

УДК 577.34. , 577.35, 620.3

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ НОВОГО МРТ КОНТРАСТИРУЮЩЕГО АГЕНТА НА ОСНОВЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, ДОПИРОВАННОГО ГАДОЛИНИЕМ

© 2025 г. Д. Д. Колманович^а, Е. А. Мысина^а, И. В. Савинцева^а,
Т. О. Козлова^б, Н. Н. Чукавин^а, В. К. Иванов^б, А. Л. Попов^а, *

^а Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

^б Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Поступила в редакцию 31.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

В работе представлены результаты исследования нового нанокompозитного материала на основе оксида церия, допированного гадолинием и функционализированного фолиевой кислотой, как перспективного материала для нового МРТ контрастирующего агента. В рамках данной работы нами проведено комплексное исследование физико-химических характеристик, коллоидной стабильности и МРТ отклика синтезированного нанокompозита, а также комплексный анализ его цитотоксичности на культуре клеток глиобластомы человека линии U251 *in vitro*. Показано, что синтезированный нанокompозит вызывает дозозависимый цитотоксический эффект в отношении клеток глиобластомы человека, вызывая развитие внутриклеточного окислительного стресса и последующей инициации процесса апоптоза. Такой нанокompозит перспективен для разработки на его основе нового тераностического агента, обладающего не только МРТ-контрастирующими свойствами, но и выраженной редокс-активностью, что обеспечивает его цитотоксический эффект и терапевтическую активность в клетке.

Ключевые слова: наночастицы, церий, гадолиний, магнитно-резонансная томография, цитотоксичность

DOI: 10.56304/S2079562924050245

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее перспективных подходов в разработке новых эффективных агентов для терапии социально-значимых заболеваний является использование наночастиц оксидов металлов, в частности диоксида церия, который имеет уникальную редокс-активную поверхность и крайне низкую токсичность, что делает его одним из наиболее перспективных наноматериалов биомедицинского применения.

Ранее показано, что наночастицы оксида церия (CeO₂) обладают ферментативными свойствами и способны имитировать активность эндогенных ферментов таких как каталаза [1], супероксиддисмутаза [2], фосфатаза [3], пероксидаза [4] и т.д. Каталитическая активность наночастиц оксида церия сильно зависит от микроокружения и способна сменяться с антиоксидантной на прооксидантную [5], что может быть использовано для создания новых противоопухолевых препаратов, обладающих селективной цитотоксичностью.

Ранее показано, что наночастицы диоксида церия способны выступать и как радиопротектор [6], и как радиосенсибилизатор [7], при этом основными параметрами, определяющими вектор их действия, является pH клеточного окружения и мощность использованного ионизирующего излучения [8]. Более того, наночастицы CeO₂ способны проявлять самостоятельную избирательную токсичность в зоне опухоли, что обуславливает их высокий потенциал в терапии онкологических заболеваний [9]. Вместе с тем сложность визуализации ультрамалых наночастиц CeO₂ ограничивает возможность контроля их локализации в организме, в связи с чем возникает необходимость их дополнительной функционализации. Одним из способов получить наночастицы, способные эффективно выполнять роль нанозима, но и еще быть диагностическим агентом в магнитно-резонансной томографии, является допирование его кристаллической решетки ионами гадолиния, которые обладают парамагнитными свойствами. При этом допирование кристаллической решетки

ки церия лантаноидами повышает его кислородную нестехиометрию, что влияет на биологическую активность через повышение редокс-активности поверхности наночастиц. Таким образом, мы получаем редокс-активный тераностический агент, внутриклеточную локализацию которого возможно визуализировать с помощью МРТ. Ранее нами показана возможность допирования кристаллической решетки оксида церия ионами гадолиния и возможность использования таких наночастиц для трекинга мезенхимальных стволовых клеток человека [10], а также селективного накопления в раковых клетках аденокарциномы человека и их гибели [11].

В рамках данной работы для функционализации наночастиц оксида церия, допированного гадолинием (CeGdO_{2-x}), мы использовали таргетную молекулу (фолиевую кислоту), рецептор которой экспрессируется на мембране некоторых видов опухолевых клеток. Такая функционализация позволяет повысить эффективность доставки тераностического агента в опухолевые клетки и его депонирование в опухолевой ткани, что может обеспечить не только достоверную визуализацию опухолевых клеток, но и пролонгированный терапевтический эффект. Проведенный комплексный анализ физико-химических характеристик синтезированных наночастиц подтвердил их высокую коллоидную стабильность и монодисперсность, их МРТ-контрастирующие свойства, а также выраженный цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток глиобластомы человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез нанокompозита осуществляли полиольным методом с использованием поливинилпирролидона в качестве стабилизатора, позволяющим получать частицы ультрамалого размера (до 10 нм). Размер и форму наночастиц CeGdO_{2-x} определяли методом просвечивающей электронной микроскопии на электронном микроскопе Leo912 AB Omega, оснащенный спектрометром потерь энергии электронов (EELS) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Химический состав (энергодисперсионный рентгеноструктурный анализ) образца был проанализирован на сканирующем электронном микроскопе Carl Zeiss NVision 40, оснащенный детектором Oxford Instruments X-MAX при ускоряющем напряжении 20 кВ. Гидродинамический диаметр и дзета-потенциал наночастиц CeGdO_{2-x} определяли с помощью анализатора BetterSize Zeta 90. Скорость релаксации коллоидного раствора CeGdO_{2-x} анализировали с помощью томографа Bruker Clinscan 7T. Значения релаксации T1 рассчитывали, как тангенс угла наклона в зависимостях обратной T-релаксации время на концентрацию Gd^{3+} . Анализ биосовместимости синтезированного ком-

позита анализировали с использованием культуры клеток глиобластомы человека линии U251 методом МТТ-теста через 24 и 48 ч соинкубации, исследованием соотношения числа живых и мертвых клеток через 24 ч соинкубации, а также анализу числа апоптотических клеток через 24 ч соинкубации. МТТ-тест основан на анализе активности цитоплазматических и митохондриальных дегидрогеназ, способных переводить водорастворимый тетразоль в нерастворимый формазан. Значение оптической плотности формазана соответствует уровню жизнеспособности клеточной культуры и уровню ее метаболической активности. Анализ числа мертвых клеток после инкубации с наночастицами был проведен путем окраски клеточной культуры смесью флуоресцентных красителей пропидиум йодид/Syto9 (Термофишер, США) и последующим фотографированием культуры клеток на инвертированном микроскопе АксиоВерт 200 (Цейс, Германия). Анализ количества апоптотических клеток определяли с помощью селективного красителя Yo-PRO1 (Термофишер, США), который проникает только в клетки, находящиеся в стадии апоптоза. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась, используя программное обеспечение GraphPad 8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Был проведен комплексный анализ физико-химических характеристик синтезированного нанокompозита широким спектром методов. Нанокompозит CeGdO_{2-x} был синтезирован полиольным методом с использованием поливинилпирролидона в качестве стабилизатора, который позволяет получать наночастицы ультрамалого размера. Анализ размера наночастиц методом просвечивающей электронной микроскопии подтвердила высокую степень монодисперсности и сферическую форму (до 10 нм) (рис. 1а), а электронная дифракция их ультрамалый размер. Методами спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (рис. 1б) и методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (рис. 1в, 1г) подтверждено, что ионы гадолиния входят в состав нанокompозита, что дополнительно подтверждается парамагнитными свойствами синтезированного нанокompозита через анализ скорости релаксации по T1 (рис. 1д, 1е). Гидродинамический диаметр нанокompозита при формировании суспензии в дистиллированной воде составил 4.2 ± 0.7 нм. Дзета-потенциал нанокompозита 0.79 ± 0.12 мВ.

МТТ-тест через 24 ч соинкубации с нанокompозитом не выявил его выраженного токсического эффекта (рис. 2а). Анализ жизнеспособности клеток глиобластомы человека после 48 ч соинкубации с наночастицами показал выраженный токсич-

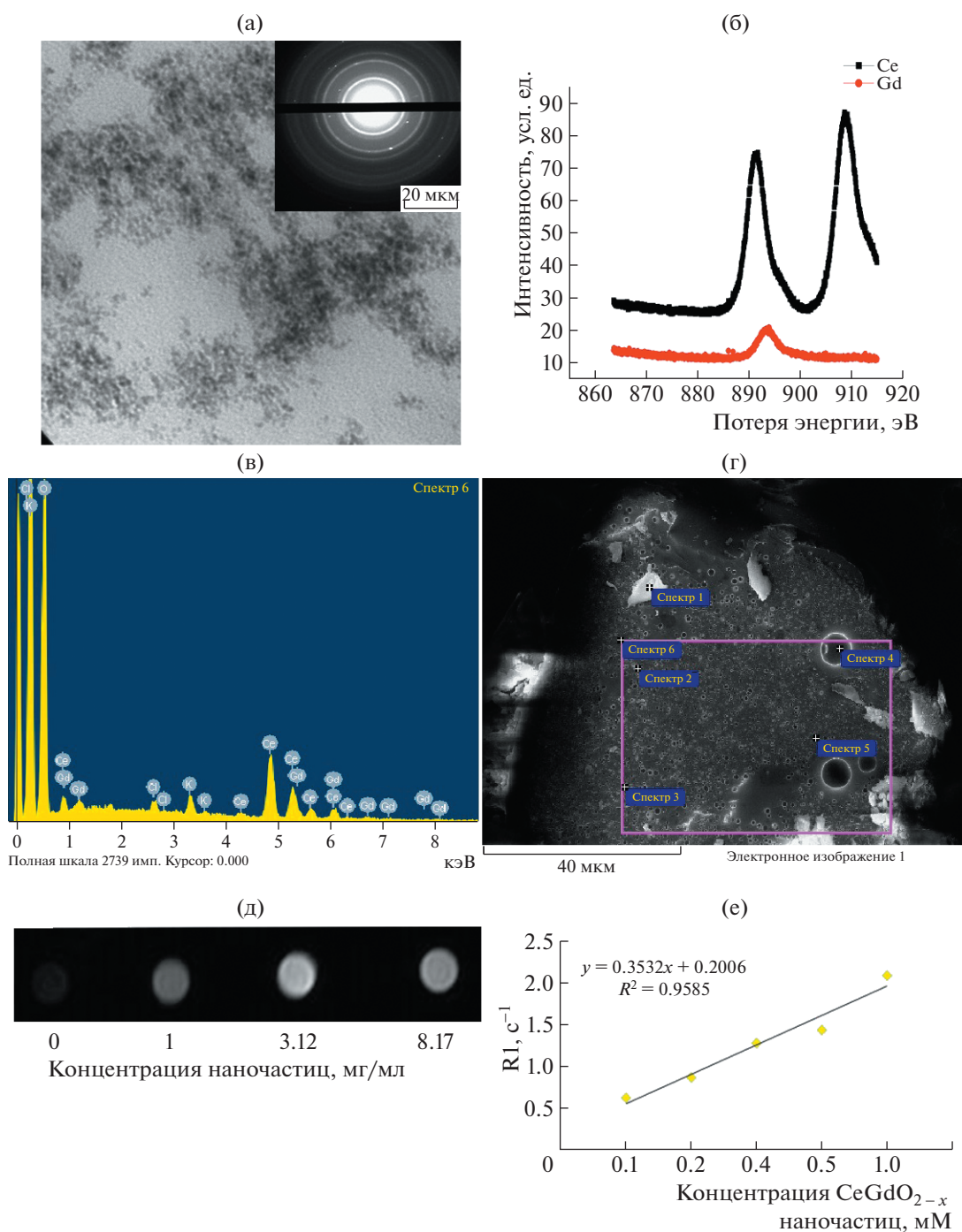


Рис. 1. Анализ физико-химических характеристик наночастиц CeGdO_{2-x} . Просвечивающая электронная микроскопия (а) и электронная дифракция (а, вставка), спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (б), метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (в, г), скорость МРТ-релаксации (д, е).

ческий эффект, начиная уже с минимальной концентрации в 0.3 мг/мл (рис. 2б). Стоит отметить, что после 24 ч инкубации клеток с наноккомпозитом происходит дозо-зависимый рост числа мертвых клеток (рис. 2в), однако достоверное различие с контрольной группой имеется только для

максимальной концентрации 5 мг/мл. Через 48 ч соинкубации максимальная концентрация наноккомпозита приводит к значительному увеличению числа мертвых клеток в культуре и достигает значения 35%, что подтверждает выраженный цитотоксический эффект.

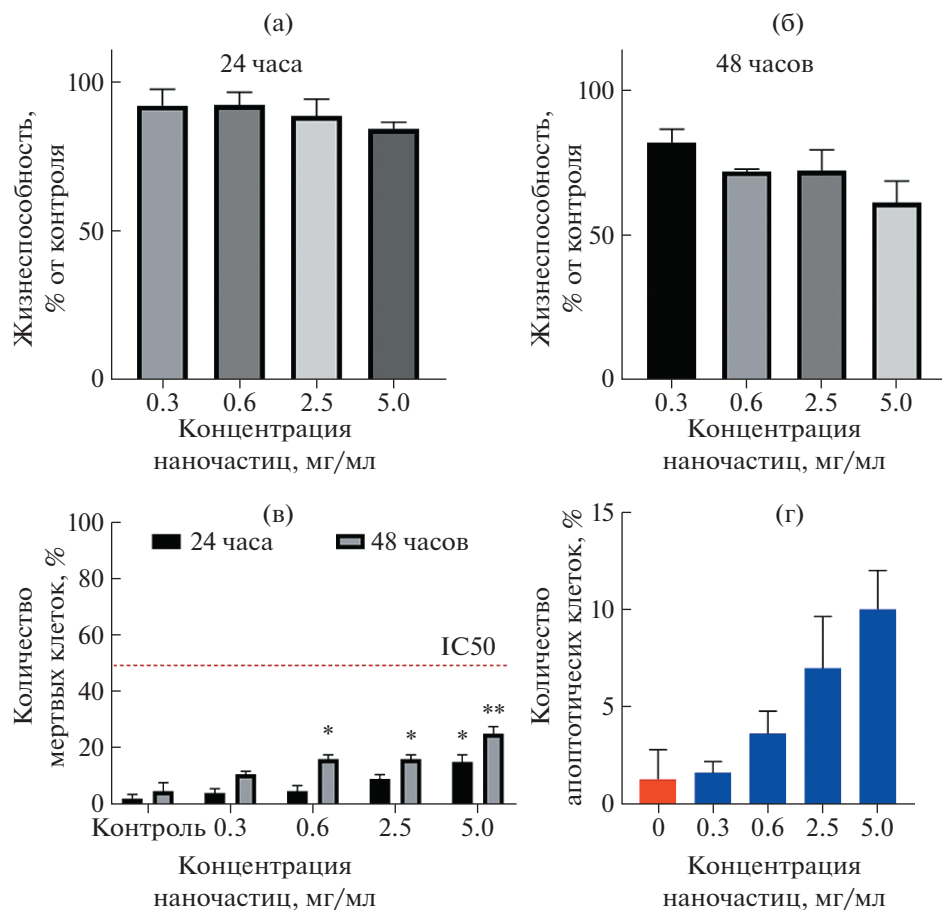


Рис. 2. Анализ биосовместимости нанокompозита в отношении клеток: МТТ-тест (а, б), анализ соотношения живых/мертвых клеток (в) и анализ количества апоптотических клеток (г).

Стоит отметить, что через 48 ч соинкубации и небольшие концентрации наночастиц (0.6 и 2.5 мг/мл) демонстрируют токсический эффект, который проявляется в статистически достоверном увеличении числа мертвых клеток. Анализ молекулярных механизмов гибели клеток после инкубации с нанокompозитом был проанализирован путем оценки числа апоптотических клеток с использованием селективного флуоресцентного красителя Yo-Pro1. Анализ полученных микрофотографий после окраски выявил значительный рост количества апоптотических клеток до 5, 8 и 11% для концентраций 0.6, 2.5 и 5 мг/мл соответственно.

Анализ микрофотографий, полученных в режиме фазового контраста (рис. 3а) через 24 ч соинкубации позволяет сделать вывод об отсутствии видимых морфологических изменений даже после инкубации с высокими концентрациями наночастиц (2.5 и 5 мг/мл). Анализ морфологии клеточных ядер (окраска Хехст 33342) через 48 ч соинкубации показывает увеличение числа кле-

ток с ядрами, которые характеризуются конденсированным хроматином (яркое свечение), что позволяет говорить о гибели клеток через процесс апоптоза. При этом большая часть ядер клеток не изменяет свою морфологию и сохраняет размер и характерную округлую форму. Анализ клеточной культуры через 24 и 48 ч после окраски красителем Syto9 показывает снижение общего количества клеток при максимальной концентрации наночастиц в 5 мг/мл, что говорит о некотором цитостатическом эффекте синтезированных наночастиц, подтверждаемым данными МТТ-теста.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован новый нанокompозит на основе оксида церия, допированного гадолинием, с дополнительной его функционализацией фолевой кислотой с целью обеспечения адресной доставки в клетки, гиперэкспрессирующие на мембране фолатные рецепторы. Полученный золь наночастиц обладает высокой степенью монодисперсности и

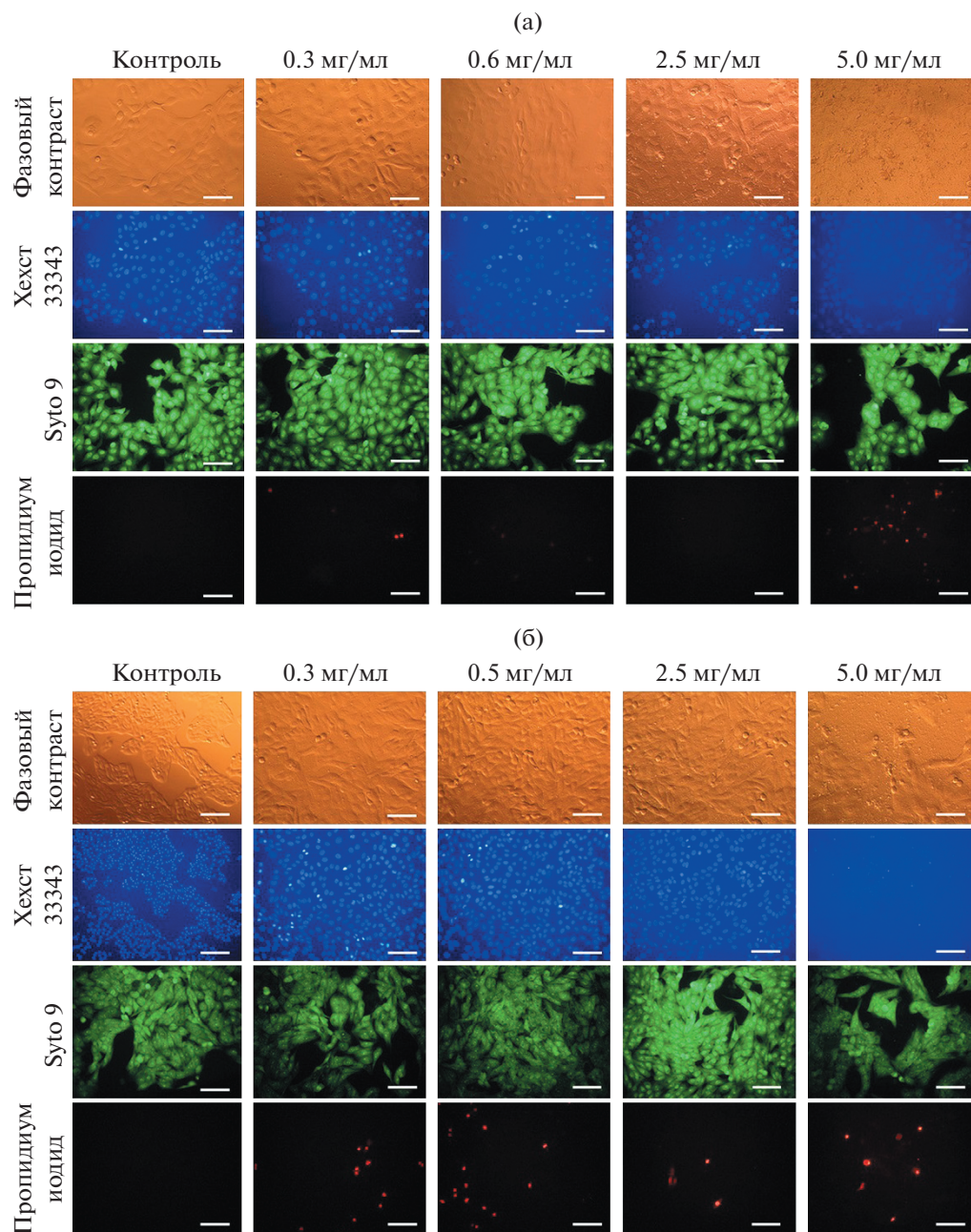


Рис. 3. Микрофотографии клеток глиобластомы линии U251 после 24 (а) и 48 (б) ч соинкубации с наночастицами, сделанные в режиме фазового контраста и флуоресценции после окраски красителем Хехст 33343 (синий, окраска ядра), пропидиум иодид (красная, окраска ядер мертвых клеток) и Syto9 (зеленая, окраска цитоплазмы). Линейка 100 мкм.

коллоидной стабильности, МРТ-контрастирующими свойствами и проявляет цитотоксический эффект по отношению к клеткам глиобластомы человека линии U251 в концентрациях от 0.3 мг/мл и выше, через запуск процесса апоптоза и последующей гибели. Разработанный нанокомпозит может лечь в основу при разработке эффективного тераностического агента для терапии онкологических заболеваний в рамках курса лучевой и адронной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10231, <https://rscf.ru/project/22-73-10231/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Baldim V., Bedioui F., Mignet N., Margail I., Berret J.-F. // *Nanoscale*. 2018. V. 10. P. 6971–6980.

2. Heckert E.G., Karakoti A.S., Seal S., Self W.T. // *Bio-materials*. 2008. V. 29 (18). P. 2705–9.
3. Yao T., Tian Z., Zhang Y., Qu Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11 (1). P. 195–201.
4. Alizadeh N., Salimi A., Sham T.K., Bazylewski P., Fanchini G. // *ACS Omega*. 2020. V. 5 (21). P. 11883–11894.
5. Hu Z., Ding Y. // *Nano Res.* 2022. V. 15. P. 333–345.
6. Popov A.L., Zaichkina S.I., Popova N.R., Rozanova O.M., et al. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. P. 106141–106149.
7. Wason M.S., Lu H., Yu L., Lahiri S.K., Mukherjee D., Shen C., Das S., Seal S., Zhao J. // *Cancers (Basel)*. 2018. V.10 (9). P. 303.
8. Briggs A., Corde S., Oktaria S., Brown R., Rosenfeld A., Lerch M., Konstantinov K., Tehei M. // *Nanomedicine*. 2013. P. 9 (7). P. 1098–1105.
9. Zholobak N.M., Shcherbakov A.B., Ivanova O.S., Reukov V., Baranchikov A.E., Ivanov V.K. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2020. V. 209. P. 111921.
10. Popov A.L., Savintseva I.V., Kozlova T.O., et al. // *Molecules*. 2023. V. 28 (3). P. 1165.
11. Popov A., Abakumov M., Savintseva I., Ermakov A., Popova N., Ivanova O., Kolmanovich D., Baranchikov A., Ivanov V. // *J. Mater. Chem. B*. 2021. V. 9. P. 6586–6599.

Gd-Doped Cerium Oxide Nanoparticles as a New MRI Contrast Agent: Analysis of Properties and Biocompatibility

D. D. Kolmanovich¹, E. A. Mysina¹, I. V. Savintseva¹, T. O. Kozlova²,
N. N. Chukavin¹, V. K. Ivanov¹, and A. L. Popov^{1, *}

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

²*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: antonpopovleonid@gmail.com

Received May 31, 2023; revised June 6, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—The paper presents the results of a study of a new folic acid functionalized nanocomposite cerium oxide based gadolinium-doped material as a promising material as a new MRI contrast agent. As part of this work, we carried out a comprehensive analysis of their characteristics, colloidal stability, and MRI response, as well as a comprehensive analysis of its cytotoxicity on a U251 human glioblastoma cell culture in vitro. It has been shown that the synthesized nanocomposite causes a dose-dependent cytotoxic effect on human glioblastoma cells, causing the development of intracellular oxidative stress and subsequent initiation of the apoptosis process. Such a nanocomposite is promising for the development of a new theranostic agent based on it, which has not only MRI-contrasting properties, but also a pronounced redox activity, which ensures its cytotoxic effect and therapeutic activity in the cell.

Keywords: nanoparticles, cerium, gadolinium, magnetic resonance imaging, cytotoxicity