

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ СЦИНТИЛЯЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ

на правах рукопису

УДК [546.65:577.359-022.532]:577.337

АВЕРЧЕНКО КАТЕРИНА АНДРІЇВНА

**МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ РЕДОКСАКТИВНИХ НАНОЧАСТИНОК
($\text{ReVO}_4\text{:Eu}^{3+}$ і CeO_{2-x}) НА БІОЕНЕРГЕТИЧНІ ПРОЦЕСИ В
МІТОХОНДРІЯХ**

03.00.02 – біофізика

**Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук**

Науковий керівник:

Єфімова Світлана Леонідівна

доктор фіз.-мат. наук,

старший науковий співробітник

Харків 2016

Зміст

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	4
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ВПЛИВ РЕДОКСАКТИВНИХ НАНОЧАСТИНОК НА ПРОЦЕСИ В БІОСИСТЕМАХ.....	12
1.1. Застосування наночастинок в біології та медицині	12
1.1.1. Наночастинки на основі рідкісноземельних елементів – властивості і особливості використання в біомедичних дослідженнях	17
1.1.2. Вплив наночастинок на основі РЗЕ на вільнорадикальні процеси в біосистемах. Мішені та механізм прооксидантної дії наночастинок	21
1.1.3. Наночастинки на основі рідкісноземельних елементів з антиоксидантними властивостями, перспективи застосування при оксидативних порушеннях	23
1.2. Механізми дії редоксактивних наночастинок на біоенергетичні процеси в мітохондріях	28
1.2.1. Мітохондріальний потенціал як основна характеристика функціонального стану мітохондрій	32
1.2.2. Активні форми кисню в регуляції мітохондріальних процесів. Опосередкована тіолами редокс-регуляція дихального ланцюга мітохондрій	33
1.2.3. Характеризування мітохондріальних процесів на основі моделей....	35
Висновки до розділу 1 і постановка мети дисертаційної роботи	38
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТЕХНІКА І МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ	39
2.1. Методика синтезу водних колоїдних розчинів наночастинок.....	39
2.2. Препаративні методи	42
2.3. Аналітичні методи.....	43
2.4. Обчислювальна кінетична модель Маркевича і Хоека	52
2.5. Характеристика використаних реактивів.....	55

Висновки до розділу 2	55
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ІНАКТИВУВАТИ РАДИКАЛИ В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ	56
3.1. Редоксактивність наночастинок в модельних абіотичних і біотичних системах	56
3.2. Ефекти наночастинок при моделюванні змін редокс-балансу біосистем	64
Висновки до розділу 3	77
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ТА ПРОЦЕСИ ДИХАННЯ І ОКИСЛЮВАЛЬНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ. МЕХАНІЗМИ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНІ ПРОЦЕСИ.....	78
4.1. Оцінка мітохондріального потенціалу в ізольованих клітинах печінки при впливі наночастинок із застосуванням JC-1	78
4.2. Вивчення дії наночастинок на біоенергетичні процеси в ізольованих мітохондріях	90
4.3. Можливі механізми дії наночастинок на процеси в мітохондріях.....	96
Висновки до розділу 4	100
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ	101
5.1. Дія наночастинок, індукторів оксидативного стресу і тіолових протекторів на мітохондріальний потенціал	102
Висновки до розділу 5	112
ВИСНОВКИ.....	113
ПРИМІТКИ	115
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	116

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

$\Delta\Psi_m$	мітохондріальний трансмембранний потенціал
АТФ	аденозинтрифосфорна кислота
АДФ	аденозиндифосфат
GSH	глутатіон відновлений
GSSG	глутатіон окислений
NAC	N-ацетил-L-цистеїн
АФК	активні форми кисню
ДНК	дезоксирибонуклеїнова кислота
ДК	дыхальный контроль
НАД (NAD)	нікотинамідадениндинуклеотид
НЧ	наночастинки
НМ	наноматеріали
РЗЕ	рідкісноземельні елементи
МХ	мітохондрії
ПОЛ	перекисне окислення ліпідів
БСА	бичачий сироватковий альбумін
ДМСО	диметилсульфоксид
JS-1	5,5',6,6'-тетраетилбензимидазол карбоцианін йодид
СОД	супероксиддисмутаза
ТБК	тіобарбитурова кислота
ЕДТА	Етилендіамінтетраацетат натрію
HBS	HEPES-buffered saline solution
FCCP	карбоніл ціанід 4 – (трифлуорометоксі) фенілгідразон
t-BHP	трет-бутилгідропероксид
H ₂ O ₂	перекис водню
ДТТ	дітіотрейтол

МТТ	(3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide), МТТ-тест
ФДТ	фотодинамічна терапія
МБ	метиленовий бликитний
ЕТЦ	електрон-транспортний ланцюг
НДЦ	нанокристалічний діоксид церія

ВСТУП

Актуальність теми. Декілька останніх десятиріч супроводжуються стрімким розвитком нанотехнологій та галузей науки і техніки, які пов'язані з дослідженням та використанням наноматеріалів (НМ). Застосування НМ у сучасній біомедицині значно розширює діапазон високочутливих методів для вивчення фундаментальних біологічних процесів та проведення діагностичних досліджень. НМ привертають особливу увагу і як потенційні лікарські засоби. Зважаючи на роль оксидативного стресу у виникненні патологій та старінні організму, використання сучасних досягнень нанотехнологій для підтримки окислювального гомеостазу є актуальним і перспективним. В даному аспекті привертають увагу редоксактивні наночастинки (НЧ) як антиоксиданти, що здатні до саморегенерації. Так, діоксид церію у нанокристалічному стані характеризується суттєвою кисневою нестехіометрією і має велику концентрацію Ce^{3+} іонів, в тому числі і на поверхні частинки. Вважається, що доступність Ce^{3+} іонів для активних форм кисню (АФК), здатність змінювати валентність (3^+ або 4^+) та наявність великої кількості кисневих вакансій визначає редоксактивність та унікальні антиоксидантні властивості наноцерія. Також вважаються перспективними для антиоксидантної терапії інші типи редоксактивних НЧ на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ). Активовані європієм НЧ на основі ортованадатів РЗЕ, через наявність в кристалічній решітці іонів зі змінною валентністю, так само є редоксактивними і можуть залучатися до різних окислювально-відновних процесів та впливати на рівень АФК. Захисний ефект цих НЧ в біосистемах реалізується як пряма антиоксидантна дія (за рахунок антирадикальної активності), або може бути опосередкований впливом на про- та антиоксидантні системи.

Мітохондрії (МХ) є головним джерелом і мішенню для АФК. Канцерогенез, деякі нейродегенеративні та кардіоваскулярні захворювання, діабет асоціюються з порушенням мітохондріальної функції та підвищенням

концентрації АФК. Основними рисами оксидативного пошкодження із залученням мітохондріальної ланки є мітохондріальна недостатність внаслідок відкривання мітохондріальної пори, деполяризація мембрани МХ, гальмування синтезу АТФ, окислення відновленого глутатіону (GSH) та тіолових груп білків.

Питання щодо впливу редоксактивних НЧ на процеси генерації АФК та біоенергетичну функцію МХ нерозривно пов'язані між собою. Тому побудова адекватної фізичної моделі, яка описує вплив редоксактивних НЧ на процеси переносу електронів в мітохондріальному дихальному ланцюзі та генерацію АФК є актуальною науковою задачею біофізики як у фундаментальному, так і прикладному сенсі, оскільки дозволить створювати новітні терапевтичні засоби на основі редоксактивних НЧ з програмованою дією.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась відповідно до тематичних планів науково-дослідних робіт Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України в рамках НДР «Багатофункціональні нанолюмінофори для біомедичних застосувань» (2009-2010 рр., номер держреєстрації № 0109U005914), НДР «Розробка нових люмінесцентних матеріалів для застосування в нанобіотехнологіях» (2011-2012 рр., номер держреєстрації № 0111U008840) Державної цільової науково-технічної та соціальної програми «Наука в університетах», НДР «Розробка методів отримання багатофункціональних люмінесцентних наноструктур для технічних і біомедичних застосувань» (номер держреєстрації №0110U006970, 2010-2011 рр.), НДР «Розробка технологій отримання гібридних органіко-неорганічних наноструктурованих люмінесцентних матеріалів (номер держреєстрації № 0112 U001897, 2012-2016 рр.). У виконанні вказаних вище НДР здобувачка брала участь як виконавець.

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягає у визначенні основних механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів – діоксиду церію CeO_{2-x} і ортованадатів

$\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) на основні показники мітохондріальної активності – мітохондріальний потенціал та процеси дихання і окислювального фосфорилування в клітинах печінки.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити *такі основні задачі*:

- оцінити здатність НЧ впливати на інтенсивність генерації АФК в модельних системах і живих клітинах;
- дослідити інтенсивність дихання і окислювального фосфорилування в ізольованих мітохондріях у присутності НЧ;
- за допомогою мікрофлуориметричного методу оцінити зміни мітохондріального потенціалу ($\Delta\Psi_m$) ізольованих гепатоцитів щурів різного віку при дії НЧ;
- визначити характер впливу НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку при моделюванні оксидативного стресу і дії тіолових антиоксидантів;
- з використанням існуючих кінетичних моделей, що описують процеси генерації АФК в залежності від зовнішніх умов, запропонувати можливі механізми дії НЧ, що досліджувались, на редокс-процеси в мітохондріях.

Об'єкт дослідження – механізми впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ на біоенергетичні процеси в мітохондріях печінки.

Предмет дослідження – мітохондріальний потенціал та інтенсивність дихання і окислювального фосфорилування в умовах дії редоксактивних НЧ на основі РЗЕ.

Методи дослідження – флуоресцентна мікроскопія, мікроспектрофлуориметрія, флуоресцентна спектроскопія, спектрофотометрія, хемілюмінометрія, полярографія, обчислювальна кінетична модель Маркевича та Хоека.

Наукова новизна отриманих результатів.

1. Вперше встановлено, що в різних модельних системах НЧ на основі РЗЕ проявляють про/антиоксидантну активність в залежності від властивостей мікрооточення, експериментальних умов, а також їх фізико-хімічних

параметрів.

2. Експериментально встановлено відмінності у механізмах проникнення НЧ в клітини. Показано, що проникнення малих частинок в клітини відбувається за механізмом адсорбції-дифузії, тоді як НЧ розміром більш ніж 10 нм проникають у клітину шляхом ендоцитозу.
3. Вперше встановлено безпосередній прооксидантний вплив НЧ на біоенергетичні процеси в МХ (інтенсивність дихання і окислювального фосфорилування).
4. Вперше, із застосуванням мікрофлуориметричного підходу, зареєстровано індуковані НЧ зміни $\Delta\Psi_m$ в неушкоджених клітинах та при моделюванні оксидативного стресу, оцінено захисний вплив тіолових сполук.
5. Експериментально доведено, що прооксидантна дія НЧ, що досліджувались, є більш вираженою у клітинах старіючого організму, що пов'язано з перебудовою в глутатіон-залежних системах регуляції окислювального балансу клітини.
6. На основі кінетичної моделі, яка описує процеси генерації АФК, запропоновано механізми впливу НЧ на основі РЗЕ, що досліджувались, на редокс-процеси в МХ.

Практичне значення отриманих результатів полягає, перш за все, в отриманні нових знань стосовно впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ на генерацію АФК в абіотичних та біотичних системах в залежності від фізико-хімічних властивостей та розмірів НЧ. Охарактеризовано взаємозв'язок редоксактивності НЧ та впливу на $\Delta\Psi_m$, інтенсивність дихання і окислювального фосфорилування. Наукові результати дисертаційної роботи та зроблені висновки стосовно механізмів впливу НЧ на біоенергетичні процеси у живій клітині можуть бути використані для розробки новітніх стратегій у створенні терапевтичних агентів для корекції порушень в системах регуляції окислювального балансу під впливом різних факторів, у тому числі, у наслідок старіння організму.

Особистий внесок здобувача. Автором дисертаційної роботи самостійно проведений аналіз наукової літератури, отримані результати експериментальних досліджень і проведена їх статистична обробка. Автором особисто виконаний первинний аналіз результатів і сформульовані попередні висновки. Разом з науковим керівником, д.ф.-м.н. Єфімовою С.Л., були визначені мета, задачі роботи і способи їх вирішення, здійснена інтерпретація отриманих результатів та зроблені остаточні висновки. В опублікованих спільно зі співавторами працях особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [1,200,201] – у дослідженні накопичення флуоресцентного зонду JC-1 мітохондріями клітин печінки щурів різного віку та аналізі змін $\Delta\Psi_m$ під впливом хімічних індукторів оксидативного стресу;

- у роботах [2,183,184,229] – в отриманні спектрів хемілюмінесценції та оцінці здатності НЧ різних розмірів впливати на інтенсивність вільно-радикальних процесів в абіотичних і біотичних системах;

- у роботах [3,198,199,228] – у аналізі мітохондріальної активності за потенціал-залежними змінами флуоресцентного сигналу зонду JC-1 у поодиноких клітинах та окисного стану гепатоцитів після впливу НЧ різних розмірів;

- у роботі [4] – дослідження особливостей впливу НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів в умовах індукованих та вікових змін окислювального балансу;

- у роботі [5] – дослідження впливу наночастинок на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів та процеси дихання та окисного фосфорилування ізольованих мітохондрій;

- у роботах [6,185] – вивчення впливу НЧ на вільно-радикальні реакції в модельних біосистемах.

- у роботі [7] – у аналізі основних механізмів впливу НЧ на біоенергетичні процеси в мітохондріях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких міжнародних та вітчизняних конференціях: Международная молодежная научно-техническая

конференция «Люминесцентные процессы в конденсированных средах» LUMCOS Харьков (Украина) 2009; 2011; 2013; The THIRD International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (*IWASOM*), Gdansk (Poland), 2011. International School-Seminar of Galina Puchkovska «Spectroscopy of Molecules and Crystals» Crimea (Ukraine), 2011; 2013; 9th International Conference on Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9), Lviv (Ukraine), 2013; Ukrainian – German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology. – Kyiv (Ukraine), 2015.

Публікації. Основні результати дисертації опубліковані у 16 наукових працях; з них: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах та 9 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків та переліку використаних літературних джерел. Повний обсяг дисертації складає 141 сторінку, дисертація містить 39 рисунків, 1 таблицю. Список використаних джерел складається з 229 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

ВПЛИВ РЕДОКСАКТИВНИХ НАНОЧАСТИНОК НА ПРОЦЕСИ В БІОСИСТЕМАХ

1.1. Застосування наночастинок в біології та медицині

Унікальні властивості наноматеріалів (НМ) визначають особливості їх взаємодії з біологічними структурами та вплив на різноманітні процеси в біосистемах. НЧ розглядають як основу для широкого застосування в біології. Поверхня і ядро НЧ можуть бути модифіковані для індивідуального і мультимодального застосування, в тому числі для розпізнавання біомолекул, терапевтичної доставки, біодатчиків і біовізуалізації. НЧ вже досить широко використовуються в дослідженнях *in vitro* та *in vivo*. Проте повна реалізація їх потенціалу потребує вирішення низки відкритих питань щодо токсичності НМ, про гострі і довгострокові наслідки їх впливу на здоров'я людини і навколишнє середовище, а також про надійність методів для оцінки їх впливу [8].

НЧ на основі РЗЕ мають значний потенціал для біомедичного застосування [9].

Наявність оптичних властивостей у НЧ, легованих РЗЕ, може бути використана для отримання різних типів зображень [9]. Їх перспективні фотофізичні властивості включають в себе високу фотостабільність, відсутність мерехтіння, вузькі емісійні лінії, великі часи життя. До переваг НЧ цієї групи належать також відносна нетоксичність, здатність перебувати в водних розчинах в колоїдному стані і легкість функціоналізації, яка дозволяє провести поєднання нанорозмірного носія з різними біологічно активними молекулами і функціональними групами. Повідомлялося про отримання багатофункціональних ванадатних НЧ, легованих РЗЕ, які можуть використовуватися в якості люмінесцентного зонда, оксидантного сенсора з

просторово-часовим вимірюванням і контрастного агента для магнітно-резонансної томографії (МРТ) [10]. Крім того, виявлені антиоксидантні властивості деяких типів НЧ цієї групи дають можливість розглядати їх як самостійні терапевтичні засоби. Так, НЧ діоксиду церію (CeO_{2-x}), оксиду алюмінію (Al_2O_3) і оксиду ітрію (Y_2O_3) проявляють властивості акцепторів радикалів. Наступне пояснення запропоновано для визначення антирадикальної дії цих НЧ: вони можуть виступати як прямі антиоксиданти, можуть блокувати або знижувати утворення АФК [11]. З даними властивостями НЧ пов'язують можливість їх застосування в терапії захворювань, патогенез яких пов'язан з оксидативним стресом.

Оксидативний стрес визначається як надмірна біодоступність АФК, яка є результатом дисбалансу між продукцією АФК і їх деструкцією, в якій беруть участь антиоксидантні захисні системи. Оксидативний стрес відіграє ключову роль в патогенезі більше 100 різних захворювань, перш за все нейродегенеративних, таких як хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, аміотрофічний склероз, епілепсія і розсіяний склероз. Оксидативний стрес може бути причиною артриту, кардіологічних дисфункцій і багатьох захворювань, що викликають необоротну сліпоту, таких як діабетична ретинопатія, макулярна і ретинальна дегенерація. Врешті, при старінні будь-якого здорового організму може виникати віковий оксидативний стрес за рахунок зниження активності природної антиоксидантної системи, а також у зв'язку зі збільшенням вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) і вільних радикалів. Враховуючи роль оксидативного стресу у виникненні патологій і старінні організму, використання сучасних досягнень нанотехнологій є актуальним і перспективним для спрямованого впливу на основні патогенетичні ланки в системах регуляції окислювального гомеостазу.

Однією з найбільш відомих теорій старіння в сучасній літературі є вільнорадикальна теорія Хармана, запропонована ще в середині минулого століття, згідно з якою пошкодження клітинних макромолекул шляхом

продукції в аеробних організмах вільних радикалів є основною детермінантою тривалості життя. Більш сучасною версією даної теорії є теорія окислативного стресу, відповідно до якої з віком відбувається збільшення утворення АФК, частина яких не є вільними радикалами, що призводить до функціональних змін, патологічних станів і навіть смерті.

Редоксактивність НЧ – здатність вбудовуватися в окислювально-відновні реакції в якості донора або акцептора електронів, передбачає, що частинка, після участі її в реакції, повинна або бути виведена з системи, або здатна відновити свої функції завдяки особливостям нанокристалічної будови. Так, наприклад, відомо, що діоксиду церія при переході в нанокристалічний стан притаманні особливі функціональні властивості, обумовлені залежністю кисневої стехіометрії даної сполуки від розміру частинок [12]. Нестехіометрія церію в нанокристалічному стані дозволяє йому брати участь в різних окислювально-відновлювальних процесах, зокрема, в інактивації деяких з найбільш токсичних АФК, таких як перекис водню, супероксидний і нітрокисильний радикали.

Хоча НЧ, що виступають в якості пасток вільних радикалів, розглядаються як перспективні для антивікової терапії, дані за віковими аспектам впливу НМ на біосистеми практично відсутні. Застосування НМ з керованою редоксактивністю для відновлення окислювального гомеостазу має значні перспективи для корекції вікових і окислативних патологій.

Серед причин, які призводять до збільшення продукції АФК, виділяють порушення транспорту електронів в дихальному ланцюзі МХ. Показано також, що МХ є ключовою ланкою в цитотоксичних ефектах окислативного стресу [13]. Канцерогенез, деякі нейродегенеративні і кардіоваскулярні захворювання асоціюються з порушенням функціонування МХ і підвищенням внутрішньоклітинної концентрації АФК. У зв'язку з цим, перспективним є пошук мітохондріально-спрямованих терапевтичних засобів, здатних регулювати окислювальне фосфорилування і редокс-процеси в МХ. Особливе значення має пошук підходів, що перешкоджають

розвитку оксидативного ушкодження МХ, і стабілізуючих біоенергетичну функцію в умовах прооксидантного впливу.

Характеристики, що визначають реакційну активність НМ – це їх розмір, хімічний склад, методи отримання та синтезу, наявність функціональних хімічних груп на поверхні, форма і радіус кривизни поверхні, її гетерогенність і наявність пор, гідрофільність та гідрофобність. Враховуючи те, що в біологічних системах дія всіх цих складових доповнюється особливостями біологічних реакцій, оцінка редоксактивності НЧ і індукованих ними змін окислювального балансу в живих системах повинна проводитися на різних структурних рівнях і в динаміці розвитку процесу. Треба також враховувати роль АФК в регуляції фізіологічних і біохімічних процесів. Вони виконують функцію між- і внутрішньоклітинних месенджерів, регуляторів і складових метаболічних процесів, є найпершою і найбільш мобільною ланкою в адаптаційній перебудові організму при екстремальних впливах. Тому вплив редоксактивних НЧ може призводити до змін або навіть порушень тих чи інших ланок регуляторного механізму. Інтеграція редоксактивних НЧ в процеси переносу електронів може супроводжуватися порушеннями функціонального стану МХ, призводити до окислювального дисбалансу і клітинної загибелі.

Сьогодні також існує низка НМ, яким не притаманні редоксактивні властивості, але при цьому вони мають виражену біологічну активність. Одними з яскравих прикладів таких частинок є фулерени і НЧ золота. Фулерени є аллотропною модифікацією вуглецю у вигляді порожнистих сферичних утворень. В основі біологічної активності фулеренів лежать три основні чинники: ліпофільність, яка визначає мембранотропні властивості, електронодефіцитність, яка дозволяє взаємодіяти з вільними радикалами, і здатність в збудженому стані передавати енергію молекулі кисню і перетворювати його в синглетний кисень.

Водорозчинні похідні фулерену C_{60} знаходять широке застосування в терапії багатьох захворювань. Так, зокрема, похідні фулерену C_{60}

використовуються як противірусні [14] і антибактеріальні [15] агенти. У низці досліджень показана ефективність фулеренів як фотосенсибілізаторів для фотодинамічної терапії (ФДТ) онкологічних захворювань [16]. Антиоксидантні і антиапоптичні ефекти фулеренів можуть використовуватися в терапії бокового аміотрофічного склерозу і хвороби Паркінсона [17]. Проте в роботі [13] досліджено токсичні ефекти фулеренів і показано, що МХ є цільовою мішенню при дії цих НЧ – спостерігається деполяризація мембрани МХ, порушення синтезу АТФ, зниження ефективності антиоксидантної захисної системи клітин, окислення ліпідів та розвиток оксидативного стресу.

Дослідження впливу НЧ золота (~2 нм) на лінію клітин раку молочної залози людини показало, що такі частинки є високочутливими радіосенсибілізаторами, а за відсутності іонізуючого випромінювання викликають пошкодження ДНК, дисфункцію МХ і загибель клітин, і такі ефекти НЧ можуть бути використані в протипухлинній терапії [18]. Дослідження, проведені авторами [19], показали, що НЧ золота здатні взаємодіяти з глутатіоном (GSH), при цьому він адсорбується на поверхні частинок, викликаючи збільшення їх гідродинамічного радіусу. Адсорбція GSH на золотих частинках залежить від розмірів самих частинок та іонної сили розчину, та є важливою характеристикою біологічної реактивності золотих НЧ. Автори [20] продемонстрували, що в культурі клітин НЧ золота демонструють низьку токсичність, а у великих дозах викликають загибель мишей, причому автори стверджують, що токсичність золотих частинок залежить саме від їх малих розмірів, що необхідно враховувати при використанні таких НЧ для таргетної доставки ліків та візуалізації.

Детальне дослідження біологічної активності НЧ вимагає різноманітності підходів, дослідницьких методик, оцінки на різних рівнях організації біосистем, починаючи від моделей і закінчуючи цілісним організмом, так як в залежності від мікрооточення і складності біосистеми

кінцевий ефект НЧ, у тому числі редоксактивних, може мати значні відмінності.

1.1.1. Наночастинки на основі рідкісноземельних елементів – властивості і особливості використання в біомедичних дослідженнях

Для сучасної біомедицини, клітинної та молекулярної біології, фундаментальної науки або діагностики необхідні високочутливі методи візуалізації. Але ці області застосування часто обмежуються оптичними властивостями доступних зондів. У клітинній біології вимірювання клітинної відповіді з просторовим і часовим розділенням є основною інструментальною проблемою. Це служить мотивацією для пошуку нових зондів і методів візуалізації. Так, слабка фотостабільність генетично кодованих зондів або органічних барвників мотивує підвищення інтересу до різних видів НЧ для візуалізації, таким як квантові точки, наноалмази, доповані барвниками частинки кремнію, леговані або металеві частинки. Внаслідок цього, одним з найактивніших напрямків для досліджень в останнє десятиліття були НЧ на основі РЗЕ, оптичні властивості і низька цитотоксичність яких робить їх перспективними для біологічного застосування.

Рідкісноземельними елементами називають групу, яка складається з 17 хімічних елементів періодичної системи: скандій, ітрій, лантан, а також група лантаноїдів. Група лантаноїдів складається з 14 елементів, починаючи з №58 церію (Ce) і закінчуючи №71 лютецієм (Lu). Головною особливістю даної групи елементів є заповнення внутрішньої 4f- орбіталі. Для іонів лантаноїдів найбільш характерною є валентність 3^{+} , яка відповідає відриву 3-х валентних 4f 16s2 чи 5d 16s2 електронів.

Привабливі властивості НЧ на основі РЗЕ, як вже згадувалося раніше, включають в себе високу фотостабільність, відсутність ефектів мерехтіння,

вузькі емісійні лінії, великий Стоксів зсув, тривалі часи життя. Крім того, такі НЧ є перспективною платформою для подальшої функціоналізації [9].

Перш за все, оптичні властивості допованих НЧ на основі РЗЕ визначаються хімічною природою їх складових (допуючими іонами і матриксом кристалічної решітки). У більшості випадків їх люмінесценція зумовлена забороненими переходами між різними f -електронними конфігураціями рідкісноземельних іонів (за виключенням Ce^{3+} і Eu^{2+} , де включаються d -електрони).

НЧ можуть бути збуджені з використанням переходу в матриці (зазвичай в ультрафіолетовому (УФ)-діапазоні) і подальшого перенесення енергії до рідкісноземельного іону, або ж шляхом безпосереднього збудження рідкісноземельного іона для безпосередньої емісії або для передачі енергії до емітуючих іонів, в разі доповування такими іонами як Ce-Tb . У більшості випадків присутній значний Стоксів зсув (~ 150 нм для $\text{YVO}_4:\text{Eu}$ НЧ), набагато більший, ніж типовий Стоксів зсув у органічних флуорофорів. Однак збудження в УФ діапазоні неоптимально для застосування в живих клітинах і організмах. Крім того, пряме збудження, наприклад, Eu^{3+} , з використанням аргонного лазера дозволяє детектувати поодинокі частинки [21]. В такому випадку вузькість спектрів поглинання обмежує коло застосування джерел світла для детектування і спостереження. Заборонена природа переходів в НЧ між різними конфігураціями f -електронів призводить до тривалого часу життя в збудженому стані (~ 1 мс), у порівнянні з часами життя органічних флуоресцентних зондів (~ 1 нс). Як наслідок, яскравість (кількість випромінюваних фотонів в одиницю часу) одного випромінюючого центру значно нижче, ніж у органічних флуорофорів або квантових точок. Проте, в одній НЧ кілька сотень або тисяч іонів дають внесок у світловихід, так що поодинокі НЧ можна детектувати біологічно сумісним лазером за допомогою CCD камери [21-23]. Крім того, великі часи життя можуть бути використані для відділення побічних сигналів, таких як фонова флуоресценція клітин, або пряме збудження акцептора при

Фьорстеровському резонансному перенесенні енергії (FRET) в експериментах [24]. Деякі рідкісноземельні іони мають значну кількість неспарених електронів, що забезпечує високий магнітний момент при впливі магнітного поля. Іонам Gd^{3+} і Eu^{2+} з сімома неспареними електронами притаманні високі магнітні моменти, і це може бути використано для зниження поздовжнього часу релаксації T_1 протонів води в сильному магнітному полі. Gd^{3+} завдяки його доступності та хімічній стабільності застосовується в якості контрастного агента при МРТ.

Для біомедичного застосування НЧ на основі РЗЕ необхідно провести оцінку цитотоксичності частинок, так як цей фактор є основним обмеженням використання НЧ в даній області. Для різних типів НЧ на основі РЗЕ, з функціоналізацією або без, не спостерігалися цитотоксичні ефекти, як на рівні організму, так і при накопиченні в клітинах [25-27]. Потенційна цитотоксичність кожної частинки залежить від її складових, хімічних властивостей, властивостей поверхні і розмірів частинки, і дослідження як складових, так і матеріалів для функціоналізації, необхідно, перш ніж можна буде робити остаточні висновки про застосування НЧ [28].

Незважаючи на існуючі обмеження і недостатність знань щодо кінцевих ефектів НЧ в біосистемах, НЧ на основі РЗЕ (наприклад, $Gd_2O_3:Eu$, $LaF_3:Ce^{3+}$, Tb^{3+}) успішно застосовуються для досліджень ДНК [29-31], що надзвичайно важливо для діагностики низки захворювань, пов'язаних з мутаціями і дегенеративними явищами в ДНК. Також НЧ успішно застосовуються для мічення білків як *in vitro* [32,33], так і *in vivo* [34], причому в разі експериментів на мишах НЧ $NaYF_4:Yb$ були покриті антитілами. НЧ на основі РЗЕ використовуються для детектування білків [17,19,35] и неспецифічного мічення клітин *in vitro* та *in vivo* [36-38], для виявлення злоякісних утворень, причому використані в даному випадку НЧ $GdPO_4$, покриті декстраном, мають здатність до довгої циркуляції в крові та підвищену специфічність до проникнення і накопичення в судинній мережі пухлини [39].

Крім того, НЧ на основі РЗЕ мають значний потенціал для біомедичного застосування завдяки біологічній активності, яку проявляють іони РЗЕ [40]. З цими ж властивостями рідкісноземельних іонів пов'язана ще одна важлива область застосування НЧ на основі РЗЕ – як окисдантних сенсорів, що дозволяють виявлення внутрішньоклітинних сигнальних молекул якими є різні АФК. Перекис водню (H_2O_2) бере участь в сигналізації в різних фізіологічних клітинних процесах (скорочення, міграція, проліферація, диференціювання, апоптоз і т.д.) і грає важливу роль при патофізіологічних станах, таких як атеросклероз, запальні процеси, нейродегенеративні та злоякісні захворювання. Здатність клітини по-різному відповідати на сигнали в даний час погано вивчена в зв'язку з відсутністю точних і динамічних методів вимірювання внутрішньоклітинних відповідей. Нещодавні експерименти з використанням рідкісноземельних НЧ внесли свій вклад до цієї галузі в кількісне і динамічне вимірювання концентрації H_2O_2 в живих клітинах: основне випромінювання НЧ $YVO_4:Eu$ пов'язане з $^5D_0 - ^7F_2$ переходом іонів легуючої домішки Eu^{3+} з максимумом на 617 нм. Переход іонів від Eu^{3+} до Eu^{2+} може бути здійснений за допомогою фотоіндукованого механізму. Відносно висока інтенсивність резонансного опромінення протягом 250 с, таким чином, достатня для того, щоб значно знизити флуоресценцію (~70%). Подальше застосування H_2O_2 *in vitro* викликає окислення Eu^{2+} и, як слідство, відновлення флуоресценції при 617 нм. Амплітуда і швидкість відновлення залежать від концентрації H_2O_2 . Крім того, це відновлення є оборотним і не спостерігається деградація НЧ: їх відповідь ідентична незалежно від часу і стану окислення. Таким чином, концентрація перекису водню може бути зареєстрована за сигналом флуоресценції. Відповідь НЧ $YVO_4:Eu$ не є специфічною для H_2O_2 , і подібне відновлення флуоресценції може бути отримано з іншими формами окисдантів. Ці частинки, ймовірно, також можуть бути використані для виявлення інших фізіологічних окислювачів, таких як ClO^- або NO [25].

1.1.2. Вплив наночастинок на основі РЗЕ на вільнорадикальні процеси в біосистемах. Мішені та механізми прооксидантної дії наночастинок

Використання НЧ в біології та медицині передбачає розуміння принципу їх дії, особливостей потрапляння в організм і шляхів проходження, накопичення або виведення з організму. При захопленні клітинами НЧ можуть взаємодіяти з клітинними органелами, білками, нуклеїновими кислотами, можуть бути залучені в процеси внутрішньоклітинної сигналізації та проліферації [28,41].

Існує низка механізмів, за допомогою яких НЧ потрапляють в клітину. Значення і внесок цих шляхів, як було показано в ряді робіт, залежить від фізико-хімічних властивостей НЧ (наприклад, хімічний склад, розмір, геометрія, поверхневий заряд, покриття/ліганди, гідрофільність/гідрофобність, ступінь агрегації), від виду клітин, а також від мікросередовища [42].

Механізм клітинної інтерналізації НЧ, імовірно, залежить від наступних факторів:

1. Фізико-хімічні властивості матеріалу, такі як хімічний склад, розмір і форма, агрегаційний статус НЧ.
2. Експериментальні умови, умови експозиції (наприклад, вплив сироватки, білків або ліпідів, таких як альбумін і поверхнево активні речовини)
3. Тип клітин (наприклад, професійні фагоцити проти непрофесійної фагоцитарної клітини-мішені) і їх диференційний статус (наприклад, у порівнянні з макрофагами, моноцитами, «нормальними» порівняно з раковими клітинами), який буде визначати, чи відбулося поглинання за рахунок активної інтерналізації або при посередництві рецепторів, специфічних для конкретної клітини [43].

Передбачення кінцевого біологічного ефекту НЧ вимагає детального розгляду питань щодо їх прямого впливу на біоструктури, а також аналізу

адаптаційних процесів в клітинах, пов'язаних з впливом чужорідної сполуки. Необхідно враховувати, що кінцевий ефект НЧ залежить від мікрооточення, і чим складніше буде модельна система або система *in vivo*, тим в більшу кількість реакцій буде залучена частинка, і тим більша кількість взаємодій і «перетворень» буде здійснюватися.

Про— і антиоксиданти залучені в безліч найважливіших біологічних реакцій. У біологічних системах одним з основних аспектів впливу прооксидантів є індукція оксидативного стресу шляхом генерації АФК, таких як H_2O_2 , OH^\bullet , O_2^\bullet або пригнічення антиоксидантної системи. На сьогоднішній день основним припущенням є те, що малі розміри і високореактивна поверхня НЧ можуть призводити до токсикологічних пошкоджень шляхом генерації АФК і, як наслідок, оксидативного стресу [44-46]. При низькому рівні оксидативного стресу індукція антиоксидантних і детоксикуючих білків регулюється фактором транскрипції Nrf2, який регулює експресію антиоксидантних захисних елементів. [47,48]. При більш високому рівні оксидативного стресу ці захисні відповіді переходять в запальні реакції внаслідок здатності АФК індукувати редокс-чутливі сигнальні шляхи, такі як MAP-кінази та NF-кВ каскади [49]. Коли рівень оксидативного стресу зростає ще більше, відбувається перерозподіл передачі електронів на внутрішній мембрані МХ і порушення в регуляції стану відкриття/закриття мітохондріальної проникно-перехідної пори, що може викликати клітинний апоптоз, що відомо також як токсичний оксидативний стрес. Таким чином, основною мішенню для прооксидантно впливу НЧ є МХ, які є як генераторами, так і мішенями АФК в клітинах.

Токсичні (прооксидантні) властивості НЧ можуть реалізовуватися не тільки шляхом індукції оксидативного стресу. НЧ здатні збирати навколо себе білкову «корону», і ця здатність залежить від розміру часток, кривизни, форми, поверхневих властивостей [50]. Таким чином, НЧ можуть мати негативні ефекти в біоструктурах шляхом порушення структури білків (розгортання, стимуляція переходу між структурами білка), фібриляції,

індукувати тиолові зшивання, а також служити причиною втрати ферментативної активності [51,52].

Ще одним шляхом реалізації негативних ефектів НЧ в біосистемах є вихід з частинок іонів, токсичних для біоструктур, в тому випадку, коли термодинамічні властивості матеріалу (в тому числі вільної поверхневої енергії) сприяють дисоціації частинок в суспензійному або внутрішньоклітинному середовищі [53]. Як приклад можна привести НЧ ZnO, які у водних розчинах дисоціюють до гідратованих Zn^{2+} іонів. Така дисоціація підвищується в кислих умовах, а також при наявності біологічних компонентів, таких як амінокислоти та пептиди [49,54]. У разі ортованадатних частинок можна припустити, що вихід з кристалічної решітки іонів ванадію буде призводити до негативних наслідків для біоструктур, так як іони ванадію є інгібіторами дихального ланцюга МХ [55,56]. Так само було показано, що гадоліній пригнічує мітохондріальну функцію, викликаючи оксидативний стрес, що запускає апоптоз в нейронах [57].

1.1.3. Наночастинки на основі рідкісноземельних елементів з антиоксидантними властивостями, перспективи застосування при оксидативних порушеннях

В даний час механізми антиоксидантної дії НЧ є предметом широких дискусій. Однак остаточна думка про причини прояву антиоксидантної активності НЧ відсутня. Так, наприклад, вивчення НЧ діоксиду церію в якості антиоксиданту [58] показало, що дана сполука здатна в системі *in vitro* демонструвати активність, подібну супероксиддисмутазі (СОД) [59-61] і каталазі [62,63], а також виявляти нейропротекторну [11] та протизапальну [64] дію. Діоксиду церія притаманні також радіопротекторні властивості [65,66].

Поширена думка, що причиною антиоксидантної активності CeO_{2-x} є окислювально-відновні процеси, пов'язані з можливим переходом $\text{Ce}^{4+} \leftrightarrow \text{Ce}^{3+}$ на поверхні НЧ, и нестехіометрією по відношенню до кисню [67], що робить його привабливою і перспективною сполукою для застосування в біології та медицині. Здатність НЧ CeO_{2-x} інактивувати вільні радикали і запобігати оксидативному стресу клітин і тканин пов'язана, певно, з тим, що НЧ виступає в якості акцептора електронів, тим самим зводячи нанівець реактивність радикалів. Не можна виключати і можливість того, що НЧ діоксиду церію мають регуляторну дію на функціонування антиоксидантної системи клітин. Варто також відзначити, що до унікальних властивостей CeO_{2-x} потрібно віднести здатність до регенерації, яка виражається в тому, що НЧ діоксиду церію, які брали участь в окисно-відновних реакціях, здатні за порівняно невеликий проміжок часу повертатися до вихідного стану (щодо кисневої нестехіометрії) [68], на відміну від вже відомих природних і синтетичних антиоксидантів, які в процесі інактивації АФК втрачають свою активність. НЧ діоксиду церію, безумовно, мають широкі перспективи в протипухлинній та імунomodуючій терапії, так як солі церію (III) були використані для таких цілей [69,70]. Було досліджено вплив НЧ CeO_{2-x} на тривалість життя змішаної культури клітин мозку [71] і показано збільшення тривалості життя культури в шість разів. Так само було показано збільшення тривалості життя колонії мух *Drosophila* при введенні оксиду церію в раціон.

Переважає думка, що основний внесок в антиоксидантні властивості церію вносить киснева нестехіометрія в нанокристалічному стані. Киснева нестехіометрія обумовлює активність НЧ діоксиду церію в біохімічних окислювально-відновлювальних процесах, взаємодії з АФК і вільними радикалами. Так, для частинок CeO_{2-x} розміром менше 5 нм спостерігається значна киснева нестехіометрія, і саме такі частинки проявляють максимальну активність в окислювально-відновлювальних процесах.

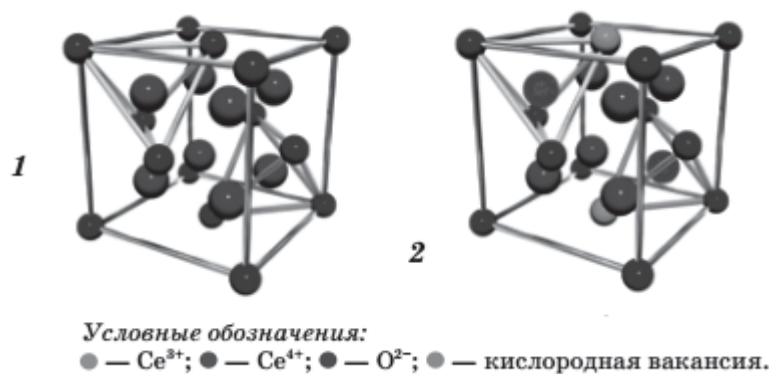
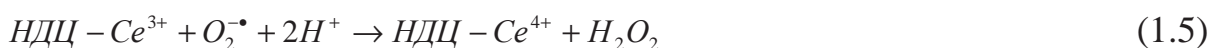
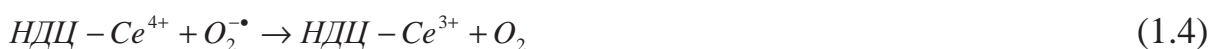


Рис. 1.1. Кристалічна структура стехіометричного макрокристалічного (1) і нестехіометричного нанокристалічного (2) діоксиду церію [67].

Наприклад, зменшення розміру частинок нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) призводить до зростання здатності розкласти перекис водню в кілька стадій (рівн. 1.1-1.3.). Регенеративна поведінка НЧ в разі розкладання перекисуу водню нагадує властивості каталази, як уже згадувалося раніше [67].



Також притаманні НДЦ властивості і іншого ензиму – СОД та здатність виконувати його «роботу», що підтверджується стандартним тестом з цитохромом С, можна описати рівняннями 1.4 - 1.5. Інактивація супероксид-аніонів частинками CeO_{2-x} протікає в два етапи і залишає частку незмінною [67,72]:



НДЦ (на відміну від СОД) здатний інактивувати і гідроксил-радикал; в даному випадку реакція, що протікає на поверхні НЧ діоксиду церію, має вигляд (рівн. 1.6) [58,67]:



У той же час в літературі існує багато експериментально підтверджених даних про токсичний вплив НЧ діоксиду церію. Показано, що НЧ церія призводять до збільшення продукції АФК, зниження рівня GSH, індукують оксидативний стрес, причому на виживаність клітин впливають доза і час дії, але не впливають розміри НЧ. Ефект впливу частинок також залежав від типу клітин – найбільш чутливими виявилися клітини бронхіального епітелію [73]. Також було показано, що НЧ CeO_{2-x} викликали запалення і пошкодження легенів у щурів, причому ефект мав дозо-залежний характер [74]. Вочевидь, токсичні ефекти НЧ діоксиду церію реалізуються через оксидативний стрес [75] і призводять до апоптичного шляху загибелі клітини. Хоча такий шлях клітинної загибелі, як апоптоз, викликаний CeO_{2-x} , може бути використаний в протипухлинній терапії.

Різностямована дія НЧ діоксиду церію, ймовірно, залежить від багатьох параметрів: від способу синтезу, розміру НЧ (показано, що менші НЧ демонструють більшу токсичність [76]), від поверхневих властивостей частинки, заряду, матеріалу, що використовується для покриття НЧ як для посилення/зміни їх властивостей, так і для перешкоджання їх агрегації. Причому всі перераховані вище фактори притаманні не тільки НЧ діоксиду церію, а й більшості НЧ, синтезованих на сьогоднішній день .

Однак в літературі переважають дані про позитивний вплив НЧ діоксиду церію на біосистеми. Одна з найбільш важливих характеристик НЧ діоксиду церію – їх низька токсичність, показана в ряді досліджень: внутрішньовенне введення щурам золю НЧ розміром 6-7 нм в дозі 175-250 мг/кг супроводжується загибеллю 60% тварин, тоді як доза 100 мг/кг є абсолютно

нетоксичною [77]. Відомо, що частинки діоксиду церію розміром 1000 нм мають незначну токсичність в культурі гіпокампальних нервових клітин (HT22) і макрофагів миші (RAW164) [67]. Дослідження НДЦ з розмірами 9 нм показало відсутність токсичності в культурі клітин L929, A549 і тканинах легенів [78]. Зниження токсичності частинок діоксиду церію і зростання антиоксидантної активності спостерігали аж до зниження розмірів частинок до 0,6-0,8 нм. Зі зменшенням розмірів частинок нижче цих значень коректно говорити вже про молекулярні або іонні системи [67].

Разом з діоксидом церію, в літературі є вказівки, що цілий ряд інших НЧ на основі РЗЕ є перспективними для медико-біологічного застосування. У тому числі – засновані на РЗЕ люмінесцюючі НЧ, що дозволяє візуалізувати і відстежувати їх розподіл в біологічних структурах.

У даній роботі вивчалися люмінесцюючі частинки такого типу – ортованадатні, доповані рідкісноземельними елементами НЧ, різної форми і розмірів. Антирадикальні властивості синтезованих ортованадатних НЧ були показані вперше в роботі [79]. Можна було б припустити, що і для НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) прийнятний подібний механізм, за рахунок переходу $\text{Eu}^{3+} \leftrightarrow \text{Eu}^{2+}$, причому цей перехід може бути здійснений за участю різних оксидантів, які виробляються в процесі клітинної життєдіяльності [26]. Позитивний ефект НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ продемонстровано в експериментах *in vivo*: спостерігалось, що дані частинки мають цілу низку позитивних ефектів на фізіологічні системи старіючого організму і здійснюють антивіковий вплив при хронічному надходженні в організм експериментальних тварин. Було показано, що НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ впливали на центральну нервову систему старих тварин (прискорення поведінкових реакцій), надавали позитивний ефект в емоційній сфері тварин (антидепресантна дія) і в сексуальній поведінці. Виявлено позитивну дію НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ на репродуктивну функцію старих тварин зі збереженням статевої активності на початковому рівні, зростанням концентрації тестостерону і активацією сперматогенезу. Отримані результати досліджень

дозволяють очікувати збільшення тривалості життя тварин при тривалому застосуванні НЧ обраного типу [80,81].

Антиоксидантну активність можуть мати і НЧ, що не містять іони зі змінною валентністю: наприклад, фулерени, механізм антиоксидантної дії яких може пояснюватися концентруванням і рекомбінацією вільних радикалів в приповерхневому гідратному шарі [82], або оксид ітрію, здатний нейтралізувати вільні радикали завдяки особливостям кристалічної структури НЧ [11].

1.2. Механізми дії редоксактивних наночастинок на біоенергетичні процеси в мітохондріях

Відомо, що баланс між утворенням та утилізацією АФК в живих системах необхідний для їх успішного функціонування. АФК виробляються МХ в процесах генерації енергії в клітині. Кількість МХ в перерахунку на клітину головним чином залежить від її енергетичних потреб. В органах, які є дуже активними в метаболічному відношенні – печінці, мозку, серцевих і скелетних м'язах міститься найбільша кількість МХ. Клітини цих органів найбільш чутливі до дії лікарських сполук, що впливають на мітохондріальну функцію, а також в першу чергу страждають при виникненні патології на мітохондріальному рівні. У тканинах ссавців 80-90% АТФ утворюється в МХ в результаті окислювального фосфорилування. Всі ферментативні етапи окисного розщеплення вуглеводів, жирів і амінокислот сходяться в аеробних клітинах в цій кінцевій стадії клітинного дихання, на якій електрони переходять від органічних субстратів до кисню, а енергія, що виділяється при цьому, використовується для утворення АТФ з АДФ і фосфату. Вивільнені в процесі окислення в циклі трикарбонових кислот електрони, акцептовані на коферментах, переносяться потім в дихальний ланцюг (ланцюг перенесення електронів), де вони з'єднуються з молекулярним киснем, утворюючи молекули води.

Дихальний ланцюг являє собою ряд білкових комплексів, вбудованих у внутрішню мітохондріальну мембрану, і вона ж – головна система перетворення енергії в МХ.

У нормальних (інтактних, або непошкоджених) МХ в присутності кисню і субстратів відбувається енергізація, тобто поява різниці електричних потенціалів і різниці рН на внутрішній мембрані. Це пов'язано з тим, що перенесення електронів по дихальному ланцюгу МХ пов'язано з переносом протонів з матриксу МХ назовні. Надлишок або нестача кисню є згубним для МХ. Збільшене утворення вільних радикалів в організмі і пов'язане з цим посилення процесів пероксидації ліпідів можуть відбуватися не тільки через надлишок кисню, але і внаслідок великого числа інших причин, таких як вплив лікарських сполук, і, зокрема, НЧ, вікових перебудов, впливу радіації та ін.

Багато біологічних ефектів НЧ на основі РЗЕ, як уже зазначалося раніше, можуть визначатися наявністю в структурі іонів лантаноїдів. Лантаноїди, до яких відносяться Ce, Gd, Y, La, Eu, проявляють біологічну активність, демонструючи про- і антиоксидантні властивості (іншими словами – редоксактивність) в залежності від мікрооточення, природи складових і концентрації в тканинах. Більшість реакцій в живих організмах відбувається з перенесенням електронів. Основними особливостями, які впливають на біологічний ефект лантаноїдів, є незавершені $4f$ електронні оболонки [83], іони зі змінними зарядами [40], подібності їх іонних радіусів і координаційних чисел [84] з іонними радіусами і координаційними числами у деяких іонів металів, які мають велике значення для оксидативного гомеостазу (наприклад, таких як Ca, Fe, Mg, Mn і Zn), і вплив катіонів лантаноїдів на можливість електронного переносу в лігандах лантаноїдних комплексів [83]. Крім того, співвідношення між різними валентними станами може мати вирішальне значення для біологічного ефекту лантаноїдів [40]. Всі лантаноїди утворюють стабільні потрійні заряджені катіони (Ln^{3+}) с $4f$ електронними конфігураціями, від $4f^0$ (La^{3+}) до $4f^{14}$ (Lu^{3+}). Лантаноїди мають

основну міру окислення +3, яка містить зовнішню оболонку, що складається з 8 електронів, і базовий шар, який має до 14 електронів. Згідно з правилом Хунда, електронні конфігурації $4f^0$ (La^{3+}), $4f^7$ (Gd^{3+}) и $4f^{14}$ (Lu^{3+}), які мають відповідно порожній, наполовину заповнений, і повністю заповнений $4f$ рівень, знаходяться в стабільному стані. Катіони, що мають $4fn$ електронні заселеності, близькі до стабільної конфігурації, можуть дуже легко змінити порядок валентності і отримати найближчу стабільну електронну конфігурацію. Церій може існувати в ступені окислення +4. У цьому стані він має таку ж електронну структуру, як і La^{+3} (порожній $4f$ рівень) (рівн. 1.7).



Tb^{4+} і Gd^{3+} так само мають однакову електронну структуру – половинне заповнення $4f$ -рівня. Порожня, напівзаповнена і повністю заповнена $4f$ оболонка надає деяку додаткову стабільність при певному стані окислення. Для Eu так само можливий наступний перехід (рівн. 1.8):



Наведені вище приклади ілюструють високу ймовірність того, що лантаноїди, маючи на електрон більше, ніж на стійкій конфігурації $4f$, вони здатні втратити електрон в результаті більш високого валентного стану ($\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) [85], в той час як за відсутності одного електрона на конфігурації $4f$, вони можуть приймати електрон, переходячи на більш низький валентний стан ($\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$). Здатність іонів лантаноїдів проводити обмін електронами з навколишнім середовищем дозволяє їм брати участь в реакціях переносу електронів. Зокрема, вони можуть вплинути на багато біологічних процесів, в яких відбуваються процеси обміну електронів, і зокрема – на процес перенесення електронів в дихальному ланцюзі МХ. У разі редоксактивних НЧ основними складовими, які визначають вплив частинок на біосистеми,

будуть фізична складова (розмір і форма), методи синтезу, концентрація і способи застосування [86-88]. У випадку НЧ CeO_{2-x} здатність проявляти антиоксидантні властивості і вбудовуватися в процеси переносу електронів буде залежати від співвідношення на $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ на поверхні НЧ і доступності цих іонів для АФК: поверхневі іони Ce^{4+} можуть забирати електрони у супероксида, який утворюється в процесі генерації енергії мітохондріями, і утворювати Ce^{3+} і O_2 . Поверхневі іони Ce^{3+} в НЧ беруть участь в розкладанні гідроксильних радикалів до води і атомів кисню, займаючи кисневі вакансії в кристалі наноцерія. Необхідно відзначити, що нанострижні $\text{Eu}(\text{OH})_3$ демонструють прооксидантні властивості, збільшуючи продукцію АФК, і даний ефект залежить від форми НЧ – нанострижні набагато ефективніші, ніж стандартні порошки $\text{Eu}(\text{OH})_3$ [89,90]. Таким чином, здатність до зміни валентного стану іонів, що входять до складу частинок, дозволяє редоксактивним НЧ обмін електронами з іншими хімічними речовинами в навколишньому середовищі, викликаючи генерацію, утилізацію або рекомбінацію АФК. Дослідження дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ вимагає детального аналізу внаслідок розрізненості і недостатності літературних даних, так як частинки такого типу здатні вбудовуватися (як показано вище) в окислювально-відновні реакції в якості донорів або акцепторів електронів; пригнічувати Са-залежні іонні канали; конкурентно замінювати Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} і Zn^{2+} в сайтах зв'язування в білках. Так само НЧ, імовірно, будуть впливати на проникність мембран, призводити до відкриття мітохондріальної пори, окислення сульфгідрильних груп білків, або ж, сорбуучи на собі тіолові сполуки, будуть порушувати баланс і знижувати пул сполук, необхідних для роботи антиоксидантної системи захисту клітини, наприклад, GSH. Так само можливо, що НЧ служитимуть роз'єднувачем процесів дихання і окисного фосфорилування внаслідок подібності іонів, що входять до складу НЧ (наприклад, іонів ванадію), і іонів фосфату, необхідних для синтезу АТФ [55,56].

1.2.1. Мітохондріальний потенціал як основна характеристика функціонального стану мітохондрій

Мітохондріальний мембранний потенціал часто використовують як основний маркер мітохондріальної активності і життєздатності клітин, а також як один із критеріїв, який свідчить про активацію апоптозу.

$\Delta\Psi_m$ в дихаючих МХ зазвичай підтримується на рівні 150-200 мВ. Його внесок становить 75% електрохімічного H^+ градієнта, який утворюється при перенесенні електронів. Потенціал розсіюється в процесі синтезу АТФ, Ca^{2+} - транспорту або роботи інших мітохондріальних білків-переносників. Вдалося зареєструвати високоамплітудні спонтанні короточасні зміни мембранного потенціалу поодиноких МХ, як в клітинах [91-96], так і в ізольованих органелах. Хоча природа і механізм флуктуацій не ясні, проте очевидно, що вони пов'язані з регулюванням фундаментальних клітинних процесів.

При порушенні функціонального стану МХ внаслідок впливу зовнішніх чинників – іонізуюче випромінювання, дія лікарських сполук, вікові перебудови, тощо, спостерігається зниженням продукції АТФ, підвищення утворення вільних радикалів, порушення в передачі кальцієвого сигналу, що ініціює перекисне окислення ліпідів, білків, ДНК МХ, відкриття мітохондріальної пори, що в результаті може привести до загибелі клітини. Так, зміни в концентрації Ca^{2+} у внутрішньоклітинних органелах також грають важливу регуляторну роль: концентрація Ca^{2+} в матриксі МХ впливає на інтенсивність реакцій циклу трикарбонових кислот і синтезу АТФ, а також має визначальне значення в запуску процесів апоптозу [97]. Зниження мітохондріального мембранного потенціалу і порушення функції МХ гепатоцитів в печінці старих щурів свідчить про множинність факторів, які здатні впливати на мітохондріальний потенціал [98]. Необхідно відзначити, що продукція АФК мітохондріями безпосередньо залежить від величини мітохондріального потенціалу [99]. Враховуючи те, що $\Delta\Psi_m$ є інтегральним показником не тільки мітохондріальної активності, але і функціонального

стану клітин в цілому, з'ясування взаємозв'язку між редоксактивністю НЧ і їх здатністю змінювати $\Delta\Psi_m$ актуально для вирішення питання про механізми дії НЧ на мітохондріальні процеси і розробки стратегії керованого впливу в умовах окислювального дисбалансу, опосередкованого порушеннями в мітохондріальному ланцюзі.

1.2.2. Активні форми кисню в регуляції мітохондріальних процесів.

Опосередкована тіолами редокс-регуляція дихального ланцюга мітохондрій

МХ є специфічними органелами, які відіграють ключову роль в багатьох фундаментальних клітинних процесах, включаючи синтез АТФ, біосинтетичні шляхи, підтримання іонного гомеостазу, зондування кисню, апоптоз. Всі ці процеси охоплюють редокс-реакції як центральні елементи. АФК є продуктами нормального метаболізму або ж впливу ряду зовнішніх чинників, і в залежності від їх концентрації, можуть бути корисні або шкідливі для клітин і тканин. На фізіологічно низькому рівні АФК виконують функцію «редокс-месенджерів» у внутрішньоклітинній регуляції і передачі сигналів. Так, наприклад, низькі концентрації АФК, зокрема, перекис водню, є медіатором різних сигнальних процесів в клітині [100,101]. При аномальному рівні АФК ініціюється оксидативна модифікація клітинних макромолекул, пригнічується функція білків і та ін., що в підсумку призводить до клітинної загибелі. Незважаючи на те, що АФК також є потужними індукторами підвищення проникності і відкриття мітохондріальної пори [102,103], що сприяє різним формам апоптичної та некротичної загибелі клітин, призводить до підвищення проникності мітохондріальних мембран [104], прямих доказів, що саме АФК обумовлюють взаємодію і активацію специфічних рецепторів, які запускають клітинну загибель по апоптичному шляху, немає [105].

Відомо, що МХ є найбільшим внутрішньоклітинним джерелом АФК. Від загальної кількості кисню, споживаного мітохондріями, 1-2% витрачається на формування АФК, в основному на рівні комплексів I і III дихального ланцюга, і ця величина приблизно залежить від типу тканини [106,107]. На сьогоднішній день ідентифіковано близько 10 потенційних мітохондріальних систем-джерел АФК [108]. Як основне джерело АФК, найчастіше, МХ є і їх основною мішенню, що призводить до негативних наслідків, таких як, наприклад, оксидативне пошкодження мітохондріальної ДНК [109]. Було показано, що комплекс I є мішенню оксидативної тіол-модифікації [110]. Необхідно відзначити, що при тому, що МХ є основними генераторами АФК із залученням компонентів дихального ланцюга, вони включають в себе також безліч редокс-ензимів [111-113], та потужну антиоксидантну захисну систему [114-116]. Редокс-мікрооточення всередині різних клітинних компартментів і органел в основному визначається пулом GSH, точніше, співвідношенням GSH і GSSG (окисленої форми глутатіону), а також іншими білками, що містять тіоли, такими як система тіоредоксин/пероксіредоксин і глутаредоксини [117-120]. Причому в МХ GSH не синтезується, а імпортується з цитозоля [121,122]. Для всіх компонентів антиоксидантного захисту, тіоредоксин/пероксіредоксинової системи, що охоплює тіоредоксин редуктазу 2 (TrxR2), тіоредоксин 2 (Trx2) і пероксіредоксин 3 (Prx 3), так само як і GSH-залежні ферменти, включаючи глутатіонпероксидази 1 та 4 (Gpx1, Gpx4), глутатіонредуктази (GR) і глутаредоксин-2 (Grx2), NADPH служить в якості загального відновника для окислених форм цих білків і GSSG [116-118].

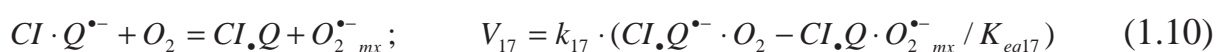
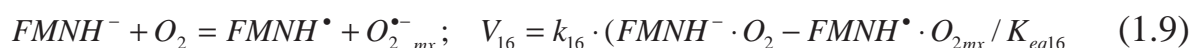
Мітохондріальний матрикс і внутрішньомембранний простір мають різне редокс-оточення, яке контролюється розподілом GSSG/GSH і тіол-вміщуючих білків, на які впливає активність відповідних джерел АФК. Пул GSH як основного редокс-буфера у внутрішньомембранному просторі залежить від активності ферментів цитоплазми і NADPH, необхідних для регенерації GSH з GSSG. Основним джерелом АФК у

внутрішньомембранному просторі є Q_o -сайт комплексу III, але гліцерин-3-фосфат дегідрогенази можуть також генерувати АФК в даному компартменті при певних умовах. Пул GSH в матриксі регулюється $NADP^+$ - залежними білками і пулом NADPH в матриксі. NADPH також має важливе значення при зниженні активності системи тіоредоксин/пероксіредоксин, які представляють собою іншу, потужну АФК-зв'язувальну систему. Крім того, реакційна здатність тіолових груп залежить від їх фактичного значення pK_a і pH компартмента, так як найбільш фізіологічні окислювачі реагують тільки з тіолатним аніоном [117,123]. В цьому відношенні важливо відзначити, що активність дихального ланцюга збільшує pH матриксу, тим самим полегшуючи депротонування тіолів.

1.2.3. Характеризування мітохондріальних процесів на основі моделей

Дихальний ланцюг внутрішньої мітохондріальної мембрани є унікальною сукупністю білкових комплексів, які переносять електрони на молекулярний кисень, щоб сформувати протон-рушійну силу як основного джерела енергії для клітинного синтезу АТФ. Останні дані свідчать про те, що окислювально-відновні реакції також беруть участь в регуляції мітохондріальної функції за допомогою редокс-модифікації специфічних тіолових груп в якості субодиниць комплексів дихального ланцюга. Електрон-транспортний ланцюг (ЕТЦ) на внутрішній мембрані МХ є основним джерелом АФК. Так, наприклад, комплекси I і III ЕТЦ є основними джерелами супероксиду ($O_2^{\cdot-}$) [124]. При цьому необхідно враховувати, що значення мітохондріального потенціалу, pH середовища, наявність або відсутність інгібіторів, які здатні порушувати функціонування комплексів, важливі для отримання достовірних даних. Так само одним з невирішених питань є генерація АФК при інгібуванні різних сегментів дихального ланцюга.

З урахуванням застосування НМ і редоксактивних НЧ зокрема, це питання потребує вирішення. Тому для дослідження всіх біоенергетичних процесів в МХ успішно застосовуються математичні комп'ютерні моделі, які успішно описують теоретичні і експериментальні дані. Так, наприклад, автори [125,126] експериментально показали, що при інгібуванні комплексу III антимиціном А (АА) основний внесок в генерацію $O_2^{\bullet-}$ належить Q_0 -сайту через перенесення електронів від окисленого цитохрому b_L до Q і зворотних реакцій в Q_0 -сайті. Однак тільки експериментальних даних для опису такої складної системи, як дихальний ланцюг, недостатньо. Тому обчислювальні моделі можуть бути корисні для виконання більш детального аналізу. Існують класичні моделі [127,128], які описують процеси, що відбуваються в дихальному ланцюзі МХ, і стандартні кінетичні моделі для опису найбільш важливих шляхів перенесення електронів в комплексах I і III [129-135]. Автори [136] для ізольованого комплексу I припустили, що $O_2^{\bullet-}$ формується при перенесенні одного електрона від повністю окисленого флавіну на кисень згідно реакціям (1.9, 1.10) [129]



Кінетична схема, запропонована авторами [137,138] описує етапи перенесення електронів у комплексі III. Також існує гіпотеза [139], що характеризує формування $O_2^{\bullet-}$ та перенос електронів у комплексі III дещо інакше. Автори [129] проаналізували і врахували раніше запропоновані моделі і запропонували свою обчислювальну модель, що одержала експериментальне підтвердження. Дана модель демонструє залежність генерації АФК комплексами I і III дихального ланцюга МХ від мітохондріального потенціалу, рН матриксу, наявності різних дихальних

субстратів, а так само інгібітора АА. Можна припустити, що НЧ, інтеркалюючи в дихальний ланцюг і порушуючи перенесення електронів (за рахунок редоксактивності), або блокуючи взаємодію і роботу переносників, тобто виступаючи в ролі інгібіторів, подібно АА, який є інгібітором Q_i-сайту комплексу III в експериментальних [140] і модельних дослідженнях [131], можуть підсилювати генерацію АФК. За допомогою реакції (1.11) [129] також можна описати вплив НЧ на генерацію вільних радикалів, зокрема, супероксида, в комплексі III.

$$b_H QH^{\bullet} + b_L Q = b_H^- QH^{\bullet} + b_L Q; \\ V_{34} = k_{34} \cdot (b_H QH^{\bullet} \cdot b_L^- Q - b_H^- QH^{\bullet} \cdot b_L Q \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\Psi / R \cdot T) / K_{eq34} \quad (1.11)$$

Пригнічуючий ефект НЧ відповідно до даної реакції моделі [129] може бути результатом порушення перенесення електронів у всіх реакціях в Q_i-сайті. Інгібування Q_i-сайту НЧ може бути результатом придушення реакцій з перенесенням електронів в Q₀-сайті в результаті порушення Q-циклу.

СОД-подібна активність НЧ, показана раніше в дослідженнях [79], вписується в рамки моделі [129], оскільки утворення перекису водню в реакціях за участю НЧ може служити причиною порушення роботи дихальних комплексів і зсуву в роботі тіолових антиоксидантів. Модель [129] демонструє, за допомогою отриманих раніше даних [131,141], що утворення АФК в дихальному ланцюзі МХ дуже чутливо до флуктуацій мітохондріального потенціалу у випадках, коли субстратом дихання служить сукцинат або NADH-пов'язані субстрати. Запропонована модель пов'язує процеси зміни МХ потенціалу, синтезу АТФ, і безпосередньо генерації АФК, динаміка яких залежить від безлічі електрокінетичних транспортних систем на внутрішній мембрані МХ як в нормальних умовах, так і при дії інгібіторів, що дозволяє найбільш адекватно оцінювати механізми, залучені в регуляцію біоенергетики НЧ.

Висновки до розділу 1 і постановка мети дисертаційної роботи

Враховуючи представлені в розділі 1 дані огляду літератури щодо про- і антиоксидантних властивостей НЧ, шляхів їх впливу на біоструктури, важливості внеску мітохондріальних процесів в прояв токсичних ефектів, і подальших перспектив застосування частинок, можна відзначити наступне:

1. Кінцевий ефект НЧ на основі РЗЕ, залежить як від властивостей матеріалу, так і від мікрооточення і складності біоструктури.
2. Унікальні люмінесцентні властивості НЧ і дозволяють використовувати їх для неспецифічного мічення в діагностиці.
3. Редоксактивність НЧ на основі РЗЕ обумовлює їх здатність впливати на процеси генерації вільних радикалів в біосистемах, що дозволяє використовувати частинки в біології та медицині для корекції станів, пов'язаних з оксидативним стресом.
4. Показано, що основною мішенню дії НЧ в клітинах є МХ і вплив НЧ на генерацію АФК визначає стан біоенергетичної функції МХ.
5. Показана важливість тіолових сполук для регуляції мітохондріальних процесів.
6. Продемонстровано, що обчислювальні моделі можуть бути успішно використані для пояснення дії редоксактивних НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

На основі отриманих висновків була сформульована мета дисертаційної роботи – визначення основних механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів – діоксиду церію CeO_{2-x} і ортованадатів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) на основні показники мітохондріальної активності – мітохондріальний потенціал та процеси дихання і окислювального фосфорилювання в клітинах печінки..

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТЕХНІКА І МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Методика синтезу водних колоїдних розчинів наночастинок

В роботі використовували НЧ на основі РЗЕ сферичної ($\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (1-2 нм)), веретеноподібної ($\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (25×8 нм), усереднений розмір – 13 нм) и стрижнеподібної ($\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (57×6-8 нм)) форм, і НЧ CeO_{2-x} сферичної форми (з розмірами 1-2 нм і 8-10 нм).

Водні колоїдні розчини НЧ ортованадатів РЗЕ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) и діоксиду церію (CeO_{2-x}) отримані методом колоїдного синтезу із застосуванням в якості стабілізатора натрієвої солі ЕДТА або цитрату натрію згідно методам, описаним раніше [79, 142-144]. Тривалість синтезу, температура і стехіометричний склад були обрані емпірично, поки не були досягнуті відтворювані геометричні параметри твердої фази. Були отримані прозорі безбарвні розчини НЧ з концентрацією твердої фази кожного типу – 1 г/л. Розміри і морфологію НЧ оцінювали за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії на електронному мікроскопі ПЕМ 125 К (Selmi, Україна), прискорююча напруга – 100 кВ (Рис 2.1).

Стандартне відхилення не перевищує $\pm 10\%$ від середнього розміру частинки. Склад сферичних НЧ був $\text{Gd}(0,6-0,8)\text{Y}(0,1-0,3)\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}(0,1)$, веретеноподібних – $\text{Gd}(0,9)\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}(0,1)$, и стрижнеподібних – $\text{La}(0,9)\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}(0,1)$.

Метод динамічного розсіювання світла (ДРС) для визначення розподілу наночастинок за розмірами. НЧ в біологічних матриксах мають тенденцію до агломерації, тому було проведено дослідження впливу середовища інкубації клітин (буферний розчин ІГЛА, з 10% бичачою ембріональною сироваткою, $\text{pH}=7,4$) на розподіл НЧ за розмірами і ζ -потенціал за допомогою приладу ZetaPALS/BI-MAS (Brookhaven Instruments

Corporation, США). Вимірювання дзета-потенціалу проводили методом PALS (Phase Analysis Light Scattering). Для контролю відтворюваності результатів було виконано десять повторних вимірів. Порівняльний аналіз проводився для водного розчину НЧ і НЧ в середовищі інкубації клітин. Розподіл НЧ за розмірами визначали методом ДРС (довжина хвилі випромінювання лазера 659 нм) при куті розсіювання 90° . Вимірювання здійснювали в спеціальній полістирольній кюветі (BI-SCP). Перед початком вимірювань досліджувані розчини термостатували при температурі 25°C .

Концентрація НЧ в досліджуваних розчинах становила 0,05 г/л. Як показали дослідження, значення ζ -потенціалу НЧ в середовищі інкубації клітин незначно знижуються за рахунок наявності в середовищі неорганічних електролітів. Так, для НЧ $\text{LaVO}_4\text{:Eu}$ ζ -потенціал знижується з -18 mV у водному розчині до -14 mV в середовищі для інкубації клітин, для НЧ $\text{GdVO}_4\text{:Eu}$ відбувається зниження з -16 mV до -13 mV , для НЧ $\text{GdYVO}_4\text{:Eu}$ зниження з -15 mV до -12 mV , відповідно.

При цьому змін розподілу фракцій за розмірами і коагуляції НЧ в середовищі інкубації клітин не спостерігалось.

Приготування комплексів «НЧ-метиленовий блакитний (МБ)». Приготування комплексів "НЧ-МБ" було виконано відповідно до [145]: водний колоїдний розчин НЧ з концентрацією 1 г/л змішували з водним розчином МБ. Після додавання НЧ до розчину МБ частка мономерів ($\lambda_{\text{max}} = 665\text{ nm}$) барвника знижувалася, а частка димерів Н-типу ($\lambda_{\text{max}} = 568\text{ nm}$) збільшувалася, що є доказом утворення гібридних частинок "НЧ-МБ" [146]. Кінцева концентрація НЧ в розчині становила 0,5 г/л, МБ – 10^{-4} M .

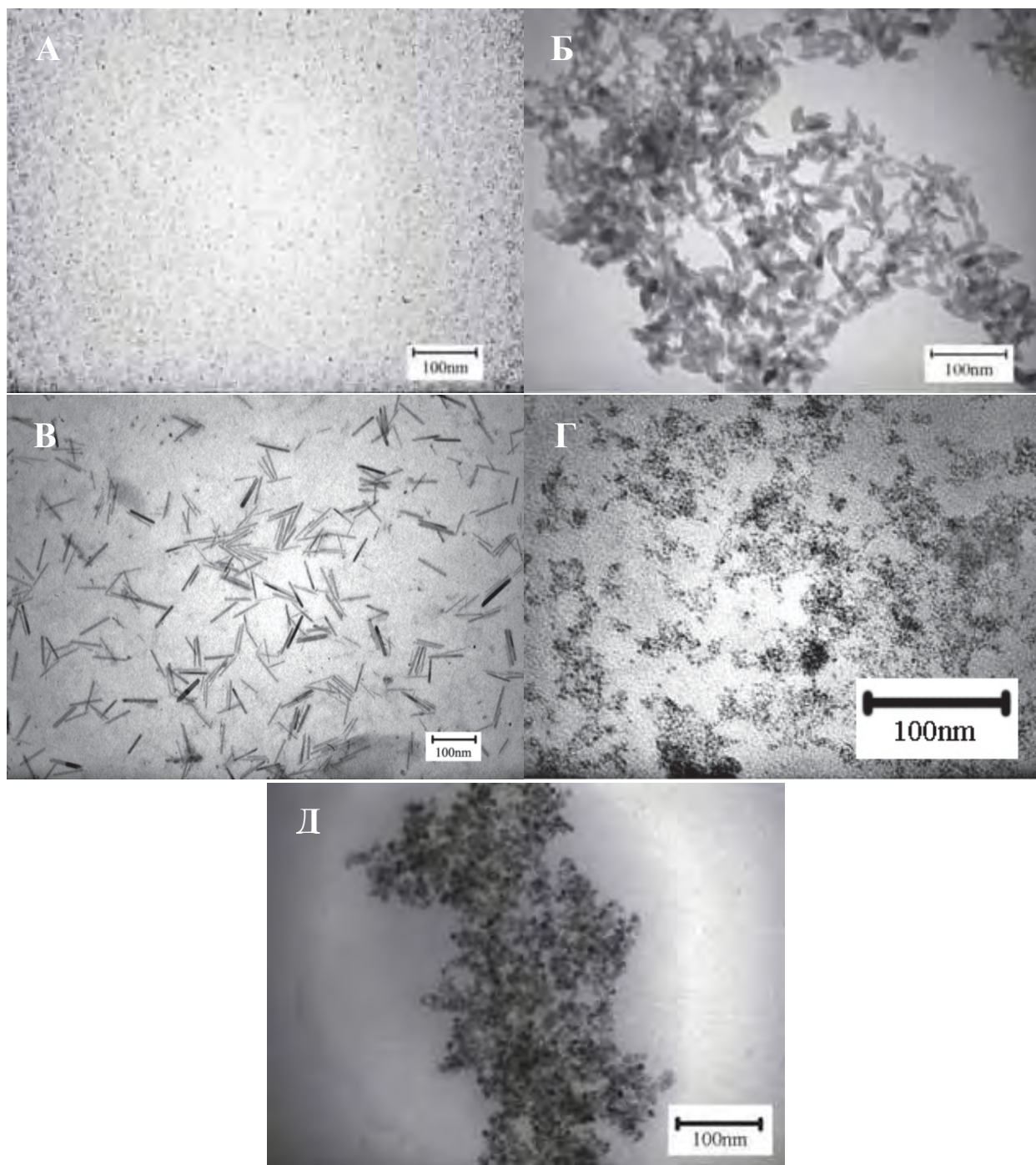


Рис. 2.1. ПЕМ-зображення НЧ, що досліджувалися: а – $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (1-2нм); б – $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (25×8 нм); в – $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (57×6-8нм); г – НЧ діоксида церія CeO_{2-x} (1-2 нм); д – НЧ діоксида церія CeO_{2-x} (8-10 нм).

2.2. Препаративні методи

У роботі використовували гепатоцити і МХ, ізольовані з печінки щурів-самців 3-місячного і 20-місячного віку лінії Вістар. Всі маніпуляції з тваринами проходили під поверхневим ефірним наркозом. Експерименти проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, Франція, 1986).

Отримання ізольованих гепатоцитів. Ізольовані гепатоцити отримували неферментативним методом. Для цього на початковому етапі перфузію печінки здійснювали *in situ* 0,9% розчином NaCl_2 зі швидкістю 20-30 мл/хв. Потім перфузію продовжували теплим ($38-40^\circ\text{C}$) середовищем, яке містило 250 мМ сахарозу; 5 мМ KCl ; 0,4 мМ KH_2PO_4 ; 0,4 мМ Na_2HPO_4 ; 0,8 мМ MgCl_2 ; 1 мМ ЕДТА; 2 мМ дітіотрейтол (ДТТ), 1 % бичачий сироватковий альбумін (БСА), рН 7,4, зі швидкістю 40-50 мл/хв. протягом 25-30 хв. Середовища насичували киснем повітря. Після закінчення перфузії печінку витягували з черевної порожнини, поміщали в охолоджене до 4°C середовище диспергування і піддавали вібрації з частотою 50 Гц протягом 60 сек. Потім вручну проводили дезагрегацію печінки. Середовище диспергування містило 250 мМ сахарозу; 10 мМ трис; 0,4 мМ Na_2HPO_4 ; 0,4 мМ KH_2PO_4 ; 0,8 мМ Mg SO_4 ; 1,2 мМ CaCl_2 ; 5 мМ KCl ; 2 % БСА, рН 7,4. В процесі дезагрегації близько 70% маси печінки переходило в поодинокі клітини. Отримана після фільтрування через нейлоновий фільтр суспензія містила як клітини з цілісною, так і з пошкодженою плазматичною мембраною.

Центрифугування цієї суспензії протягом 2-4 хв. при 100g призводило до поділу клітин на два шари, які візуально легко відрізнити. Верхній шар – більш світлий – містив, головним чином, клітини з порушеною плазматичною мембраною і відкидався. Нижній – темніший шар – містив переважно нативні клітини і служив основним об'єктом дослідження. Для максимального видалення з нього пошкоджених гепатоцитів суспензію

клітин нижнього шару ще раз піддавали промиванню центрифугуванням при 100g протягом 1-4 хв.

Цілісність та життєздатність клітин в отриманій суспензії визначали за забарвленням клітин вітальним барвником 0,4% трипановим синім, вона становила 90-95%. Отримані показники життєздатності та загальний вихід ізольованих гепатоцитів узгоджувалися з результатами застосування неферментативного методу виділення гепатоцитів, наведених в ряді робіт [147-149].

В експериментах також використовували гомогенат печінки (безклітинна система): після декапітації печінку швидко витягували і поміщали в крижане середовище гомогенізації (0,05 М трис-буфер pH 7,4). Гомогенат фільтрували через подвійний шар капрону.

Виділення мітохондрій печінки. Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування [150] в модифікації [151] з гомогенату печінки (співвідношення об'єму тканини і середовища виділення – 1:7). Склад середовища виділення: 0,3 М сахароза; 1 мМ трілон Б; 10 мМ трис-HCl; pH 7,4. Фракцію МХ отримували після одного або двох промивань в середовищі виділення без трілону Б; в цьому ж середовищі суспендували і кінцевий осад.

2.3. Аналітичні методи

Флуоресцентний аналіз клітин. В даний час існує низка потенціал-залежних аніонних і катіонних барвників, які застосовуються для оцінки трансмембранних потенціалів живих клітин за допомогою мікроскопії та проточної цитометрії [152-159].

Для вимірювання мітохондріального трансмембранного потенціалу був використаний катіонний зонд JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраетилбензимидазол карбоціанін йодид), який відноситься до класу поліметинових барвників і дозволяє вивчати мітохондріальну функцію в

динаміці. (Рис. 2.2). JC-1 вибірково накопичується в МХ і при зростанні потенціалу відбувається оборотна зміна кольору флуоресценції з зеленого на жовтогарячий, що пов'язано з оборотним утворенням J-агрегатів і появою в спектрі люмінесценції нової довгохвильової екситонної смуги. Тому спостереження за змінами флуоресценції агрегатів дають можливість досліджувати динаміку процесів, пов'язаних зі змінами мітохондріальної активності.

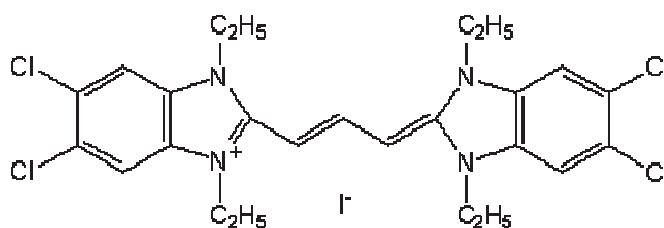


Рис. 2.2. Структурна формула поліметинового катіонного зонда JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3-тетраетилбензимидазол карбоцианін йодид.

Вихідний розчин JC-1 (10^{-3} М в DMSO) зберігався при -20°C і безпосередньо перед експериментом розбавлявся до потрібної концентрації. Клітини (з концентрацією 5×10^5 кл/мл) інкубували з JC-1 (10^{-6} М) в середовищі ІГЛА з 10% ембріональною бичачою сироваткою, рН 7,4 при кімнатній температурі протягом 1,5 год. для досягнення урівноваження барвника в системі, після чого проводили наступні дії:

1. експозиція з протонатором FCCP (карбоніл ціанід 4 – (трифлуорометоксі) фенілгідразон) (5 мкМ) для оцінки впливу на інтенсивність флуоресценції J-агрегатів;
2. експозиція з прооксидантами для моделювання оксидативного стресу: кінцева концентрація перекису водню (H_2O_2) в інкубаційному середовищі становила 0,5 мМ і 1 мМ, трет-бутилгідропероксида (t-BHP) – 5 мкМ і 50 мкМ;
3. експозиція з НЧ: 25 мкл або 50 мкл вихідного розчину НЧ (1 г/л) додавали в кожен кювету, і клітини інкубували з частинками протягом 1,

3, 24 год. Кінцева концентрація НЧ в зразках становила 0,025 г/л і 0,05 г/л, відповідно.

4. експозиція з тіоловими сполуками для оцінки протекторного впливу: 2 мМ GSH, 5 мМ N-ацетил-L-цистеїн (NAC), 2 мМ ДТТ вносили на 1 год. перед додаванням НЧ або сполук, що моделювали оксидативний стрес.
5. спільна експозиція клітин протягом 24 год. з НЧ (з концентрацією 0,05 г/л) і оксидантами H_2O_2 та t-BHP (концентрація 1 мМ і 5 мкМ, відповідно) для оцінки захисних властивостей НЧ в умовах окислювального дисбалансу.
6. дослідження механізмів проникнення частинок в клітини: спільна експозиція НЧ (1 г/л) з інгібіторами ендоцитозу – нокодазолом (10 мкМ) і цитохолазіном Д (10 мкМ).

Мікрофлуориметрія і мікроспектрофлуориметрія була описана в роботах [160,161]. В подальших модифікаціях методу кількісного зображення для поліпшення точності вимірювань аналізується мітохондріальна функція *in situ* [162-164]. Флуоресцентна мікроскопія виконувалася з використанням інвертованого епіфлуоресцентного мікроскопа (IX-71; Olympus, Tokyo, Japan) (рис. 2.3) з 60×кратним збільшенням. Флуоресценція JC-1 збуджувалася опроміненням від 75 В ксенонової лампи високого тиску, що проходить крізь 450-490 нм смуговий фільтр. Випромінюване світло пропускається крізь відсічний фільтр (510 нм), що дозволяє спостерігати флуоресценцію мономерної і агрегатної форми барвника. Фільтри, що використовувались для оцінки флуоресценції мономерів або J-агрегатів, були 510-560 нм і > 570 нм, відповідно. Нейтральний фільтр використовували таким чином, щоб інтенсивність збудження дорівнювала 50% від інтенсивності лампи. Крім того, використання шторки дозволяє опромінювати зразки тільки на період часу, необхідного для реєстрації спектрів і зображень. Ці умови дозволили уникнути пошкодження клітин і

фотодеструкції зондів збуджуючим світлом. Зображення були отримані за допомогою цифрової камери (C-5060 Olympus, Tokyo, Japan) (рис 2.3), з'єднаної з мікроскопом. Програмне забезпечення DP-soft 5.0 (Olympus, Tokyo, Japan) використовували для аналізу цифрових зображень. Обробку зображень здійснювали за допомогою Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA) для вимірювання середньої інтенсивності флуоресценції (зеленої та червоної) об'єктів. Дані з урахуванням фонового шуму були нормалізовані за площею. Оцінювали інтегральну флуоресценцію клітини, нормовану до фону. Інтенсивність флуоресценції виражали у відносних одиницях.



Рис. 2.3. Флуоресцентний мікроскоп Olympus IX71 і цифрова камера Olympus C-5060 (Olympus, Tokyo, Japan). Взято з [165].

Для оцінки відносних змін мітохондріального потенціалу за флуоресценцією агрегатів барвника JC-1 використовували *log*

($F_{\text{експеримент}}/F_{\text{контроль}}$), де $F_{\text{експеримент}}$ – флуоресценція барвника в клітинах, оброблених НЧ, прооксидантами або тіоловими сполуками, $F_{\text{контроль}}$ – флуоресценція барвника в контрольних клітинах. Дані подані як середні значення з ~ 25 -30 клітин з кожного зразка, в кожен момент часу, в кожній проаналізованій точці. Результати виражали у відсотках, за 100% прийнято показники в системі без НЧ.

Спектри люмінесценції були отримані за допомогою спектрометра USB 4000 (Ocean Optics, USA) (рис. 2.4), з'єднаного з оптичними виходами люмінесцентного мікроскопа. Така система дозволила отримати спектри люмінесценції від локальних ділянок зображень.



Рис.2.4. Спектрометр USB4000 (Ocean Optics, USA). Взято з [166].

Взаємодія НЧ з JC-1. Взаємодію J-агрегатів з НЧ було досліджено спектрофотометрично в модельній системі. НЧ (з кінцевою концентрацією 0,05 г/л) змішували з JC-1 (з кінцевою концентрацією 10^{-6} М), в буфері, що містить 10 мМ HEPES і 0,15 М KCl, рН 7,4, і витримували протягом 20 хв. Потім вимірювали спектри поглинання на довжині хвилі 560 нм (мономери) і 590 нм (агрегати).

Вимірювання виживання клітин - МТТ-тест. Калориметричний МТТ (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) тест був виконаний для оцінки метаболічної активності клітин, оброблених НЧ. Після 1, 3 і 24 год. інкубації клітин з НЧ в буфері Кребса – Гензелейта, інкубаційне середовище видалялося, і клітини ресуспендували в середовищі без НЧ (1 мл). Далі 100 мкл вихідного розчину МТТ (5 мг/мл) додавали до кожного зразка, і клітини інкубували з барвником протягом 2 год. при 37° С. Потім інкубаційне середовище з барвником видаляли, і клітини лізували в ДМСО з підкисленим ізопропанолом. Спектри поглинання вимірювали з максимумами 570 нм і 630 нм. Результати виражали у вигляді ΔD , у відсотках, за 100% прийняте виживання клітин в системі без НЧ [167].

Вимірювання накопичення малонового діальдегіду при дії НЧ в клітинах печінки. Рівень пероксидації ліпідів, а саме малонового діальдегіду (МДА) – основного кінцевого продукту і показника переокисного окислення ліпідів, вимірювали з використанням методу, описаного Кумарі і його співавторами [168] з деякими модифікаціями, а саме: через 1, 3 або 24 години інкубації гепатоцитів з НЧ (кінцева концентрація частинок – 0,05 г/л, в окремих експериментах інкубацію клітин з НЧ здійснювали в буфері Кребса- Гензелейта з рН 6,9, 7,4, 7,8.), додавали 0,01 М іонол, потім суміш центрифугували, супернатант видаляли і замінювали буфером без НЧ. Далі додавали 0,6 мл 1% 2-тіобарбітурової кислоти і 2 мл 1% H_3PO_4 до 0,2 мл клітинної суспензії (10^6 кл/мл). Отриману суміш нагрівали протягом 45 хв. при 100° С на водяній бані і далі охолоджували протягом 10 хв., щоб зупинити реакцію. Вимірювали оптичну щільність на 532 нм і 580 нм. Результати виражали у вигляді ΔD , у відсотках, за 100% прийнято рівень накопичення МДА в системі без НЧ.

Визначення загальної антиоксидантної активності (АОА). Модельна система для визначення загальної АОА НЧ містила: фосфатний буфер рН 7,45; суспензію ліпопротеїнів яєчного жовтка (ЖЛП), розведеного буфером в 25 разів; 25 мМ $FeSO_4$; 0,01 М іонол; 20% трихлороцтова кислота; 0,5% ТБК;

0,3% додецилсульфат Na. Жовток курячого яйця гомогенізували в рівному обсязі фосфатного буфера (0,5 мл суспензії + 12 мл буфера). У дослідні проби додавали НЧ, в контрольну пробу замість НЧ додавали воду. Перекисні реакції активували додаванням в зразок 0,2 мл 25 мМ FeSO₄ (інкубація на водяній бані при температурі 37° С протягом 15 хв.). Далі додавали 1 мл 20% розчину трихлороцтової кислоти. Реакцію зупиняли за допомогою 0,1 мл 0,01 М іонола, зразки центрифугували (1000 об/хв.), надосадову рідину видаляли, додавали 1,8 мл 0,5% ТБК, знову інкубували проби на водяній бані в режимі кипіння протягом 15 хв. Спектри поглинання вимірювали з максимумами 532 нм і 580 нм. Результати виражали в вигляді ΔD, у відсотках, за 100% прийнята АOA в системі без НЧ.

Вимірювання спектрів поглинання. Всі спектри поглинання вимірювали за допомогою двопроменевого скануючого UV-Vis спектрофотометра SPECORD 200 (Analytik Jena, Німеччина). При проведенні вимірювань використовували кювети з довжиною оптичного шляху 0,2 або 1 см. Управління приладом і обробку спектрів здійснювали за допомогою програмного забезпечення в операційній системі Windows. Основні характеристики спектрофотометра [169]:

- *оптика*: монохроматор с голографічною решіткою і асферичною оптикою кварцевого напилення;
- *діапазон хвиль*: 190–1100 нм;
- *точність довжини хвилі*: $\leq \pm 0.5$ нм;
- *відтворюваність довжини хвилі*: $\leq \pm 0.05$ нм;
- *ширина спектральної смуги*: варіюється 1; 2; 4 нм.

Вимірювання хемілюмінесценції при дії НЧ в модельних системах, в гомогенатах тканин, в гепатоцитах і мітохондріях. ХЛ стимулювали реактивом Фентона. При вивченні властивостей НЧ в абіотичній системі інкубаційна проба містила 0,05 М трис-буфер рН 7,4; 50 мкМ люмінал; 10 мкМ Fe²⁺; НЧ, що досліджувались, (з кінцевою концентрацією в зразках 0,05 г/л). Реакцію запускали додаванням H₂O₂ (кінцева концентрація 1,35 мМ).

Спектри ХЛ вимірювали за допомогою хемілюмінометра «Lum-5773», Росія. Оцінювали показники світлосуми ХЛ за 5 хвилин і максимальну амплітуду спалаху ХЛ.

Безклітинна біотична система для оцінки анти- або прооксидантних властивостей НЧ додатково містила гомогенат клітин печінки (кінцева концентрація білка в досліджуваних зразках становила 70-80 мкг/мл). Інкубація зразків тривала 30 хв. при 37° С (контрольний зразок не містив НЧ). Після цього зразки поміщали в термостатовану кювету хемілюмінометра і вимірювали ХЛ, як описано вище. Для дослідження протекторних властивостей всіх типів НЧ в інкубаційне середовище з гомогенатом клітин печінки, в якості індукторів оксидативного стресу додавали перекис водню або терт-бутилгідропероксид (t-BHP). Оксиданти (2 mM H₂O₂ або 100 мкм t-BHP) додавали до зразків до (за 10 хв) або після (через 10 хв) внесення НЧ. Загальний час інкубації становив 30 хвилин, після чого вимірювали ХЛ проб. В експериментах для зміни окисного балансу середовища використовували також ультрафіолетове (УФ) і червоне випромінювання. Джерелом УФ випромінювання служила УФ-лампа з енергією 180 Дж/м². Джерелом червоного випромінювання служив гелій-неоновий лазер ЛГН 208Б, $\lambda = 632,8$ нм, потужність 1,5 мВт. В обох випадках опромінення проводили протягом 5 хв.

При дослідженні впливу НЧ на окислювальний баланс ізольованих гепатоцитів, свіжевиділені клітини (з концентрацією 5×10^5 кл/мл) інкубували з НЧ кожного типу відповідно (кінцева концентрація НЧ в кожному зразку становила 0,05 г/л) протягом 1, 3 або 24 год. в буфері Кребса – Гензелейта, рН 7,4 (контрольна проба не містила НЧ). По завершенні часу інкубації клітини відмивали від НЧ, ресуспендували в 0,05 М трис-буфері, рН 7,4. Вимірювання спектрів ХЛ проводили за тих же умов, що описані вище.

При дослідженні впливу НЧ на ізольовані МХ, свіжевиділені МХ (з концентрацією білка $41,89 \pm 0,85$ мг/мл) ресуспендували в 0,1 М трис-буфері, рН 7,4. Потім додавали НЧ (з кінцевою концентрацією в зразках – 0,05 г/л), і

зразки інкубували при 25°C протягом 20 хв., після чого були поміщені в лід. Інкубація МХ з НЧ при 25°C протягом 20 необхідна для розвитку ефектів частинок. Необхідно відзначити, що ніяких відмінностей у функціональному стані МХ між контрольними зразками (без НЧ), що перебували при 25°C протягом 20 хв., і контрольними зразками також без НЧ, які перебували на льоду протягом усього експерименту, не спостерігалось. Вимірювання спектрів ХЛ проводили за тих же умов, що описані вище.

Результати виражали у відсотках, за 100% прийнята інтенсивність або світлосума ХЛ в системі без НЧ.

Полярографічне вимірювання дихання і окисного фосфорилування.

Дихання МХ визначали за допомогою закритого кисневого електрода Кларка [170] в термостатованій кюветі (30° C) в реакційному середовищі наступного складу: 150 мМ сахароза; 75 мМ KCl; 10 мМ KH_2PO_4 ; 2 мМ MgCl_2 ; 10 мМ трис-HCl; рН 7,4, 41,89±0,85 мг/мл білка в 1 мл. Субстратами окислення служили глутамат (4 мМ) та малат (4 мМ). Концентрація внесеного АДФ становила 400 мкМ. Додаткові добавки в полярографічну кювету в залежності від типу вимірюваної активності: ЕГТА – 1 або 2 мкМ, БСА (знежирений, V фракція) – 1 мг/мл. За кривими споживання кисню розраховували швидкості дихання МХ в метаболічних станах 2 і 3 за Чансом (V_2 і V_3), дихальний контроль (ДК, V_3/V_2).

Результати виражали у відсотках, за 100% прийнято показники дихання і окисного фосфорилування в системі без НЧ.

Визначення рівня АТФ. Після впливу НЧ на ізольовані МХ рівень АТФ визначали в реакційному середовищі наступного складу: 100 мМ трис-HCl; 1 мМ ЕДТА; 2 мМ MgCl_2 ; 4 мМ НАДФ×Na за допомогою екзогенних гексогенази – 5 од/мл (+0,02% БСА або 72 мг/мл глюкоза) і глюкозо-6-фосфату (від 0,35 до 25 од/мл) за методом [171], описаним в [172].

Результати виражали у відсотках, за 100% прийнято показники рівня АТФ в системі без НЧ.

Визначення вмісту білка. Вміст білка в досліджуваних зразках визначали за методом Бредфорда [173].

Обробка даних. Отримані дані обробляли за допомогою програм «Statistika 6.0» (StatSoft, США). Результати були представлені у вигляді середнього арифметичного \pm похибка середнього. Вірогідність відмінностей середніх оцінювали, використовуючи t-критерій Стюдента. Відмінності вважали вірогідними довірчої ймовірності 0,05.

2.4. Обчислювальна кінетична модель Маркевича і Хоека

Для аналізу даних та інтерпретації отриманих результатів використовували кінетичну схему переносу електронів і утворення супероксида, запропоновану авторами Маркевичем і Хоеком [129]. Дана схема описує основні шляхи перенесення електронів в електрон-транспортному ланцюзі і в головних центрах утворення АФК – комплексах I і III і лежить в основі обчислювальної моделі для мітохондріального дихального ланцюга (Рис. 2.5). Дана кінетична схема включає в себе наступні переносники електронів:

- 1) Для комплексу I: флавін монопнуклеотид, послідовність залізо-сірчаних кластерів, починаючи з N3 і N1A і закінчуються N2 кластером, і коензим Q.
- 2) Для комплексу III: коензим Q, цитохроми b_L , b , b_H , c_1 .

Комплекси II і IV в даній моделі не розглядаються як прямі джерела АФК.

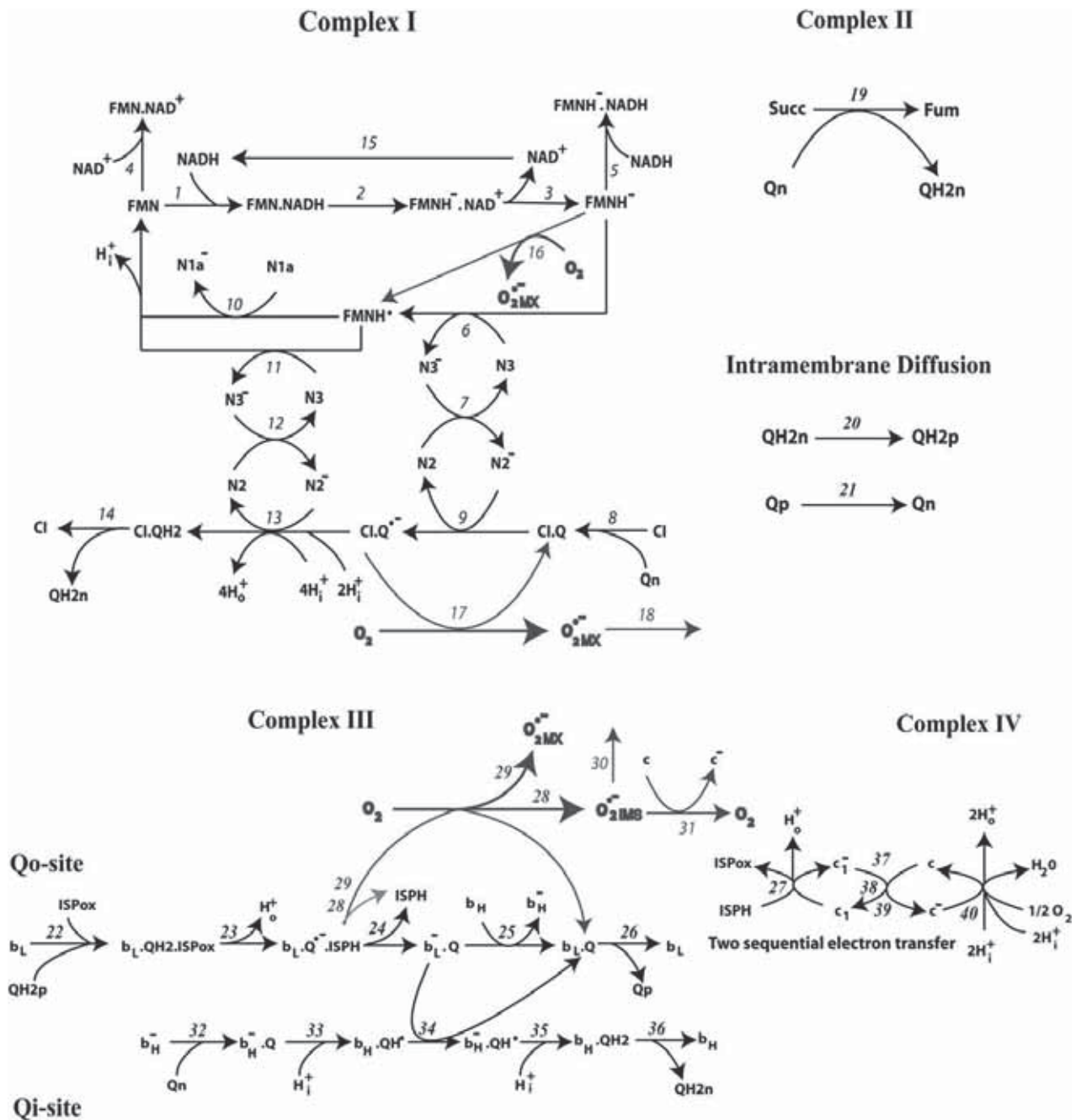


Рис. 2.5. Кінетична схема перенесення електронів і утворення супероксида в дихальному ланцюзі MX [129].

Повна схема реакцій, що описують перенос електронів і утворення супероксиду відповідно до наведеної кінетичної схеми (рис. 2.5), містить 40 реакцій, які наведені на рис. 2.6.

No.	Reaction	Rate equation
<i>Electron transfer in Complex I</i>		
1	$\text{NADH} + \text{FMN} = \text{FMN.NADH}$	$V_1 = k_1 \cdot (\text{NADH} \cdot \text{FMN} - \text{FMN.NADH}/K_{eq1})$
2	$\text{FMN.NADH} = \text{FMNH}^+ \cdot \text{NAD}^+$	$V_2 = k_2 \cdot (\text{FMN.NADH} - \text{FMNH}^+ \cdot \text{NAD}^+ / K_{eq2})$
3	$\text{FMNH}^+ \cdot \text{NAD}^+ = \text{FMNH}^+ + \text{NAD}^+$	$V_3 = k_3 \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{NAD}^+ - \text{FMNH}^+ \cdot \text{NAD}^+ / K_{eq3})$
4	$\text{FMN} + \text{NAD}^+ = \text{FMN.NAD}^+$	$V_4 = k_4 \cdot (\text{FMN} \cdot \text{NAD}^+ - \text{FMN.NAD}^+ / K_{eq4})$
5	$\text{FMNH}^+ + \text{NADH} = \text{FMNH}^+ \cdot \text{NADH}$	$V_5 = k_5 \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{NADH} - \text{FMNH}^+ \cdot \text{NADH} / K_{eq5})$
<i>The first electron transfer</i>		
6	$\text{FMNH}^+ + \text{N}_3 = \text{FMNH}^+ \cdot \text{N}_3$	$V_6 = k_6 \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{N}_3 - \text{FMNH}^+ \cdot \text{N}_3 / K_{eq6})$
7	$\text{N}_3 + \text{N}_2 = \text{N}_3 + \text{N}_2$	$V_7 = k_7 \cdot (\text{N}_3 + \text{N}_2 - \text{N}_3 \cdot \text{N}_2 / K_{eq7})$
8	$\text{Cl} + \text{Qn} = \text{Cl} \cdot \text{Q}$	$V_8 = k_8 \cdot (\text{Cl} \cdot \text{Qn} - \text{Cl} \cdot \text{Q} / K_{eq8})$
9	$\text{Cl} \cdot \text{Q} + \text{N}_2 = \text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} + \text{N}_2$	$V_9 = k_9 \cdot (\text{Cl} \cdot \text{Q} \cdot \text{N}_2 - \text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{N}_2 / K_{eq9})$
<i>The second electron transfer</i>		
10 ^a	$\text{FMNH}^+ + \text{N1a} = \text{FMN} + \text{N1a}^+ + \text{H}^+$	$V_{10} = k_{10} \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{N1a} - \text{FMN} \cdot \text{N1a}^+ \cdot \exp(2.3 \cdot (7 - \text{pHi})) / K_{eq10})$
11 ^a	$\text{FMNH}^+ + \text{N}_3 = \text{FMN} + \text{N}_3 + \text{H}^+$	$V_{11} = k_{11} \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{N}_3 - \text{FMN} \cdot \text{N}_3 \cdot \exp(2.3 \cdot (7 - \text{pHi})) / K_{eq11})$
12	$\text{N}_2 + \text{N}_3 = \text{N}_2 + \text{N}_3$	$V_{12} = k_{12} \cdot (\text{N}_2 \cdot \text{N}_3 - \text{N}_2 \cdot \text{N}_3 / K_{eq12})$
13 ^a	$\text{N}_2 + \text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} + 8 \cdot \text{H}^+ = \text{N}_2 + \text{Cl.QH}_2 + 6 \cdot \text{H}^+$	$V_{13} = k_{13} \cdot (\text{N}_2 \cdot \text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \exp(2 \cdot 2.3 \cdot (7 - \text{pHi})) - \text{N}_2 \cdot \text{Cl.QH}_2 \cdot \exp(4 \cdot (F - \Delta\psi/R \cdot T + 2.3 \cdot (\text{pHi} - \text{pHo}))) / K_{eq13})$
14	$\text{Cl.QH}_2 = \text{Cl} + \text{QH}_2\text{n}$	$V_{14} = k_{14} \cdot (\text{Cl.QH}_2 - \text{Cl} \cdot \text{QH}_2\text{n} / K_{eq14})$
<i>NAD⁺ reduction to NADH in mitochondrial matrix</i>		
15	$\text{NAD}^+ = \text{NADH}$	$V_{15} = k_{15} \cdot (\text{NAD}^+ - \text{NADH} / K_{eq15})$
<i>Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) production by Complex I into the mitochondrial matrix</i>		
16	$\text{FMNH}^+ + \text{O}_2 = \text{FMNH}^+ \cdot \text{O}_2^{\cdot -}$	$V_{16} = k_{16} \cdot (\text{FMNH}^+ \cdot \text{O}_2 - \text{FMNH}^+ \cdot \text{O}_2^{\cdot -} / K_{eq16})$
17	$\text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} + \text{O}_2 = \text{Cl.Q} + \text{O}_2^{\cdot -}$	$V_{17} = k_{17} \cdot (\text{Cl} \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{O}_2 - \text{Cl.Q} \cdot \text{O}_2^{\cdot -} / K_{eq17})$
<i>Superoxide anion dismutation in the mitochondrial matrix</i>		
18	$2\text{O}_2^{\cdot -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	$V_{18} = V_{max18} \cdot \text{O}_2^{\cdot -} / (K_{m18} + \text{O}_2^{\cdot -})$
<i>Succinate dehydrogenase reaction (Complex II)</i>		
19 ^b	$\text{Succ} + \text{Qn} \rightarrow \text{Fum} + \text{QH}_2\text{n}$	$V_{19} = V_{max19} \cdot \text{Qn} / (\text{Qn} + \text{QH}_2\text{n}) / (K_{19} + \text{Qn} / (\text{Qn} + \text{QH}_2\text{n}))$
<i>Q and QH₂ intramembrane diffusion</i>		
20 ^c	$\text{QH}_2\text{n} = \text{QH}_2\text{p}$	$V_{20} = k_{20} \cdot (\text{QH}_2\text{n} - \text{QH}_2\text{p} / K_{eq20})$
21 ^c	$\text{Qp} = \text{Qn}$	$V_{21} = k_{21} \cdot (\text{Qp} - \text{Qn} / K_{eq21})$
<i>Q_o-site reactions (Complex III)</i>		
22	$\text{b}_L + \text{ISPox} + \text{QH}_2\text{p} = \text{b}_L \cdot \text{QH}_2\text{ISPox}$	$V_{22} = k_{22} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{ISPox} \cdot \text{QH}_2\text{p} - \text{b}_L \cdot \text{QH}_2\text{ISPox} / K_{eq22})$
23 ^a	$\text{b}_L \cdot \text{QH}_2\text{ISPox} = \text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} + \text{H}^+$	$V_{23} = k_{23} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{QH}_2\text{ISPox} - \text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} \cdot \exp(F \cdot \delta_1 \cdot \Delta\psi / R \cdot T + 2.3 \cdot (7 - \text{pHo})) / K_{eq23})$
24	$\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} = \text{b}_L \cdot \text{Q} + \text{ISPox}$	$V_{24} = k_{24} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} - \text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \text{ISPox} / K_{eq24})$
25 ^a	$\text{b}_L \cdot \text{Q} + \text{b}_H = \text{b}_L \cdot \text{Q} + \text{b}_H$	$V_{25} = k_{25} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \text{b}_H - \text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \text{b}_H \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\psi / R \cdot T) / K_{eq25})$
26	$\text{b}_L \cdot \text{Q} = \text{Qp} + \text{b}_L$	$V_{26} = k_{26} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{Q} - \text{Qp} \cdot \text{b}_L / K_{eq26})$
27 ^a	$\text{ISPox} + \text{c}_1 = \text{ISPox} + \text{c}_1 + \text{H}^+$	$V_{27} = k_{27} \cdot (\text{ISPox} \cdot \text{c}_1 - \text{ISPox} \cdot \text{c}_1 \cdot \exp(2.3 \cdot (7 - \text{pHo})) / K_{eq27})$
<i>Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) production by Complex III into the intermembrane space (IMS)</i>		
28	$\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} + \text{O}_2 = \text{b}_L \cdot \text{Q} + \text{ISPox} + \text{O}_2^{\cdot -}$	$V_{28} = k_{28} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} \cdot \text{O}_2 - \text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \text{ISPox} \cdot \text{O}_2^{\cdot -} / K_{eq28})$
<i>Superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot -}$) production by Complex III into the mitochondrial matrix</i>		
29	$\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} + \text{O}_2 = \text{b}_L \cdot \text{Q} + \text{ISPox} + \text{O}_2^{\cdot -}$	$V_{29} = k_{29} \cdot (\text{b}_L \cdot \text{Q}^{\cdot -} \cdot \text{ISPox} \cdot \text{O}_2 - \text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \text{ISPox} \cdot \text{O}_2^{\cdot -} / K_{eq29})$
<i>Superoxide anion spontaneous dismutation and oxidation by cyt c in IMS</i>		
30	$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{O}_2^{\cdot -} \rightarrow \text{O}_2 + \text{O}_2^{\cdot -}$	$V_{30} = k_{30} \cdot (\text{O}_2^{\cdot -})^2$
31	$\text{O}_2^{\cdot -} + \text{c} = \text{O}_2 + \text{c}^{\cdot -}$	$V_{31} = k_{31} \cdot (\text{O}_2^{\cdot -} \cdot \text{c} - \text{O}_2 \cdot \text{c}^{\cdot -} / K_{eq31})$
<i>Q_o-site reactions (Complex III)</i>		
32	$\text{b}_H + \text{Qn} = \text{b}_H \cdot \text{Q}$	$V_{32} = k_{32} \cdot (\text{b}_H \cdot \text{Qn} - \text{b}_H \cdot \text{Q} / K_{eq32})$
33 ^a	$\text{b}_H \cdot \text{Q} + \text{H}^+ = \text{b}_H \cdot \text{QH}^+$	$V_{33} = k_{33} \cdot (\text{b}_H \cdot \text{Q} - \text{b}_H \cdot \text{QH}^+ \cdot \exp(F \cdot \delta_3 \cdot \Delta\psi / R \cdot T - 2.3 \cdot (7 - \text{pHi})) / K_{eq33})$
34 ^a	$\text{b}_H \cdot \text{QH}^+ + \text{b}_L \cdot \text{Q} = \text{b}_H \cdot \text{QH}^+ + \text{b}_L \cdot \text{Q}$	$V_{34} = k_{34} \cdot (\text{b}_H \cdot \text{QH}^+ \cdot \text{b}_L \cdot \text{Q} - \text{b}_H \cdot \text{QH}^+ \cdot \text{b}_L \cdot \text{Q} \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\psi / R \cdot T) / K_{eq34})$
35 ^a	$\text{b}_H \cdot \text{QH}^+ + \text{H}^+ = \text{b}_H \cdot \text{QH}_2$	$V_{35} = k_{35} \cdot (\text{b}_H \cdot \text{QH}^+ - \text{b}_H \cdot \text{QH}_2 \cdot \exp(F \cdot \delta_3 \cdot \Delta\psi / R \cdot T - 2.3 \cdot (7 - \text{pHi})) / K_{eq35})$
36	$\text{b}_H \cdot \text{QH}_2 = \text{b}_H + \text{QH}_2\text{n}$	$V_{36} = k_{36} \cdot (\text{b}_H \cdot \text{QH}_2 - \text{b}_H \cdot \text{QH}_2\text{n} / K_{eq36})$
<i>Cytochrome c reduction</i>		
37	$\text{c}_1^{\cdot -} + \text{c} = \text{c}_1 + \text{c}^{\cdot -}$	$V_{37} = k_{37} \cdot (\text{c}_1^{\cdot -} \cdot \text{c} - \text{c}_1 \cdot \text{c}^{\cdot -} / K_{eq37})$
38	$\text{c}_1^{\cdot -} \cdot \text{c} = \text{c}_1 + \text{c}^{\cdot -}$	$V_{38} = k_{38} \cdot (\text{c}_1^{\cdot -} \cdot \text{c} - \text{c}_1 \cdot \text{c}^{\cdot -} / K_{eq38})$
39	$\text{c}_1 \cdot \text{c} = \text{c}_1 + \text{c}^{\cdot -}$	$V_{39} = k_{39} \cdot (\text{c}_1 \cdot \text{c} - \text{c}_1 \cdot \text{c}^{\cdot -} / K_{eq39})$
<i>Cytochrome c oxidase reaction (Complex IV)</i>		
40 ^d	$2 \cdot \text{c}^{\cdot -} + 4 \cdot \text{H}^+ + (1/2) \cdot \text{O}_2 = 2 \cdot \text{c} + \text{H}_2\text{O} + 2 \cdot \text{H}^+$	$V_{40} = k_{40} \cdot \text{c}^{\cdot -} / (1 + k_{40} / \text{O}_2) \cdot (\exp(-\Delta G^0 / 2 \cdot R \cdot T) \cdot \exp(2 \cdot 2.3 \cdot (7 + \text{pHo} - 2 \cdot \text{pHi})) \cdot \exp(-\Delta\psi \cdot F / R \cdot T) \cdot \text{O}_2^{0.25} \cdot \text{c}^{\cdot -} - \text{c} \cdot \exp(\Delta\psi \cdot F / RT))$

Рис. 2.6. Реакції і рівняння швидкостей в моделі дихального ланцюга [129].

За аналогією з даною моделлю, де використовується АА, що широко використовується як інгібітор Q_i сайту в комплексі III в експериментальних і обчислювальних дослідженнях генерації АФК в дихальному ланцюзі МХ, запропоновані механізми дії НЧ на дихальний ланцюг МХ.

2.5. Характеристика використаних реактивів

В роботі використовували інкубаційні розчини і середовища виробництва ФУПП («Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова» РАМН); сироватку крові ембріонів великої рогатої худоби (ООО «БиолоТ», Росія); АДФ, АТФ, GSH, сукцинат, глутамат, – виробництва фірми “Reanal” (Угорщина); тритон X–100 – виробництва фірми “Ferak” Німеччина); ЕДТА, малат, глюкоза, HEPES, бичачий сироватковий альбумін (знежирений, V фракція) – виробництва фірми “Sigma”, (США), МТТ – тест – виробництва фірми «MERC», (США); люмінол – виробництва фірми Applichem, (США), і реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації ЧДА, ХЧ и ОСЧ.

Висновки до розділу 2

1. Методологічна база та обладнання забезпечують сучасний рівень досліджень і дозволяють на основі флуоресцентного аналізу проводити якісну і кількісну оцінку процесів в поодиноких клітинах.
2. Відпрацьована методика неферментативного виділення гепатоцитів.
3. Відпрацьовано методики мікрофлуориметрії і мікроспектрофлуориметрії.
4. Сучасні методи досліджень та обладнання дозволяють всебічно охарактеризувати вплив НЧ на біологічні системи.
5. Застосування обчислювальної кінетичної моделі дозволяє визначити біофізичну значимість отриманих експериментальних результатів.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ЗДАТНОСТІ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ІНАКТИВУВАТИ РАДИКАЛИ В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ

3.1. Редоксактивність наночастинок в модельних абіотичних і біотичних системах

Як вже зазначалося в розділі «огляд літератури», дані про біологічну активність НЧ суперечливі. Ряд авторів повідомляє про антиоксидантні властивості діоксиду церію [58-66], але представлені і дані про негативні наслідки застосування CeO_{2-x} [73-76]: в даному випадку можна говорити, що частинки демонструють прооксидантні властивості, викликаючи запалення і клітинну загибель. Так само практично відсутні дані про редоксактивність НЧ на основі ортованадатів РЗЕ. Тому перш ніж досліджувати вплив НЧ на біоенергетичні процеси в МХ, необхідно було оцінити, як проявляється біологічна активність частинок в різних модельних системах і з'ясувати, як зміниться інтенсивність генерації АФК в залежності від фізико-хімічних і геометричних параметрів, а також розмірів досліджуваних НЧ.

Одним з основних методів для досліджень здатності НЧ впливати на генерацію або інактивацію АФК і вільних радикалів була обрана активована ХЛ. Даний метод широко застосовується в медико-біологічних дослідженнях [174-176], оскільки має низку переваг:

- 1) не впливає на хід процесів в розчинах, клітинах і тканинах, де реєструється світіння;
- 2) високочутливий при виявленні високореакційних радикалів. Метод ХЛ реєструє навіть найактивніші радикали, концентрація яких в досліджуваній системі може бути зникаюче мала, і в цьому – його унікальність і перевага перед іншими методами.

Перша модельна система – це абіотична система з реактивом Фентона. У даній системі була досліджена здатність НЧ різних розмірів і форми інактивувати радикали. Показано, що всі досліджувані НЧ демонструють антирадикальну активність (що було очікувано для діоксиду церію) незалежно від матеріалу і розмірів – для всіх частинок інтенсивність спалаху і світлосуми ХЛ знижена (Рис. 3.1).

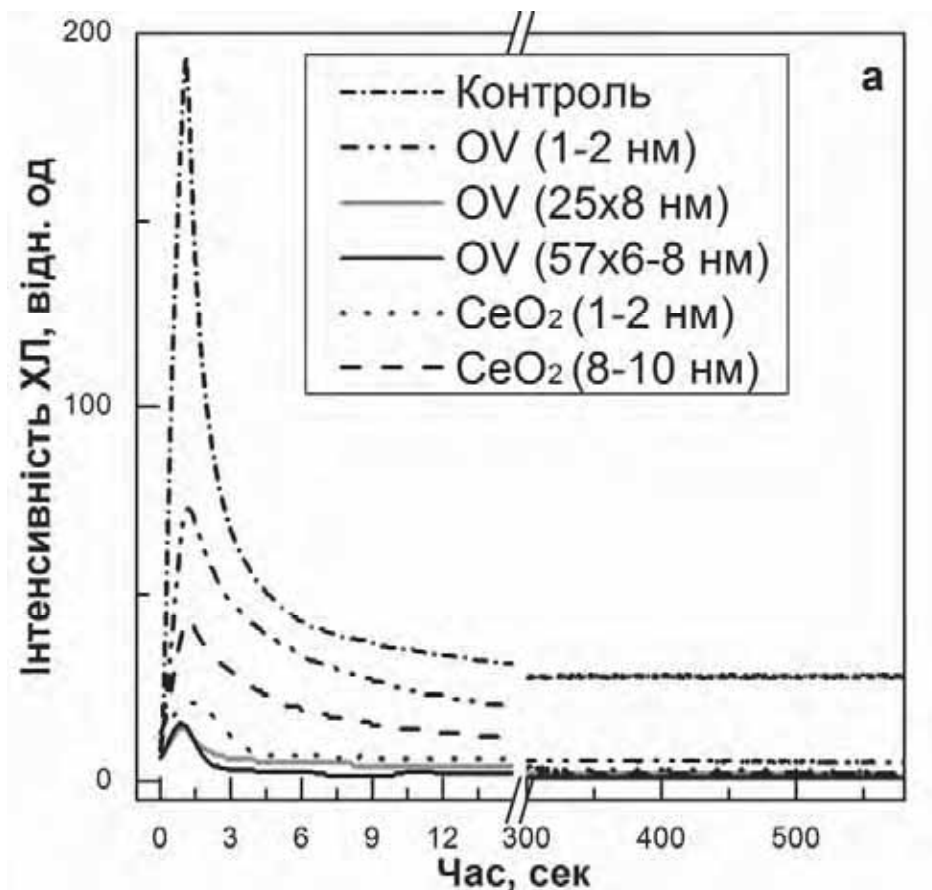


Рис. 3.1. Інтенсивність вільно-радикальних процесів в присутності НЧ в абіотичній системі при індукції ХЛ реактивом Фентона.

Ці дані узгоджуються з результатами досліджень СОД-подібної активності НЧ в абіотичній системі окислення адреналіну [79]: було показано, що НЧ діоксиду церію, незалежно від розмірів, проявляють антирадикальну активність (близько 50%) по відношенню до супероксидного радикала при концентрації частинок 0,002 г/л. Слабка антирадикальна активність при даній концентрації спостерігалася і для малих сферичних ортованадатних

частинок. Антирадикальний ефект зростав зі збільшенням концентрації ортованадатів. У той же час спостерігалася парадоксальна поведінка – інверсія антиоксидантного ефекту – для малих (1-2 нм) частинок діоксиду церію, що може пояснюватися їх підвищеною схильністю до агрегації зі зростанням концентрації.

Згідно з літературними даними, кінцевий ефект НЧ в біосистемі залежить від мікрооточення і умов експерименту, і може проявлятися на клітинному, субклітинному або молекулярному рівні. Зміна генерації АФК при дії НЧ може, імовірно, відбуватися на двох рівнях: 1) хімічна реакційність як частинок, так і домішок (наприклад, сполук, що використовуються для стабілізації частинок в колоїдних розчинах), 2) фізична взаємодія частинок з клітинними структурами, які беруть участь в каталізі біологічних окислювально-відновлювальних процесів [42]. Тому далі в біотичній модельній системі, яка не містить клітинний матеріал, а містить ліпопротеїни яєчного жовтка, за рівнем накопичення МДА, який є кінцевим продуктом ПОЛ і служить маркером оксидативного стресу, визначалася загальна АОА НЧ. Було встановлено, що найбільш виражені антиоксидантні властивості проявляють НЧ CeO_{2-x} , як малі (розміром 1-2 нм), так і з розміром 8-10 нм (Рис. 3.2). Для ортованадатних НЧ антиоксидантна дія виявлялася в залежності від розмірів і форми, і у малих сферичних НЧ відсутня.

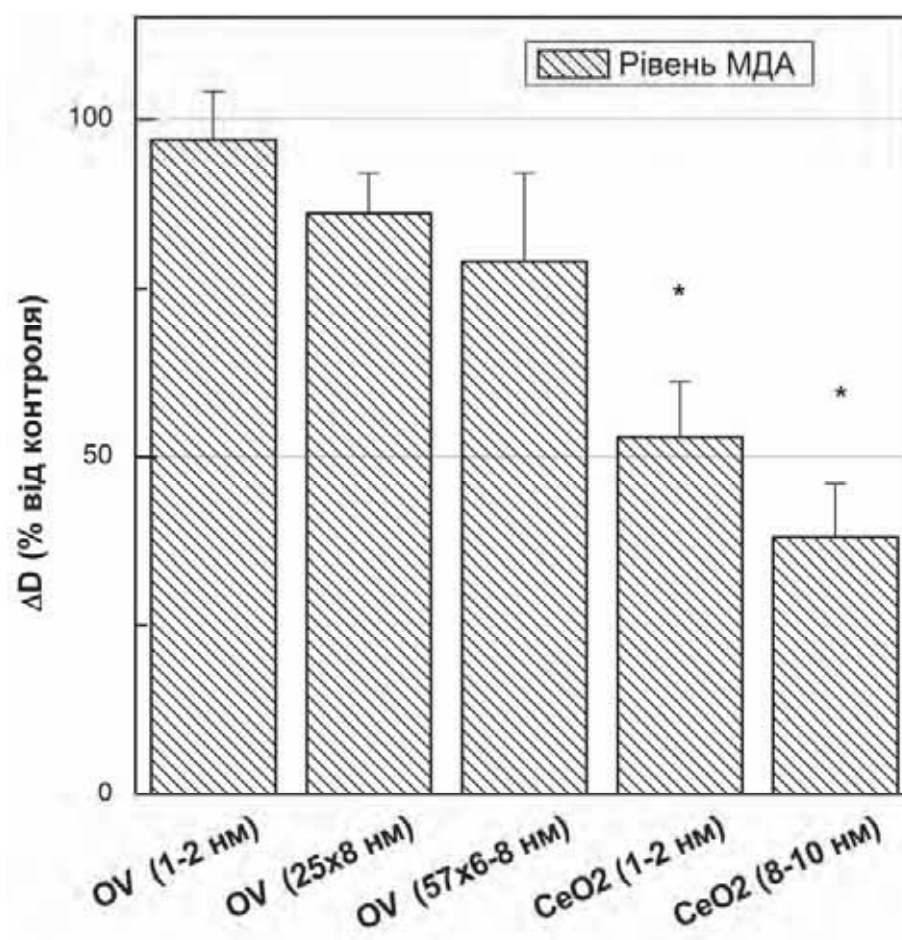


Рис. 3.2. Загальна антиоксидантна активність НЧ в модельній біотичній системі з ліпопротеїнами жовтка;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Подальші дослідження проводили в більш складній біотичній модельній системі, що містить клітинний матеріал (гомогенат клітин печінки). 30-ти хвилинна інкубація з малими сферичними ортованадатними НЧ і 1-2 нм НЧ діоксиду церію призводила до збільшення світлосуми ХЛ (Рис. 3.3). У разі ж НЧ CeO_{2-x} розміром 8-10 нм величина світлосуми навпаки знижувалася в порівнянні з контролем (Рис. 3.3). Таким чином, для сферичних малих НЧ обох типів в даних експериментальних умовах ефект був односпрямованим – прооксидантним, тоді як сферичні частинки CeO_{2-x} більшого розміру проявляли антиоксидантну дію.

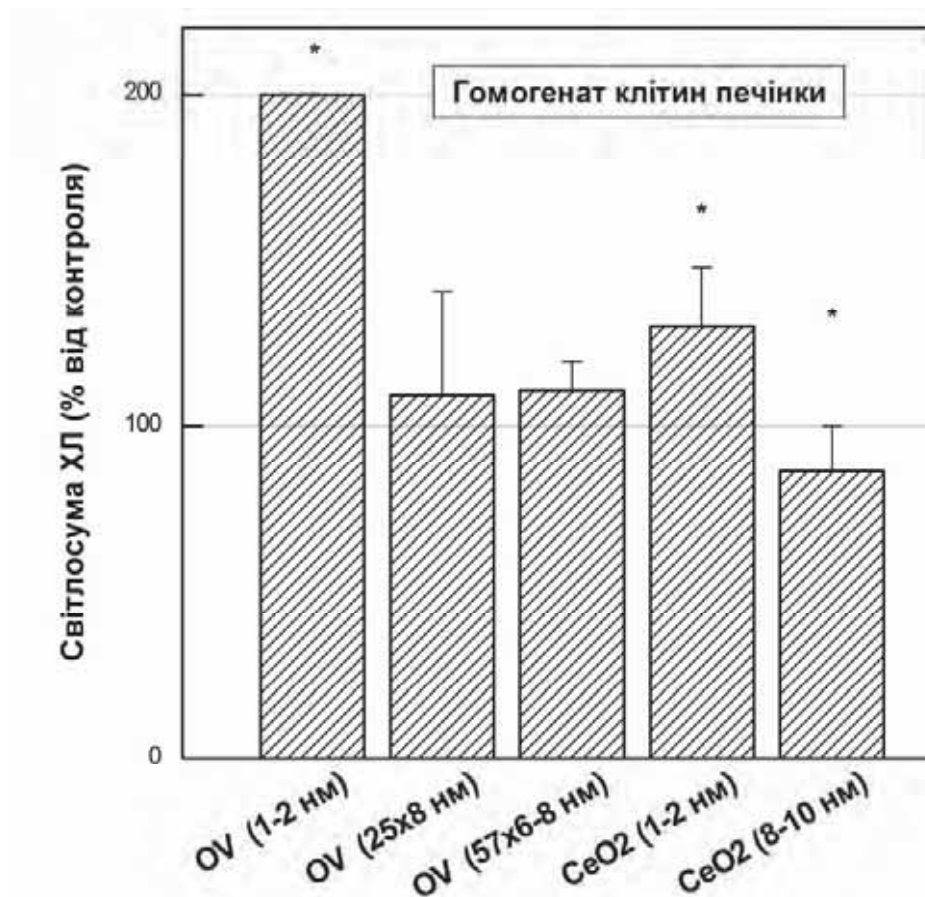


Рис. 3.3. Вплив НЧ на генерацію радикалів в біотичній модельній системі (гомогенат клітин печінки) з реактивом Фентона за показником світлосуми ХЛ;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Прооксидантний ефект малих ортованадатних НЧ відтворювався і в ізольованих МХ (Рис. 3.4). Як відомо з літератури, МХ – одна з основних мішеней для НЧ, і кінцева клітинна відповідь на дію НЧ обумовлена саме їх взаємодією з МХ [42,177]. Аномальна генерація АФК МХ може бути результатом безпосередньої взаємодії малих НЧ (1-2 нм) з мембранами МХ, сорбції білків внаслідок високої реактивності поверхні НЧ. В даному випадку токсична дія частинок може бути обумовлена їх дуже малими розмірами, оскільки малі частинки здатні безпосередньо взаємодіяти з іонними каналами, викликаючи набухання МХ і втрату структури крист [42].

Наслідком порушення балансу в генерації АФК мітохондріями є так само порушення синтезу АТФ і падіння мітохондріального потенціалу.

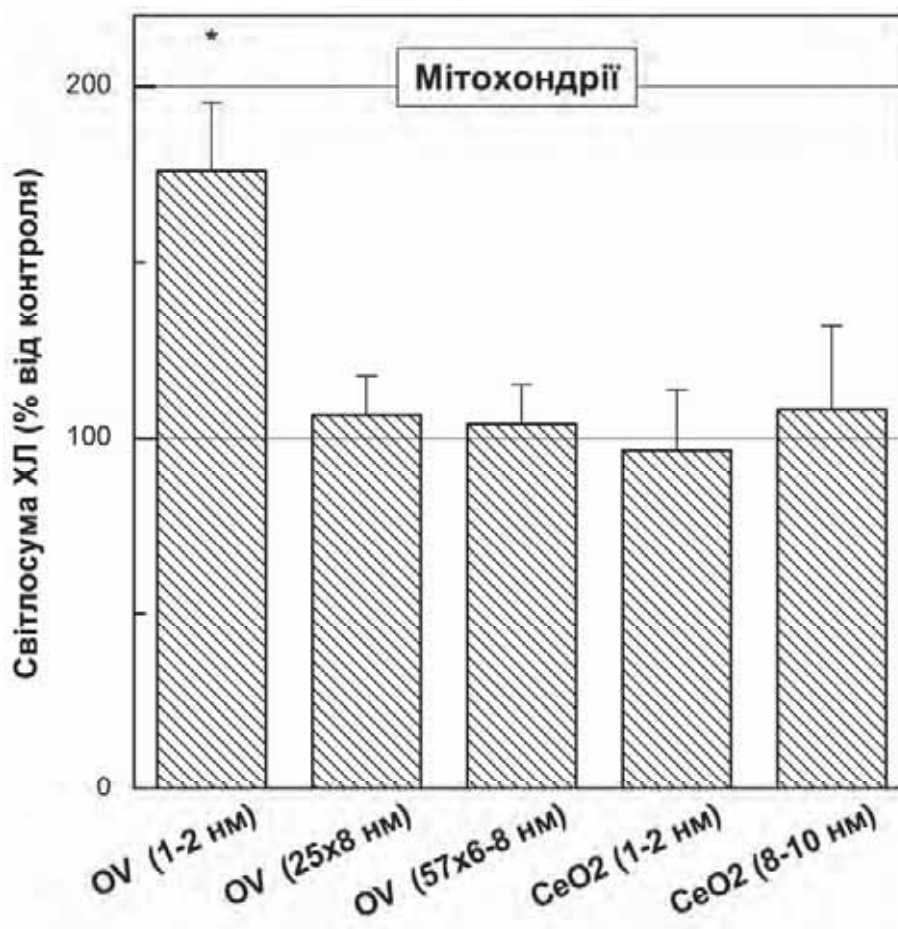


Рис. 3.4. Вплив НЧ на генерацію радикалів в ізолюваних мітохондріях за показником світлосуми ХЛ;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

На відміну від модельної біотичної системи, що містить гомогенат клітин печінки, в ізолюваних гепатоцитах інкубація протягом 1 год. з НЧ не викликала достовірних змін показників ХЛ, за винятком виявленого зниження світлосуми ХЛ при впливі НЧ CeO_{2-x} 8-10 нм (рис. 3.5). Відсутність помітного впливу всіх НЧ ортованадатів і малих частинок CeO_{2-x} на ізолювані гепатоцити в даному випадку може бути пов'язана з більшою

збереженістю і стабільністю функціонування нативних клітинних систем, що відповідають за підтримання окисного балансу, і з біодоступністю НЧ.

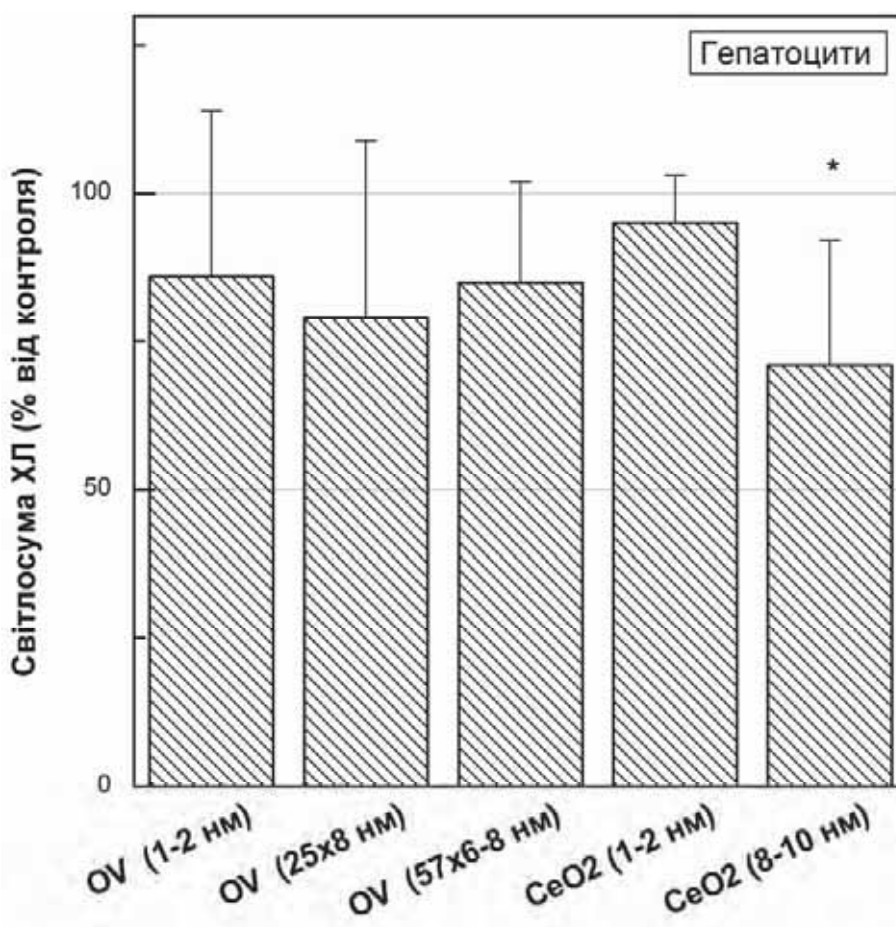


Рис. 3.5. Вплив НЧ на генерацію радикалів в ізольованих гепатоцитах після 1 год. інкубації за показником світлосуми ХЛ;
(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Зміна рівня МДА в ізольованих гепатоцитах при інкубації з НЧ підтверджує прооксидантні ефекти малих НЧ (ортованадатів і діоксиду церію розмірами 1-2 нм) і антиоксидантну дію діоксиду церію 8-10 нм (Рис. 3.6). Таким чином, антиоксидантний ефект частинок CeO_{2-x} (8-10 нм) підтверджується в 3-х досліджених системах і узгоджується з даними літератури про антирадикальні і антиоксидантні властивості діоксиду церію.

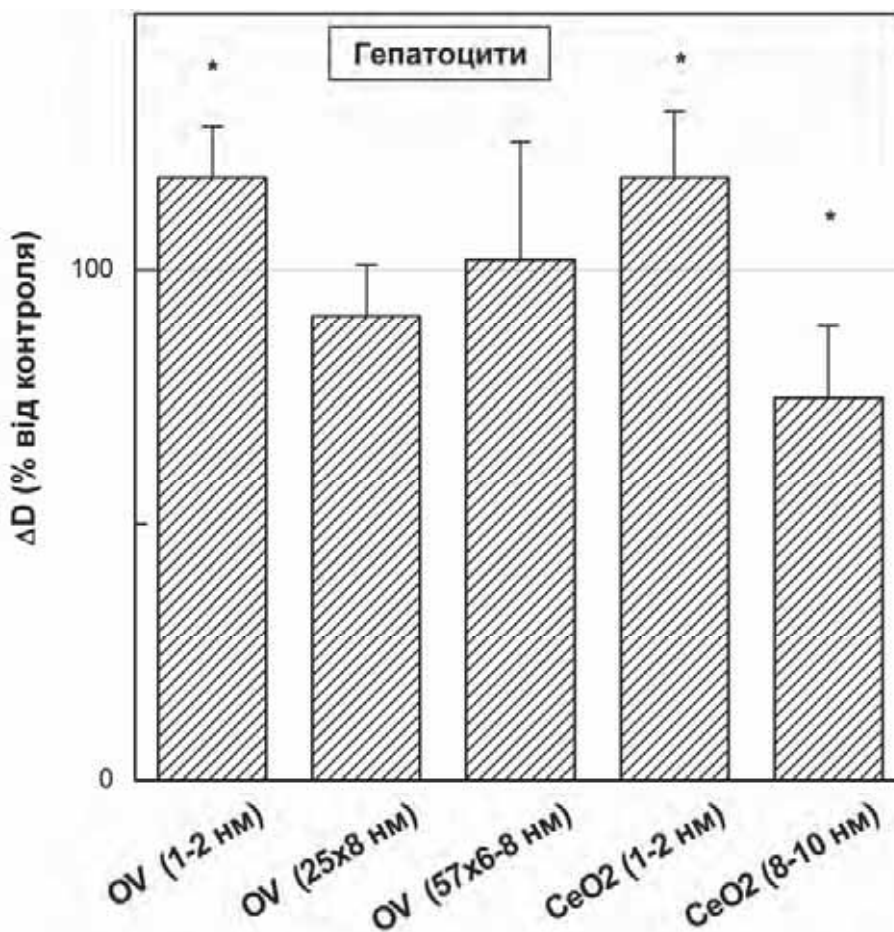


Рис. 3.6. Вплив НЧ на рівень МДА в ізольованих гепатоцитах після 1 год. інкубації;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Таким чином, показано, що здатність НЧ інактивувати радикали, або навпаки, посилювати інтенсивність вільно-радикальних процесів і генерацію АФК залежить від мікрооточення (наявності в системі біологічного матеріалу), і в системах, що містять МХ, відбувається зміна антиоксидантних ефектів НЧ на прооксидантні (крім діоксиду церію розміром 8-10 нм). Отримані дані разом підтверджують те, що МХ є основною мішенню для НЧ і визначають характер клітинної відповіді при дії НЧ.

В даний час механізми антиоксидантної дії НЧ є предметом широких дискусій, і отримані результати свідчать про те, що НЧ, що проявляють антирадикальні властивості в модельних абіотичних системах, не завжди

проявляють антиоксидантні властивості в біотичних системах. Окислювальний баланс в біологічній системі є результатом комплексної регуляції. Фізіологічний рівень і швидкість генерації АФК в клітинах підтримуються на постійному рівні завдяки існуванню багаторівневої антиоксидантної системи захисту. Підвищення концентрації АФК в результаті зсуву рівноваги між процесами їх утворення і детоксикації є передумовою порушення функціональної активності клітин, розвитку оксидативного стресу і патологічних процесів. Збільшення продукції АФК може відбуватися при порушенні транспорту електронів в дихальному ланцюзі МХ і електрон-транспортному ланцюзі мікросом, в результаті появи пулу каталітично активних іонів металів зі змінною валентністю (особливо Fe^{2+}), при активації порооксидантних ферментів або зниженні ефективності системи антиоксидантного захисту. Така відповідь супроводжує дію різних стресових чинників і носить характер адаптивного процесу. АФК в даному випадку можуть грати роль вторинних посередників, що передають сигнал до регуляторних систем [178]. Мабуть, ці ж механізми опосередковують спостережені в даних дослідженнях посилення вільно-радикальних процесів під впливом НЧ в системах, що містять клітинний матеріал і МХ.

3.2. Ефекти наночастинок при моделюванні змін редокс-балансу біосистем

Як показано вище і зазначалося в розділі «огляд літератури», прояв про- і антиоксидантних властивостей НЧ залежить від мікрооточення в біологічній системі, з якої частинки взаємодіють, і наявності в системі МХ. Очевидно також, що редоксактивні НЧ можуть проявляти різні властивості в залежності від редокс-стану модельної системи. Для вивчення даного питання моделювали зміни редокс-балансу системи за допомогою про- і антиоксидантів, а також органічних барвників, які використовуються в ФДТ, здатних генерувати вільні радикали при опроміненні.

Оцінку впливу НЧ на інтенсивність генерації радикалів в системі, що містить гомогенат клітин печінки, проводили в умовах моделювання оксидативного стресу за допомогою H_2O_2 і t-BHP, НЧ були додані до або після індукції оксидативного стресу. Як видно на малюнку 3.7, незалежно від послідовності внесення індукторів оксидативного стресу і НЧ, малі 1-2 нм НЧ ортованадатів РЗЕ посилювали окислювальний дисбаланс в системі. Ефект НЧ розмірами 25×8 нм і $57 \times 6-8$ нм за показником світлосуми ХЛ в цілому можна оцінити як нейтральний. Малі частинки діоксиду церію посилювали окислювальний дисбаланс в модельній системі, якщо були додані після внесення H_2O_2 і t-BHP. Таким чином, малі частинки не тільки здатні активувати вільно-радикальні процеси в біотичній системі, але можуть посилювати індукований оксидативний стрес. Лише попередня інкубація зразків з НЧ CeO_{2-x} розміром 8-10 нм перешкоджала розвитку оксидативного стресу, викликаного H_2O_2 , що проявлялося в зниженні світлосуми ХЛ (Рис. 3.7), проте дані НЧ не чинили захисної дії в разі індукції оксидативного стресу t-BHP.

Таким чином, ключове значення в реалізації прооксидантних ефектів НЧ в даній системі мають їх гранично малі розміри і, в меншій мірі, природа матеріалу. Можна припустити, що зростаюча зі зменшенням розмірів НЧ реакційна здатність проявляється через взаємодію в біотичній системі з біомолекулами, які беруть участь в регуляції окислювального балансу, наприклад, GSH. Це, мабуть, і визначає активацію вільно-радикальних процесів під впливом малих сферичних НЧ ортовандатів і діоксиду церію.

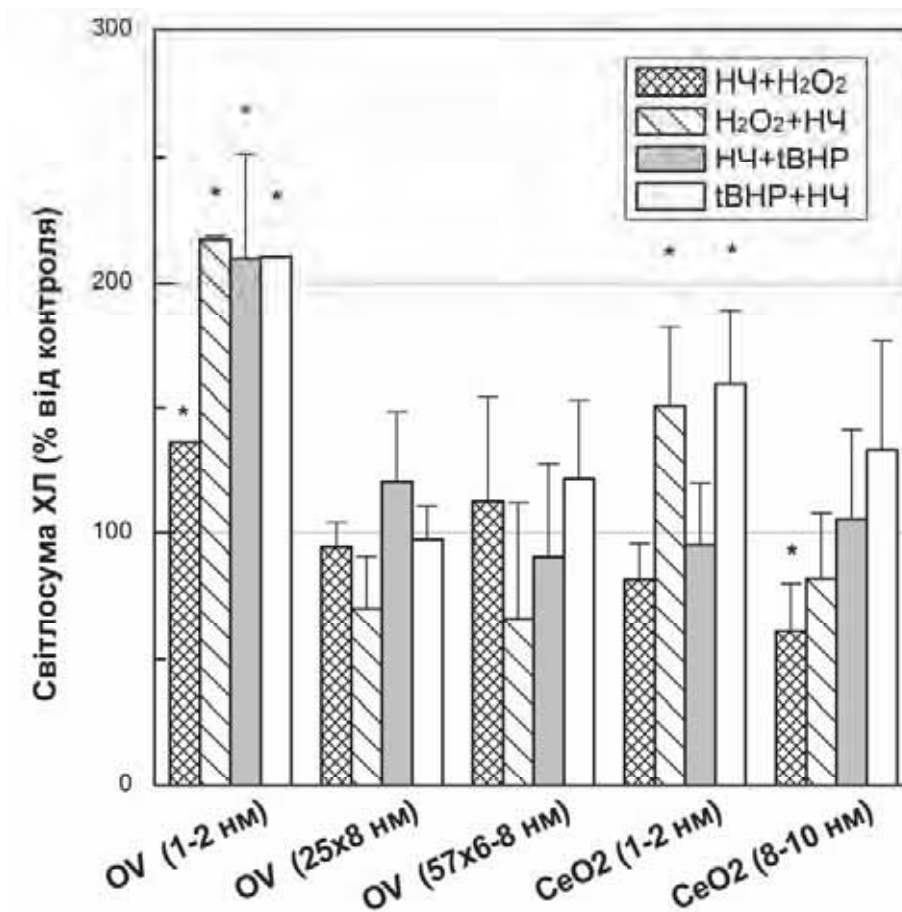


Рис. 3.7. Вплив НЧ на генерацію радикалів в модельній безклітинній системі, яка містить гомогенат клітин печінки, на фоні індукції оксидативного стресу за допомогою 1 мМ H_2O_2 і 50 мкМ t-BHP; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Модифікація досліджуваних НЧ органічним барвником МБ становить інтерес, так як МБ – барвник, який застосовується для ФДТ [179], і в комбінації з НЧ терапевтичний ефект може бути посилений як за рахунок редоксактивності НЧ, так і зниження побічних токсичних ефектів в ході ФДТ.

Дослідження комплексів «НЧ-МБ» проводили в абіотичній (Рис. 3.8) і біотичній (гомогенат клітин печінки) (Рис. 3.9) системах.

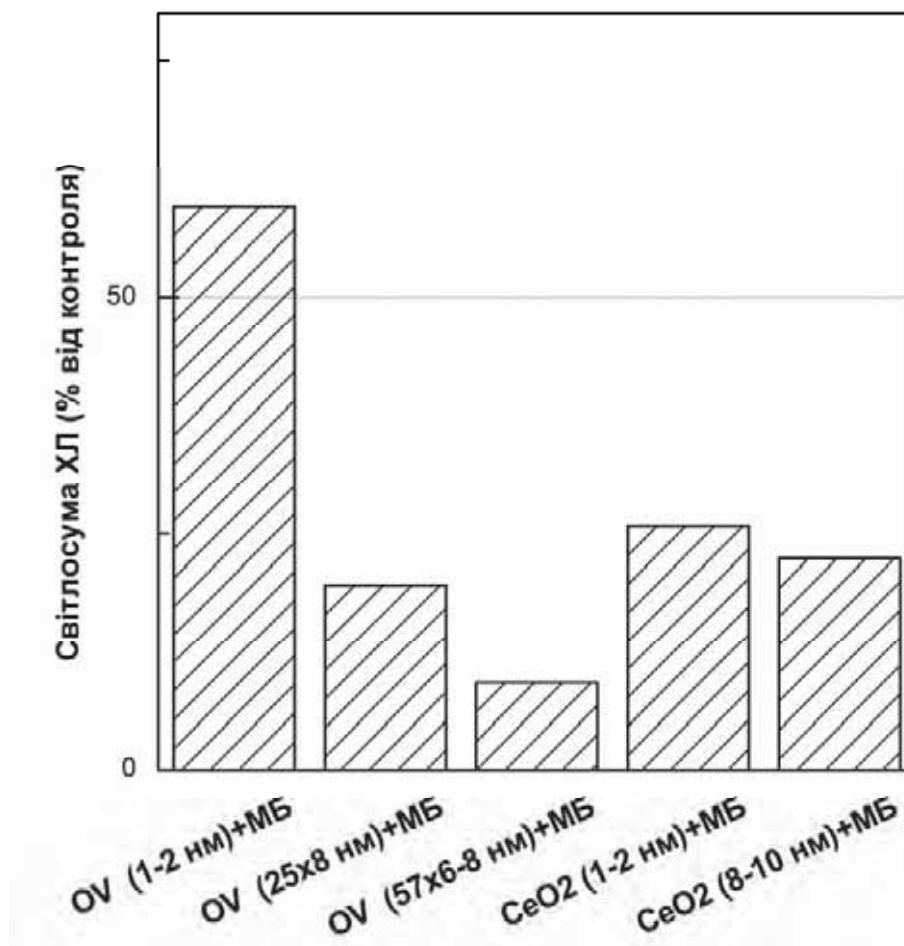


Рис. 3.8. Вплив комплексів «НЧ-МБ» на інтенсивність генерації радикалів в абіотичній системі (показник світлосуми ХЛ);

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Як видно з рисунків, ефекти комплексів «НЧ-МБ» в абіотичній і біотичній системах суттєво розрізняються, так само як це було показано раніше для немодифікованих НЧ. Встановлено, що антирадикальні ефекти всіх типів НЧ в обох системах практично не залежать від наявності органічного компонента в комплексах і визначаються тільки властивостями НЧ. При цьому в даних умовах посилення прооксидантного ефекту НЧ при включенні МБ в наноккомплекс не відбувалося (рис 3.9).

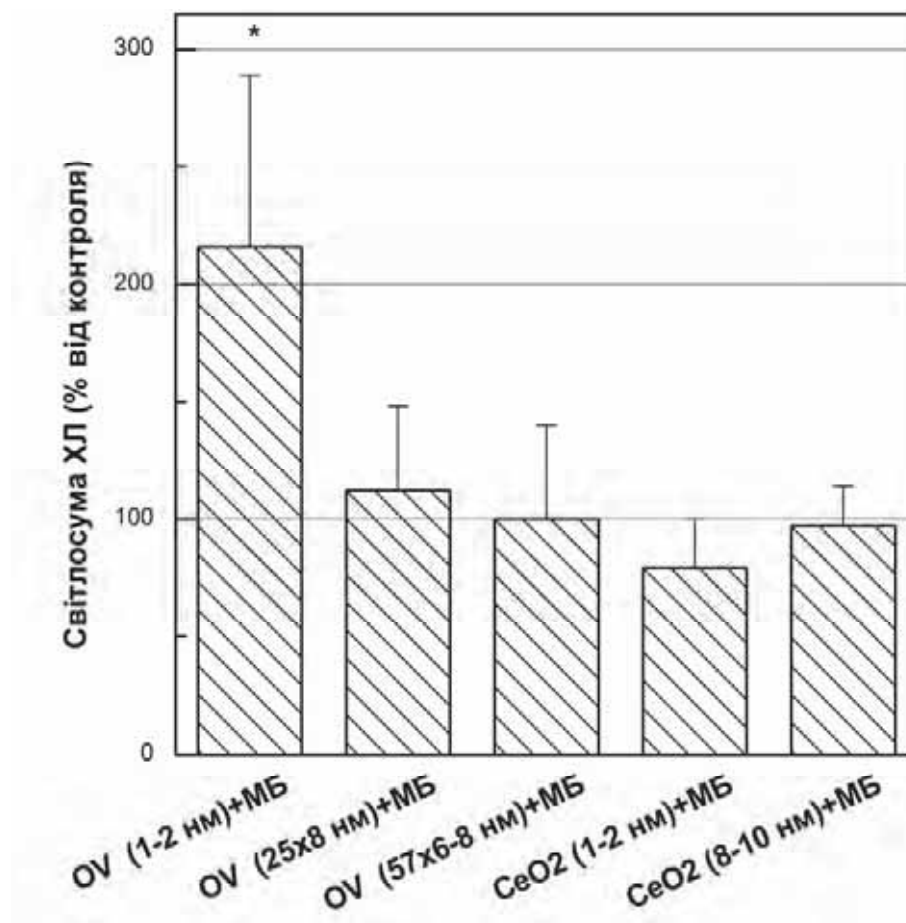


Рис. 3.9. Вплив комплексів «НЧ-МБ» на інтенсивність генерації радикалів в біотичній системі (гомогенат клітин печінки) (показник світлосуми ХЛ); (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

У ФДТ терапевтичний ефект досягається шляхом опромінення об'єктів випромінюванням з певною довжиною хвилі та інтенсивністю, що викликає генерацію вільних радикалів в тканинах. Тому необхідним є як вибір барвника, так і оптимізація умов для посилення прооксидантної дії комплексів барвників з НЧ для ФТД.

Фотодинамічний ефект в біотичній модельній системі (гомогенат клітин печінки) індукували опроміненням гелій-неоновим лазером, $\lambda = 632,8$ нм. Однак в даній системі опромінення лазером не викликало додаткової генерації радикалів у присутності комплексів «НЧ-МБ».

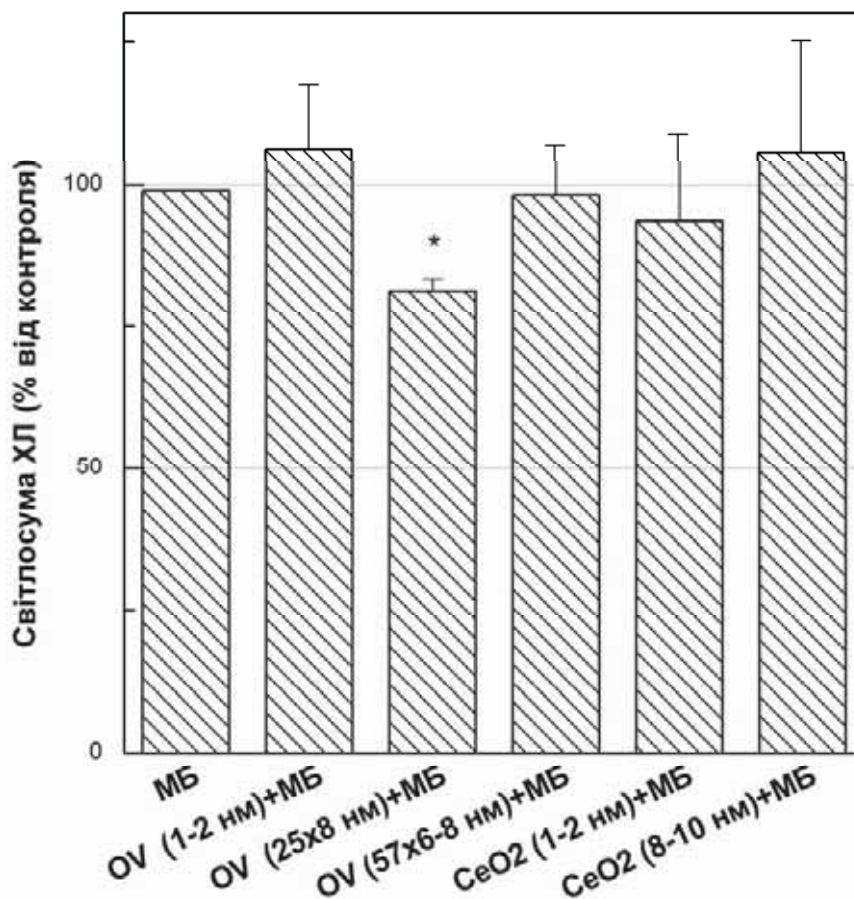


Рис. 3.10. Вплив комплексів «НЧ-МБ» на генерацію вільних радикалів в біотичній модельній системі (гомогенат клітин печінки) при опроміненні гелій-неоновим лазером, $\lambda = 632,8$ нм (показник світлосуми ХЛ); (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Іншим варіантом впливу, що індукує вільно-радикальні процеси, стало опромінення УФ. При впливі УФ опромінювання ефект НЧ з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм можна було охарактеризувати як протекторний. Прооксидантна дія сферичних ортованадатних частинок в даних умовах не змінювалася (Рис. 3.11).

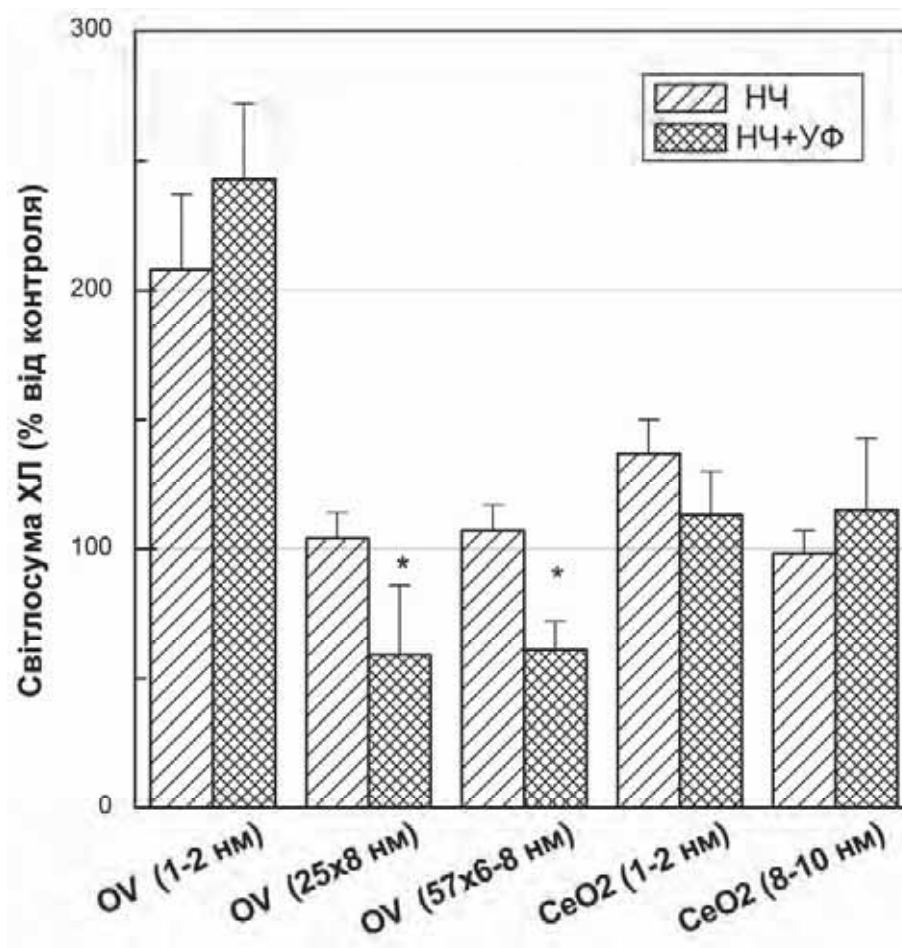


Рис. 3.11. Вплив НЧ на інтенсивність генерації радикалів в абіотичній модельній системі з гомогенатом клітин печінки при опроміненні УФ (показник світлосуми ХЛ);
(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Захисний вплив НЧ з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм при дії УФ опромінювання зберігався і в комплексах «НЧ-МБ», а посилення прооксидантних ефектів не спостерігалось (рис 3.12). Це можна пояснити тим, що інтенсивності опромінювання недостатньо для досягнення фотодинамічного ефекту, а бо ж тим, що у ФДТ стан, у якому знаходиться барвник (мономерна чи димерна форма), дуже важливий для досягнення терапевтичного ефекту, адже мономери чи димери можуть бути залучені до різних видів фотохімічних реакцій, які запускають різні механізми та мають різну ефективність при знищенні клітин [179]. В нашому випадку при створенні комплексу «НЧ-МБ»

частка димерів Н-типу ($\lambda_{\max}=568$ нм) збільшувалася порівняно з часткою мономерів ($\lambda_{\max}=665$ нм).

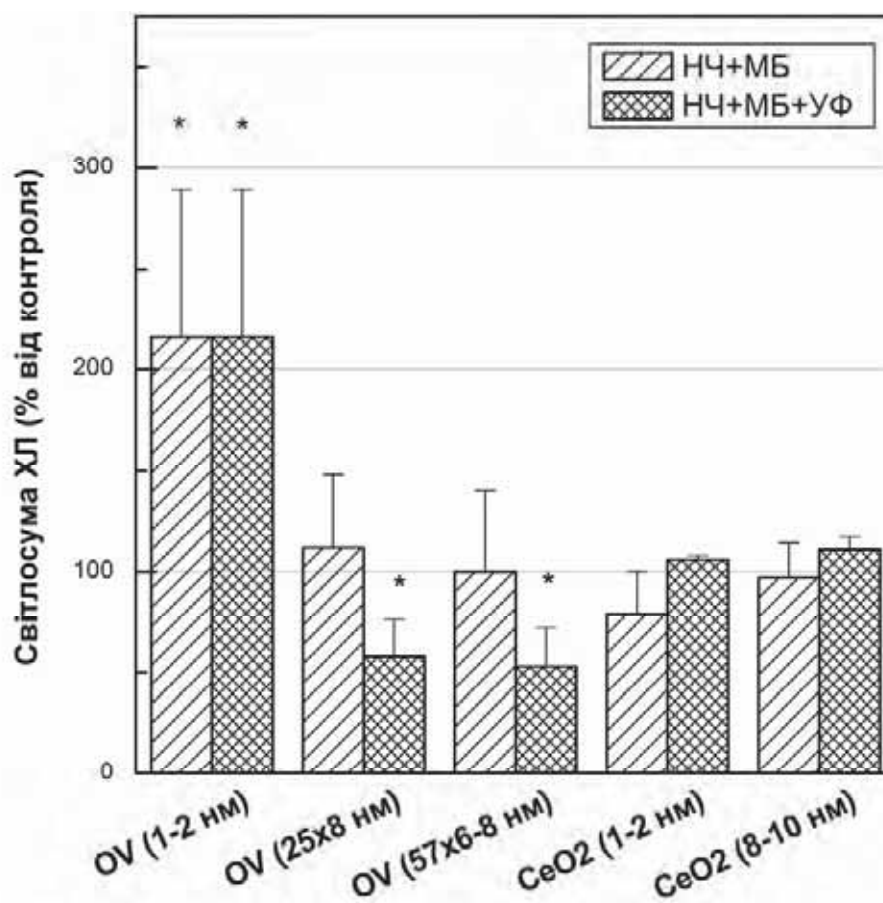


Рис. 3.12. Вплив комплексів «НЧ-МБ» на генерацію вільних радикалів в біотичній модельній системі (гомогенат клітин печінки) при опроміненні УФ (показник світлосуми ХЛ);

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

Таким чином, різні типи НЧ залежно від умов експерименту і вихідного редокс-стану системи можуть проявляти протекторну або прооксидантну дію. Захисну дію НЧ розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм в даних експериментальних умовах можна пояснити тим, що дані частинки виступають акцепторами вільних радикалів, і спостережуваний ефект залежить як від розмірів, так і від форми НЧ, так як малі сферичні частинки, ортованадати і діоксид церію,

не проявили захисних властивостей у всіх досліджуваних моделях або навіть посилювали прооксидантні процеси.

Для захисту від токсичних ефектів НЧ часто використовують модифікацію поверхні тіолами. Оскільки деякі типи НЧ проявляли прооксидантну дію, було досліджено поведінку НЧ в присутності GSH. GSH захищає клітину від токсичних дій ксенобіотиків і в цілому визначає редокс-статус внутрішньоклітинного середовища, а так само є субстратом ряду ферментів, відповідальних за утилізацію АФК в клітині.

Малі НЧ (сферичні ортованадатні і частинки CeO_{2-x} розміром 1-2 нм), які демонструють прооксидантні властивості в біосистемах, що містять клітинний матеріал (підсилюють генерацію радикалів) (рис. 3.3, 3.5), в присутності екзогенного GSH не демонструють прооксидантні ефекти – світлосума спалаху ХЛ знижена (Рис. 3.13).

Цілком можливо, що прооксидантні ефекти даних НЧ можуть бути пов'язані, в першу чергу, зі змінами в співвідношенні GSH/GSSG в результаті прямої взаємодії НЧ з відновленою чи окисленою формою сполуки, або в результаті процесів детоксикації, які каталізуються глутатіон S-трансферазою.

Даний процес відбувається за допомогою транспортування атома сірки в сполуках і формування меркаптидів, меркаптурової кислоти, похідних GSH з речовинами. Цей процес є найбільш активним в печінці і забезпечує нейтралізацію ксенобіотиків.

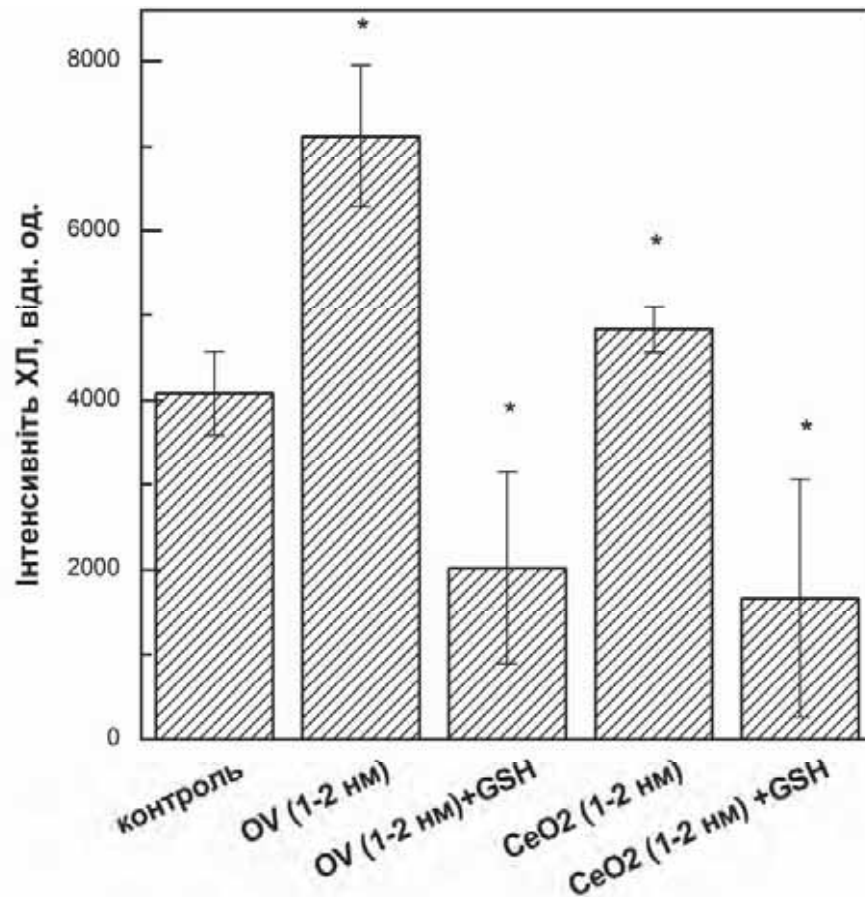


Рис. 3.13. Вплив малих сферичних НЧ і відновленого GSH на інтенсивність генерації радикалів в модельній біотичній системі (гомогенат клітин печінки) (показник інтенсивності ХЛ);
(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Оцінка прямої взаємодії малих ортованадатних НЧ з GSH і GSSG, показала, що пороговою концентрацією обох форм, відновленої та окисленої, що викликає агрегацію частинок в обох випадках при фізіологічних рН (рН 7,4), є 0,5 мМ. Однак при використанні більш низьких концентрацій GSH від 0,1 мМ до 0,4 мМ взаємодія НЧ з GSH відбувалося при кожній із досліджених концентрацій, що супроводжувалося збільшенням радіусу частинок і агрегацією. У той же час, при рН 7,8 жодна з предпорогових концентрацій не викликала агрегацію частинок.

У подальших дослідженнях вивчався характер впливу НЧ на інтенсивність генерації вільних радикалів в біотичній модельній системі в залежності від рН в межах від 6,9 до 7,8.

Як свідчать дані літератури, високий рівень GSH і більш кислі значення рН сприяють зменшенню летальності клітин при впливі хімічних агентів, що обумовлено ефектами протонованої форми GSH. Дані особливості клітинної відповіді при оксидативному стресі оцінювали раніше [180]. Так, було показано, що GSH пригнічує окислення DCFH і 2-дезоксирибози в 4 рази сильніше при рН 6,8, ніж при рН 7,4. Слід зазначити також, що у водному середовищі згідно роботи [181] окислення GSH не спостерігається, принаймні, протягом години, а збільшення частки окисленої форми при переході від кислого до лужного середовища, пов'язане зі зміною концентрації непроторованих сульфгідрильних груп GSH, необхідних для утворення цієї форми.

Дослідження впливу НЧ на інтенсивність генерації радикалів в ізолюованих гепатоцитах в фізіологічному діапазоні рН від 6,9 до 7,8 показало, що збільшення рівня МДА в клітинах після обробки НЧ залежить від рН (Рис. 3.14).

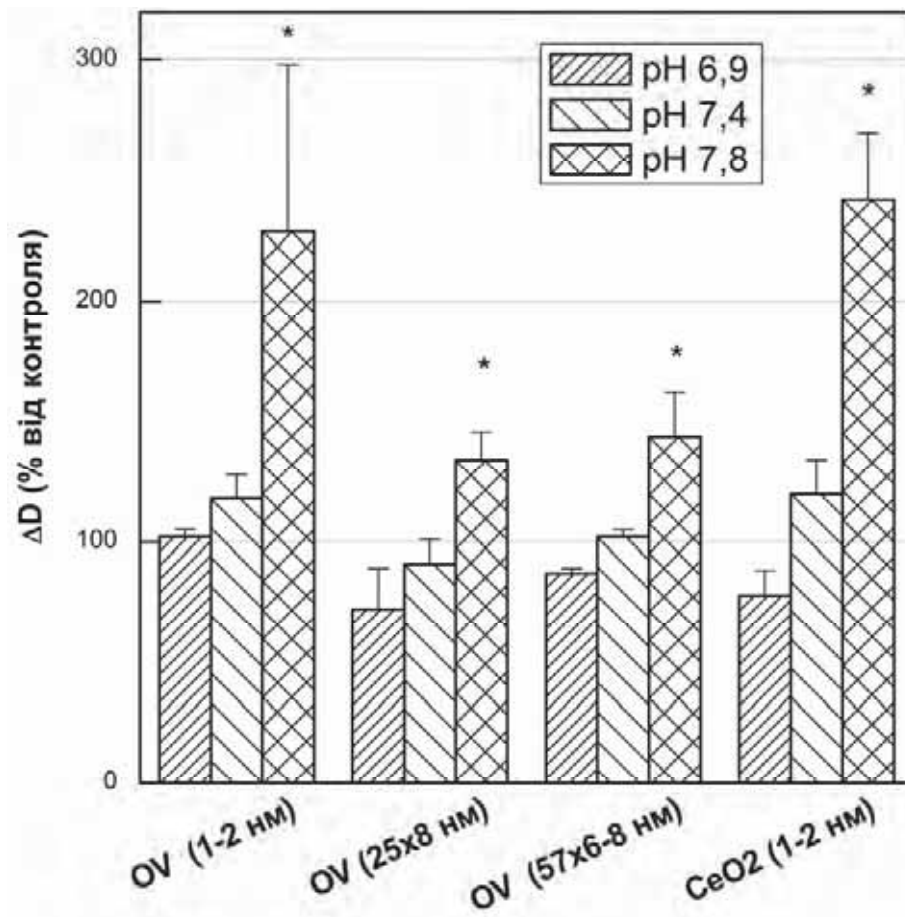


Рис. 3.14. Вплив НЧ на інтенсивність генерації радикалів в ізольованих гепатоцитах за показником накопичення вторинного продукту ПОЛ – МДА при різних значеннях рН;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Таким чином, прояв прооксидантних ефектів НЧ залежить від рН середовища і визначається рівнем GSH в протонованому стані, так як в залежності від рН відбувається зміна редокс-балансу GSH (зміна співвідношення GSH/GSSG в сторону окисленої форми сполуки). Це є причиною більш вираженого прооксидантного впливу НЧ при рН 7,8.

З іншого боку, схильність малих НЧ до агрегації може бути важливим фактором шкідливого впливу НЧ в біологічних системах. В цьому випадку ми припускаємо, що негативний ефект НЧ ($\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ і CeO_{2-x} з розмірами 1-2 нм) можна пояснити зміною агломераційного стану НЧ [182], і

внаслідок цього – механічними пошкодженнями клітинних структур. Відсутність ефекту НЧ в ізольованих гепатоцитах при фізіологічних значеннях рН 7,4 в даних експериментальних умовах може бути пов'язана з більш високим ступенем збереженості систем антиоксидантного захисту в ізольованих клітинах, в порівнянні з іншими моделями в біотичних системах.

Таким чином, представлені дані свідчать, що вплив НЧ на інтенсивність генерації радикалів в модельних системах відрізняється від дії, що спостерігається в біологічних структурах. Критичне значення має розмір НЧ. Токсичні (прооксидантні) ефекти малих НЧ в біосистемах обумовлені, вочевидь, прямою взаємодією з компонентами дихального ланцюга і порушення функції МХ, які є основними генераторами супероксидних радикалів в клітинах.

Взаємодія НЧ з GSH, що спостерігається в модельних системах, може відтворюватися і у внутрішньоклітинних структурах, чим частково можна пояснити порушення окислювального балансу біосистеми. Відсутність прооксидантної дії малих НЧ в присутності екзогенного GSH в безклітинній системі підтверджує це припущення.

При впливі УФ опромінювання НЧ з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм продемонстрували захисні і антирадикальні властивості.

Таким чином, для створення умов контрольованої генерації вільних радикалів з використанням НЧ потрібне проведення комплексного дослідження із застосуванням різних комбінацій і підходів, вибором режимів опромінення, і варіаціями фізико-хімічних властивостей наноматеріалів.

Висновки до розділу 3

В даному розділі було викладено вплив НЧ на основі РЗЕ на інтенсивність генерації вільних радикалів в модельних біосистемах різної складності.

7. Прооксидантні та антиоксидантні ефекти НЧ залежать як від їх фізико-хімічних характеристик, так і від мікрооточення.
8. У біосистемах, що містять МХ, відбувається зміна антиоксидантних ефектів НЧ на прооксидантні, що підтверджує припущення, що МХ є основною мішенню при дії редоксактивних НЧ.
9. Виражені прооксидантні властивості малих НЧ можуть бути пов'язані з високою реакційною здатністю цих частинок, змінами їх агрегатних властивостей, а також залежать від біодоступності НЧ, їх взаємодії з нанорозмірними клітинними структурами, в тому числі компонентами антиоксидантної системи захисту клітини.
10. Особливості впливу НЧ з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм на інтенсивність генерації радикалів в біосистемах визначаються їх фізико-хімічними властивостями, пов'язані зі збільшенням розмірності НЧ та з їх формою, що визначає характер взаємодії з біомолекулами, клітинними структурами, внутрішньоклітинну акумуляцію і розподіл НЧ.
11. Показана ключова роль GSH в регуляції інтенсивності генерації вільних радикалів у присутності НЧ.

Основні наукові результати, описані в розділі 4, опубліковані в [2,6,183-185].

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ТА ПРОЦЕСИ ДИХАННЯ І ОКИСЛЮВАЛЬНОГО ФОСФОРИЛЮВАННЯ. МЕХАНІЗМИ ДІЇ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНІ ПРОЦЕСИ

4.1. Оцінка мітохондріального потенціалу в ізольованих клітинах печінки при впливі наночастинок із застосуванням JC-1

Серед зондів, що дозволяють оцінювати $\Delta\Psi_m$, найбільш систематично вивчені похідні родамину і карбоціаніни. До їх переваг відносяться можливість прижиттєвого спостереження клітин і відсутність негайного токсичного ефекту [186]. У визначенні відмінностей $\Delta\Psi_m$ на рівні поодиноких клітин і ізольованих органел в порівнянні з похідними родамину і карбоціанінів найбільші переваги має ліпофільний катіон JC-1. JC-1 застосовувався при аналізі $\Delta\Psi_m$ в різних клітинах ссавців і людини. Показано, що утворення J-агрегатів відбувається при певних концентраціях барвника, певних значеннях pH внутрішньомітохондріального середовища і певній іонній силі в порівнянні з зовнішньомітохондріальним оточенням. Ліпофільні молекули флуорохрома акумулюються в матриксі МХ з подальшим утворенням J-агрегатів в залежності від $\Delta\Psi_m$. JC-1 дозволяє вивчати локальні зміни $\Delta\Psi_m$, і, на відміну від інших барвників, візуалізувати МХ з низьким і високим потенціалом. Утворення і стабілізація агрегатів барвника в МХ залежить від інтактності МХ і підтримки $\Delta\Psi_m$. Різні агенти і лікарські сполуки руйнують електрохімічний градієнт, і викликають деполяризацію мембрани і втрату жовтогарячої флуоресценції J-агрегатів. Результати, отримані за допомогою JC-1, так само свідчать про значні відмінності $\Delta\Psi_m$ між типами клітин і про існування внутрішньоклітинних

мітохондріальних субпопуляцій з різним потенціалом, і навіть вказують на його флуктуації в межах хондріома однієї клітини [187,188].

При оцінці трансмембранного потенціалу МХ різних типів клітин за допомогою JC-1 найбільш часто застосовують показники інтенсивності флуоресценції мономерів і агрегатів, а також їх співвідношення. Ряд авторів вважають, що найбільш інформативним критерієм є інтенсивність флуоресценції агрегатів [189]. Приймаючи до уваги це твердження, а також ґрунтуючись на результатах власних досліджень, даний параметр був обраний для оцінки змін $\Delta\Psi_m$ в інтактних клітинах і на тлі впливів, які модулюють оксидативний стрес, при дослідженні впливу НЧ і тіолових сполук на потенціал МХ.

Динаміка накопичення агрегатів зонда JC-1 в ізольованих гепатоцитах представляє собою криву з виходом на плато при врівноваженні системи до 60 хв. інкубації клітин у присутності барвника. Беручи до уваги отримані результати, подальші експерименти проводили при забарвленні клітин не менше години (Рис 4.1).

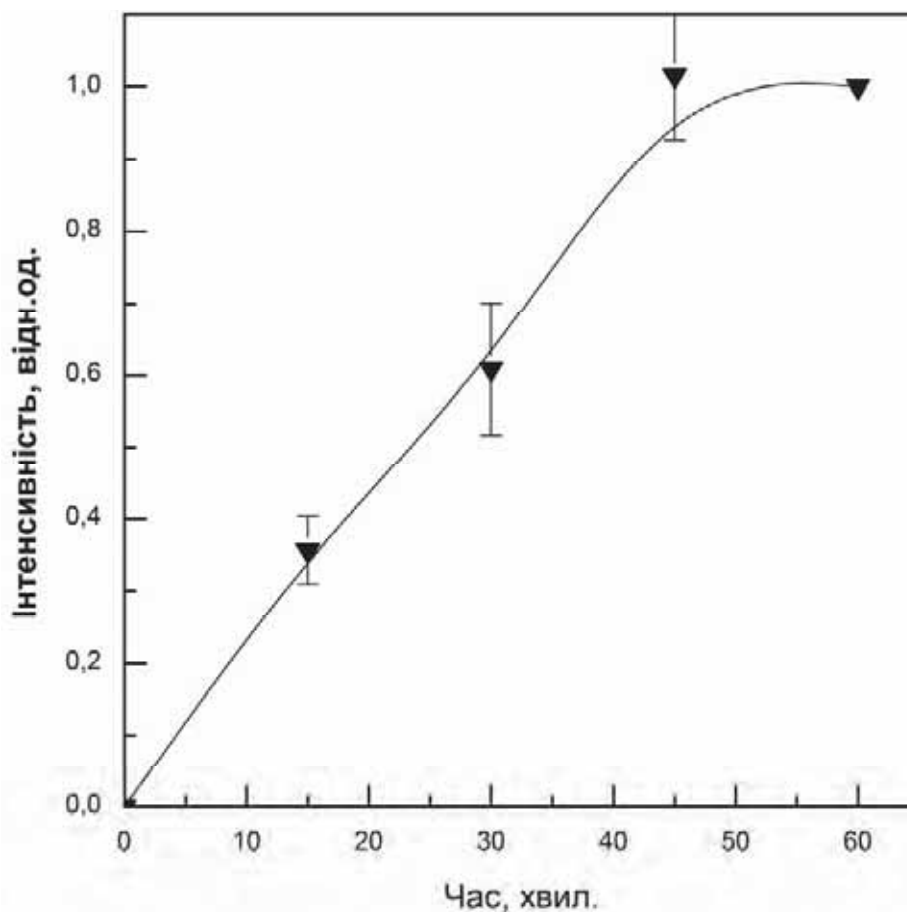


Рис. 4.1. Динаміка накопичення агрегатів зонду JC-1 мітохондріями ізолюваних клітин печінки щурів.

За допомогою мікроспектрофлуориметрії були охарактеризовані спектрально-люмінесцентні властивості зонда JC-1 при його акумуляції в клітинах (Рис. 4.2, крива № 1). Як показав флуоресцентний аналіз поодиноких клітин, в присутності протонофора FCCP (1 мкМ) відбувається падіння флуоресценції агрегатної форми барвника і зникнення відповідного піку в спектрі флуоресценції з максимумом $\lambda=590$ нм (Рис. 4.2, крива № 2, Рис. 4.3), що підтверджує чутливість даного параметра до змін мітохондріального трансмембранного потенціалу.

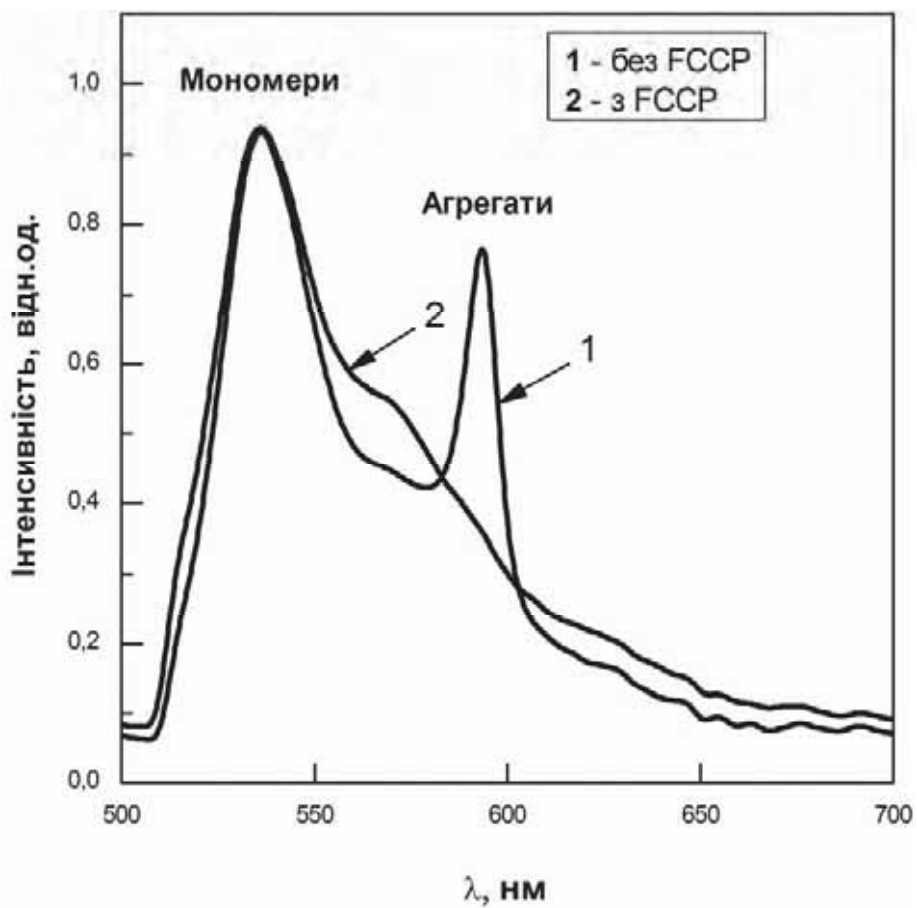


Рис. 4.2. 1 – спектр флуоресценції мітохондріального зонда JC-1 в поодиноких гепатоцитах; 2 – вплив протонатора FCCP (1 мкМ) на спектр флуоресценції зонда JC-1 в поодиноких гепатоцитах $\lambda_{\text{збудження}} = 450\text{-}490$ нм.

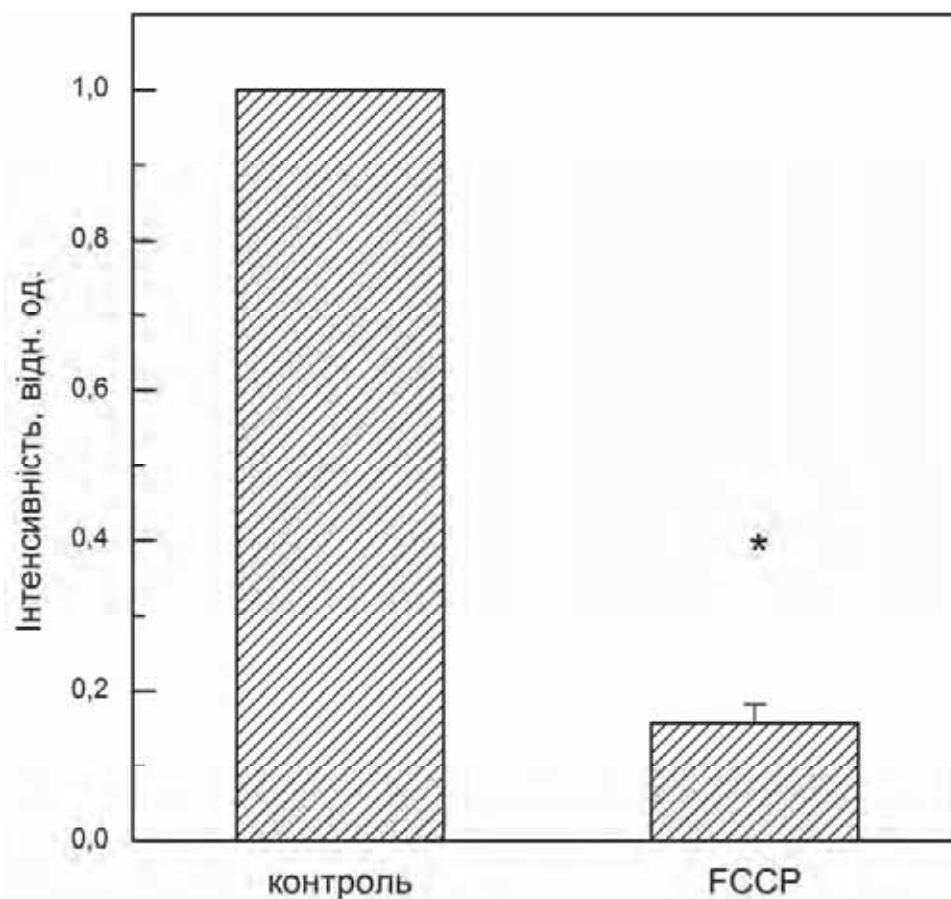


Рис. 4.3. Вплив протонатора FCCP на інтенсивність флуоресценції J-агрегатів зонда JC-1 в мітохондріях гепатоцитів щурів;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Мікрофлуориметрія також дозволяє оцінювати профіль інтенсивності люмінесценції агрегатів і мономерів в окремій клітині. На рисунку 4.4 представлені дані, що відображають розподіл інтенсивності флуоресценції по перетину клітини. Периферійний розподіл агрегатів зонда добре узгоджується з даними літератури про локалізацію МХ з високим потенціалом [190].

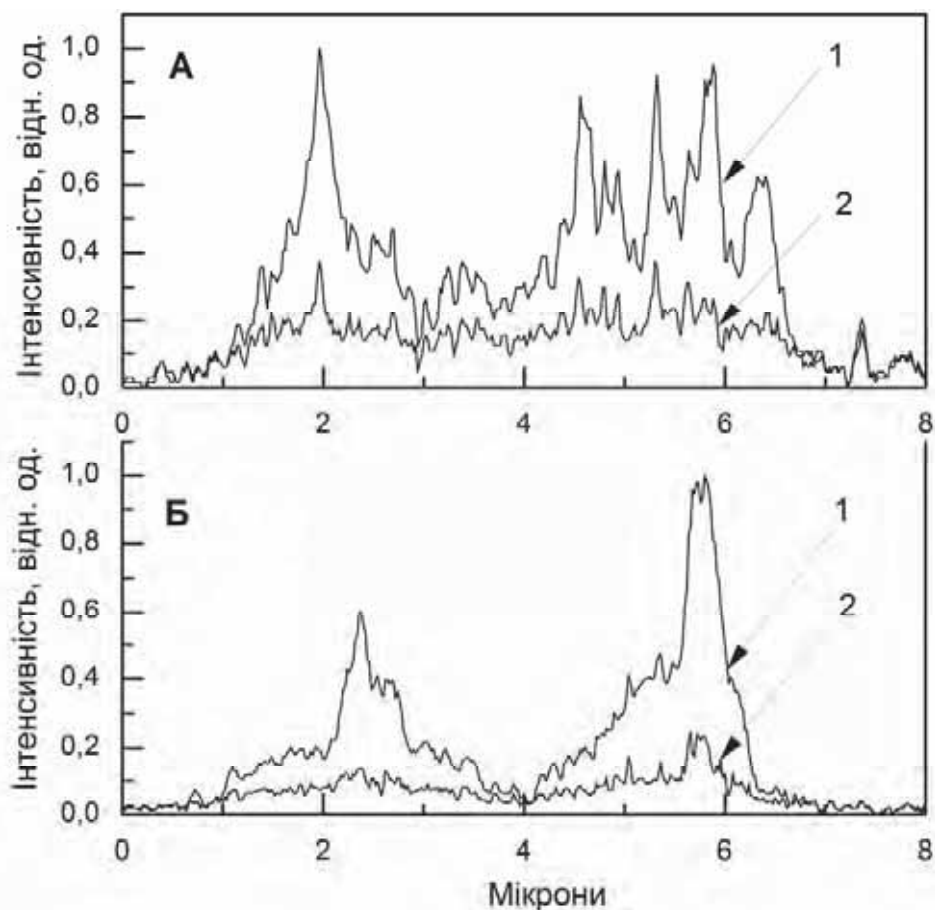


Рис. 4.4. Флуоресцентні профілі двох (А і Б) поодиноких гепатоцитів, забарвлених JC-1. Розподіл інтенсивності флуоресценції агрегатів (1) і мономерів (2) барвника вздовж центральної ділянки клітин.

За деякими даними літератури, токсичний вплив НЧ на МХ обумовлений розвитком оксидативного стресу [42,191].

Органічний і неорганічний пероксиди (50 мкМ t-BHP і 1 мМ H_2O_2) були використані для моделювання оксидативного стресу в ізольованих гепатоцитах і оцінки ролі оксидативного пошкодження в механізмі індукованих змін $\Delta\Psi_m$ (рис. 4.5). Ступінь викликаних окислювачами ушкоджень мітохондріальної функції і здатність тіолових сполук (2 мМ DTT і 2 мМ GSH) запобігати дисфункції МХ були оцінені з використанням кількісної мікрофлуориметрії за інтенсивністю флуоресценції J-агрегатів.

1мМ H_2O_2 в клітинному середовищі інкубації викликає оксидативний стрес, і, як наслідок, зниження флуоресценції агрегатів барвника. Здатність H_2O_2

індукувати летальні клітинні пошкодження і порушення функціонування мембранного транспорту в 100 разів нижче, ніж у t-BHP. Як видно з рис. 4.5, t-BHP викликає значне падіння $\Delta\Psi_m$, вочевидь, внаслідок викликаного оксидативного стресу.

Виявлено, що використання GSH забезпечує більш ефективний, в порівнянні з ДТТ, захист MX від прооксидантного впливу t-BHP (рис. 4.5).

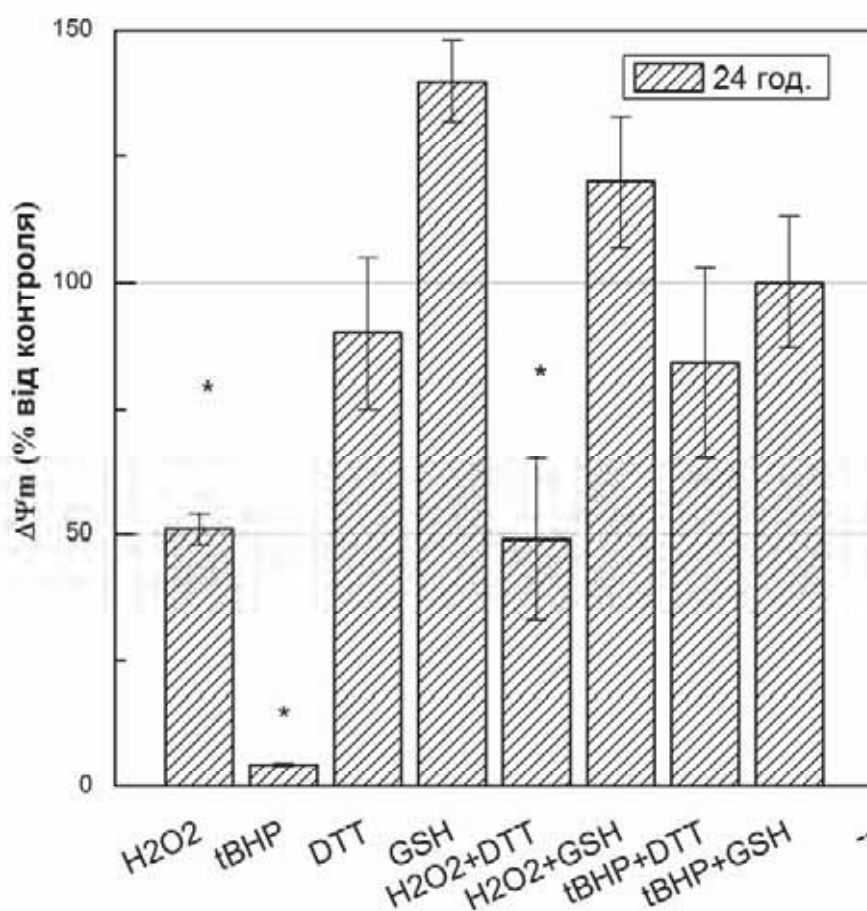


Рис. 4.5. Зміни $\Delta\Psi_m$ в поодиноких гепатоцитах, викликані індукторами оксидативного стресу – 1 мМ H₂O₂ і 50 мкМ t-BHP, і захисна дія тіолових сполук – 2 мМ ДТТ і 2 мМ GSH; час експозиції – 24 год.

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Отримані результати показують високу чутливість та інформативність даного підходу при реєстрації змін $\Delta\Psi_m$, викликаних токсичними агентами в поодиноких клітинах.

Щоб дослідити безпосередню взаємодію НЧ з молекулами JC-1 і виключити ймовірність негативного впливу НЧ на формування J-агрегатів, ми проаналізували спектри поглинання барвника в присутності частинок. Було виявлено, що НЧ є нейтральними щодо агрегатів JC-1, про що свідчить стабільність спектральних характеристик зонда незалежно від наявності всіх трьох типів НЧ ортованадатів в досліджуваній системі (Рис. 4.6).

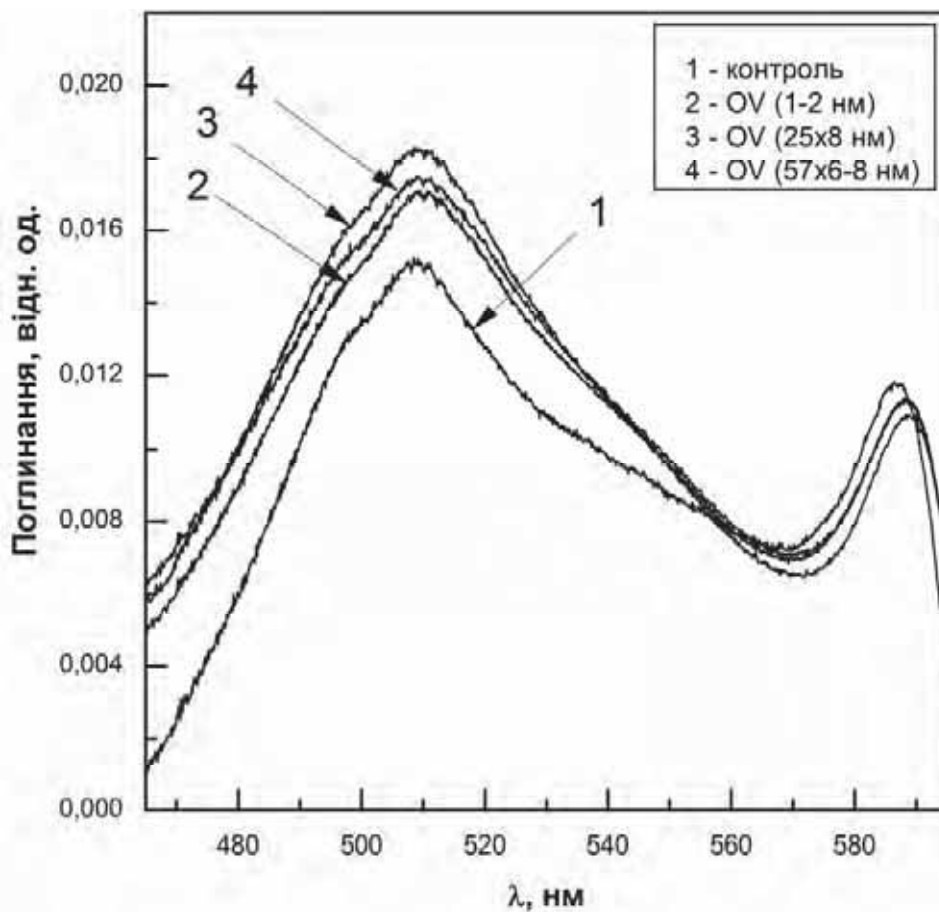


Рис. 4.6. Спектри поглинання JC-1 ($C=10^{-6}$ М) в присутності або у відсутності НЧ ортованадатів РЗЕ ($C=0,05$ г/л).

Таким чином, використання JC-1 дозволяє оцінювати вплив НЧ на функціональний стан МХ.

На сьогоднішній день механізми проникнення НЧ в клітини є предметом широкої дискусії. Оптимальним для активації процесів ендоцитозу вважається розмір НЧ 15-20 нм. Вважається, що частинки меншого розміру можуть проникати в клітини за механізмом адсорбції-дифузії.

За допомогою мікрофлуориметричного підходу з використанням зонда JC-1, спостерігаючи за змінами трансмембранного потенціалу МХ, і використовуючи нокодазол і цитохолазін Д – сполуки, які блокують ендоцитоз, було показано, що малі сферичні ортованадатні НЧ здатні безпосередньо проникати в клітини без участі механізмів ендоцитозу і пригнічувати функцію МХ (спостерігається зниження флуоресценції агрегатів зонда під впливом НЧ в порівнянні з контролем), тоді як надходження інших ортованадатних НЧ розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм відбувається за ендоцитозним механізмом (падіння мітохондріального потенціалу при дії НЧ і інгібіторів ендоцитозу не відбувається). При цьому самі інгібітори не чинили впливу на мітохондріальний потенціал (Рис. 4.7).

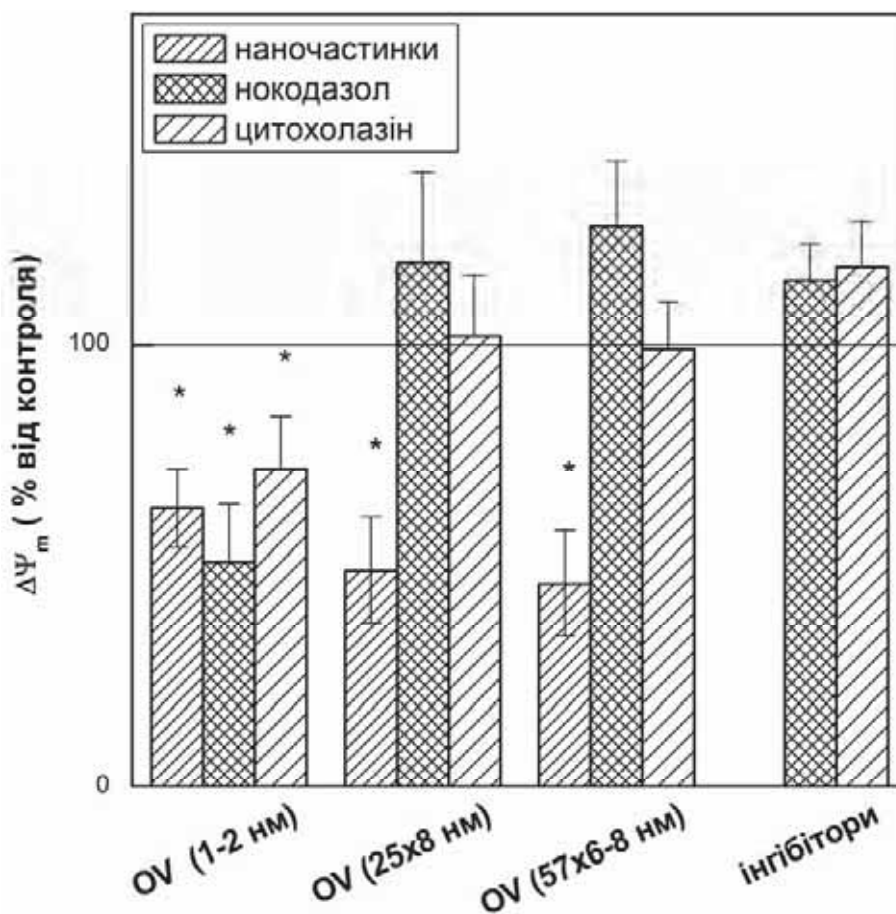


Рис. 4.7. Оцінка механізмів проникнення НЧ різних розмірів в клітини: зміни $\Delta\Psi_m$ при пригніченні ендоцитозу інгібіторами (нокодазол, $C = 10$ мкМ, цитохалазін Д, $C = 10$ мкМ) під впливом НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Швидкість проникнення малих ортованадатних НЧ в клітини пояснює їх здатність порушувати мітохондріальну функцію вже з перших годин впливу на ізолювані гепатоцити. Як видно на рисунку 4.8, малі (1-2 нм) ортованадатні частинки вже через годину інкубації викликають падіння $\Delta\Psi_m$. До 3 год. спостерігається відновлення $\Delta\Psi_m$ майже до контрольних значень, що може бути обумовлено активацією захисних систем клітини: відомо, що при більш низькому ступені оксидативного стресу захисна система активує відновлення клітинного редокс-гомеостазу [192]. Розвиток реакції, що спостерігається в наших експериментах, може бути пов'язаний з активацією

процесів адаптації при впливі малих сферичних ортованадатних НЧ. Але через 24 год. спостерігається значне падіння флуоресценції J-агрегатів, що свідчить про зниження енергізації мембрани МХ, наслідком чого може бути аномальна продукція АФК і розвиток оксидативного стресу в клітинах. Пригнічення мітохондріальної функції під впливом НЧ розмірами 25×8 і 57×6-8 нм спостерігалось тільки на 3 год експерименту, вочевидь, за рахунок більш повільного надходження в клітини за шляхом ендоцитозу. Стимуляція на початковому етапі мітохондріальних процесів НЧ CeO_{2-x} обох типів, в разі малих частинок згодом також змінювалася падінням $\Delta\Psi_m$, але на відміну від всіх типів ортованадатних НЧ, значно менш вираженим (рис. 4.8).

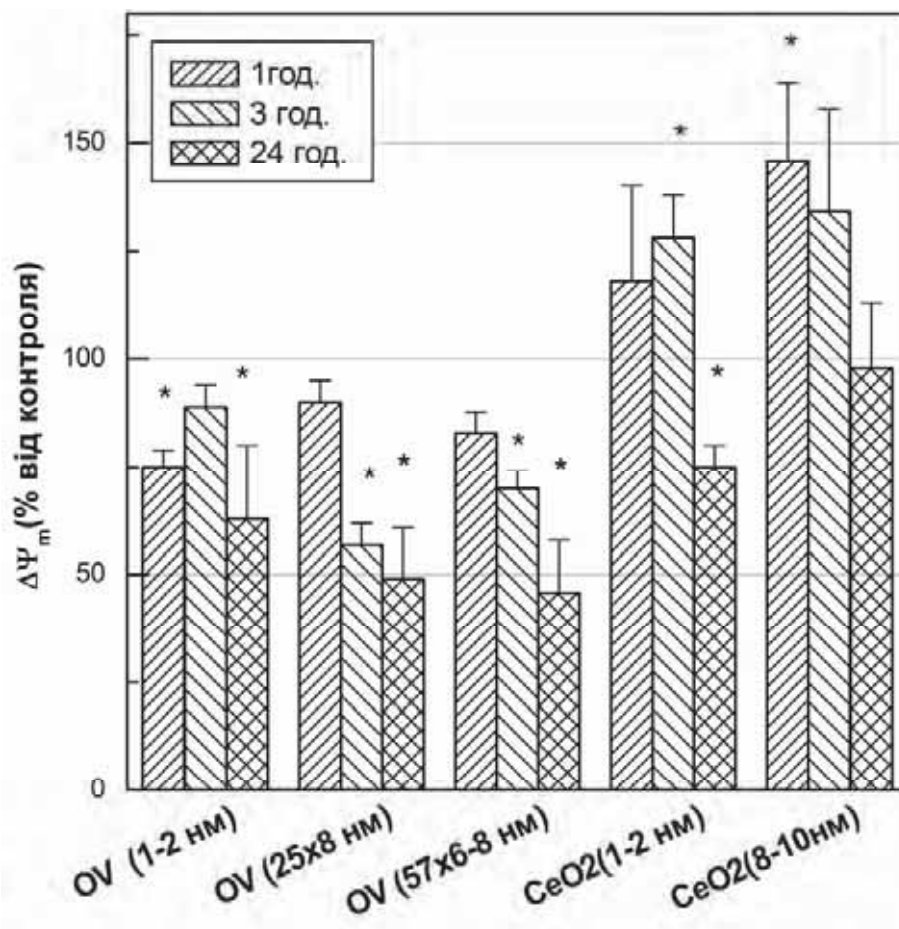


Рис. 4.8. Оцінка мітохондріального потенціалу гепатоцитів щурів при впливі НЧ з допомогою зонда JC-1 в динаміці;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Зростання $\Delta\Psi_m$ на початковому етапі впливу НЧ CeO_{2-x} може бути обумовлено дією стабілізатора НЧ – цитрату, який є субстратом мітохондріального дихання. Ймовірно, збільшення його локальної концентрації при надходженні спільно з НЧ до МХ призводить до спостереженого ефекту.

Дані, отримані за допомогою флуоресцентного аналізу, корелюють з результатами МТТ-тесту (рис. 4.9): після трьохгодинної інкубації гепатоцитів з НЧ інтегральна активність мітохондріальних дегідрогеназ збільшилася ($140 \pm 15\%$ по відношенню до відповідного контролю) під дією тільки сферичних ортованадатних частинок. Це дозволяє зробити припущення, що відбувається розвиток деяких компенсаційних процесів у відповідь на генерацію АФК і зниження $\Delta\Psi_m$. Однак, такі ефекти мали лише тимчасовий характер (рис. 4.9).

Отримані дані свідчать про те, що ресурсів ендогенної системи захисту недостатньо для запобігання мітохондріальній дисфункції, яку викликають НЧ. Однак НЧ можуть впливати на МХ не тільки через утворення АФК, а й безпосередньо взаємодіяти з мітохондріальними структурами, що характерно, зокрема, для малих НЧ [193]. Можна зробити наступний висновок, що вплив НЧ на стан МХ реалізується як через прооксидантну дію, так і шляхом прямої взаємодії з мітохондріальними білками і ферментами, що також є причиною порушення мітохондріальних процесів, необхідних для нормального функціонування МХ.

Необхідно відзначити, що нещодавні публікації показали, що розмір є критичним параметром, пов'язаним з токсичністю НЧ, і деякі дослідники показують, що не тільки розмір, але і форма частинок може мати велике значення при клітинній відповіді на вплив НЧ [194].

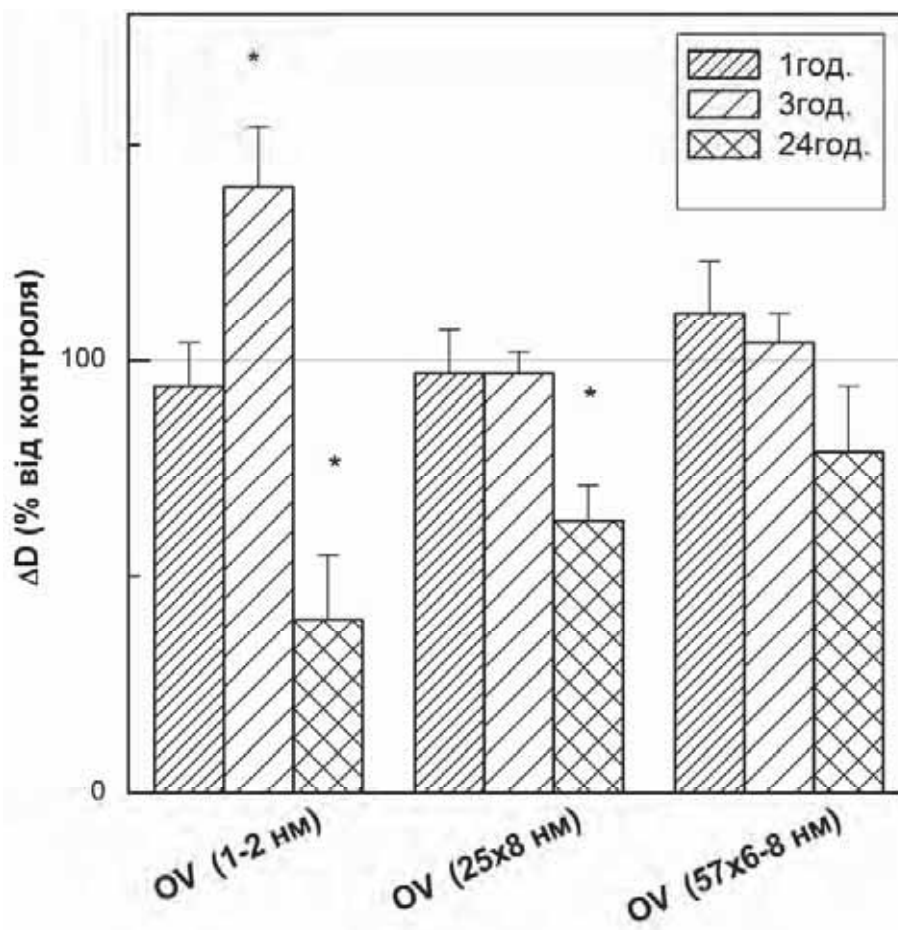


Рис. 4.9. Залежність виживаності клітин від часу експозиції з НЧ (МТТ-тест); (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

4.2. Вивчення дії наночастинок на біоенергетичні процеси в ізольованих мітохондріях

Для більш детального вивчення механізму дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ досліджували їх вплив безпосередньо на процеси дихання і окислювального фосфорилування ізольованих МХ.

Відомо, що концентрація продуктів вільнорадикального пошкодження біомолекул в тканинах значною мірою визначається швидкістю генерації АФК мембранозв'язаними і розчинними ферментними системами. При цьому вважається, що основна кількість АФК утворюється в редокс-ланцюгах МХ [195]. Згідно з даними [196], швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$, яка відбувається при

випадкових збоях в роботі електронтранспортних ланцюгів, прямо пропорційна швидкості споживання кисню при диханні: $I = q \times V$, де q – коефіцієнт пропорційності. Теоретично, при надійній роботі дихального ланцюга МХ, q може наблизитися до нуля, але практично – будь-яка причина, що порушує нормальні умови його роботи (часткова або повна гіпоксія, стан забезпеченості субстратами дихання, температура, дія ксенобіотиків, НЧ та ін.), значно збільшує цей коефіцієнт, і, як наслідок, призводить до зростання потоку O_2^{\bullet} в МХ и в клітині в цілому [196].

Для оцінки швидкості дихання МХ використовували субстрати глютамат з малатом. МХ інкубували з НЧ 20 хв. при 25°C. Необхідно відзначити, що ніяких відмінностей у функціональному стані МХ між контрольними зразками (без НЧ), що перебували при 25°C 20 хв. і контрольними зразками також без НЧ, які перебували на льоду протягом усього експерименту, не спостерігалось.

Визначали наступні показники: швидкість субстратного дихання в стані V_2 , яке представляє собою швидкість споживання кисню МХ в початковому стані; швидкість фосфорилуючого дихання в стані V_3 – це активний фосфорилуючий стан, який спостерігається в присутності АДФ, коли дихання МХ різко активується; дихальний контроль (ДК), який являє собою співвідношення V_2 і V_3 і характеризує ступінь сполучення процесів дихання і окисного фосфорилування, і рівень АТФ в МХ після впливу НЧ.

Дані, які наведені на рисунках 4.10 і 4.11, свідчать, що інтенсивність дихання і окислювального фосфорилування в присутності НАД-залежних субстратів змінюються в залежності від розмірів і матеріалу досліджуваних НЧ. Необхідно відзначити, що при використанні сукцината і ротенона для дослідження впливу малих ортованадатних НЧ на ізольовані МХ, процеси дихання і окислювального фосфорилування не реєструвалися, що може свідчити про повне придушення активності комплексу III під впливом частинок цього типу.

Як видно на рисунку 4.10, найбільший інгібуючий ефект мають малі (1-2 нм) ортованадатні частинки, знижуючи V_2 в 2,5 рази, а V_3 – майже в 3,5 рази в порівнянні з контролем (рис. 4.11). Частинки з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм не чинили істотного впливу на V_2 (рис. 4.10) і незначно знижували V_3 , малий діоксид церію знижував тільки V_3 так само невиразно (рис. 4.11).

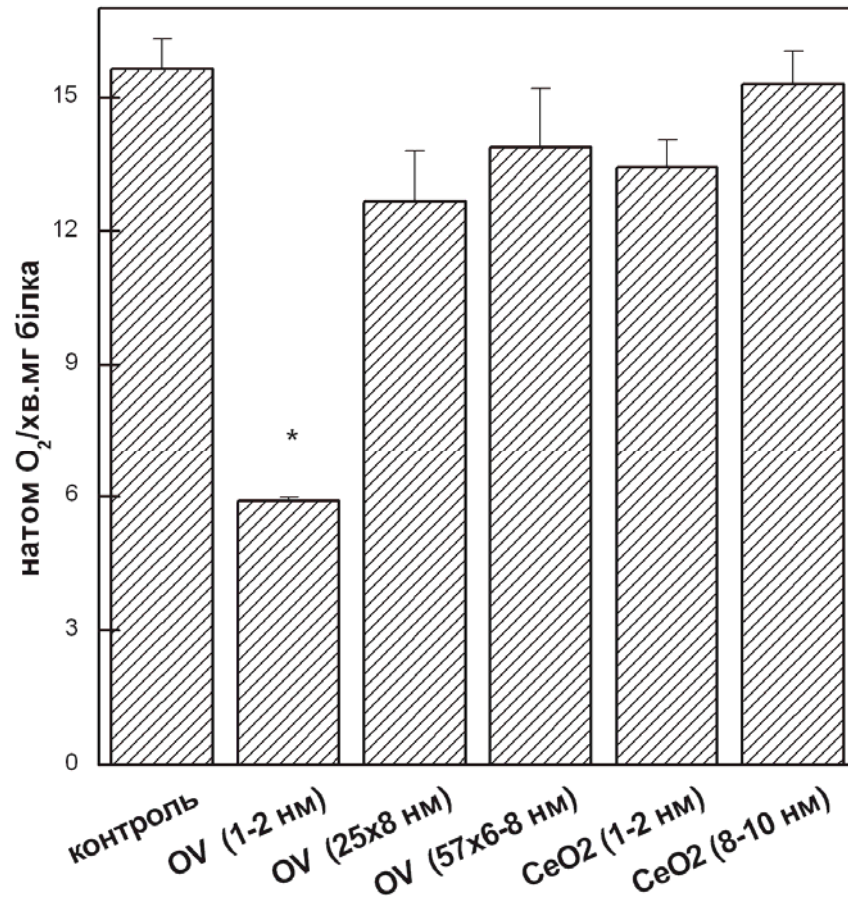


Рис. 4.10. Вплив НЧ на швидкість субстратного дихання в стані V_2 ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

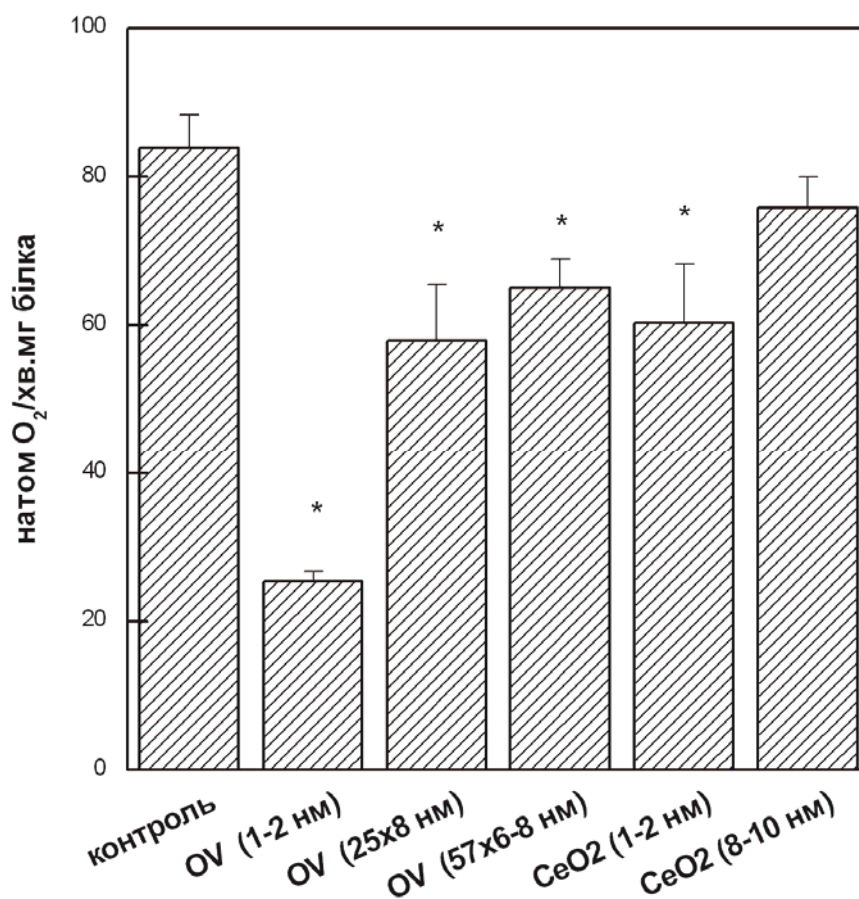


Рис. 4.11. Вплив НЧ на швидкість фосфорилюючого дихання в стані V_3 ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Як видно на рисунку 4.12, малі НЧ ортованадатів істотного впливу на ДК не чинили, що пояснюється однаковим за ступенем пригніченням швидкостей V_2 і V_3 . Частинки з розмірами 25×8 і $57 \times 6-8$ нм також не чинили істотного впливу на ДК. CeO_{2-x} розміром 8-10 нм також не впливає на даний показник (рис.4.12).

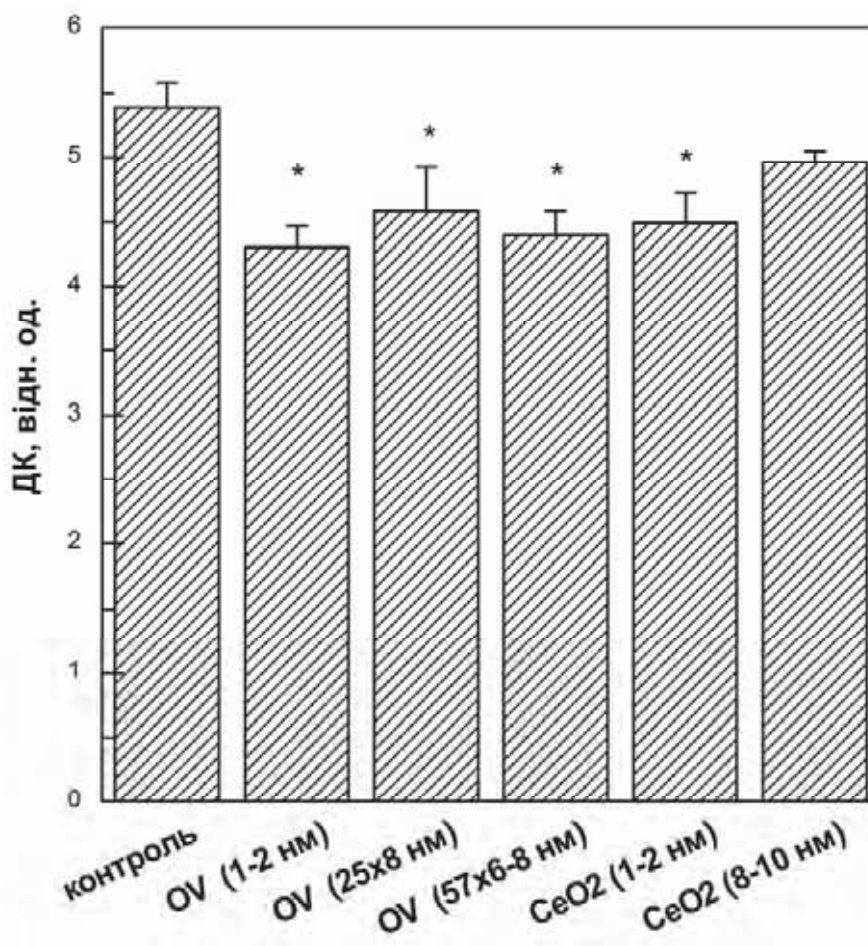


Рис. 4.12. Вплив НЧ на дихальний контроль;
 (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Хоча отримані дані свідчать про те, що НЧ суттєво не впливають на ступінь сполучення процесів дихання і окисного фосфорилування (відсутній істотний вплив на ДК), при впливі всіх типів НЧ ортованадатів і малих частинок CeO_{2-x} рівень АТФ в МХ знижений, причому найбільше це зниження виражено у разі малих сферичних частинок – ортованадатів і CeO_{2-x} (Рис. 4.13).

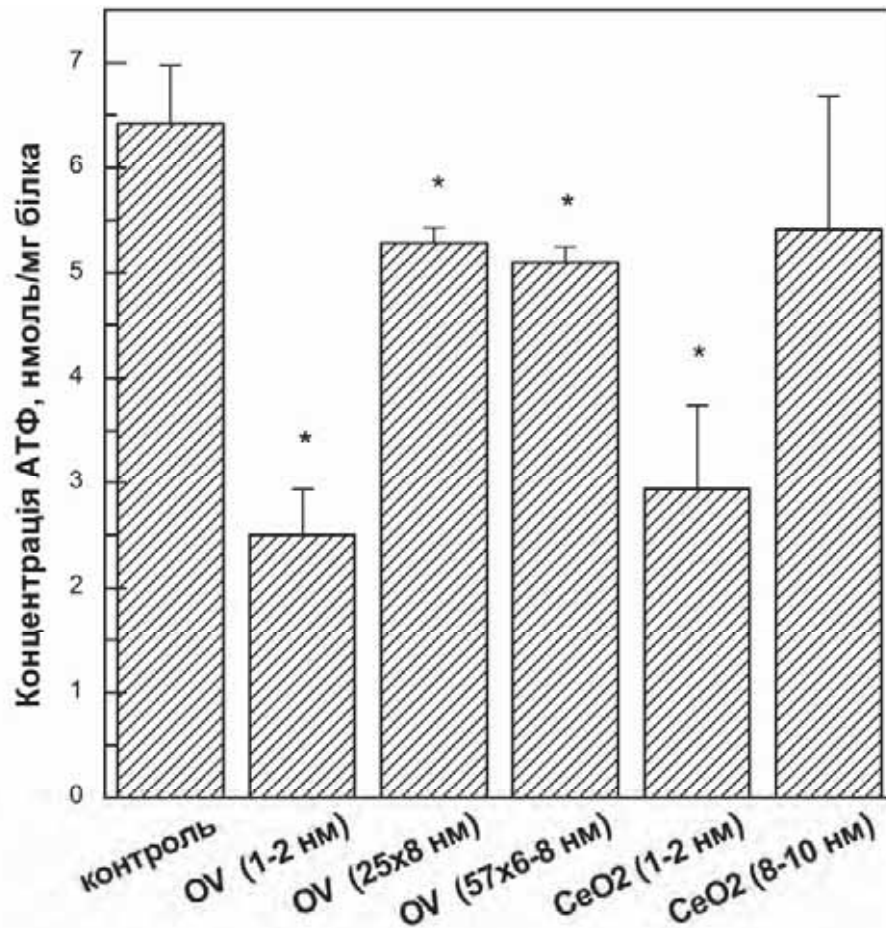


Рис. 4.12. Рівень АТФ в мітохондріях після інкубації з НЧ;
(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Ефекти, що спостерігаються, можуть бути пов'язані з редоксактивністю НЧ і їх здатністю безпосередньо втручатися в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів вільних радикалів. Ванадат – інгібітор дихального ланцюга МХ, що окисляє глутамат і сукцинат, а також може бути конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази і мітохондріальних АТФаз [49]. Подібність іонів фосфату і ванадату може бути причиною порушення синтезу АТФ [197]. Для малих сферичних частинок обох типів не можна виключати також можливості безпосереднього проникнення в МХ, механічного пошкодження мембран внаслідок їх малих розмірів і високої схильності до агрегації при накопиченні у внутрішньоклітинних структурах. Крім того АТФ може витрачатися для підтримки $\Delta\Psi_m$.

Те, що майже всі НЧ, за винятком CeO_{2-x} розміром 8-10 нм, пригнічують мітохондріальне дихання, підтверджує дані, отримані за допомогою зонда JC-1 і свідчить про те, що біоенергетичні процеси в МХ є мішенню при дії досліджуваних НЧ.

4.3. Можливі механізми дії наночастинок на процеси в мітохондріях

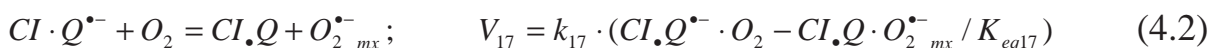
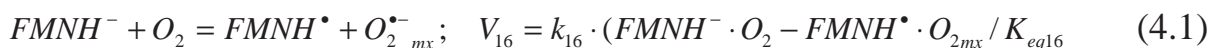
Таким чином, показано, що дія НЧ, за винятком діоксиду церію розміром 8-10 нм, на біоенергетичні процеси в МХ проявляється в придушенні і роз'єднанні процесів дихання і фосфорилування, падінні рівня АТФ і $\Delta\Psi_m$ і пов'язана з додатковою активацією утворення АФК.

Дія НЧ може реалізовуватися за участю декількох механізмів:

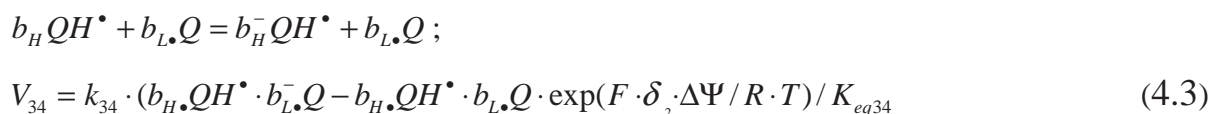
Перший механізм – інгібування транспорту електронів НЧ.

Вбудова НЧ в мембрани, безпосередня взаємодія з переносниками електронів може призводити до пригнічення транспорту електронів і активації утворення супероксида і перекису водню. Молекулярний механізм даного процесу можна пояснити із застосуванням діючої кінетичної моделі, запропонованої Маркевичем і Хоеком [129], яка описує продукцію супероксидного радикала в електрон-транспортному ланцюзі. Дана модель описує процеси перенесення електронів в комплексах I і III, збільшення генерації супероксидного радикала при пригніченні цих комплексів інгібіторами, враховує зміни рН і мітохондріального потенціалу в генерації АФК.

У даній моделі за допомогою низки реакцій описується перенесення електронів від повністю відновленого флавіна на кисень (реакція 4.1) з утворенням супероксида, так само передбачається, що семіхінон в комплексі з CI.Q (реакція 4.2) є джерелом генерації супероксиду в комплексі I. За аналогією з даною моделлю швидкість генерації супероксиду під впливом НЧ насамперед може бути пов'язана зі зміною констант і швидкості даних реакцій.



Експериментальні та розрахункові результати моделювання показують, що зворотні реакції в Q_i сайті можуть відігравати важливу роль у формуванні АФК при інгібуванні комплексу III антимиціном А (реакція 4.3.).



Дана реакція обчислювальної моделі [129] передбачає, що АА повністю пригнічує перенесення електронів від цитохрому b_L к b_H , тобто в даному випадку константа $v_{34}=0$. Необхідно відзначити, що умови, при яких $v_{34}=0$, по суті є результатом придушення реакцій перенесення електронів від семіхінонів до цитохрому b_L , і від цитохрома b_L к b_H в Q_0 сайті. Інгібування Q_i сайту так само може бути результатом порушення перенесення електронів в Q_0 сайті в результаті порушення Q-циклу. Такий же механізм можливий і при дії НЧ, що підтверджується результатами цього дослідження про придушення ФАД-залежного дихання ізольованих МХ в присутності малих ортованадатних НЧ.

Однак в ряді робіт відзначається, що для значного збільшення виробництва АФК, необхідно більш ніж 70% інгібування комплексу III. На противагу цьому, незначного пригнічення комплексу I достатньо для збільшення продукції АФК. Дані особливості можуть мати значення також в індукції оксидативного стресу при дії досліджуваних НЧ. За допомогою розрахунків автори [129] продемонстрували, що зростання загальної кількості АФК залежить від величини $\Delta\Psi_m$ при інгібуванні Q_i сайту АА при окисненні NADH і сукцинату. Це відбувається через значне збільшення продукції $O_2^{\bullet-}$

окисленим флавінмононуклеотидом в комплексі І при інгібуванні комплексу ІІІ, і так само може бути одним з механізмів впливу НЧ на процеси в МХ.

Другий механізм – інтеграція НЧ в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів електронів.

НЧ діоксиду церію відповідно до редокс-потенціалу пари $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}=+1440\text{мВ}$ здатні перехоплювати електрони з дихального ланцюга і переносити їх на гідроксильний радикал з його нейтралізацією ($\text{OH}^{\bullet}/\text{HO}^{-}=+1900\text{ мВ}$). Однак виведення електронів з дихального циклу впливає на ефективність фосфорилування. Для НЧ ортованадатів виведення електронів з дихального циклу менш ймовірно, оскільки значення редокс потенціалу допуючої пари $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}$ нижче значень для переносників дихального ланцюга МХ. Але нейтралізація гідроксильного радикала також можлива, що підтверджується результатами аналізу в безклітинній системі.

Під впливом ортованадатних НЧ можливе утворення супероксиду в МХ без пригнічення дихального ланцюга за механізмом редокс-ціклінга, з переносом електрона на кисень відповідно до значень редокс потенціалів пари $\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}=-137\text{ мВ}$ і допуючого іона $\text{Eu}^{3+}/\text{Eu}^{2+}=-350\text{мВ}$.

Схематичне зображення можливих шляхів генерації/нейтралізації АФК в дихальному ланцюзі МХ представлено на рисунку 4.13.

Ще одним механізмом пригнічення МХ процесів наночастинками є те, що малі частинки схильні до агрегації при накопиченні у внутрішньоклітинних структурах. Тому в разі малих НЧ може відбуватися механічне пошкодження мембран через безпосереднє проникнення в МХ.

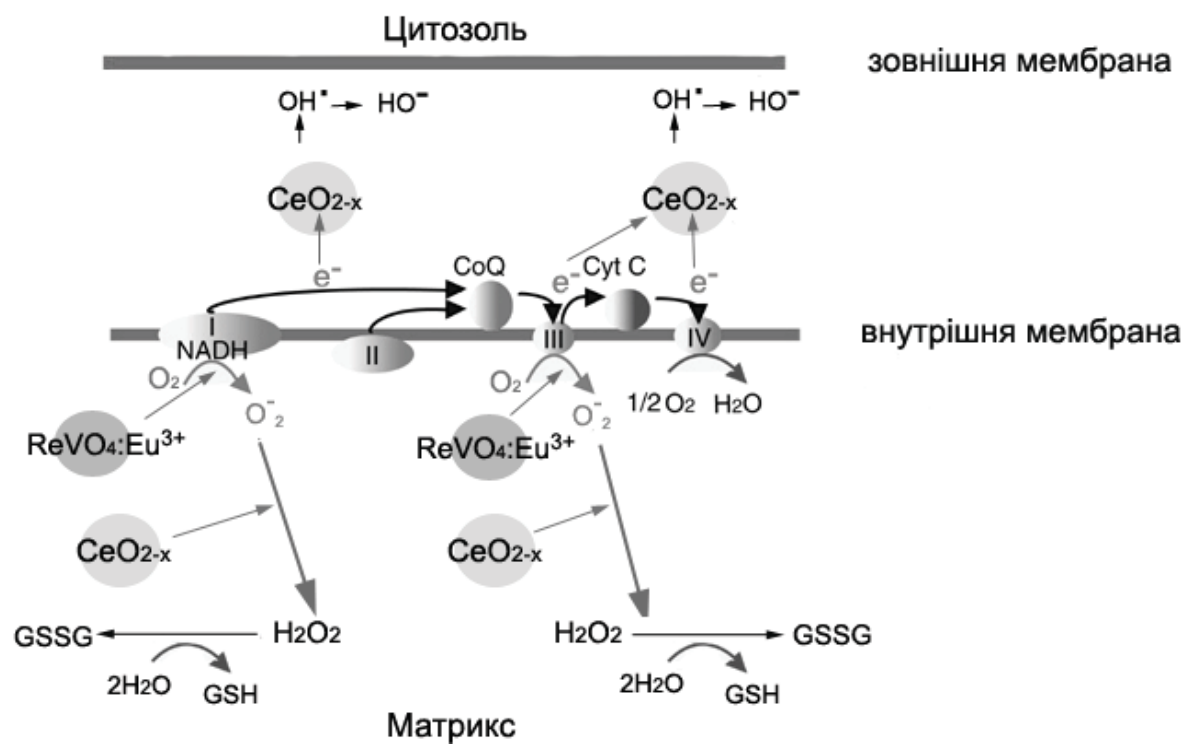


Рис. 4.13. Запропонована модель механізмів дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

Висновки до розділу 4

В даному розділі було встановлено, що біоенергетичні процеси в МХ є мішенню при дії досліджуваних НЧ і отримані наступні результати:

1. Кількісна флуоресцентна мікроскопія з мітохондріальним зондом JC-1 дозволяє контролювати $\Delta\Psi_m$ в поодиноких живих клітинах: експозиція клітин з НЧ призводить до зниження інтенсивності флуоресценції J-агрегатів, що вказує на порушення мітохондріальної функції.
2. Особливості взаємодії НЧ з клітинами і ізольованими МХ обумовлені розмірами і формою частинок.
3. Зниження $\Delta\Psi_m$ в клітинах при впливі досліджуваних НЧ, виключаючи діоксид церію розміром 8-10 нм, корелює з придушенням процесів дихання і окислювального фосфорилування в ізольованих МХ.
4. Супресуючий ефект ортованадатних НЧ на $\Delta\Psi_m$ може частково визначатися впливом іонів, які вивільняються з поверхні частинок при метаболічних перетвореннях в клітинах і подібністю фосфатів та ванадатів, а ефекти малих частинок CeO_{2-x} можуть бути обумовлені здатністю до утворення комплексів з фосфатами.
5. Застосування обчислювальної моделі дозволяє з'ясувати механізми пригнічення мітохондріальної активності наночастинками.

Основні наукові результати, описані в розділі 4, опубліковані в [1,3,5,7, 198-201].

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ НАНОЧАСТИНОК НА МІТОХОНДРІАЛЬНИЙ ПОТЕНЦІАЛ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Вільнорадикальна теорія старіння пояснює не тільки процеси старіння, а й процеси виникнення і розвитку різного роду захворювань, пов'язаних з віком [202-205]. Численні дані літератури про те, що при старінні накопичуються продукти вільнорадикального окислення ДНК [206,207], білків [175,208] та ліпідів [209-211], дозволяють припустити, що з віком активується прооксидантна система і/або знижується активність антиоксидантної системи клітин і організму. Більшість даних літератури свідчить про зниження з віком активності ряду ферментів антиоксидантної системи [212-215], вмісту антиоксидантів [216-219], а також загальної антиоксидантної активності [203,220] і перекисної резистентності еритроцитів [221,222] – показників стану неферментативної антиоксидантної системи організму.

Як було показано в розділі 3, в біотичних і абіотичних системах вплив НЧ на інтенсивність генерації вільних радикалів істотно відрізняється. Залежно від мікрооточення і експериментальних умов НЧ демонструють захисні властивості або підсилюють індукцію оксидативного стресу. Крім того, ми показали, що головною мішенню ортованадатних НЧ і малих НЧ діоксиду церію є МХ, внаслідок чого відбувається порушення їх біоенергетичної функції. Взаємодія НЧ з МХ залежить від часу взаємодії, розмірів і матеріалу НЧ.

Через те, що при старінні відбувається ряд необоротних змін у будові клітинних мембран, в роботі захисних систем клітини, що може визначати вікові особливості впливу НЧ на МХ і вимагає детального дослідження. Існує значна кількість експериментальних доказів зниження при старінні організмів ефективності неферментативної антиоксидантної системи. Один з

основних показників стану неферментативної антиоксидантної системи – загальна антиокислювальна активність клітинних, а також МХ мембран, при старінні має тенденцію до зниження. З віком також відбувається збільшення інтенсивності ПОЛ саме в МХ. Очікується, що вплив редоксактивних НЧ на МХ в гепатоцитах старих щурів може мати значні відмінності.

5.1. Дія наночастинок, індукторів оксидативного стресу і тіолових протекторів на мітохондріальний потенціал

Нами було проведено дослідження $\Delta\Psi_m$ в гепатоцитах молодих і старих тварин. Показано, що достовірних відмінностей значення $\Delta\Psi_m$ в клітинах щурів 3-х місячного і 20-і місячного віку за показником флуоресценції барвника JC-1 не спостерігається (Рис. 5.1).

Як було показано в розділі 4, малі НЧ проникають в клітини за механізмом адсорбції-дифузії без участі ендоцитозу. Це дозволяє НЧ проникнути безпосередньо в цитозоль і внутрішньоклітинні структури, такі як ядро і МХ [223]. Зміни $\Delta\Psi_m$ пов'язані з високою реактивністю малих НЧ і їх схильністю до агрегації і здатністю пошкоджувати клітинні структури. Ці дані корелюють з даними про високу прооксидантну активність цих частинок в модельних біосистемах різної складності, як було показано в розділі 3.

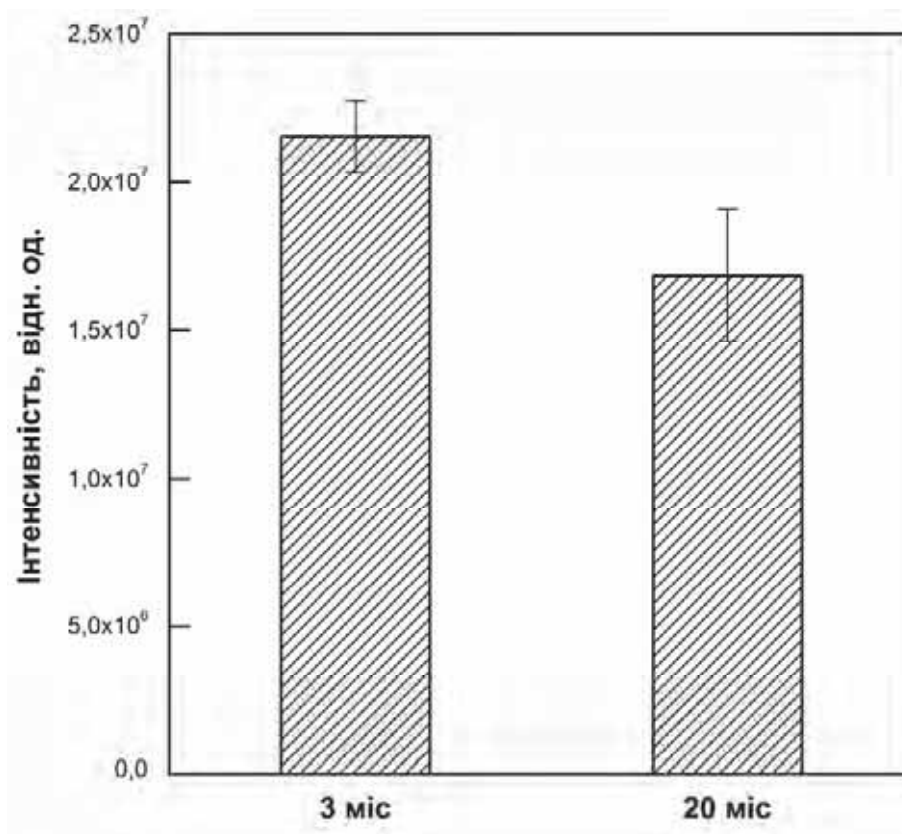


Рис. 5.1. Флуоресценція агрегатів JC -1 в гепатоцитах щурів різного віку.

Дослідження впливу різних концентрацій НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку показало, що пригнічення активності МХ відбувається в залежності від концентрації НЧ ортованадатів (Рис. 5.2).

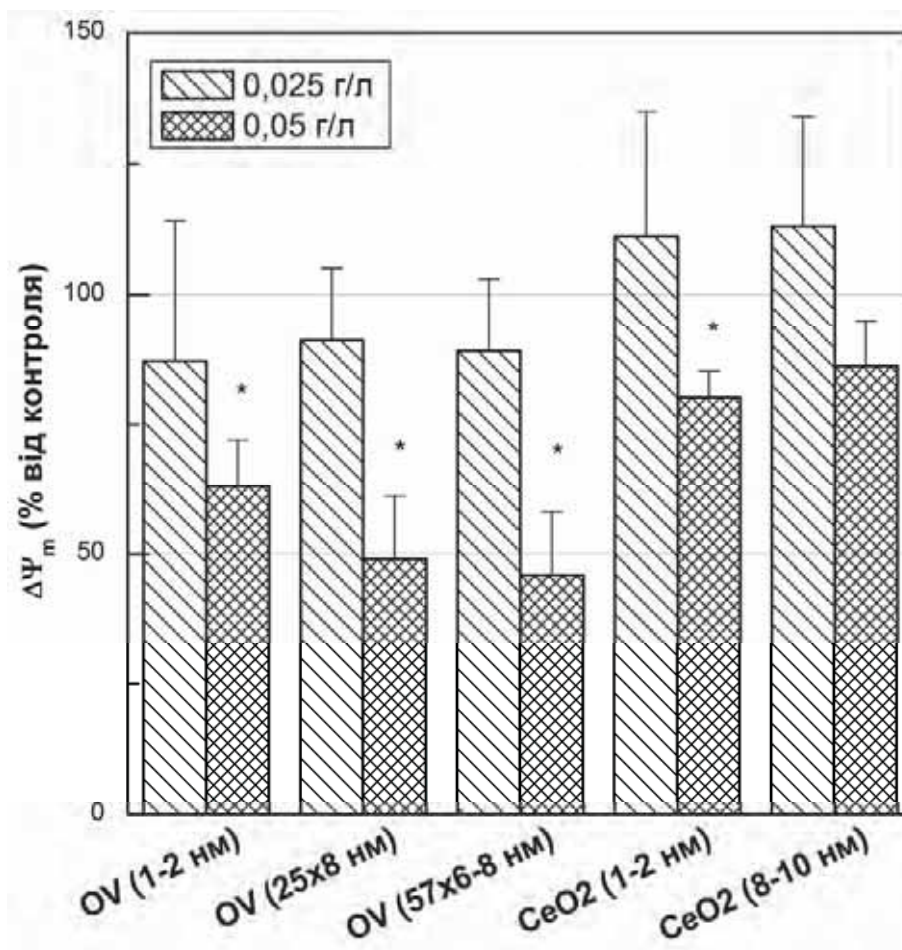


Рис. 5.2. Вплив різних концентрацій НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів 3 місячного віку;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Менші концентрації (0,025 г/л) мають більш виражений ефект у 20 місячних щурів у порівнянні з 3 місячними тваринами (рис. 5.2, 5.3). Крім того, при більш високій концентрації (0,05 г/л) супресуючий ефект малих ортованадатних НЧ більш виражений. Найбільші відмінності в реакції $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку на вплив НЧ спостерігалися для малих частинок ортованадатів: в клітинах старих щурів ці частинки значно сильніше пригнічують МХ (рис. 5.3).

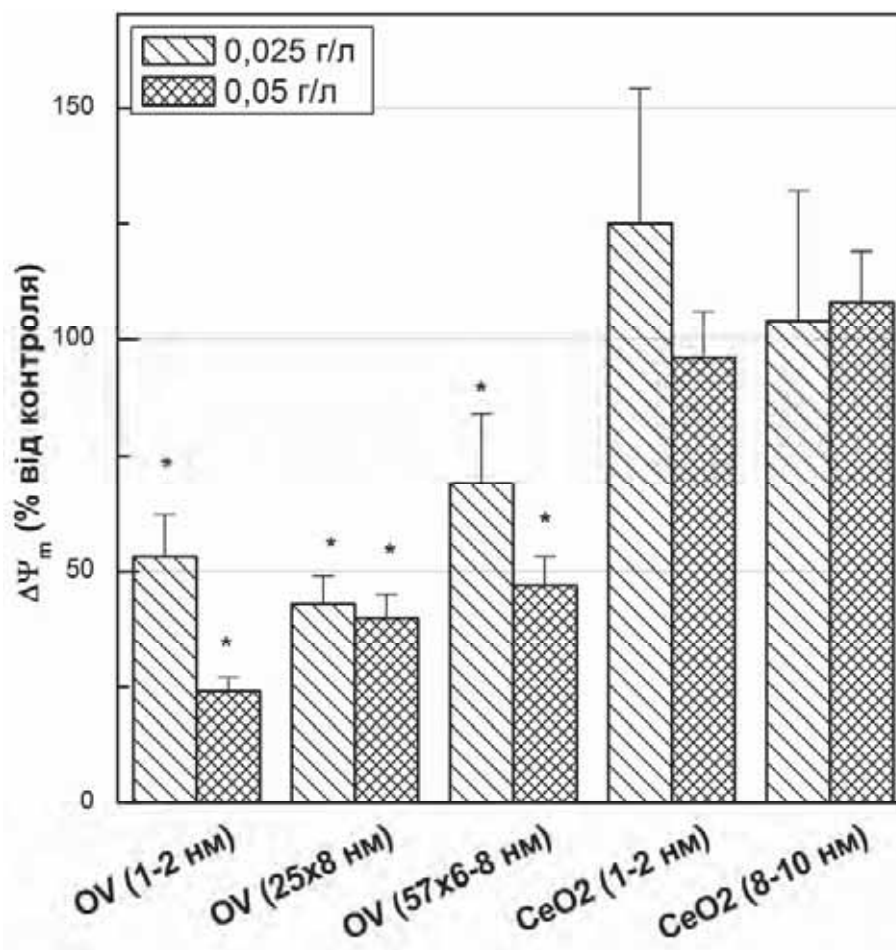


Рис. 5.3. Вплив різних концентрацій НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів 20 місячного віку;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

1-2 нм НЧ CeO_{2-x} з концентрацією 0,05 г/л викликають незначне зниження $\Delta\Psi_m$ тільки в гепатоцитах молодих щурів (рис. 5.2, 5.3).

Те, що клітини старих тварин більш чутливі до прооксидантного впливу, можна пояснити різним початковим станом і реактивністю антиоксидантної захисної системи клітин. Подальше використання в дослідженнях тіолових сполук NAC і GSH як протекторів від негативного впливу НЧ на $\Delta\Psi_m$ є підтвердженням того, що вплив НЧ на окислювальний баланс гепатоцитів щурів різного віку має вікові особливості та відмінності.

Показано, що GSH на відміну від NAC повністю нейтралізує негативні наслідки впливу НЧ на МХ. GSH є одним з основних компонентів тілової

буферної окислювально-відновної системи в клітині. Виснаження пулу відновленого глутатіону і зміна співвідношення GSH/GSSG можуть бути опосередковані ферментативними процесами детоксикації НЧ [224]. Екзогенний GSH здатний проникати в клітини в незмінному вигляді і таким чином захищати не тільки позаклітинні, але і внутрішньоклітинні структури. NAC здатний захистити клітини і MX тільки частково, тому що він є попередником енергзатратного процесу синтезу GSH, і цього може бути недостатньо для нейтралізації дії НЧ при зниженні функції MX і порушенні синтезу АТФ.

Ми виявили, що в гепатоцитах 20 місячних щурів GSH демонструє яскраво виражену захисну дію проти впливу ортованадатних НЧ, а також окислювального стресу, змодельованого за допомогою прооксидантів (H_2O_2 і t-BHP) (Таблиця 5.1). У MX старих тварин під впливом GSH в окремих випадках спостерігалось підвищення значень $\Delta\Psi_m$ над рівнем контролю. З віком активність ферментів антиоксидантної захисної системи збільшується, але рівень екзогенного GSH і субстратів зменшується, і цей факт пояснює спостережувані відмінності впливу екзогенного GSH в клітинах 3 місячних і 20 місячних щурів (Таблиця 5.1). NAC також демонструє більш виражену захисну дію від токсичного впливу t-BHP (50 мкм) в клітинах старих щурів (Таблиця 5.1).

Надійне функціонування GSH-залежних антиоксидантних ферментів в тканинах тісно пов'язане з глутатіонредуктазою – ферментом, який регенерує GSH з GSSG [225]. Разом вони утворюють єдину GSH-залежну антиоксидантну систему. Іншими ферментами, за допомогою яких інактивується H_2O_2 , є Se-залежні глутатіонпероксидази. За даними ряду авторів, роль глутатіонпероксидази в утилізації H_2O_2 значно вище, ніж каталази [213,226]. На думку ряду авторів, глутатіонпероксидаза є ключовим ферментом в захисті клітин як в нормі, так і в умовах оксидативного стресу.

Таблиця 5.1.

Захисний вплив глутатіону (2 мМ) і N-ацетилцистеїну (5 мМ) на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів різного віку на тлі дії прооксидантів (H_2O_2 (1 мМ); tBHP (50 мкМ)) і наночастинок;

(* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

	$\Delta\Psi_m$, % від контролю	
	3 міс. щури	20 міс. щури
1мМ H_2O_2	81±9*	108±10
50 мкМ t-BHP	4±1*	5±1*
GSH	133±6	116±11
GSH + 1 мМ H_2O_2	117±12	146±12*
GSH + 50 мкМ tBHP	100±13	185±14*
NAC	61±6*	74±14*
NAC+50 мкМ t-BHP	43±6*	81±7*
OV (1-2 нМ)	63±9*	27±4*
OV (25×8 нМ)	49±12*	32±4*
OV (57×6-8нМ)	46±12	46±7
GSH+OV (1-2 нМ)	95±7	93±14
GSH+OV (25×8 нМ)	101±8	114±18
GSH+OV (57×6-8 нМ)	105±6	134±13
NAC+OV (1-2 нМ)	58±5*	61±6*
NAC+OV (25×8 нМ)	58±5*	59±6*
NAC+OV (57×6-8 нМ)	58±8	68±5

В даному випадку механізми прооксидантної дії НЧ можуть реалізуватися через підвищення генерації АФК, і зокрема, супероксидного радикала, який є попередником більшості АФК. Так само під дією НЧ може відбуватися підвищення локальної концентрації H_2O_2 в МХ внаслідок їх

СОД-подібної активності [79]. Згідно з даними літератури, в МХ старих тварин відбувається значне збільшення рівня оксидативного стресу, обумовлене саме віком, і підвищення активності антиоксидантних ферментів, при цьому відбувається зниження рівня GSH. Підвищена активність ферментів антиоксидантного захисту, що використовують GSH як субстрат, на тлі падіння рівня GSH з віком, очевидно, є причиною спостережуваних розходжень у дії екзогенного GSH при впливі НЧ і індукторів оксидативного стресу в клітинах молодих і старих тварин.

Раніше було показано (розділ 3), що в біотичній системі сферичні ортованадатні НЧ підсилюють ефект оксидативного стресу, що моделюється за допомогою H_2O_2 і t-BHP, а попередня інкубація зразків з 8-10 нм CeO_{2-x} перешкоджає розвитку оксидативного стресу, викликаного H_2O_2 .

При дослідженні сумарного впливу НЧ і прооксидантів спостерігалася парадоксальна стабілізації $\Delta\Psi_m$ і відсутність токсичного ефекту НЧ в гепатоцитах молодих тварин (Рис. 5.4, 5.5). Однак у порівнянні з клітинами 3-місячних тварин, в клітинах старих тварин подібний ефект не спостерігався (Рис. 5.4, 5.5).

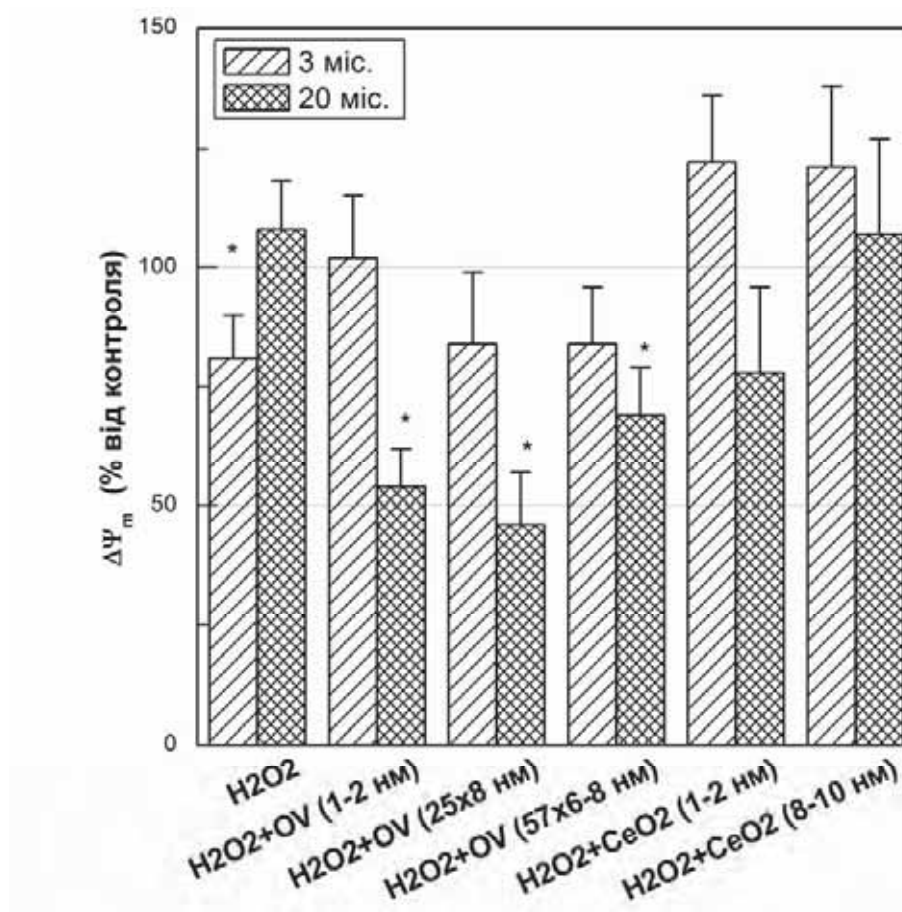


Рис. 5.4. Вплив НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку при моделюванні оксидативного стресу за допомогою 1 мМ H_2O_2 ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

З огляду на те, що адаптаційні ресурси клітини мобілізуються в результаті помірної генерації АФК, під впливом прооксидантів в застосованих концентраціях, сумарний ефект проявляється як збереження рівня $\Delta\Psi_m$.

На відміну від молодих, у старих тварин незалежно від наявності прооксидантів рівень мітохондріального потенціалу знизився під впливом НЧ (Рис. 5.4, 5.5), причому в присутності t-BHP $\Delta\Psi_m$ знизився набагато сильніше в порівнянні з H_2O_2 .

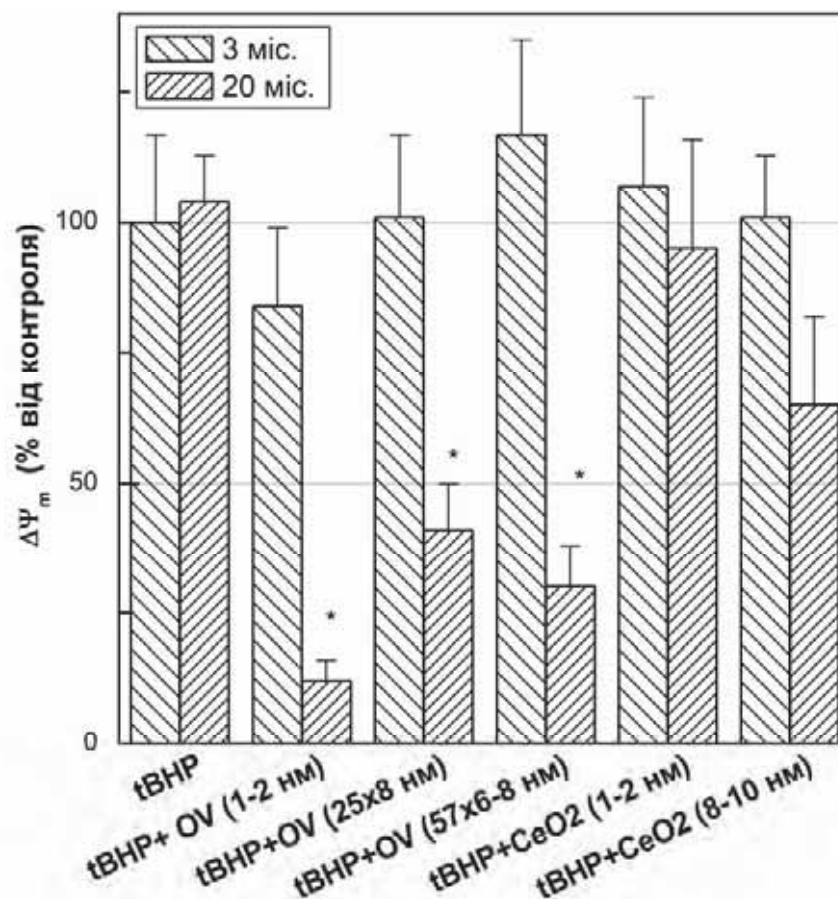


Рис. 5.5. Вплив НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку при моделюванні оксидативного стресу за допомогою 5 мкМ t-BHP;
 (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Відсутність захисного ефекту НЧ в клітинах старих тварин може бути пов'язана з меншою реактивністю захисних антиоксидантних систем і низькою забезпеченістю GSH. У клітинах молодих тварин реактивність захисних систем вище, і адаптивне відновлення, викликане АФК, більш швидке. Отримані дані свідчать про те, що індукована НЧ недостатність функції МХ є АФК-залежною, має вікової характер і залежить від стану тіолової буферної системи. Відмінності при впливі редоксактивних НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку, які залежать від перебудов в системах антиоксидантного захисту та зменшення їх реактивності, від вихідного стану мембран і зміни загального окислювального балансу, необхідно враховувати

при розробці стратегій створення препаратів на основі НЧ для терапевтичного застосування або діагностики.

Пояснюючи молекулярний механізм дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ щурів різного віку, згідно з авторами [227], які за допомогою модельних розрахунків і експериментально показали, що вихід перекису водню з МХ і ступінь генерації АФК при диханні залежить від активності глутатіон/тіоредоксін – захисної системи, можна припустити, що утворення перекису водню в МХ в присутності НЧ може безпосередньо відбуватися в ферментних комплексах дихального ланцюга, а також за рахунок дисмутації вже утвореного супероксида завдяки власній СОД-подібній активності НЧ діоксиду церію. Дані процеси призводять до підвищеного витрачання GSH. Це підтверджується тим, що в роботі ми спостерігаємо захисну дію екзогенного глутатіону, який необхідний для роботи ферментів, відповідальних за утилізацію перекису водню

Також треба враховувати, що помірною генерацією АФК здатна запускати внутрішньоклітинні антиоксидантні системи, і є одним з базових механізмів захисту клітин від оксидативного стресу. На рівні клітин і організму ефект НЧ може проявлятися не як пряма антирадикальна дія, яку ми спостерігали в модельних безклітинних системах, а як активація внутрішньоклітинних сигнальних процесів для відновлення окислювального балансу.

Висновки до розділу 5

В даному розділі було показано, що вплив НЧ на $\Delta\Psi_m$ має вікові особливості, які необхідно враховувати при розробці стратегій подальшого застосування НЧ.

1. Пригнічуючий вплив на МХ малих НЧ обумовлений високою реактивністю даних частинок і особливостями проникнення в біоструктури.
2. Ортованадатні НЧ показали значну вікову специфіку впливу: в клітинах 20 місячних тварин зниження $\Delta\Psi_m$ було значно більш вираженим.
3. Особливості впливу НЧ на МХ гепатоцитів 20 місячних тварин обумовлені віковими змінами в системі антиоксидантного захисту та функціональним станом мембран клітин, зниженням синтезу і рівня GSH з віком на тлі підвищення активності GSH-залежних ферментів; захисний ефект екзогенного GSH в гепатоцитах старих щурів підтверджує дане твердження.
4. Активація адаптивних ресурсів клітин і парадоксальна стабілізація $\Delta\Psi_m$ спостерігається при одночасному впливі НЧ і прооксидантів в клітинах 3 місячних щурів, але не в клітинах 20 місячних тварин, що пояснюється зниженням реактивності антиоксидантної захисної системи з віком.

Основні наукові результати, описані в розділі 5, опубліковані в [4,5,7,228,229].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було розв'язано поставлену наукову задачу щодо визначення основних механізмів впливу редоксактивних НЧ на основі рідкісноземельних елементів – діоксиду церію CeO_{2-x} і ортованадатів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) на основні показники мітохондріальної активності – мітохондріальний потенціал та процеси дихання і окислювального фосфорилування в клітинах печінки.

Основними науковими та практичними результатами роботи є такі:

1. Встановлено, що в модельних абіотичних і біотичних системах вплив редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів на інтенсивність генерації вільних радикалів різниться, визначається фізико-хімічними властивостями і розмірами наночастинок: найбільшу прооксидантну активність демонструють малі (1-2 нм) ортованадатні наночастинок.
2. Експериментально доведено, що малі наночастинок ортованадатів та діоксиду церію проникають в клітини за механізмом адсорбції-дифузії, на відміну від великих наночастинок, для яких основним шляхом є ендоцитоз.
3. Показано, що здатність наночастинок впливати на інтенсивність генерації вільних радикалів корелює з їх здатністю порушувати мітохондріальний потенціал, процеси дихання і окисного фосфорилування, що свідчить про те, що біоенергетичні процеси в мітохондріях є мішенню для редоксактивних наночастинок.
4. Встановлено, що повний розвиток пригнічуючого впливу всіх типів наночастинок, за винятком CeO_{2-x} із розміром 8-10 нм, на мітохондріальний потенціал спостерігається через 24 години; даний ефект може пояснюватися взаємодією наночастинок з електрон-транспортним ланцюгом мітохондрій.

5. Експериментально показано, що додавання в біотичну систему з наночастинками, що виявляють прооксидантні властивості, регуляторів окислювального балансу клітини (глутатіону та інших тіолових сполук) призводить до втрати здатності наночастинок посилювати генерацію вільних радикалів та спричиняти зміни мітохондріального потенціалу клітини.
6. Експериментально показано, що клітини старих тварин є більш чутливими до прооксидантної дії наночастинок, і захисна дія екзогенного глутатіону також найбільш виражена в клітинах старих тварин.
7. Встановлено, що при сумісній дії прооксидантів та наночастинок у молодих щурів відбувається стабілізація мітохондріального потенціалу, що можна пояснити ефектом преадаптації на тлі помірного утворення активних форм кисню. В клітинах старих тварин подібний ефект не спостерігався.
8. На основі кінетичної моделі Маркевича та Хоека запропоновано два механізми впливу наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів та діоксиду церію на редокс-процеси в мітохондріях. Перший механізм пов'язаний з інгібуванням транспорту електронів і активацією утворення супероксиду та перекису водню, другий – з інтеграцією наночастинок в електрон-транспортні процеси в мітохондріях у якості донорів або акцепторів електронів.

ПРИМІТКИ

Автор вважає своїм приємним обов'язком подякувати науковому керівнику дисертації, доктору фізико-математичних наук, начальнику відділу нанокристалічних матеріалів, Єфімовій Світлані Леонідівні за запропоновану тему дослідження і допомогу при виконанні досліджень по темі дисертаційної роботи, член-кореспонденту НАН України, доктору фізико-математичних наук, професору Малюкіну Юрію Вікторовичу за вибір напрямку, запропоновані оригінальні ідеї, інтерес до дослідження і плідне обговорення результатів, кандидату біологічних наук, Кавок Наталії Сергіївні, за інтерес, увагу і допомогу в підготовці дисертаційної роботи.

Автор глибоко вдячна кандидату хімічних наук Ключкову Володимирі Кириловичу і молодшому науковому співробітнику відділу нанокристалічних матеріалів Сєдих Ользі Олегівні за допомогу в синтезі нанокристалів, кандидату хімічних наук Ігорю Анатолійовичу Боровому за консультації і надання люмінесцентних зондів, кандидату фізико-математичних наук Семінко Владиславу Вікторовичу за допомогу в підготовці публікацій, а так само кандидату біологічних наук, Малюкіній Маргариті Юріївні, за допомогу в проведенні експериментів.

Особливу подяку автор дисертації висловлює доктору біологічних наук, старшому науковому співробітнику Нікітченко Юрію Вікторовичу за допомогу, цінні поради та зауваження в ході підготовки дисертаційної роботи.

Автор висловлює щирі вдячність всім співробітникам відділу нанокристалічних матеріалів за підтримку, прояв уваги і надану допомогу при виконанні даної роботи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса / Е.А. Аверченко, Н.С.Кавок, А.М. Степаненко [и др.] // Біофізичний вісник. – 2009. – Вып. 22, № 1. – С. 49–56.
2. Хемилюминесцентная диагностика свободнорадикальных процессов в абиотической системе и в клетках печени в присутствии наночастиц на основе редкоземельных элементов $n\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re = Gd, Y, La) и CeO_2 / Е.А. Аверченко, Н.С.Кавок, В.К. Клочков [и др.] // Журнал прикладной спектроскопии. – 2014. – Вып. 81, № 5. – С. 754–760.
3. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements / N.S. Kavok, K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, S.L. Yefimova [et al.] // European Physical Journal: E Soft Matter and Biological Physics. – 2014. – V. 37, № 12: 127.
4. Age-associated features of mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes induced by rare-earth based nanoparticles / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Functional Materials. – 2015. – V. 22, № 2. – P. 219–224.
5. Влияние наночастиц на основе ортованадатов редкоземельных элементов и оксида церия на биоэнергетические процессы в митохондриях гепатоцитов / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, Ю.В. Никитченко [и др.] // Біофізичний вісник. – 2015. – Вып. 33, № 1. – С. 60–67.
6. Effect of inorganic nanoparticles and organic complexes on their basis on free-radical processes in some model systems / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2015. – V. 31, № 2. – P. 138–145.
7. Аверченко Е.А. Щодо механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів на редокс-процеси в мітохондріях

- / К.А. Аверченко, Н.С. Кавок, С.Л. Єфімова // Біофізичний вісник. – 2016. – Вып. 35, № 1. – С. 10–20.
8. De M. Applications of nanoparticles in biology / M. De, P. S. Ghosh, V.M. Rotello // *Adv. Mater.* – 2008. – V. 20, № 22. – P. 4225–4241.
 9. Bouzigues C. Biological applications of rare-earth based nanoparticles / C. Bouzigues, Th.Gacoin, A. Alexandrou // *ACS Nano*. – 2011. – V. 5, № 11. – P. 8488–8505.
 10. Multifunctional rare-earth vanadate nanoparticles: luminescent labels, oxidant sensors, and MRI contrast agents / M. Abdesslem, M. Schoeffel, I. Maurin [et al.] // *ACS Nano*. – 2014. – V.8, № 11. – P. 11126–11137.
 11. Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective / D. Schubert, R. Darguch, J. Raitano [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. – V. 342, № 1. – P. 86–91.
 12. Trovarely A. Catalysis by ceria and related materials / A. Trovarely – London: Imperial College Press, 1998. – 528 p.
 13. Cytotoxic effects of hydroxylated fullerenes on isolated rat hepatocytes via mitochondrial dysfunction / Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 2011. – V. 85, № 11. – P. 1429–1440.
 14. Synthesis and virucidal activity of a water-soluble, configurationally stable, derivatized C60 fullerene / R. Schinazi, R. Sijbesma, G. Srdanov [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1993. – V. 37, № 8. P. 1707–1710.
 15. Antimycobacterial activity of ionic fullerene derivatives / S. Bosi, T. Da Ros, S. Castellano [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2000. – V. 10, № 10. – P. 1043–1045.
 16. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism / P. Mroz, A. Pawlak, M. Satti [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 2007. – V. 43, № 5. – P. 711–719.
 17. In fullerenes: chemistry, physics, and technology / L.L. Dugan, E. Lovett, S. Cuddihy [et al.]. – New York: John Wiley and Sons, 2000. – 467 p.

18. The role of mitochondrial function in gold nanoparticle mediated radiosensitisation / L.E. Taggart¹, S.J. McMahon¹, F.J. Currell [et al.] // *Cancer Nanotechnol.* – 2014. – V. 5, № 1:5.
19. Interparticle interactions in glutathione mediated assembly of gold nanoparticles / I.S. Lim, D. Mott, W. Ip [et al.] // *Langmuir.* – 2008. – V. 2. – P. 8857–8863.
20. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles / Y.S. Chen, Y.C. Hung, I. Liao [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – V. 4, № 8. – P. 858–864.
21. Functionalized fluorescent oxide nanoparticles: artificial toxins for sodium channel targeting and imaging at the single-molecule level. / E. Beaurepaire, V. Buisson, M.P. Sauvat [et al.] // *Nano Lett.* – 2004. – V. 4, № 11. – P. 2079–2083.
22. Optical in situ size determination of single lanthanide ion doped oxide nanoparticles / D. Casanova, D. Giaume, T. Gacoin [et al.] // *Appl. Phys. Lett.* – 2006. – V. 89: 253103.
23. Single lanthanide-doped oxide nanoparticles as donors in fluorescence resonance energy transfer. D. Casanova, D. Giaume, T. Gacoin, [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110, № 39. – P. 19264–19270.
24. Demchenko A.P. Nanoparticles and nanocomposites for fluorescence sensing and imaging / A.P. Demchenko // *Methods Appl. Fluoresc.* – 2013. – V. 1, № 2. – P. 1–28.
25. Diode-pumped Nd:YVO₄/Nd:YLF laser at 488 nm / Y.L. Li, H.L. Jiang, T.Y. Ni [et al.] // *Laser Phys.* – 2011. – V. 21, № 4. – P. 677–679.
26. Single europium-doped nanoparticles measure temporal pattern of reactive oxygen species production inside cells / D. Casanova, C. Bouzigues, T.L. Hguyen, [et al.] // *Nat. Nanotechnol.* – 2009. – V. 4. – P. 581–585.
27. High contrast in vitro and in vivo photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm³⁺ and Yb³⁺ doped fluoride nanophosphors / M. Nyk, R. Kumar, T. Y. Ohulchanskyy [et al.] // *Nano Lett.* – 2008. – V. 8. – P. 3834–3838.

28. Lewinski N. Cytotoxicity of nanoparticles / N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek // *Small*. – 2008. – V. 4, № 1. – P. 26–49.
29. Wang L. Luminescent and hydrophilic LaF₃-polymer nanocomposite for DNA detection / L. Wang, P. Li // *Luminescence*. – 2008. – V. 24, № 1. – P. 39–44.
30. Son A. Luminescent lanthanide nanoparticles as labels in DNA microarrays for quantification of methyl tertiary butyl ether degrading bacteria / A. Son, M. Nichkova, D. Dosev, I. M. Kennedy, K. R. Hristova // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2008. – V. 8, № 5. – P. 2463–2467.
31. Quantitative DNA hybridization in solution using magnetic/luminescent core-shell nanoparticles / A. Son, M. Nichkova, D. Dosev [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2007. – V. 370, № 2. – P. 186–194.
32. Moore E. G. From antenna to assay: lessons learned in lanthanide luminescence / E.G. Moore, A.P. Samuel, K.N. Raymond // *Acc. Chem. Res.* – 2009. – V. 42, № 4. – P. 542–552.
33. Application of luminescent Eu:Gd₂O₃ nanoparticles to the visualization of protein micropatterns / D. Dosev, M. Nichkova, M. Liu [et al.] // *J. Biomed. Opt.* – 2005. – V. 10, № 6: 064006.
34. Synthesis, characterization, and biological application of size-controlled nanocrystalline NaYF₄:Yb,Er infrared to-visible up-conversion phosphors / G. Yi, H. Lu, S. Zhao [et al.] // *Nano Lett.* – 2004. – V. 4, № 11. – P. 2191–2196.
35. A new highly sensitive immunoassay for cytokines by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFI) / A. Ogata, H. Tagoh, T. Lee [et al.] // *J. Immunol. Methods*. – 1992. – V. 148, № 1-2. – P. 15–22.
36. Tracking transplanted cells in live animal using upconversion fluorescent nanoparticles / N.M. Idris, Z. Li, L. Ye [et al.] // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30, № 28. – P. 5104–5113.
37. In vivo and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in caenorhabditis elegans / S.F. Lim, R. Riehn, W.S. Ryu [et al.] // *Nano Lett.* – 2006. – V. 6, № 2. – P. 169–174.

38. Laser scanning up-conversion luminescence microscopy for imaging cells labeled with rare-earth nanophosphors / M. Yu, F. Li, Z. Chen [et al.] // *Anal. Chem.* – 2009. V. 81, № 3. – P. 930–935.
39. Dextran coated gadolinium phosphate nanoparticles for magnetic resonance tumor imaging / H. Hifumi, S. Yamaoka, A. Tanimoto [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2009. – V. 19. – P. 6393–6399.
40. Valcheva-Traykova M. Involvement of lanthanides in the free radicals homeostasis / M. Valcheva-Traykova, L. Saso, I. Kostova // *Curr. Top. Med. Chemi.* – 2014. – V. 14, № 22. – P. 2508–2519.
41. Bogunia-Kubik K. From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine / K. Bogunia-Kubik, M. Sugisaka // *Biosystems.* – 2002. – V. 65. – P. 123–138.
42. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms / K. Unfried, C. Albreght, L.O. Klotz [et al.] // *Nanotoxicology.* – 2007. – V. 1, № 1. – P. 52 – 71.
43. Toxic potential of materials at the nanolevel / A. Nel, T. Xia, L. Madler [et al.] // *Science.* 2006. – V. 311, № 5761. – P. 622–627.
44. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10) / K. Donaldson, V. Stone, P.J. Borm [et al.] // *Free Radical Biol. Med.* – 2003. – V. 34, № 11. – P. 1369–1382.
45. Oberdorster G. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles / G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster // *Environ. Health Perspect.* – 2005. – V. 113, № 7. – P. 823–839.
46. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm / T. Xia, M. Kovoichich [et al.] // *Nano Lett.* – 2006. – V. 6, № 8. – P. 1794–1807.
47. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects / N. Li, M. Hao, R.F. Phalen [et al.] // *Clin Immunol.* – 2003. – V. 109, № 3. – P. 250–265.

48. Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line / G.G. Xiao, M. Wang, N. Li [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278, № 50. – P. 50781–50790.
49. ATSDR evaluation of potential for human exposure to zinc / N. Roney, M. Osier, S.J. Paikoff [et al.] // *Toxicol. Ind. Health.* – 2007. – V. 23, № 5–6. – P. 247–308.
50. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles / T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104, № 7. – P. 2050–2055.
51. Chen M. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles / M. Chen, A. von Mikecz / *Exp. Cell Res.* – 2005. – V. 305, № 1. – P. 51–62.
52. Vertegel A.A. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme / A.A. Vertegel, R.W. Siegel, J.S. Dordick // *Langmuir.* – 2004. – V. 20, № 16. – P. 6800–6807.
53. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility / N.M. Franklin, N.J. Rogers, S.C. Apte [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – V. 41, № 24. – P. 8484–8490.
54. Extracellular proteins limit the dispersal of biogenic nanoparticles / J.W. Moreau, P.K. Weber, M.C. Martin [et al.] // *Science.* – 2007. – V. 316, № 5831. – P. 1600–1603.
55. Либерман Е.А. Действие аналогов фосфата – арсената и ванадата – на мембранный потенциал митохондрий / Е.А. Либерман, О.Л. Мякотина, Л.М. Цофин // *Биологические мембраны.* – 1987. – Т. 14, № 11. – С. 1216–1220.

56. The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds / D.C. Crans, J.J. Smee, E. Gaidamauskas [et al.] // *Chem. Rev.* – 2004. – V. 104, № 2. – P. 849–902
57. Impaired mitochondrial function and oxidative stress in rat cortical neurons: implications for gadolinium-induced neurotoxicity / X. Feng, Q. Xia, L. Yuan [et al.] // *Neurotoxicology*. – 2010. – V. 31, № 4. – P. 391–398.
58. Nanoceria as antioxidant: synthesis and biomedical applications / A.S. Karakoti, N.A. Monteiro-Riviere, R. Aggarwal [et al.] // *JOM*. – 2008. – V. 60, № 3. – P. 33–37.
59. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles / C. Korsvik, S. Patil, S. Seal [et al.] // *Chem. Commun.* – 2007. – V. 14, № 10. – P. 1056–1058.
60. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria / E.G. Heckert, A.S. Karakoti, S. Seal [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – V. 29, № 18. – P. 2705–2709.
61. PEGylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry / A.S. Karakoti, S. Singh, A. Kumar [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131, № 40. – P. 14144–14145.
62. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity / T. Pirmohamed, J.M. Dowding, S. Singh [et al.] // *Chem. Commun.* – 2010. – V. 46, № 16. – P. 2736–2738.
63. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties / J.M. Perez, A. Asati, S. Nath [et al.] // *Small*. – 2008. – V. 4, № 5. – P. 552–556.
64. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / S.M. Hirst, A.S. Karakoti, R.D. Tyler [et al.] // *Small*. – 2009. – V. 5, № 24. – P. 2848–2856.
65. Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and

- upregulation of superoxide dismutase 2 / J. Colon, N. Hsieh, A. Ferguson [et al.] // *Nanomedicine*. – 2010. – V. 6, № 5. – P. 698–705.
66. UV-shielding property, photocatalytic activity and photocytotoxicity of ceria colloid solutions / N.M. Zholobak, V.K. Ivanov, A.B. Shcherbakov [et al.] // *J. Photochem. Photobiol., B*. – 2011. – V. 102, № 1. – P. 32–38.
 67. Наноматериалы на основе диоксида церия: свойства и перспективы использования в биологии и медицине / А.Б. Щербаков, Н.М. Жолобак, В.К. Иванов [и др.] // *Биотехнология*. – 2011. – Т. 4, №1. – С. 9–28.
 68. Иванов В.К.. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинское применение нанодисперсного диоксида церия / В.К. Иванов, А.Б. Щербаков, А.В. Усатенко // *Успехи химии*. – 2009. – Т. 9, № 78. – С. 924–941.
 69. Jakupc M.A. Pharmacological properties of cerium compounds / M.A. Jakupc, P. Unfried, B.K. Keppler // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2005. – V. 153. – P. 101–111
 70. The suppression effect of light rare earth elements on proliferation of two cancer cell lines / Y. Ji, B. Xiao, Z.H. Wang [et al.] // *Biomed. Environ. Sci.* – 2000. – V. 13, № 4. – P. 287–292.
 71. Rzigalinski B.A. Cerium oxide nanoparticles increase the lifespan of cultured brain cells and protect against free radical and mechanical trauma / B.A. Rzigalinski, D. Bailey, L. Chow [et al.] // *FASEB J.* – 2003. – V.17, № 4. P. – A606.
 72. Super-oxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles / C. Korsvik, S. Patil, S. Seal [et al.] // *Chem. Commun. (Camb)*. – 2007. – V. 14, № 10. – P. 1056–1058.
 73. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells / E.J. Park, J. Choi, Y.K. Park [et al.] // *Toxicology*. – 2008. – V. 245, № 1-2. – P. 90–100.

74. Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats / J.Y. Ma, H. Zhao, R.R. Mercer [et al.] // *Nanotoxicology*. – 2011. – V. 5, № 3. – P. 312–325.
75. Eom H.J. Oxidative stress of CeO₂ nanoparticles via p38-Nrf-2 signaling pathway in human bronchial epithelial cell, Beas-2B / H.J. Eom, J. Choi. // *Toxicol. Lett.* – 2009. – V. 187, № 2. – P.77–83.
76. Oberdörster G. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles / G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster // *Environ. Health Perspect.* – 2005. – V. 113, № 7. – P. 823–839.
77. Brain distribution and toxicological evaluation of a systemically delivered engineered nano-scale ceria / S.S. Hardas, D.A. Butterfield, R. Sultana [et al.] // *Toxicol. Sci.* – 2010. – V. 116, № 2. – P. 562–576.
78. Hazard and risk assessment of a nanoparticulate cerium oxide based diesel fuel additive –a case study / B. Park, K. Donaldson, R. Duffin [et al.] // *Inhal. Toxicol.* – 2008. – V. 20, № 6. – P. 547–566.
79. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // *Coloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects*. – 2012. – V. 409 – P. 176–182.
80. Деякі фізіологічні ефекти надходження наночасток за умов хронічного надходження в організм / Н.О. Карпенко, Ю.В. Малюкін, Є.М. Коренева, [та ін.] // *Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології (Дванадцяті Данилевські читання): матер. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, Харків 14-15 бер. 2013 р. – X., 2013. – С. 60–61.*
81. The effects of chronic intake of cerium dioxide or gadolinium ortovanadate nanoparticles in aging male rats / N.A. Karpenko, Yu.V. Malukin, E.M. Koreneva [et al.] // *Proceedings of the 3rd Int. Conf. “Nanomaterials: Applications and Properties ’2013”, September 16-21, 2013; Alushta, the Crimea, Ukraine.* – 2013. – Vol.2, № 4. – P. 04NAMB28-1–04NAMB28-4.

82. Andrievsky G.V. Is C₆₀ fullerene molecule toxic? / G.V. Andrievsky, V.K. Klochkov, L.I. Derevyanchenko // Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2005. – V. 13, № 4. – P. 363–376.
83. Oxidative injury in the mouse spleen caused by lanthanides / J. Liu, N. Li, L. Ma [et al.] // J. Alloys Comp. – 2010. – V. 489. – P. 708–713.
84. Oxidative injury in the brain of mice caused by lanthanides / H. Zhao, Z. Cheng, R. Hu [et al.] // Biol. Trace Elem. Res. – 2011. – V. 142. – P. 174–189.
85. Ni J.Z. Bioorganic Chemistry of rare earth elements / J.Z. Ni – Beijing: Academic Press, 1999. – P. 203–222.
86. Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis* / S. Tedesco, H. Doyle, J. Blasco [et al.] // Aquat. Toxicol. – 2010. – V. – 100. – P. 178–186.
87. Reactive oxygen species driven angiogenesis by inorganic nanoparticles / C.R. Patra, J.H. Kim, K. Pramanik [et al.] // Nano Lett. – 2011. – V. 11, № 11. – P. 4932–4938.
88. Xia J. Effects of selected metal oxide nanoparticles on multiple biomarkers in *Carassius auratus* / J. Xia, H.Z. Zhao, G.H. Lu // Biomed. Environ. Sci. – 2013. – V. 26, № 9. – P. 742–749.
89. Pro-angiogenic properties of europium (III) hydroxide nanoparticles / C.R. Patra, R. Bhattacharya, S. Patra [et al.] // Adv. Mater. – 2008. – V. 20, № 4. – P. 753–756.
90. In vitro toxicity studies of europium hydroxide nanorods in mice / C.R. Patra; S.S.A. Moneim, E. Wang [et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2009. – V. 240, № 1. – P. 88–98.
91. Fall C. P. Visualization of cyclosporine A and Ca²⁺-sensitive cyclical mitochondrial depolarization in cell culture / C. P. Fall, J. P. Bennett // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1999. – V. 1410, № 7. – P. 77–84.
92. Buckman J. F. Spontaneous mitochondrial activities in astrocytes / J. F. Buckmann, I. J. Reynolds // Abstr. Soc. Neurosci. – 2001. – V. 27. – P. 96–99.

93. Duchen M.R. Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes / M.R. Duchen, A. Leyssens, M. Crompton // *J. Cell Biol.* – 1998. – V. 142, № 4. – P. 975–988.
94. Huser J. Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore / J. Huser, L. A. Blatter // *Biochem. J.* – 1999. – V. 343. – P. 311–317.
95. Krippeit-Drews P. Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells / P. Krippeit-Drews, M. Dufer, G. Drew // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – V. 267, № 1. – P. 179–183.
96. Buckman J. F. Spontaneous changes in mitochondrial membrane potential in cultured neurons / J. F. Buckman, I. J. Reynolds // *J. Neurosci.* – 2001. – V. 21, № 14. – P. 5054–5065.
97. Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses / L.D. Robb-Gaspers, P. Burnett, G.A. Rutter [et al.] // *EMBO J.* – 1998. – V. 17, №17. – P. 4987–5000.
98. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: Membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase / T.M. Hagen, D.L. Yowe, J.C. Bartholomew [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V.94, № 7 – P. 3064 – 3069.
99. Superoxide production by cytochrome bc1 complex: a mathematical model / F. Guillaud, S. Dröse, A. Kowald [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1837, № 10. – P.1643–1652.
100. Rhee S.G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling / S. G. Rhee // *Science.* – 2006. – V. 312, № 5782. – P. 1882–1883.
101. Bedard K. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology / K. Bedard, K. H. Krause // *Physiol. Rev.* – 2007. – V. 87, № 1. – P. 245–313.

102. Halestrap A.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase / A.P. Halestrap, K.Y. Woodfield, C.P. Connern // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, № 6. – P. 3346–3354.
103. Slow calcium waves and redox changes precede mitochondrial permeability transition pore opening in the intact heart during hypoxia and reoxygenation / S.M. Davidson, D.M. Yellon, M.P. Murphy [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2012. – V. 93, № 3. – P. 445–453.
104. Leung A.W.C. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore / A.W.C. Leung, A.P. Halestrap // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777, № 7-8. – P. 946–952.
105. Circu M.L. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis / M.L. Circu, T.Y. Aw // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – V. 48, № 6. – P. 749–762.
106. Ames B.N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging / B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hagen. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – V. 90, № 17. – P. 7915–7922.
107. Tunnars J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / Tunnars J.F. // *J. Physiol.* – 2003. – V. 552, № 2. – P. 335–344.
108. Andreyev A.Y. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species / A.Y. Andreyev, Y.E. Kushnareva, A.A. Starkov // *Biochemistry (Mosc).* – 2005. – V. 70, № 2. – P. 200–214.
109. Lambert A.J. Superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane / Lambert A.J., Brand M.D. // *Biochem. J.* – 2004. – V. 382, № 2. – P. 511–517.
110. Peptide-based antibodies against glutathione-binding domains suppress superoxide production mediated by mitochondrial complex I / J.F. Chen, C.L. Chen, S. Rawale [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285, № 5. – P. 3168–3180.

111. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // *Biochem. J.* – 2009. – V. 471, № 1. – P. 1–13.
112. Mitochondria and reactive oxygen species / A.J. Kowaltowski, N.C. Souza-Pinto, R.F. Castilho [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 47, № 4. – P. 333–343.
113. Brand M.D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production / M.D. Brand // *Exp. Gerontol.* – 2009. – V. 45, № 7-8. – P. 466–472.
114. Starkov A.A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling / A.A. Starkov // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – V. 1147. – P. 37–52.
115. Cox A.G. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signaling / A.G. Cox, C.C. Winterbourn, M.B. Hampton // *Biochem. J.* – 2009. – V. 425, № 2. – P. 313–325.
116. Murphy M.P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications / M.P. Murphy // *Antioxid. Redox Signal.* – 2012. – V. 16, № 6. – P. 476–495.
117. Winterbourn C.C. Thiol chemistry and specificity in redox signaling / C.C. Winterbourn, M.B. Hampton // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – V. 45, № 5. – P. 549–561.
118. Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling / E.M. Hanschmann, J.R. Godoy, C. Berndt [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – V. 19, № 13. – P. 1539–1605.
119. Go Y.M. Redox compartmentalization in eukaryotic cells / Y.M. Go, D.P. Jones // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1780, № 11. – P. 1271–1290.
120. Schafer F.Q. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple / F.Q. Schafer, G.R. Buettner // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 30, № 11. – P. 1191–1212.

121. Griffith O.W. Origin and turnover of mitochondrial glutathione / O.W. Griffith, A. Meister // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1985. – V. 82, № 14. – P. 4668–4672.
122. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant / M. Mari, A. Morales, A. Colell [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2009. – V. 11, № 11. – P. 2685–2700.
123. Peskin A.V. Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate / A.V. Peskin, C.C. Winterbourn // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 30, № 5. – P. 572–579.
124. Superoxide production by cytochrome bc1 complex: a mathematical model / F. Guillaud, S. Dröse, A. Kowald [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2014. – V. 1837, № 10. – P. 1643–1652.
125. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle / C.L. Quinlan, A.A. Gerencser, J.R. Treberg [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286, № 36. – P. 31361–31372.
126. Drose S. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex / S. Drose, U. Brandt // *J. Biol. Chem.* – 2008. V. 283, № 31. – P. 21649–21654.
127. Bistability of mitochondrial respiration underlies paradoxical reactive oxygen species generation induced by anoxia / V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, J.A. Zeak [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2009. – V. 5, № 12: e1000619.
128. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain // V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, V.N. Pivtoraiko [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2011. – V. 7, № 3: e1001115.
129. Markevich N.I. Computational modeling analysis of mitochondrial superoxide production under varying substrate conditions and upon inhibition of different segments of the electron transport chain / N.I. Markevich, J.B. Hoek // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – V. 1847, № 6-7. – P. 656–679.

130. Demin O.V. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain / O.V. Demin, B.N. Kholodenko, V.P. Skulachev // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – V. 184. – P. 21–33.
131. Orii Y. Oxidation process of bovine heart ubiquinol-cytochrome c reductase studied by stopped-flow rapid-scan spectrophotometry and simulations based on the mechanistic Q cycle model / Y. Orii, T. Miki // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272, № 28. – P. 17594–17604.
132. A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria / L.D. Gauthier, J.L. Greenstein, S. Cortassa [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105, № 4. – P. 1045–1056.
133. Analysis of the kinetics and bistability of ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase / J.N. Bazil, K.C. Vinnakota, F. Wu [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105, № 2. – P. 343–355.
134. Korzeniewski B. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle / B. Korzeniewski, J.A. Zoladz // *Biophys. Chem.* – 2001. – V. 92, № 1-2. – P. 17–34.
135. Beard D.A. A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation / D.A. Beard // *PLoS Comput. Biol.* – 2005. – V. 1, № 4. – P. 0252–0264.
136. Kussmaul L. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria / L. Kussmaul, J. Hirst // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103, № 20. – P. 7607–7612.
137. Proton pumping in the bc₁ complex: a new gating mechanism that prevents short circuits / A.R. Crofts, S. Lhee, S.B. Crofts [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757, № 8. – P. 1019–1034.
138. The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Q_o-site of the cytochrome bc₁ complex / A.R. Crofts, S. Hong, C. Wilson [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1827, № 11-12. – P. 1362–1377.

139. Domain conformational switch of the iron–sulfur protein in cytochrome bc₁ complex is induced by the electron transfer from cytochrome b_L to b_H / C.A. Yu, X. Cen, H.W. Ma [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2088. – V. 1777, № 7-8. – P. 1038–1043.
140. Cadenas E. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria / E. Cadenas, A. Boveris // *Biochem. J.* – 1980. – V. 188, № 1. – P. 31–37.
141. Lambert A.J. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) / A.J. Lambert, M.D. Brand // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279, № 38. – P. 39414–39420.
142. Characteristics of nLnVO₄:Eu³⁺ (Ln = La, Gd, Y, Sm) sols with nanoparticles of different shapes and sizes / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // *Journal of Applied Spectroscopy.* – 2012. – V. 79, № 5. – P. 726–730.
143. Lanthanide phosphate nanorods as inorganic fluorescent labels in cell biology research / P. Ranjan, Bh. Resham, P. Sujata [et al.] // *Clinical chemistry.* – 2007. – V. 53, № 11. – P. 2029–2031.
144. Size and shape influence of luminescent orthovanadate nanoparticles on their accumulation in nuclear compartments of rat hepatocytes / V.K. Klochkov, N.S. Kavok, A.V. Grigorova [et al.] // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2013. – V. 33, № 5. – P. 2708–2712.
145. The aggregation of methylene blue and Nile blue in the presence of ReEuVO₄ (Re = Gd, Y, La) nanoparticles with different form factor / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // *Voprosy khimii i khimicheskoiologii.* – 2014. – № 1. – P. 102–109.
146. Tani T. Photographic science: advances in nanoparticles, J-aggregates, dye sensitization, and organic devices / Oxford: Oxford University press, 2011. – 290 p.

147. Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic functions in primary culture / S. R. Wang, G. Renaud, J. Infante [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol.* – 1985. – V. 21, № 9. – P. 528–530.
148. Дыхание и окислительное фосфорилирование в изолированных клетках печени / И.П. Канаева, А.В. Карякин, Т.В. Аленичева [и др.] // *Цитология.* – 1975. – Т. 17. – С. 545–551.
149. Метод получения изолированных клеток печени / В.И. Луговой, Л.П. Кравченко, Л.В. Карева, [и др.] // *Криобиология и криомедицина.* – 1983. – № 13. – С. 36–39.
150. Kamatch S.A. Interaction of Ca^{2+} with endoplasmatic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes / S.A. Kamatch, K.A. Narayan // *Anal. Biochem.* – 1972. – V. 48, № 1. – P. 53–61.
151. Лемешко В. В. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем: автореф. дис. на соискание научн. степени докт. биол. наук : спец. 03.00.02 «Биофизика» / В.В. Лемешко. – Минск, 1983. – 36 с.
152. Shapiro H. M. Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry / H. M. Shapiro, P. J. Natale, L. A. Kamensky // *Proc .Natl. Acad. Sci. USA.* – 1979. – V. 76, № 1. – P. 5728–5730.
153. Brauner T. Comparative measurements of membrane potentials with microelectrodes and voltage-sensitive dyes / T. Brauner, D. F. Holser, R. J. Strasser // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1984. – V. 771, № 2. – P. 208–216.
154. Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol-loaded cells / V. Dall'Asta, R. Gatti, G. Orlandini [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1997. – V. 231, № 2. – P. 260–268.
155. Wolff C. Comparative study of membrane potential-sensitive fluorescent probes and their use in ion channel screening assays / C. Wolf, B. Fuks, P. Chatelain // *J. Biomol. Screen.* – 2003. – V. 8, № 5. – P. 533–543.

156. Membrane potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes / B. Ehrenberg, V. Montana, M. Wei [et al.] // *Biophys. J.* – 1988. – V. 53, № 5. – P. 785–794.
157. The fluorescent cationic dye rhodamine 6G as a probe for membrane potential in bovine aortic endothelial cells / M. Mandala, G. Serck-Hanssen, G. Martino [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1999. – V. 274, № 1. – P. 1–6.
158. Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells / S. Davis, M. Weiss, J.R. Wong [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1985. – V. 260, № 25. – P. 13844–13850.
159. The use of confocal microscopy in quantifying changes in membrane potential / D. Elgar, F. Verdonck, A. Grober [et al.] // *Afr. J. Biotechnol.* – 2006. – V. 5, № 13. – P. 1303–1307.
160. Schneckenburger H. Measurements of mitochondrial deficiencies in living cells by microspectrofluorometry /H. Schneckenburger, P. Gessler, I. Pavenstädt-Grupp // *J. Histochem. Cytochem.* – 1992. – V. 40, № 10. – P. 1573–1578.
161. Fluorescent image cytometry: from qualitative to quantitative measurements / J. Vigo, J.M. Salmon, S. Lahmy [et al.] // *Anal. Cell Pathol.* – 1991. – V. 3, № 3. – P. 145–165.
162. Homogeneous longitudinal profiles and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential / G. Diaz, A.M. Falchi, F. Gremo [et al.] // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 475, № 3. – P. 218–224.
163. Toescu E.C. Assessment of mitochondrial polarization status in living cells based on analysis of the spatial heterogeneity of rhodamine 123 fluorescence staining / E.C. Toescu, A. Verkhratsky // *Pflügers Arch.* – 2000. – V. 440, № 6. – P. 941–947.
164. Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions / O.I. Wagner, J. Lifshitz, P.A. Janmey [et al.] // *J. Neurosci.* – 2003. – V. 23, № 27. – P. 9046–9058.

165. Руководство пользователя Olympus IX71. – Olympus America Inc. – (<http://www.olympus.ua>).
166. Руководство пользователя Ocean Optics, USA. – (<http://oceanoptics.com>).
167. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis / D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24, № 7. – P. 1121–1131.
168. Effect of vitamin E on the severity of myocardial infarction induced by isoproterenol / S.S. Kumari, A. Varghese, D. Muraleedharan, [et al.] // *Indian J. Med. Res.* – 1989. – V. 90 – P. 468–471.
169. Руководство пользователя SPECORD® PC 200/205/210/250. Analytil Jena AG. – 2005. – 43 с.
170. Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке / В. П. Скулачев. – М.: Наука, 1969. – 440 с.
171. Lamprecht W., Trautschold I. / *Methods of enzymatic analysis* // W. Lamprecht, I. Trautschold – New York: Acad. Press., 1965. – P. 543-551.
172. Методы биохимических исследований / [под ред. М.И. Прохоровой]. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с.
173. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
174. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценции / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биологической химии*. – 2009. – № 49. – С. 341–388.
175. Дружина Н. А. Хемилюминесцентные методы в биохимических исследованиях / Н. А. Дружина, А. Ю. Моисеев // *Укр. биохим. журнал*. – 2005. – Т. 77, №2. – С.58–65.
176. Jimenez A. M. Chemiluminescence methods (present and future) / A. M. Jimenez, M. J. Navas // *Grasas y Aceites* – 2002. – V. 53, № 1. – P. 64–75.
177. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal

- stem cells / A.A. Alshatwi, P.V. Subbarayan, E. Ramesh [et al.] // *Food Addit. Contam.* – 2013. – V. 30, № 1. – P. 1–10.
178. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М. Колісник, Г. Колісник, Є. Нідзюлка [та ін.] // *Біологія тварин.* – 2009. – Т. 11, № 1-2. – С. 59–67.
179. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications / J.P. Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira [et al.] // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2, № 3. – P. 175–191.
180. Effects of glutathione and pH on the oxidation of biomarkers of cellular oxidative stress / H. Zhu, M. He, G.L. Bannenberg [et al.] // *Arch. Toxicol.* – 1996. – V. 70, № 10. – С. 628–34.
181. Исследование неферментативного взаимодействия селена и серебра с цистеином и глутатионом с помощью приборного комплекса МХ-5310 / А. В. Новиков, Г. Н. Кошелева, Р. А. Бубляев, [и др.] // *Научное приборостроение.* – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 79–87.
182. Jiang J. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticles dispersions for toxicological studies / J. Jiang, G. Oberdoster, P. Biswas // *J. Nanopart. Res.* – 2009. – № 11. – P. 77–89.
183. Averchenko K.A. Nanoparticles influence on the free-radical processes in model system of adrenaline autooxidation / K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, N.S. Kavok // *Book of Abstracts of XX Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”.* – Beregove (Crimea), 2011. – P. 185.
184. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles evaluated by chemiluminometry / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // *Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”.* – Beregove (Crimea), 2013. – P. 173–174.
185. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles and their complexes in biological systems / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K.

- Klochkov [et al.] // Book of Abstracts of 3rd International Scientific-Technical Conference for Young Scientists «Luminescent Processes in Condensed State of Matter (LUMCOS – 2013)». – Kharkiv (Ukraine), 2013. – P. 55–56.
186. Johnson L.V. Localization of mitochondria in living cells with rodamine 123 / L.V. Johnson, M.L. Walsh, L.B. Chen // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77, № 2. – P. 990–994.
 187. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells // G. Diaz, M.D. Setzu, A. Zucca [et al.] // J. Cell Sci. – 1999. – V. 112. – P. 1077–1084.
 188. Homogeneous longitudinal procses and synchronous fluctuations of mitochondrial transmembrane potential // G. Diaz, A. Falchi, F. Gremo [et al.] // FEBS Lett. – 2000. – V. 475, № 3. – P. 218–224.
 189. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition / F. Di Lisa, P.S. Blank, R. Colonna [et al.] // J. Physiol. – 1995. – V. 486, № 1. – P.1–13.
 190. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells / T. J. Collins, M. Berridge, P. Lipp [et al.] // EMBO J. – 2002. – V. 21, № 7. – P. 1616–1627.
 191. Copper oxide nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in human hepatocarcinoma cells. / M.A. Siddiqui, H.A. Alhadlaq, J. Ahmad [et al.] // Plos One. – 2013. – V. 8, № 8: e 69534.
 192. Ishige K. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms / K. Ishige, D. Schubert, Y. Sagara // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – V. 30, № 4. – P. 433–446.
 193. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells / Y. Wang, W.G. Aker, H.M. Hwang [et al.] // Sci. Total Environ. – 2011. – V. 409, № 22. – P. 4753–4762.

194. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes / A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2004. – V.68, № 2. – P. 244–266.
195. Skulachev V. P. Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group / V. P. Skulachev // Aging Cell. – 2004. – V. 3, № 1. – P. 17–19.
196. Кольтовер В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк / В. К. Кольтовер // Успехи геронтол. – 2000. – Вып. 4. – С. 33–40.
197. Byczkowski J.Z. Interaction of vanadate with respiratory chain of rat liver and wheat seedling mitochondria / J.Z. Byczkowski, L. Zychlinski, J. Tluczkiewicz // Int. J.Biochem. – 1979. – V.10. – P. 1007–1011.
198. Влияние ортованадатов редкоземельных элементов и оксида церия на окислительный баланс изолированных гепатоцитов / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, В.К. Ключков [и др.] // Сборник тезисов Международной молодежной научно-технической конференции «Люминесцентные процессы в конденсированных средах (LUMCOS 2011)». – Харьков (Украина), 2011. – С. 23–24.
199. JC-1 molecular probe-based evaluation of mitochondrial potential changes in single rat hepatocytes exposed to nanoparticles / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, I.A. Borovoy [et al.] // Book of abstracts of the Third “International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM-2011)”. – Gdańsk (Poland), 2011. – P. 147.
200. Производные JC-1 с различной длиной алкильных цепей для оценки митохондриального потенциала гепатоцитов / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, А.М. Степаненко [и др.] // Сборник тезисов Международной молодежной научно-технической конференции «Люминесцентные процессы в конденсированных средах (LUMCOS 2009)». – Харьков (Украина), 2009. – С. 35–36.

201. Метод флуоресцентных зондов для оценки влияния прооксидантных соединений на потенциал митохондрий гепатоцитов крыс разного возраста / Е.А. Аверченко, Н.С. Кавок, А.М. Степаненко [и др.] // Сборник тезисов школы – семинара «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения». – Харьков (Украина), 2009. – С. 22.
202. Emanuel N.M. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis / N. M. Emanuel // IARC Sci. Publ. – 1985. – V. 58. – P. 127–149.
203. Finkel T. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing / T. Finkel, N. J. Holbrook // Nature. – 2000. – V. 408, № 6809. – P. 239–247.
204. Druge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Druge // Physiol. Rev. – 2002. – V. 82, № 1. – P. 47–95.
205. Stadtman E. R. Protein oxidation in aging and age-related diseases / E.R. Stadtman // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2001. – V. 928. – P. 22–38.
206. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria / M. Lopez-Torres, R. Gredilla, A. Sanz [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – V. 32, № 9. – P. 882–889.
207. Wei Y. H. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging / Y.H. Wei, H.C. Lee // Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2002. – V. 227, № 9. – P. 671–682.
208. Age-related increases in oxidatively damaged proteins of mouse kidney mitochondrial electron transport chain complexes / K.B. Choksia, J.E. Nussb, W.H. Boystonc [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – V. 43, № 10. – P. 1423–1438.
209. Pamplona R. Membrane fatty acid unsaturation, protection against oxidative stress, and maximum life span: a homeoviscous-longevity adaptation / R. Pamplona, G. Barja, M. Portero-Otin // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2002. – V. 959. – P. 475–490.

210. Phaneuf S. Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age / S. Phaneuf, C. Leeuwenburgh // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2002. – V. 282, № 2. – P. R423–R430.
211. Zhu Y. Age-related changes in glutathione and glutathione-related enzymes in rat brain / Y. Zhu, P. M. Carvey, Z. Ling // *Brain Res.* – 2006. – V. 1090, № 1. – P. 35–44
212. Tian L. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging / L. Tian, Q. Cai, H. Wei // *Free Radic. Biol. Med.* – 1998. – V. 24, № 9. – P. 1477–1484.
213. Влияние пептидных биорегуляторов и мелатонина на показатели биологического возраста и продолжительности жизни мышей / В. Н. Анисимов, В. Х. Хавинсон, Н. Ю. Заварзина [и др.] // *Успехи геронтол.* – 2000. – Вып. 4. – С. 88–96.
214. Vohra B. P. Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs / B. P. Vohra, S. P. Sharma, V. K. Kansal // *Indian J. Biochem. Biophys.* – 2001. – V. 38, № 5. – P. 321–326.
215. Хавинсон В. Х. Молекулярная физиология старения / В. Х. Хавинсон, В. Г. Морозов, В. В. Малинин // *Успехи геронтол.* – 2001. – Вып. 7. – С. 65–71.
216. Паранич А. В. Возрастные особенности становления и стабилизации антиокислительного гомеостаза у крыс / А. В. Паранич // *Биологический вестник.* – 1997. – Т. 1, № 2. – С. 43–47
217. De A.K. Age-associated changes in antioxidants and antioxidative enzymes in rats / A. K. De, R. Darad // *Mech. Ageing Dev.* – 1991. – V. 59, № 1–2. – P. 123–128.
218. Age-related change in the alpha-tocopherolquinone/alphatocopherol ratio in the rat erythrocyte membrane / K. Yanagawa, H. Takeda, T. Matsumiya [et al.] // *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* – 1999. – V. 36, № 5. – P. 335–341.

219. Glutathione metabolism in heart and liver of the aging rat / M. Stio, T. Iantomasi, F. Farilli [et al.] // *Biochem. Cell Biol.* – 1993. – V. 72. – P. 58–61.
220. Изменение антиокислительной активности липидов при старении / Е.Б. Бурлакова, Е.М. Молочкина, Н.П. Пальмина, [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1976. – Т. 22, № 4. – С. 541–546.
221. Воскресенский О. Н. Влияние природных биоантиоксидантов на патологические процессы, связанные со старением / О. Н. Воскресенский // *Итоги науки и техники. ВИНТИ. Общие проблемы биологии.* – 1986. – Т. 5. – С. 163–201.
222. Мамаев В.Б. Замедление старения антиоксидантами: медико-биологические аспекты / Мамаев В. Б. – Черногоровка, 1988. – 70 с. – (Препринт / АН СССР, Ин-т химической физики).
223. Buzea C. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity / C. Buzea, I. Pacheco Blandino, K. Robbie // *Biointerphases.* – 2007. – V. 2, № 4. – P. MR17–71.
224. Абрамова Ж.И. Человек и противooksидлительные вещества / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер; ред. Н. В. Саватеев – Ленинград: Наука, 1985. – 230 с.
225. Кулинский В. И. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатионпероксидазы / В.И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // *Успехи соврем. биологии.* – 1993. – Т. 113, №. 1. – С. 107–122.
226. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты [Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.]. – М.: Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.
227. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study / M.A. Aon, B.A. Stanley, V. Sivakumaran [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2012. – V. 139, № 6. – P. 479–491.
228. Evaluation of effects of rare-earth- based nanoparticles on isolated rat’s hepatocytes / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, [et al.] // *Book of Abstracts of Ukrainian – German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology.* – Kyiv (Ukraine), 2015. – P. 251.

229. Oxidative processes in biological systems in the presence of rare-earth doped nanoparticles / K.A. Averchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Book of abstracts of 9-th International Conference “Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9)”. – Lviv (Ukraine), 2013. – P. 130–131.