative stress. *Mater. Sci. Eng. C.* 2015, 50, 151–159.
5. Niu J., Azfer A., Rogers L., Wang X., Kolattukudy P. Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2007, 7(3), 549–559.
6. 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, 6, 143–149.

7. Kong L., Cai X., Zhou X., Wong L., Karakoti A., Seal S., McGinnis J. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. *Neurobiol. Dis.* 2011, 42(3), 514–523.
8. Rubio L., Annangi B., Vila L., Hernández A., Marcos R. Antioxidant and anti-genotoxic properties of cerium oxide nanoparticles in a pulmonary-like cell system. *Arch. Toxicol.* 2016, 90(2), 269–278.
9. Popov A., Zaichkina S., Popova N., Rozanova O., Romanchenko S., Smirnov A., Ivanova O., Mironova E., Selezneva I., Ivanov V. Radioprotective effects of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles *in vitro* and *in vivo*. *RSC Adv.* 2016, 6, 106141–106149.
10. Zholobak N., Shcherbakov A., Vitukova E., Yegorova A., Scripinets Y., Leonenko I., Baranchikov A., Antonovich V., Ivanov V. Direct monitoring of the ROS-cerium dioxide nanoparticles interaction in living cells. *RSC Adv.* 2014, 4, 51703–51710.
11. Popov A., Ermakov A., Savintseva I., Selezneva I., Poltavtseva R., Zaraisky E., Poltavtsev A., Stepanov A., Ivanov V., Sukhikh G. Citrate-stabilized nanoparticles of CeO<sub>2</sub> stimulate proliferation of human mesenchymal stem cells *in vitro*. *Int. J. Nanomech. Sci. Tech.* 2016, 7, 1–12.
12. Popov A.L., Popova N.R., Selezneva I.I., Akkizov A.Y., Ivanov V.K. Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts *in vitro*. *Mater. Sci. Eng. C.* 2016, 68, 406–413.
13. Estelrich J., Sánchez-Martín M., Busquets M. Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents. *Int. J. Nanomedicine.* 2015, 10, 1727–1741.
14. Louis C., Bazzi R., Marquette C.A., Bridot J., Roux S., Ledoux G., Mercier B., Blum L., Perriat P., Tillement O. Nanosized hybrid particles with double luminescence for biological labeling. *Chem. Mater.* 2005, 17, 1673–1682.
15. Bridot J., Faure A., Laurent S., Riviere C., Billotey C., Hiba B., Janier M., Josserand V., Coll J., Elst L.V., Muller R., Roux S., Perriat P., Tillement O. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for *in vivo* imaging. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5076–5084.
16. Gil D.O., Dolgoplova E.A., Shekunova T.O., Sadovnikov A.A., Ivanova O.S., Ivanov V.K., Tretyakov Yu.D. Fotoprotekturnye svoystva tverdykh rastvorov na osnove dioksida ceriya [Photoprotector properties of ceria-based solid solutions]. *Nanosistemy: fizika, khimiya, matematika* [Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics]. 2013, 4(1), 78–82. In Russian
17. Gasymova G.A., Ivanova O.S., Baranchikov A.Ye., Sherbakov A.B., Ivanov V.K., Tretyakov Yu.D. Sintez vodnykh zoley nanokristallicheskogo dioksida ceriya, dopirovanogo gadolinium. *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics.* 2011, 2(3), 113–120. In Russian
18. Charapovich V.S., Valochnik E.V., Antanenko E.V., Lotkova E.S., Romanovskaya T.V., Grinev V.V. Optimization of the critical parameters of the MTT-assay to assess cell- and drug-mediated cytotoxicity. *Meditsinskiy zhurnal.* 2006, 2(16), 106–108. In Russian
19. Ivanov V.K., Baranchikov A.E., Polezhaeva O.S., Kopitsa G.P., Tretyakov Yu.D. Oxygen nonstoichiometry of nanocrystalline ceria. *Russ. J. Inorg. Chem.* 2010, 55(3), 325–327.
20. Dowding J., Dosani T., Kumar A., Seal S., Self W. Cerium oxide nanoparticles scavenge nitric oxide radical (NO). *Chem. Commun.* 2012, 48, 4896–4898.
21. Xue Y., Luan Q., Yang D., Yao X., Zhou K. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *Phys. Chem. C.* 2011, 115(11), 4433–4438.
22. Park B., Donaldson K., Duffin R., Tran L., Kelly F., Mudway I., Morin J., Guest R., Jenkinson 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, 20(6), 547–566.

23. Kumari M., Kumari S., Grover P. Genotoxicity analysis of cerium oxide micro and nanoparticles in Wistar rats after 28 days of repeated oral administration. *Mutagenesis*. 2014, 29(6), 467–479.
24. Ould-Moussa N., Safi M., Guedeau-Boudeville M., Montero D., Conjeaud H., Berret J. *In vitro* toxicity of nanocerium: effect of coating and stability in biofluids. *Nanotoxicology*. 2014, 8, 799–811.
25. Maiorano G., Sabella S., Sorce B., Brunetti V., Malvindi M., Cingolani R., Pompa P. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein-nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS Nano*. 2010, 4, 7481–7491.
26. Singh S., Dosani T., Karakoti A., Kumar A., Seal S., Self W. A phosphate-dependent shift in redox state of cerium oxide nanoparticles and its effects on catalytic properties. *Biomaterials*. 2011, 32(28), 6745–6753.
27. Colon J., Herrera L., Smith J., Patil S., Komanski C., Kupelian P., Seal S., Jenkins W., Baker C. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2009, 5, 225–231.
28. Zholobak N., Sherbakov O., Babenko L., Bogorad-Kobelska O., Bubnov R., Spivak M., Ivanov V. The perspectives of biomedical application of the nanocerium. *EPMA J*. 2014, 5(1), A136.
29. Muller F., Lustgarten M., Jang Y., Richardson A., van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med*. 2007, 43, 477.
30. Horie M., Nishio K., Kato H., Fujita K., Endoh S., Nakamura A., Miyauchi A., Kinugasa S., Yamamoto K., Niki E., Yoshida Y., Hagihara Y., Iwahashi H. Cellular responses induced by cerium oxide nanoparticles: induction of intracellular calcium level and oxidative stress on culture cells. *J. Biochem*. 2011, 150(4), 461–471.
31. 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, 28(31), 4600–4607.
32. Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtès C., L'Aou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. Part. *Fibre Toxicol*. 2011, 8, 10.
33. Quinteros M., Cano Aristizábal V., Dalmasso P., Paraje M., Páez P. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. In Vitro*. 2016, 36, 216–223.
34. Selvaraj V., Nepal N., Rogers S., Manne N., Arvapalli R., Rice K., Asano S., Fankhanel E., Ma J., Shokuhfar T., Maheshwari M., Blough E. Inhibition of MAP kinase/NF- $\kappa$ B mediated signaling and attenuation of lipopolysaccharide induced severe sepsis by cerium oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2015, 59, 160–171.
35. Leonavičienė L., Kirdaitė G., Bradūnaitė R., Vaitkienė D., Vasiliauskas A., Zabulytė D., Ramanavičienė A., Ramanavičius A., Ašmenavičius T., Mackiewicz Z. Effect of Gold Nanoparticles in the Treatment of Established Collagen Arthritis in Rats. *Medicina (Kaunas)*. 2012, 48(2), 91–101.
36. Gao Y., Chen K., Ma J., Gao F. Cerium oxide nanoparticles in cancer. *Onco. Targets Ther*. 2014, 7, 835–840.
37. Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J., Zink J., Nel A. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*. 2008, 2(10), 2121–2134.
38. Colvin V. The Potential Environmental Impact of Engineered Nanomaterials. *Nat. Biotechnol*. 2003, 21, 1166–1170.
39. Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K., Linse S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2007, 104, 2050–2055.

40. Chen M., von Mikecz A. Formation of Nucleoplasmic Protein Aggregates Impairs Nuclear Function in Response to SiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *Exp. Cell Res.* 2005, 305, 51–62.
41. Linse S., Cabaleiro-Lago C., Xue W., Lynch I., Lindman S., Thulin E., Radford S., Dawson K. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007, 104, 8691–8696.

**Information about authors:**

**Popov Anton L.**, Junior Research Fellow, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russian Federation). E-mail: antonpopovleonid@gmail.com

**Tatarnikova Olga G.**, Junior Research Fellow, Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russian Federation). E-mail: knopka1606@list.ru

**Shekunova Taisiya O.**, post-graduate student, Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russian Federation). E-mail: tasiok@mail.ru

**Popova Nelli R.**, PhD, Research Fellow, Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences (Pushchino, Russian Federation). E-mail: nellipopovaran@gmail.com

**Baranchikov Alexander E.**, PhD, head of the laboratory, Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation). E-mail: a.baranchikov@yandex.ru

**Ivanov Vladimir K.**, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, director of Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russian Federation). E-mail: van@igic.ras.ru

**Kozik Vladimir V.**, Professor, head of the Department of Inorganic Chemistry, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: vkozik@mail.ru