

## КАТАЛЕПТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА НАНОРАЗМЕРНОГО ОКСИДА ЦЕРИЯ

Бричка С.Я.<sup>1,2</sup>, Куришко Г.Г.<sup>2</sup>, Бессарабов В.И.<sup>2</sup>, Баула О.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт химии поверхности им. А.А.Чуйко НАН Украины, Киев, Украина.

<sup>2</sup>Киевский национальный университет технологий и дизайна, Киев, Украина.

**Введение.** Углубление знаний о механизмах воздействия  $\text{CeO}_2$  на организм несомненно приведет к созданию новых типов лекарственных средств. Исследователями разных стран накоплен обширный материал о физиологической активности наноразмерного диоксида церия. Обнаружено, что нанокристаллический  $\text{CeO}_2$  принимает участие в биохимических окислительно-восстановительных реакциях инактивирования свободных радикалов подобно супероксиддисмутазе и разложению перекиси водорода подобно каталазе. Установлено, что окислительный стресс связан с прогрессирующим нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Лу Герига и т.д. Наночастицы оксида церия изучены в качестве сильных антиоксидантных агентов, способных оказывать нейропротекторное действие. Антитела, конъюгированные с наночастицами покрытые полиэтиленгликолем, предложено использовать для селективной доставки с целью защиты от окислительного стресса, приводящему к опосредованной нейродегенерации, для выживания нейронов и сохранения сигнальных путей. Утверждается, что оксид церия избирательно может доставлен только в пострадавшие районы мозга [1]. При добавление хлорида церия к плазме крови время её свертывания значительно увеличивается. Учитывая низкую токсичность активного фармацевтического ингредиента (АФИ) при оральном введение, антикоагуляционные свойства ионов церия могут быть полезны для создания лекарственных препаратов [2]. Наночастицы  $\text{CeO}_2$  обладают радиозащитными свойствами при облучении

клеток. Разрабатываются лекарства радиационной защиты на основе наночастиц [3]. Окислительный стресс в организме ведет к образованию радикалов, которые высокотоксичны и вызывают потерю клеток при их трансплантации. Получен альгинатный гидрогель с  $\text{CeO}_2$  для обеспечения бессрочной антиоксидантной защиты. Совместное инкубирование свободных радикалов с клетками продемонстрировало сильную цитозащиту от их воздействия. Нанокompозитный гидрогель может применяться в клеточной трансплантации [4].

Ожирение является всемирной проблемой патологического состояния людей, что сильно ухудшает здоровье человека, и на сегодняшний день отсутствует эффективная терапии против чрезмерного накопления жира. Хирургия остается лучшим лечением для снижения веса. Поскольку избыточный вес коррелирует с повышенным окислительным стрессом предложено использовать оксид церия в качестве потенциального фармакотерапевтического решения для лечения ожирения. Доказано эффективное снижение веса и понижение уровня инсулина, лептина, глюкозы и триглицеридов в плазме крови при введении в организм животных оксида церия [5].

В галлоизитные нанотрубки инкапсулировали кортикостероидные и гипотензивные лекарственные препараты, а также лекарственные средства для купирования приступов стенокардии. Скорость выделения биологически активных молекул в раствор из нанотрубок в 50-100 раз ниже, чем из микро- и наночастиц других носителей. Поэтому сегодня галлоизитные нанотрубки успешно используют в качестве нанотубулярных систем доставки лекарственных препаратов к больным органам живых существ [6-8].

**Цель работы:** синтез наноразмерного диоксида церия на галлоизитных нанотрубках в качестве носителя для последующего скрининга физиологической активности.

**Экспериментальная часть.** К 6.25 г галлоизитных нанотрубок (NaturalNano, Inc.) в 40 мл дистиллированной воды прибавляли 4 мл 0.5 М или 16.3 мл 1 М раствора  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ . При перемешивании к полученному раствору приливали 6 мл 1 М или 24.5 мл 2 М раствора  $\text{NaOH}$  до достижения значений pH 8-9. Осадок отфильтровывали, промывали до отсутствия нитрат-анионов (контроль проводили по качественной реакции с дифениламином в серной кислоте) и высушивали при 383 К. Образцы ГНТ/ $\text{CeO}_2$  с 0.5-5 % содержанием оксида церия получены исходя из стехиометрического соотношения реагентов - 1 (Гал<sup>1</sup>), 3 (Гал<sup>3</sup>), 5 % (Гал<sup>5</sup>) (табл.1). Химический анализ материалов осуществляли методом атомно-эмиссионной спектроскопии (прибор ICPE-9000, Shimadzu) с расчетом неопределенности доверительного интервала. Подготовку образцов для химического анализа проводили путем микроволнового разложения (XP1500Plus MARS, CEM).

Нанотрубки характеризовали с использованием электронного сканирующего микроскопа MIRA3 LMU, Tescan с системой энергодисперсионного спектроскопического химического анализа Oxford X-MAX 80 mm<sup>2</sup> с неопределенностью прибора  $\pm 1$  %. Материалы также исследовали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Hitachi H-800. Размер частиц измеряли на фотографиях с использованием программы линейных измерений с выборкой более 40 объектов для образца. Кристаллическую структуру также устанавливали рентгенографическим анализом, ДРОН-2М с  $\text{Cu K}_\alpha$ -излучением. УФ-спектры записывали на UV-VIS-NIR-spectrophotometer UV-3600, Shimadzu в режиме отражения в диапазоне 220-3300 нм с неопределенностью  $\pm 0.25$  нм.

Таблица 1 – Результаты химического анализа образцов методом атомного эмиссионного анализа

Стехиометрическое содержание CeO <sub>2</sub> , %	Пробы образца	Навеска, мг	Содержание Ce, %	Усредненное содержание CeO <sub>2</sub> , %	Неопределенность доверительного интервала, %
1	1	182.6	0.816	0.999	0.011
	2	134.6	0.802		
	3	113.4	0.820		
3	1	201.4	2.602	3.188	0.021
	2	117.3	2.575		
	3	129.6	2.608		
5	1	203.3	3.92	4.888	0.062
	2	217.4	4.02		
	3	160.9	3.996		

Опыты, нацеленные на изучение поведения белых крыс, проведены с использованием введения вещества в дозах 1, 10, 20, 25, 30, 50 и 100 мг/кг в перерасчете на оксид церия. Животным внутрибрюшинно вводили наноматериал ГНТ/CeO<sub>2</sub> с 5 % содержанием оксида церия и частицы CeO<sub>2</sub>, Aldrich. Композитный материал по показателю острой токсичности (ЛД<sub>50</sub>>>500 мг/кг) относится в категории малотоксичных веществ.

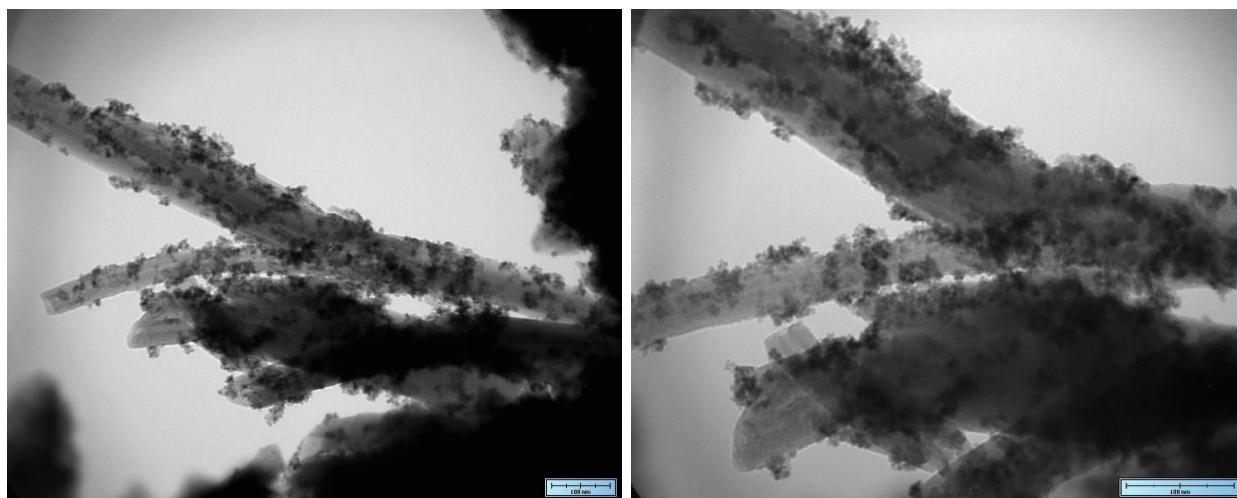
**Результаты и их обсуждение.** Дифрактограммы галлоизита согласуется с литературными данными [12]. Для идентификации галлоизитов используют рефлекс  $d_{001}=7.14 \text{ \AA}$  - предельно низким значением, который не встречается в спектрах ряда полиморфов каолиновой группы. В области  $2\theta=18^\circ$  наблюдаемый сигнал, относящийся к примеси галлоизита, - фаза гидроксида алюминия. При малых углах дифрактограм в образцах обнаружены сигналы, которые указывают на смесь трубчатого галлоизита-(7

Å) и трубчатого галлоизита-(10 Å). После модифицирования диоксидом церия сигнал при 10 Å исчезает, что связано с десорбцией воды из межслоевого пространства галлоизита. Трубчатый галлоизит часто описывают химической формулой  $Al_2Si_2O_5(OH)_4 \cdot nH_2O$ , где  $n=0-2$ . Электронные изображения галлоизитов свидетельствует, что массив материала состоит с беспорядочно размещенных трубок. По данным ТЭМ в образцах наряду с трубками наблюдаются частицы, которые не имеют характерной трубчатой морфологии (в том числе гидроксид алюминия) и полостей. По данным СЭМ и ТЭМ распределение нанотрубок по внешним диаметрам составляет 20-100 нм с максимумом при 40-50 нм и длина 250-1000 нм. Усредненная толщина стенок около 8-22 нм свидетельствует о многослойности нанотрубок. Размер единичного слоя стенки гидратированного трубчатого галлоизита-(10 Å) соответствует сумме толщин бисеток кремнекислородной тетраэдрической и алюмогидроксилкислородной октаэдрической сеток (7.14 Å) и монослоя воды (3 Å).

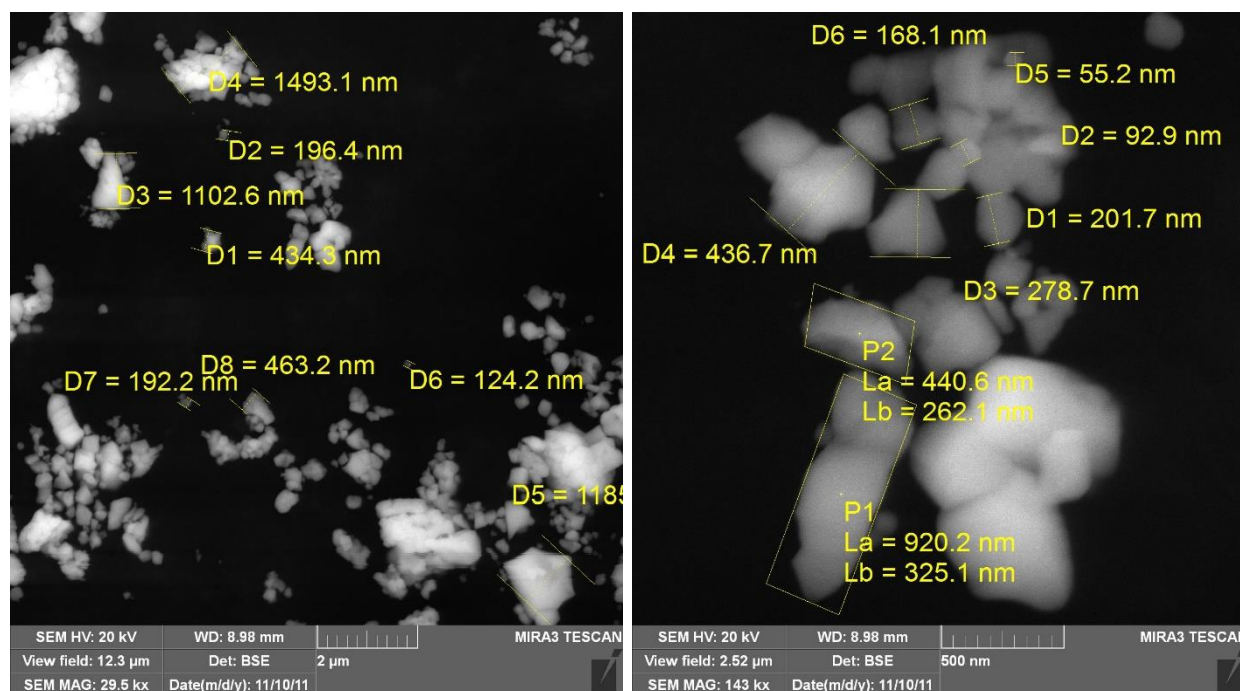
Образцы модифицированных оксидом церия алюмосиликатных нанотрубок на электронных изображениях на просвет (рис. 1, а) имеют ряд отличительных черт, появляются наночастицы, которые расположены как на нанотрубках, так и отдельно лежащие. По данным атомно-эмиссионной спектроскопии содержание церия в образцах в перерасчете на диоксид составляет с неопределенностью доверительного интервала  $0.998 \pm 0.011$ ,  $3.188 \pm 0.021$  и  $4.887 \pm 0.062$  %. Рентгенографический анализ свидетельствует об образовании кристаллического диоксида церия.

Образцы модифицированных алюмосиликатных нанотрубок на электронных изображениях на просвет по сравнению с чистым материалом имеют морфологические отличия в виде наночастиц. Электронографические исследования частиц с рефлексами  $d(hkl)=3.12$  (100), 2.7 (200), 1.89 (220) и 1.64 Å (311) указывают, что они относятся к модификатору диоксиду церия.

На дифрактограммах модифицированных нанотрубок также наблюдаются сигналы диоксид церия кубической структуры, которые согласуются с электронографическим анализом. Интенсивность рефлексов от оксида с увеличением концентрации модификатора растет. Значительная полуширина сигналов диоксида церия может быть интрепретирована вкладом слабой степенью кристалличности и наноразмерностью кристаллов модификатора.



а



б

Рис. 1. – ТЭМ изображения ГНТ/CeO<sub>2</sub> (а) и СЭМ изображения CeO<sub>2</sub> (б)

Размер частиц оксида церия для образца Гал<sup>1</sup> составляет 1.8-6.4 (средний по максимуму распределения 2.2), Гал<sup>3</sup> - 2.6-7.3 (4.1), Гал<sup>5</sup> - 3.9-10.9 (6.8) нм. Очевидно, что увеличение концентрации модификатора приводит к увеличению размера частиц. На наш взгляд, наноразмерный носитель имеет темплатирующее действие. Небольшой размер оксида нами объясняется в том числе и значительным количеством гетерогенных контактов между нанотрубками, которые способствует кристаллизации маленьких частиц. Зависимость содержания диоксида церия от среднего значения диаметров частиц может быть описана линейной функцией (рис. 2).

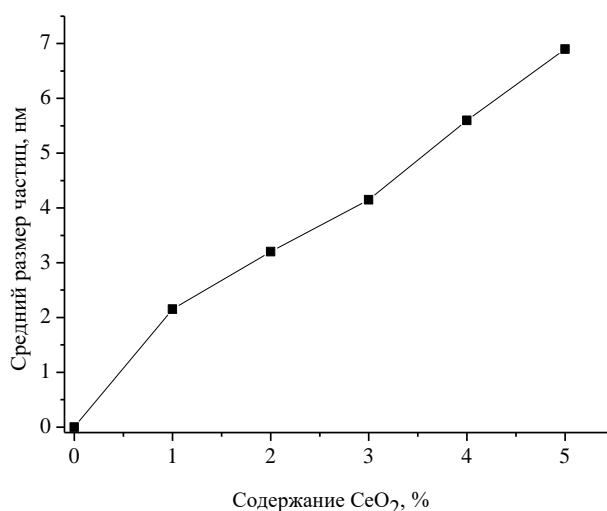


Рис.2. – Зависимость среднего размера частиц оксида церия от его содержания в нанотрубках.

Функциональные свойства, в том числе физиологическое воздействие на человека, определяется размерным фактом и соотношением  $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$  [10]. Четырех и трёхвалентный церий в УФ-области дает сигнал около 250 и 400 нм для больших частиц. Вклад в сигналы перехода заряда  $\text{O}^{2-}(2p) \rightarrow \text{Ce}^{4+}(4f)$  относят к 250 нм. В тоже время он перекрывается с электронным переходом  $5d^1 \rightarrow 4f^1$  ионов  $\text{Ce}^{3+}$ . Сигнал ионов  $\text{Ce}^{3+}$ , как правило, внедряется в



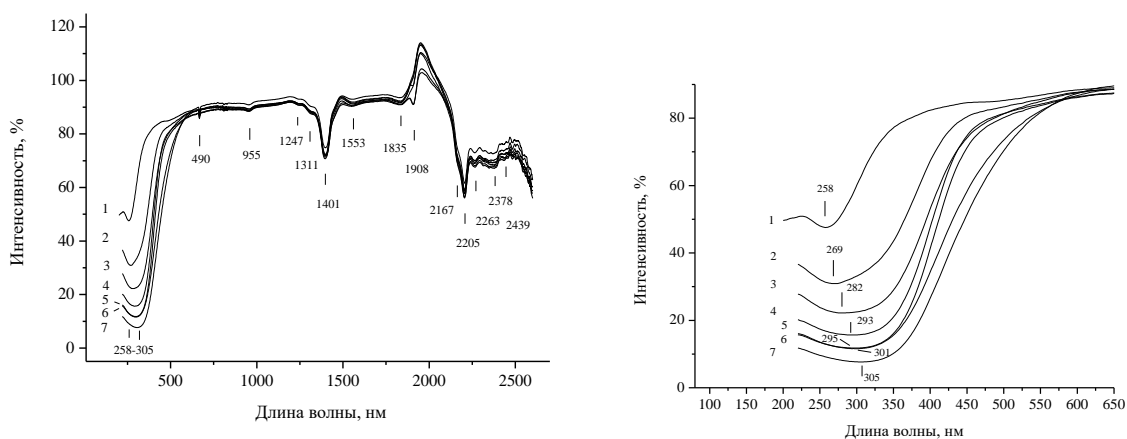
кристаллическую структуру диоксида церия вместо  $\text{Ce}^{4+}$  как дефект, спектрально наблюдается около 400 нм переход  $\text{O}^{2-}(2p) \rightarrow \text{Ce}^{3+}(4f)$ , но четыре валентный также имеет переходы в этом диапазоне. Поэтому четырех и трех валентные ионы церия описываются с противоположных точек зрения: одна часть исследователей сигнал при 250 нм относит исключительно к  $\text{Ce}^{4+}$ , другая – к  $\text{Ce}^{3+}$ . Следовательно, сигнал в области 400 нм интерпретируется, базируясь на вышеуказанном предположении. На наш взгляд обсуждение количественных характеристик поглощения ионов церия в УФ спектрах ведет к грубым ошибкам из-за недостатка теоретических расчетов. Максимумы сигнала при 282 (Гал<sup>1</sup>), 295 (Гал<sup>3</sup>), 305 (Гал<sup>5</sup>) нм для всех образцов находятся в близкой области. Следует отметить, что зависимости максимума поглощения от содержания диоксида церия и от размера частиц имеют нелинейный, сложный характер (рис. 3).

При клиническом наблюдении за поведением животных было отмечено, что введение ГНТ/ $\text{CeO}_2$  в дозе 1 мг/кг вызывает активацию двигательной активности и повышение зоосоциального груминга. Начиная с дозы 10 мг/кг введение наноматериала приводит к появлению заторможенности, снижению двигательной активности, пилоэрекции и птоза животных. Вышеуказанная симптоматика развивалась через 5-7 мин после введения вещества и дозозависимо вырастала с увеличением дозы до 20, 25, 30, 50 и 100 мг/кг. Кроме описанной симптоматики регистрировались также элементы “восковой гибкости” тела животных - проявление каталепсии. Совокупность изменений поведения животных при введении субстанции характеризовалась резерпиноподобным “серотониновым синдромом”.

В следующей серии опытов проводилась инструментальная оценка влияния ГНТ/ $\text{CeO}_2$  на поведенческие реакции животных с использованием метода “открытое поле” с регистрацией горизонтальной и вертикальной двигательной активности, ориентировочно-исследовательный рефлексов и количества актов груминга. Наноматериал в дозах 1 и 5 мг/кг не оказывает

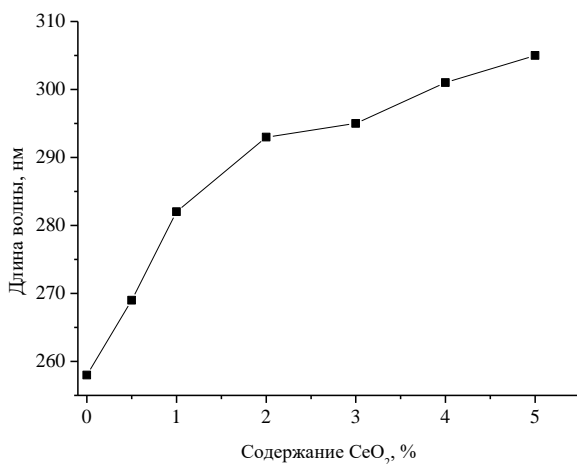


влияние на поведенческие реакции животных. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что в дозах 10 и 30 мг/кг АФИ дозозависимо снижает двигательную активность животных и угнетает ориентировочно-исследовательскую реакцию.



а

б



в

Рис. 3. – Оптические спектры образцов галлоизита, модифицированных оксидом церия (269 - 0.5, 282 - 1, 293 - 2, 295 - 3, 301 - 4 и 305 нм – 5 %) (а, б) и зависимость максимума длины волны от содержания оксида церия (в) в нанотрубках.

Таблица 2. – Влияние ГНТ/CeO<sub>2</sub> в дозе 10 и 30 мг/кг на поведенческие реакции белых крыс

Регистрируемые показатели активности	Контроль	Опыт с дозой	
		10	30
Квадраты	37.7±1.6	14.7±4.8	8.8±4.1
Стойки (вертикальная)	4.5±1.4	1.8±0.6	0.67±0.3
Норки	3.2±0.7	0.8±0.5	0
Грумминг	4.2±1.6	1.8±0.9	2.5±1.1

n=6 – количество животных

Снижение спонтанной двигательной активности под влиянием исследуемого вещества может свидетельствовать о депрессирующем действии на центральную нервную систему. Каталептогенный эффект характерен для фармакодинамической группы нейролептиков (антипсихотиков).

Принимая во внимание, что ГНТ/CeO<sub>2</sub> начиная с дозы 10 мг/кг вызывает снижение двигательной активности, представлялось оправданным определить каталептогенное действие исследуемого вещества. Каталептогенное действие определялось по методу К.С. Раевского. При этом регистрировались три степени выраженности катаlepsии с их ранжировкой по баллам. Проведенные опыты показали, что порошок в дозе 10 мг/кг через 30 мин после введения вызывает у животных явление катаlepsии, которое регистрируется в течении 3 ч наблюдения с наибольшей выраженностью в первые 30 мин. При увеличении дозы наноматериала до 30 мг/кг выраженность катаlepsии усиливается, за исключением первых 30 мин и удлиняется по времени до 5 ч наблюдения (табл. 3).

Таблица 3. – Каталептогенное действие ГНТ/CeO<sub>2</sub>

Показатели гатаlepsии	Время наблюдения, ч							
	0.5		1		3		5	
Доза, мг/кг	10	30	10	30	10	30	10	30
Стойки	5/6*	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6	2/6
Мостики	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6	2/6
Поза жабы	4/6	2/6	1/6	2/6	1/6	3/6	0/6	0/6
Баллы	4.8	4	3.5	4	3.5	4.5	0	1

\* - в знаменателе – количества регистрируемых, а в числителе – максимальное количество баллов признаков катаlepsии

Следует отметить, что галлоизитные нанотрубки и оксид церия размером 60-500 нм (рис. 1, б) не проявляют сколь заметное каталептогенное действие.

**Выводы.** Наночастицы оксида церия размером 1-15 нм получены на галлоизитных нанотрубках в реакции между Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> и NaOH. Синтез проводили в водном растворе без стабилизаторов при комнатной температуре, что уменьшает стоимость технологии их получения. Рентгенофазовые исследования выявили диоксид церия кубической структуры. АФИ ГНТ/CeO<sub>2</sub> относится к малотоксичным веществам с ярко выраженными каталептогенными свойствами.

### Литература

1. Cimini A., D'Angelo B., Das S., Gentile R., Benedetti E., Singh V., Monaco A.M., Santucci S., Seal S. Antibody-conjugated PEGylated cerium oxide nanoparticles for specific targeting of A $\beta$  aggregates modulate neuronal survival pathways // Acta Biomaterialia. - 2012. - Vol. 8, № 6. - P. 2056-2067.
2. Kawagoe M., Ishikawa K., Wang S.-C., Yoshikawa K., Arany S., Zhou X.-P., Wang J.-S., Ueno Y., Koizumi Y., Kameda T., Koyota S., Sugiyama T. Acute

effects on the lung and the liver of oral administration of cerium chloride on adult, neonatal and fetal mice // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. - 2008. - Vol. 22, № 1. - P. 59-65.

3. Briggs A., Corde S., Oktaria S., Brown R., Rosenfeld A., Lerch M., Konstantinov K., Tehei M. Cerium oxide nanoparticles: influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation // *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. - 2013. - Vol. 9, № 7. - P. 1098-1105.

4. Weaver J.D., Stabler C.L. Antioxidant cerium oxide nanoparticle hydrogels for cellular encapsulation // *Acta Biomaterialia*. - 2015. - Vol. 16. - P. 136-144.

5. 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. - Vol. 11, № 7. - P. 1725-1734.

6. Бричка С.Я. Природные алюмосиликатные нанотрубки: структура и свойства // *Наноструктурное материаловедение*. - 2009. - № 2. - С. 40-53.

7. Lvov Y.M., Shchukin D.G., Mohwald H., Price R.R. Halloysite clay nanotubes for controlled release of protective agents // *ACS Nano*. - 2008. - Vol. 2, № 5. - P. 814-820.

8. Levis S.R., Deasy P.B. Characterisation of halloysite for use as a microtubular drug delivery system // *International Journal of Pharmaceutics*. - 2002. - Vol. 243. - P. 125-134.

9. Бричка С.Я., Бричка А.В., Чернявская Т.В., Котел Л.Ю. Модифицирование алюмосиликатных нанотрубок диоксидом церия // *Украинский химический журнал*. - 2013. - Т.79, №6. - С. 97-100.

10. Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. Структурно-чувствительные и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // *Успехи химии*. - 2009. - Т.78, №9. - С.924-941.