

УДК 571.27:546.655.4

## РАДИКАЛ-ПРОДУЦИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

<sup>1</sup>Созарукова М.М., <sup>2</sup>Савинова Е.А., <sup>2</sup>Проскурнина Е.В.

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова»

Российской академии наук, Москва, e-mail: s\_madinam@bk.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва,

e-mail: savinova.ekaterina96@yandex.ru, proskurnina@gmail.com

Наночастицы диоксида церия являются ярким представителем нового класса биомиметиков, сочетающим в себе уникальные физико-химические свойства и способность выполнять функции широкого спектра природных ферментов. Перспективы биомедицинского применения обуславливают необходимость всестороннего анализа нанодисперсного диоксида церия, в том числе в аспекте его влияния на важное звено иммунной системы и свободнорадикального гомеостаза в организме – нейтрофилы крови. Исследована радикал-продуцирующая активность нейтрофилов крови практически здоровых доноров ( $n = 3$ ) до и после взаимодействия с наночастицами  $\text{CeO}_2$ , стабилизированного декстраном ( $\text{CeO}_2$ :декстран 1:1.1), хемиллюминесцентным методом в присутствии люминола. Образование клетками свободных радикалов инициировали путем последовательного добавления веществ с разным механизмом активирующего действия: праймирующий агент форбол-12-миристинат-13 ацетат (ФМА) и основной стимул *N*-формилметионил-лейцил-фенилаланин (фМЛФ). Установлено, что влияние наночастиц  $\text{CeO}_2$ , стабилизированного декстраном, на функциональную активность нейтрофилов может иметь разнонаправленный характер. Показано супрессорное действие наночастиц  $\text{CeO}_2$  на спонтанную (собственную) хемиллюминесценцию (ХЛ) клеток ( $n = 1$ ), на ФМА- и фМЛФ-индуцированную ХЛ ( $n = 2$ ). Продемонстрирован эффект усиления образования активных форм кислорода нейтрофилами крови без стимуляции ( $n = 2$ , спонтанная ХЛ) и в случае активации их радикал-продуцирующей функции ФМА ( $n = 2$ ) и фМЛФ ( $n = 2$ ) в присутствии наночастиц  $\text{CeO}_2$ .

**Ключевые слова:** нейтрофилы, наночастицы, диоксид церия, нанозимы, свободные радикалы, активные формы кислорода, хемиллюминесценция

## RADICAL-PRODUCING ACTIVITY OF BLOOD NEUTROPHILS IN THE PRESENCE OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

<sup>1</sup>Sozarukova M.M., <sup>2</sup>Savinova E.A., <sup>2</sup>Proskurnina E.V.

<sup>1</sup>N.S. Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,

Moscow, e-mail: s\_madinam@bk.ru;

<sup>2</sup>N.P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics, Moscow,

e-mail: savinova.ekaterina96@yandex.ru, proskurnina@gmail.com

Cerium dioxide nanoparticles are a bright representative of a new class of biomimetics that combine unique physical and chemical properties and the ability to perform the functions of a wide range of natural enzymes. Prospects for biomedical applications necessitate a comprehensive analysis of nanodispersed cerium dioxide, including in terms of its effect on an important link in the immune system and free radical homeostasis in the body – blood neutrophils. The radical-producing activity of blood neutrophils from practically healthy donors ( $n = 3$ ) was studied before and after interaction with  $\text{CeO}_2$  nanoparticles stabilized with dextran ( $\text{CeO}_2$ :dextran 1:1.1) by the chemiluminescent method in the presence of luminol. The formation of free radicals by cells was initiated by successive addition of substances with different mechanisms of action: the priming agent phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA) and the main stimulus *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). It has been established that the effect of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles stabilized with dextran on the functional activity of neutrophils can be multidirectional. The suppressive effect of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles on spontaneous (intrinsic) chemiluminescence (CL) of cells ( $n = 1$ ) and on FMA- and fMLF-induced CL ( $n = 2$ ) was shown. The effect of enhancing the formation of reactive oxygen species by blood neutrophils without stimulation ( $n = 2$ , spontaneous CL) and in the case of activation of their radical-producing function of PMA ( $n = 2$ ) and fMLF ( $n = 2$ ) in the presence of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles was demonstrated.

**Keywords:** neutrophils, nanoparticles, cerium dioxide, nanozymes, free radicals, reactive oxygen species, chemiluminescence

Растущие темпы развития нанотехнологий и их биомедицинского применения актуализируют задачу всесторонней оценки влияния создаваемых наноматериалов на организм человека. В организме постоянно поддерживается определенный уровень свободных радикалов, необходимых для нормальной жизнедеятельности. В этом аспекте важной составляющей таких ис-

следований является изучение наноматериалов как участников свободнорадикальных реакций [1]. Ярким представителем нового класса биомиметиков, нанозимов (нанозимов), неорганических материалов, обладающих ферментоподобной активностью, являются наночастицы диоксида церия [2]. Наночастицы  $\text{CeO}_2$  способны выполнять функции аналогично ряду природных энзи-

мов, что расширяет перспективы их биомедицинского применения для профилактики, диагностики и терапии социально значимых заболеваний, в том числе связанных с окислительным стрессом и онкологическими [3]. Одними из основных источников свободных радикалов в организме являются нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) крови, осуществляющие функцию иммунной защиты путем фагоцитоза и секреции цитокинов. При попадании наночастиц в кровотоки первичный контакт происходит с нейтрофилами, мигрирующими в очаг воспаления. Несмотря на то, что в ряде исследований сообщается об увеличении числа нейтрофилов в ответ на введение наночастиц, работ, посвященных изучению прямой активации клеток последними, а именно нанодисперсным диоксидом церия, довольно мало [4, 5]. Кроме того, следует отметить, что по большей части эти исследования проведены на изолированной популяции клеток.

Цель исследования – анализ влияния одного из наиболее перспективных представителей класса нанозимов, наночастиц диоксида церия, на радикал-продуцирующую функцию нейтрофильного звена лейкоцитов при двухстадийной стимуляции клеток.

#### Материалы и методы исследования

*Синтез и физико-химическая характеристика наночастиц  $\text{CeO}_2$ .* Нестабилизированный коллоидный раствор  $\text{CeO}_2$  получали термогидролизом гексанитратоцерата (IV) аммония (#215473, Sigma) [6]. Концентрацию золя  $\text{CeO}_2$  определяли термогравиметрическим методом. Коллоидный раствор наночастиц  $\text{CeO}_2$  стабилизировали декстраном (#31388, ~ 6.000 г/моль, Sigma) в мольном соотношении 1:1.1 ( $\text{CeO}_2$ :декстран). Рентгенограммы образцов нанодисперсного  $\text{CeO}_2$  были получены с помощью дифрактометра Bruker D8 Advance (CuK $\alpha$ -излучение, геометрия  $\theta$ – $2\theta$ ). Идентификацию дифракционных максимумов осуществляли с использованием банка данных ICDD PDF2.

*Хемилюминесцентный анализ радикал-продуцирующей активности нейтрофилов крови.* Оценку функциональной активности нейтрофильного звена лейкоцитов проводили хемилюминесцентным методом с использованием протокола двухстадийной последовательной стимуляции клеток [7]. В качестве источника нейтрофилов использовали цельную венозную кровь практически здоровых доноров (Д.1, Д.2, Д.3) в возрасте  $22 \pm 1$  лет. Кровь была отобрана из локтевой вены натошак в вакутейнеры с гепарином лития (17 МЕ/мл). Хемилюми-

несценцию клеток регистрировали в растворе Хенкса + Нерес (среда, pH 7,4) на 12-канальном хемилюминометре (Lum-1200). В кювету, содержащую среду (450 мкл) и люминол (45 мкМ), вносили 25 мкл исследуемого образца (цельная кровь до и после инкубации с золем  $\text{CeO}_2$ , стабилизированным декстраном) и регистрировали спонтанную хемилюминесценцию (10 мин). Затем добавляли праймирующий агент форбол-12-мирилат-13-ацетат (ФМА, 50 нг/мл) и после 20 мин инкубации вводили основной стимул *N*-формилметиониллейцил-фенилаланин (фМЛФ, 10 мкМ). Все реагенты фирмы Sigma (США). Хемилюминограммы регистрировали при комнатной температуре не менее 2 ч.

#### Результаты исследования и их обсуждение

В результате термолитиза водного раствора гексанитратоцерата (IV) аммония был получен электростатически стабилизированный золь диоксида церия (0,125 М) с размером частиц, равным 3 нм [6]. По данным рентгенофазового анализа, синтезированный золь содержал однофазный диоксид церия (PDF2 34-0394). Для функционализации поверхности наночастиц  $\text{CeO}_2$  был выбран декстран – полисахарид, являющийся перспективным биосовместимым лигандом благодаря широкому спектру применения как в качестве самостоятельного фармакологического агента, так и в составе комбинированных препаратов для инфузионной терапии [8, 9]. Спектры поглощения водного золя  $\text{CeO}_2$ , стабилизированного декстраном, демонстрировали появление полосы поглощения в области 275–310 нм, характерной для нанокристаллического диоксида церия (данные не приведены).

После модификации декстраном коллоидный раствор диоксида церия инкубировали с образцами цельной крови (не менее 30 мин). Хемилюминесцентный ответ (ХЛ-ответ) клеток регистрировали в присутствии люминола, являющегося зондом, чувствительным к пероксиду водорода и активным формам хлора [10]. Были зарегистрированы спонтанная (собственная) хемилюминесценция нейтрофилов и стимулированная в результате последовательного применения праймирующего агента (ФМА) и основного стимула (фМЛФ) [7]. Двойная стимуляция (ФМА+фМЛФ) предполагает активацию клеток двумя веществами с разным механизмом действия, что приводит к наиболее полному ХЛ-ответу клеток. Хемилюминограммы, типичные для образцов крови практически здоровых доноров ( $n = 3$ ), пред-

ставлены на рис. 1. Контрольные измерения с индивидуальным раствором декстрана продемонстрировали отсутствие влияния на функциональную активность нейтрофилов (данные не приведены).

Как видно, в присутствии наночастиц  $\text{CeO}_2$  в случае пробы Д.1 происходит усиление собственного ХЛ-ответа клеток (рис. 1, А). При этом предварительная инкубация крови с золей  $\text{CeO}_2$ , стабилизированном декстраном (1:1.1), не оказывала влияния на вид кинетики, развивающейся при двухстадийной стимуляции нейтрофилов (рис. 1, Б). Для количественной оценки радикал-продуцирующей активности клеток в присутствии наночастиц  $\text{CeO}_2$  для всех участков кинетической кривой (спонтанная ХЛ, ФМА-индуцированная ХЛ, фМЛФ-индуцированная ХЛ) были рассчитаны такие параметры, как интенсивность (амплитуда ответа) и интегральный показатель, площадь под ХЛ-кривой, пропорциональная концентрации образующихся свободных радикалов (рис. 2–4).

На основании полученных данных в качестве наиболее показательного параметра при анализе не менее трех параллельных измерений была выбрана площадь под кинетической кривой ( $S_{\text{сп}}$ ,  $S_{\text{ФМА}}$  и  $S_{\text{фМЛФ}}$ ). Получено, что для образцов Д.1 и Д.3 присутствие наночастиц диоксида церия вызывает усиление спонтанной (собственной) ХЛ клеток, для пробы Д.2 – уменьшение интенсивности свечения (рис. 2). При этом наиболее выраженный эффект наблюдается для образца Д.1. Установлено, что при ФМА-индуцированной ХЛ нейтрофилов нанодисперсный диоксид церия может оказывать как супрессорное (Д.1, Д.2), так и активирующее (Д.3) действие (рис. 3). Показано, что предварительная инкубация проб с золей  $\text{CeO}_2$ , стабилизированном декстраном, вызывает разнонаправленный характер изменения ХЛ-ответа клеток, индуцированного фМЛФ (рис. 3): эффект снижения ХЛ (Д.1 незначительный эффект, Д.2 – выраженный) и увеличение интенсивности свечения (Д.3).

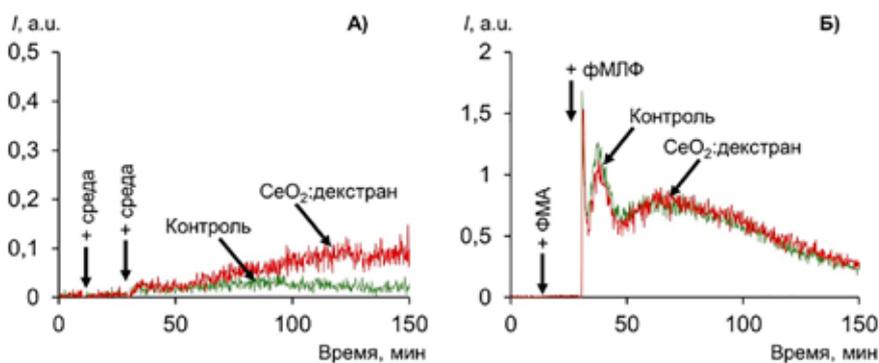


Рис. 1. (А) Спонтанная (собственная) и (Б) стимулированная (последовательная двойная стимуляция ФМА+фМЛФ) хемилуминесценция нейтрофилов крови практически здорового донора (Д.1) до и после инкубации с золей  $\text{CeO}_2$  (0,25 ммоль/л), стабилизированном декстраном в мольном соотношении 1:1.1

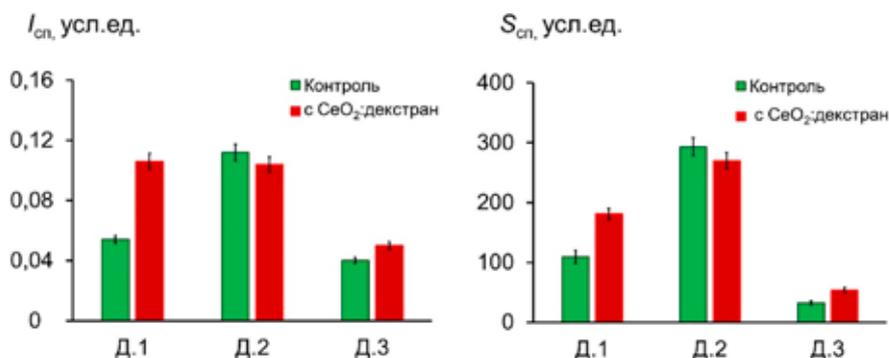


Рис. 2. Гистограммы распределения интенсивности ( $I_{\text{сп}}$ ) и светосуммы ( $S_{\text{сп}}$ , площадь под ХЛ-кривой) спонтанной (собственной) ХЛ нейтрофилов для исследуемых образцов крови до и после инкубации с наночастицами  $\text{CeO}_2$ , стабилизированного декстраном (1:1.1)

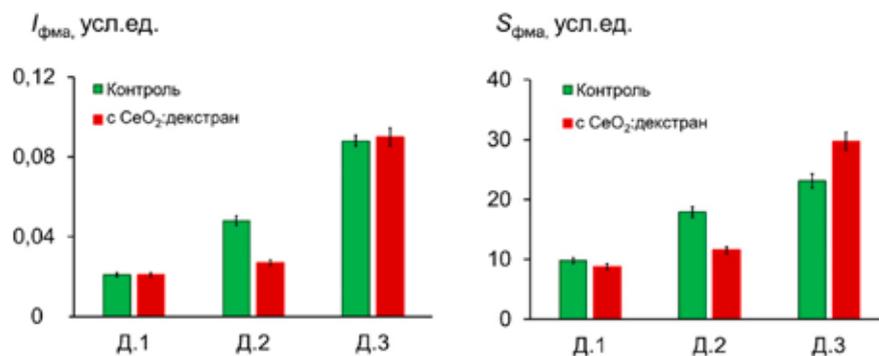


Рис. 3. Гистограммы распределения интенсивности ( $I_{fma}$ ) и светосуммы ( $S_{fma}$ , площадь под ХЛ-кривой) ФМА-индуцированной ХЛ нейтрофилов для исследуемых образцов крови до и после инкубации с наночастицами  $SeO_2$ , стабилизированного декстраном (1:1.1)

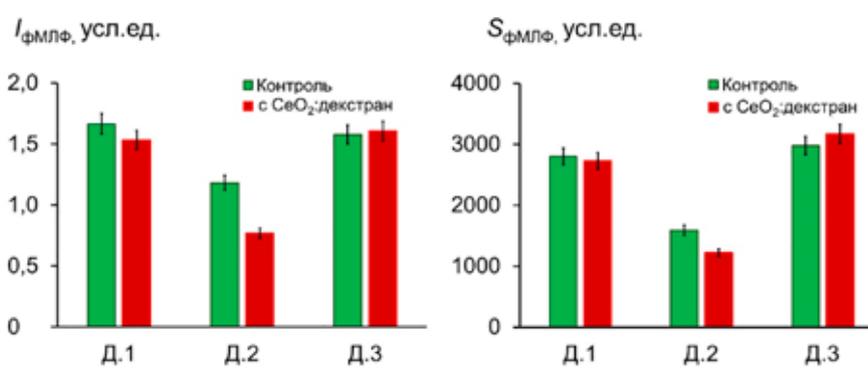


Рис. 4. Гистограммы распределения интенсивности ( $I_{fmLf}$ ) и светосуммы ( $S_{fmLf}$ , площадь под ХЛ-кривой) фМЛФ-индуцированной ХЛ нейтрофилов для исследуемых образцов крови до и после инкубации с наночастицами  $SeO_2$ , стабилизированного декстраном (1:1.1)

Влияние наночастиц диоксида церия, стабилизированного декстраном (1:1.1), на функциональную активность нейтрофилов крови практически здоровых доноров

Проба	Собственная ХЛ нейтрофилов	ФМА-индуцированная ХЛ нейтрофилов	фМЛФ-индуцированная ХЛ нейтрофилов
Д.1	активация	супрессия	супрессия
Д.2	супрессия	супрессия	супрессия
Д.3	активация	активация	активация

Таким образом, получено, что наночастицы  $SeO_2$  оказывают разное влияние на функциональную активность нейтрофилов на примере крови практически здоровых доноров. При этом эффект может иметь как ингибирующий характер (Д.1 (супрессия стимулированной ХЛ), Д.2 (супрессия спонтанной и стимулированной ХЛ), так и активирующий (Д.3) в случаях ХЛ-ответа клеток, обусловленного различными механизмами (таблица).

Для наночастиц химия поверхности является ключевым фактором, определяющим как их участие в биохимических

процессах, так и характер взаимодействия с клетками, в том числе с нейтрофилами [11]. Нейтрофилы поглощают наночастицы путем фагоцитоза и пиноцитоза. Подобно патогенам или бактериям, наночастицы, взаимодействуя с мембранами нейтрофилов, запускают некоторые нейтрофильные реакции: активацию радикал-продуцирующей функции, дегрануляцию и образование внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps – NETs) [12]. Несмотря на имеющиеся исследования, демонстрирующие увеличение числа нейтрофилов в ответ на присутствие наночастиц, данные

о прямой активации этих клеток наночастицами, в частности нанодисперсным  $\text{CeO}_2$ , практически не встречаются. Стимуляция радикал-продуцирующей активности нейтрофилов ФМА и фМЛФ происходит через разные механизмы действия: внутри- и внеклеточный соответственно. В случае праймирующего действия ФМА проникает в клетку путем пассивной диффузии и активирует протеинкиназный путь сборки НАДФН-оксидазы [13]. Внеклеточный рецепторный механизм стимуляции характерен для фМЛФ, причем происходит последовательная смена вне- и внутриклеточного синтеза активных форм кислорода [7]. Дисмутация образующихся супероксидных анион-радикалов приводит к тому, что в среде накапливается пероксид водорода, а за счет работы миелопероксидазы – активные формы хлора. Про- и антиоксидантные свойства наночастиц  $\text{CeO}_2$  тесно связаны между собой. Важным вопросом является механизм модуляции наночастицами  $\text{CeO}_2$  радикал-продуцирующей активности нейтрофилов. На данном этапе работы можно предположить, что в ряде случаев активирующее действие наночастиц  $\text{CeO}_2$  обусловлено прооксидантной активностью нанодисперсного диоксида церия по отношению к пероксиду водорода [14], в то время как супрессорное – реализуется за счет антиоксидантных свойств к гипохлориту [15].

### Заключение

Получено, что наночастицы  $\text{CeO}_2$ , модифицированные декстраном, модулируют функциональную активность нейтрофилов крови практически здоровых доноров. Нанодисперсный диоксид церия оказывает активирующее или супрессорное действие как на собственную хемилуминесценцию клеток, так и на стимулированную ФМА и фМЛФ. Сделано предположение о возможном механизме наблюдаемых эффектов: усиление ХЛ нейтрофилов за счет прооксидантной активности наночастиц  $\text{CeO}_2$  по отношению к пероксиду водорода, ингибирование свечения клеток – антиоксидантные свойства нанодисперсного диоксида церия к гипохлориту. Продолжение исследований в данном направлении представляется необходимым и важным, поскольку это позволит уточнить механизмы регуляции наночастицами  $\text{CeO}_2$  неспецифического иммунного ответа.

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-2763.2021.1.3).*

### Список литературы

1. Ji X., Zhou Y., Li Q., Song H., Fan C. Protein-mimicking nanoparticles for a cellular regulation of homeostasis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2021. Vol. 13. No. 27. P. 31331–31336.
2. Jiang D., Ni D., Rosenkrans Z.T., Huang P., Yan X., Cai W. Nanzyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2019. Vol. 48. No. 14. P. 3683–3704.
3. Thakur N., Manna P., Das J. Synthesis and biomedical applications of nanoceria, a redox active nanoparticle. *J. Nanobiotechnology*. 2019. Vol. 17. No. 1. P. 1–27.
4. Goncalves D.M., De Liz R., Girard D. Activation of neutrophils by nanoparticles. *Sci. World J.* 2011. Vol. 11. P. 1877–1885.
5. Lin M.-H., Lin C.-F., Yang S.-C., Hung C.-F., Fang J.-Y. The interplay between nanoparticles and neutrophils. *J. Biomed. Nanotech.* 2018. Vol. 14. No. 1. P. 66–85.
6. Scherbakov A.B., Teplonogova M.A., Ivanova O.S., Shekunova T.O., Ivonin I.V., Baranchikov A.E., Ivanov V.K. Facile method for fabrication of surfactant-free concentrated  $\text{CeO}_2$  sols. *Mater. Res. Express*. 2017. Vol. 4. No. 5. P. 055008.
7. Образцов И.В., Годков М.А., Полимова А.М., Дёмин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Оценка функциональной активности нейтрофилов цельной крови методом двухстадийной стимуляции: новый подход к хемилуминесцентному анализу // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9 (18). № 4. С. 418–425.
8. Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaitanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*. 2008. Vol. 4. No. 5. P. 552–556.
9. Naha P.C., Hsu J.C., Kim J., Shah S., Bouché M., Si-Mohamed S., Rosario-Berrios D.N., Douek P., Hajfathalian M., Yasini P. Dextran-coated cerium oxide nanoparticles: a computed tomography contrast agent for imaging the gastrointestinal tract and inflammatory bowel disease. *ACS Nano*. 2020. Vol. 14. No. 8. P. 10187–10197.
10. Allred C.D., Margetts J., Hill H.R. Luminol-induced neutrophil chemiluminescence. *Biochim. Biophys. Acta*. 1980. Vol. 631. No. 2. P. 380–385.
11. Li H., He B., Liu X., Li J., Liu Q., Dong W., Xu Zh., Qian G., Zuo H., Hu C., Qian H., Mao C., Wang G. Regulation on toll-like receptor 4 and cell barrier function by Rab26 siRNA-loaded DNA nanovector in pulmonary microvascular endothelial cells. *Theranostics*. 2017. Vol. 7. No. 9. P. 2537–2554.
12. Vlasova I.I., Kapralov A.A., Michael Z.P., Burkert S.C., Shurin M.R., Star A., Shvedova A.A., Kagan V.E. Enzymatic oxidative biodegradation of nanoparticles: Mechanisms, significance and applications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016. Vol. 299. P. 58–69.
13. Vogt K.L., Summers C., Chilvers E.R., Condliffe A.M. Priming and depriming of neutrophil responses in vitro and in vivo. *Eur. J. Clin. Invest.* 2018. Vol. 48. P. e12967.
14. Sozarukova M.M., Proskurnina E.V., Ivanov V.K. Prooxidant potential of  $\text{CeO}_2$  nanoparticles towards hydrogen peroxide. *Nanosyst.: Phys., Chem., Math.* 2021. Vol. 12. No. 3. P. 283–290.
15. Pulido-Reyes G., Das S., Leganés F., Silva S., Wu S., Self W., Fernández-Piñas F., Rosal R., Seal S. Hypochlorite scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *RSC Adv*. 2016. Vol. 6. No. 67. P. 62911–62915.