

УДК 546.655.4-31:57.085.23

**Н.М. Жолобак¹, З.М. Олевинская¹, Н.Я. Спивак¹, А.Б. Щербаков²,
В.К. Иванов³, А.В. Усатенко⁴**

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина

²Национальный университет пищевых технологий,
ул. Владимирская, 68, Киев, 01033, Украина

³Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
пр-т Ленинский, 31, Москва, 119991, Россия

⁴НИИ Нанотехнологической индустрии Университета «Украина»,
ул. Хорива, 1г, Киев, 04071, Украина

АНТИВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ПОЛИАКРИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Исследовано антивирусное действие зелей наночастиц диоксида церия (SeO_2) в культуре клеток млекопитающих. Впервые показано их ингибирующее влияние на развитие цитопатического действия (ЦПД) тест-вируса везикулярного стоматита (ВВС) при условии 24-часового предварительного контакта с клетками L929 и ЕРТ. Установлено, что эффективность защитного действия зависит от исходного прекурсора и способа получения водных зелей наночастиц SeO_2 .

Ключевые слова: антивирусное действие, наночастицы SeO_2 , низкомолекулярная полиакриловая кислота, культуры клеток млекопитающих.

Соединения церия делительное время применяются в медицине [8]. Однако, биологические свойства нанокристаллического диоксида церия малоизучены. Сегодня данное соединение является одним из самых перспективных объектов наномедицины, что обусловлено его сравнительно низкой токсичностью [10] и высокой кислородной нестехиометрией [3]. Последний факт обеспечивает влияние нанокристаллического диоксида церия на целый ряд биохимических процессов. Например, показано [5], что введение нанодисперсного диоксида церия ($d = 3-5$ нм) увеличивает выживаемость нейронов спинного мозга крысы. В работе [10] показа-

© Н.М. Жолобак, З.М. Олевинская, Н.Я. Спивак, А.Б. Щербаков, В.К. Иванов, А.В. Усатенко, 2010

но, что наночастицы CeO_2 диаметром 6-12 нм, не являются цитотоксичными по отношению к клеткам линии нейробластомы мышей HT22 и мышинным макрофагам линии RAW164.

В наших предыдущих исследованиях также подтверждена низкая цитотоксичность наночастиц CeO_2 , а также зависимость их цитотоксического действия от исходного прекурсора, способа получения, метода обработки и стабилизатора [11].

Целью наших исследований было изучение антивирусного действия группы созданных нанокристаллических коллоидных растворов CeO_2 в перевиваемых культурах клеток млекопитающих.

Материалы и методы. Водные золи наночастиц CeO_2 , стабилизированные низкомолекулярной полиакриловой кислотой, получали, как описано [11]. Синтез наночастиц диоксида церия проводили с использованием разных прекурсоров: церия (III) азотнокислого (растворы А3-А6) и церия (IV) сернокислого (растворы Б2-Б4). В качестве стабилизатора коллоидного раствора использовали полиакриловую кислоту (ПАК). Количественный состав наночастиц, стабилизатора, а также характеристика водных зольей наночастиц CeO_2 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Объекты исследования

Шифр объекта	Состав		Характеристика водных зольей наночастиц CeO_2	Диапазон исследованных концентраций (CeO_2 , мкг/мл)
	CeO_2 мг/мл	ПАК мг/мл		
А3	20,0	7,0	на поверхности наночастиц максимальное количество гидроксосоединений церия (III) в виде гидроксида и (частично) оксида, возрастает доля Ce (IV)	5,0 – 1000,0
А4	3,5	7,0	закристаллизованные наночастицы Ce (IV) на поверхности которых содержится некоторое количество гидроксида церия (III)	7,0 – 900,0
А5	3,5	7,0	обработка золя H_2O_2 , присутствует остаточный токсичный моноперокситригидроксид церия	0,7 – 175,0
А6	5,0	7,0	минимальное содержание гидроксосоединений церия (III) и пероксидных соединений; образовались наночастицы CeO_2	2,5 – 625,0
Б2	2,8	5,0	наночастицы содержат максимальное количество гидроксидов в виде $\text{Ce}(\text{OH})_4$	0,5 – 150,0
Б3	2,8	10,0	наночастицы содержат большое количество Ce (IV) в виде гидроксида и (частично) оксида	1,0 – 140,0
Б4	5,0	15,0	золь с минимальным содержанием гидроксосоединений церия; образовались наночастицы CeO_2	2,0 – 250,0
ПАК	–	105,0	–	–

Примечание. В качестве исходного прекурсора использованы: Ce (III) азотнокислый (А3-А6), Ce (IV) сернокислый (Б2-Б4).

В работе использовали культуры клеток: референтную клеточную линию фибробластов мышей (L929) и эпителиальных клеток тестикул эмбрионов поросят (ЕРТ) из музея клеточных культур Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

Для формирования монослоя клеток в лунки планшетов (96-луночные платы «Costar», США) вносили по 0,1 мл суспензии, содержащей 5×10^5 клеток/мл, и инкубировали 24 час при 37 °С в термостате ТС-80 М-2, в атмосфере с влажностью 98 %, содержащей 5 % CO_2 . В качестве среды роста использовали синтетическую питательную среду 199 («Биотестлаборатория», Украина), содержащую 5–10 % эмбриональной сыворотки телят («Sigma», США), 25 мМ НЕПЕС, 10 мМ глутамина, пенициллина и стрептомицина (по 100 ед/мл каждого).

В состав поддерживающей среды входили: среда 199, 2 % эмбриональной сыворотки телят, 25 мМ НЕПЕС, 10 мМ глутамина, пенициллин и стрептомицин (по 100 ед/мл каждого). Для промывки монослоя клеток использовали среду 199 без сыворотки.

Антивирусное действие исследуемых зольей наночастиц CeO_2 определяли по изменению интенсивности цитопатического действия вируса (ЦПД) везикулярного стоматита (ВВС) на клетки L929 и ЕРТ. Использовали две схемы внесения исследуемых зольей к монослою клеток:

профилактическую (за 24 часа до инфицирования) и схему, предусматривающую внесение различных двукратных разведений растворов через 30 мин. после инфицирования ВВС. Учет развития характерного ЦПД ВВС проводили через 24 часа после инфицирования клеток. Каждое разведение исследуемого вещества испытывали трехкратно. В качестве контроля использовали ПАК, которую добавляли к монослою клеток в концентрациях 0,005–5,0 мкг/мл.

Подсчет количества клеток осуществляли после их окраски кристалл-виолетом [9]. Для этого из лунок удаляли надосадочную жидкость, а к клеткам на 15 минут вносили 0,2 % раствор красителя Crystal Violet («Sigma», США) в 2 % этаноле. Краситель удаляли, а окрашенный монослой клеток промывали под проточной водой и высушивали. Оптическую плотность окрашенных клеток измеряли на спектрофотометре с вертикальным лучом LabsystemMultiscan (Великобритания) при длине волны 540 нм. Процент задержки развития ЦПД ВВС учитывали по отношению количества живых клеток в лунках, обработанных исследуемыми золями наночастиц, к контрольным неинфицированным с учетом уровня развития ЦПД в контрольных инфицированных ВВС лунках по формуле:

$$\left(\frac{P_{\text{оп}} - P_{\text{кв}}}{P_{\text{контр}} - P_{\text{кв}}} \right) \times 100, \text{ где}$$

$P_{\text{оп}}$ – показатели оптической плотности опытных лунок,

$P_{\text{контр}}$ – интактных неинфицированных лунок,

$P_{\text{кв}}$ – оптическая плотность в лунках контроля вируса.

На основании полученных данных определяли IC_{100} и IC_{50} – концентрации растворов, вызывающие соответственно 100 % и 50 % задержку развития ЦПД ВВС в культуре клеток, а также ЕС – минимальную эффективную концентрацию, обеспечивающую максимальное ингибирование развития ЦПД ВВС в культуре клеток [2].

Крутизну кривой потери активности, связанной со снижением концентрации, определяли по соотношению IC_{100}/IC_{50} , по величине которого судили о диапазоне эффективного действия исследованных растворов.

Результаты и их обсуждение. Некоторыми исследователями показано, что ПАК обладает антивирусной активностью как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*, в том числе в первичной культуре эмбриональных фибробластов крысы и клеток почек кролика против ВВС, Синдбис вируса и вируса осповакцины [6, 7]. В связи с тем, что ПАК в наших исследованиях использовалась как стабилизатор растворов наночастиц, был определен диапазон ее антивирусного действия в культурах клеток L929 и ЕРТ.

Установлено, что внесение ПАК сопровождалось задержкой развития ЦПД ВВС во всех испытанных культурах клеток. Минимальная концентрация ПАК, обеспечивающая 100 % ингибирование развития ЦПД ВВС в культурах клеток L929 и ЕРТ в профилактической схеме, составила соответственно 124,0 и 195,0 мкг/мл (табл. 2 и 3). Необходимо отметить, что при внесении ПАК через 30 мин. после инфицирования, культура клеток ЕРТ оказалась значительно менее чувствительной к ее защитному действию: внесение ПАК тормозило развитие ЦПД ВВС не более чем на треть, тогда как в культуре клеток L929 эффективность использования ПАК практически не отличалась от профилактической схемы введения. Указанный факт различной чувствительности клеток к защитному действию ПАК, вероятно, обусловлен разной природой клеточных культур.

В связи с выявленной антивирусной активностью ПАК, эффективность исследованных зольей оценивали с учетом возможного ее влияния в составе растворов на антивирусный эффект наночастиц SeO_2 . Учитывали эффект таких концентраций растворов, которые находились вне пределов антивирусного действия ПАК.

Оказалось, что профилактическая обработка клеточных культур золями наночастиц SeO_2 вызывала формирование в клетках состояния противовирусной резистентности: 100 % задержку развития ЦПД ВВС наблюдали при концентрации наночастиц SeO_2 в 10–20 раз более низких, чем ПАК. При этом растворы наночастиц, полученные с использованием в качестве прекурсора солей Се (IV), характеризовались более высокой антивирусной активностью: в культурах клеток L929 и ЕРТ IC_{100}/IC_{50} золя Б4, содержащего минимальные концентрации гидроксосоединений церия, составил, соответственно, 5 и 10, что свидетельствовало о широком диапазоне эффективных концентраций.

Внесение коллоидных растворов наночастиц SeO_2 к культуре клеток ЕРТ через 30 мин. после инфицирования не обеспечивало 100 % защиты монослоя от цитодеструктивного дей-

ствия ВВС (табл. 2). С другой стороны, в культуре фибробластов мышей наблюдался 100 % защитный эффект при внесении к клеткам золя А3, в котором на поверхности наночастиц присутствует максимальное количество гидроксосоединений церия (III). Достаточно широкий диапазон его активности ($IC_{100}/IC_{50} = 4$) может быть связан с вирус-повреждающим действием гидроксосоединений. Необходимо отметить, что золи, где в качестве прекурсора использовали соли Се (IV), в процессе формирования наночастиц теряли антивирусную активность в культуре инфицированных клеток. Так, золь Б4, эффективный в профилактической схеме использования, был полностью лишен активности при внесении его к монослою предварительно инфицированных клеток L929 и ЕРТ. Указанное явление, вероятнее всего, связано с уменьшением в составе золя количества гидроксосоединений церия (IV) и пероксидных соединений.

Таблица 2

Антивирусное действие зольей наночастиц SeO_2 в культуре клеток L929

Профилактическая обработка					Обработка клеток после инфицирования				
Золь SeO_2	E_{max} , %	$C(E_{max})$, мкг/мл	IC_{50} мкг/мл	IC_{100}/IC_{50}	Золь SeO_2	E_{max} , %	$C(E_{max})$, мкг/мл	IC_{50} мкг/мл	IC_{100}/IC_{50}
А3	100	15,0	5,0	3,0	А3	100	8,0	2,0	4,0
А4	60	30,0	20,0	–	А4	–	–	20,0	–
А5	100	6,0	1,5	4,0	А5	–	–	2,0	–
А6	100	7,6	2,0	3,8	А6	–	–	20,0	–
Б2	60	10,0	5,0	–	Б2	80	5,0	0,5	–
Б3	100	7,5	1,5	5,0	Б3	85	2,0	0,3	–
Б4	100	10,0	2,0	5,0	Б4	–	–	–	–
ПАК	100	124,0	40,0	3,1	ПАК	100	75,0	25,0	3,0

Примечания:

E_{max} , % – максимальная степень защиты монослоя клеток от цитопатического действия (ЦПД) ВВС;

$C(E_{max})$, мкг/мл – минимальная концентрация раствора SeO_2 , при которой наблюдается E_{max} ;

IC_{50} – концентрация SeO_2 , которая приводит к 50%-ному ингибированию ЦПД ВВС;

прочерк – отсутствие эффекта.

Таблица 3

Антивирусное действие зольей наночастиц SeO_2 в культуре клеток ЕРТ

Профилактическая обработка					Обработка клеток после инфицирования				
Золь SeO_2	E_{max} , %	$C(E_{max})$, мкг/мл	IC_{50} мкг/мл	IC_{100}/IC_{50}	Золь SeO_2	E_{max} , %	$C(E_{max})$, мкг/мл	IC_{50} мкг/мл	IC_{100}/IC_{50}
А3	100	10,0	5,0	2,0	А3	–	–	–	–
А4	25	20,0	–	–	А4	24	14,0	–	–
А5	100	5,0	1,4	3,6	А5	25	1,4	–	–
А6	75	20,0	15,0	–	А6	24	19,0	–	–
Б2	100	6,8	2,0	3,4	Б2	60	35,0	25,0	–
Б3	–	–	–	–	Б3	36	35,0	–	–
Б4	100	10,0	1,0	10,0	Б4	–	–	–	–
ПАК	100	195,0	75,0	2,6	ПАК	36	100,0	–	–

Примечания:

E_{max} , % – максимальная степень защиты монослоя клеток от цитопатического действия (ЦПД) ВВС;

$C(E_{max})$, мкг/мл – минимальная концентрация раствора SeO_2 , при которой наблюдается E_{max} ;

IC_{50} – концентрация SeO_2 , которая приводит к 50%-ному ингибированию ЦПД ВВС;

прочерк – отсутствие эффекта.

Таким образом, нами впервые исследована чувствительность культур клеток млекопитающих – L929, ЕРТ – к защитному антивирусному действию водных зольей наночастиц SeO_2 , стабилизированных полиакриловой кислотой, отличающихся исходным прекурсором и последующей обработкой. При этом показано, что антивирусное действие исследованных зольей зависит от способа получения, а также метода обработки водных зольей наночастиц SeO_2 , который определяет, в частности, содержание в системе гидроксосоединений церия и/или перекисных соединений.

Помимо этого, свой вклад в наблюдаемый противовирусный эффект золей (в диапазоне высоких концентраций) вносит также и стабилизатор – соль низкомолекулярной полиакриловой кислоты. Указанный факт связан с ее способностью активировать гены иммунного ответа (IR-гены) главного комплекса гистосовместимости [4], обеспечивая т.о. адекватный (генетически контролируемый) ответ на контакт с антигеном. Подобные результаты были получены М.Г. Бостанджяном и Л.Л. Фадеевой (1975). Ими была показана противовирусная активность поливинилпирролидона, являющегося, как и ПАК, полиэлектролитом с контролируемой структурой. Защитный эффект в культуре почек эмбриона свиньи против ВВС и в клетках фибробластов эмбриона человека против вируса простого герпеса обеспечивали сопоставимые с полученными нами для ПАК концентрации сополимера поливинилпирролидона, составившие 40–50 мкг/мл [1].

Показано, что золи, где в качестве прекурсора использовали соли Се (IV), содержащие сформированные наночастицы CeO_2 в концентрации 2,0–10,0 мкг/мл при профилактической схеме внесения ко всем исследованным культурам клеток, обладают способностью формировать состояние противовирусной резистентности.

Представленные результаты открывают перспективу для углубленного изучения биологических эффектов, а также возможности для практического применения синтезированных нами водных дисперсий наночастиц CeO_2 .

*Н.М. Жолобак¹, З.М. Олевінська¹, М.Я. Співак¹, О.Б. Щербаков²,
В.К. Іванов³, О.В. Усатенко³*

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

²Національний університет харчових технологій, Київ

³Інститут загальної та неорганічної хімії ім. Н.С. Курнакова РАН, Москва

⁴ІНДІ Нанотехнологічної індустрії Університету «Україна», Київ

АНТИВІРУСНА ДІЯ НАНОЧАСТИНОК ДИОКСИДУ ЦЕРІУ, СТАБІЛІЗОВАНИХ НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОЮ ПОЛІАКРИЛОВОЮ КИСЛОТОЮ

Резюме

Досліджено антивірусну дію золів наночастинок діоксиду церію (CeO_2) в культурі клітин свавців. Вперше показано їх інгібуючу дію на розвиток цитопатичної дії (ЦПД) тест-вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) за умови їх 24-годинного попереднього контакту з клітинами L929 і EPT. Встановлено, що ефективність захисної дії залежить від вихідного прекурсору та способу отримання водних золів наночастинок CeO_2 .

Ключові слова: антивірусна дія, наночастинки CeO_2 , низкомолекулярна поліакрилова кислота, культури клітин свавців.

*N.M.Zholobak¹, Z.M.Olevinskaya¹, N.Y.Spivak¹, A.B.Shcherbakov²,
V.K.Ivanov³, A.V.Usatenko⁴*

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National University of Food Technologies, Kyiv

³Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

⁴Research Institute of Nanotechnological Industry of the University "Ukraine", Kyiv

ANTIVIRAL EFFECT OF CERIUM DIOXIDE NANOPARTICLES STABILIZED BY LOW-MOLECULAR POLYACRYLIC ACID

Summary

Antiviral activity of nanosize cerium dioxide sols (CeO_2) in animal cell culture has been studied. The inhibiting effect of the mentioned sols upon reproduction of vesicular stomatitis test-virus was demonstrated for the first time in case of preliminary 24-hour contact with cells lines L929 and EPT. The effectiveness of protective action depends on initial precursor and the way of obtained water nanosize nanosols.

The paper is presented in Russian.

Key words: antiviral effect, nanoparticles, nanosize, vesicular stomatitis, precursor, nanosols.

The author's address: Zholobak N.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, D03680, Ukraine.

1. Бостанджян М.Г., Фадеева Л.Л. Невирусные продуценты интерферона – Ереван, «Айастан» – 1975. – 120 с.

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації за ред. О.В. Стефанова / Міністерство охорони здоров'я України. Державний фармакологічний центр. – Київ, 2001. – С. 390 – 392.
3. *Иванов В. К., Щербаков А. Б., Усатенко А. В.* Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия // *Успехи химии.* – 2009. – **78**, №9. – С. 924-941.
4. Применение иммуномодуляторов в хирургической практике / Методическое пособие. – М., 2004. – 52 с.
5. *Das M., Patil S., Bhargava N. et al.* Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons // *Biomaterials.* – 2007. – **28**, N 10. – P.1918-1925.
6. *De Somer, P., E. De Clercq, A. Billiau et al.* Antiviral activity of polyacrylic and polymetacrylic acids. I. Mode of action in vitro // *J. Virol.* – 1968. – **2**, N 9. – P.878-885.
7. *De Somer, P., E. De Clercq, A. Billiau et al.* Antiviral activity of polyacrylic and polymetacrylic acids. II. Mode of action in vivo // *J. Virol.* – 1968. – **2**, N 9. – P.886-893.
8. *Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K.* Pharmacological properties of cerium compounds // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2005. – **153**. – P.101-111.
9. *Medvedev A.E., Fuchs B.B., Rakhmievich A.L.* A study of the action of immunosuppressive factors from tumor cells on lymphocytes and macrophages in vitro and on the graft-versus-host reaction in mice // *Biomed. Sci.* – 1990. – **3**, N 1. – P.261-266.
10. *Schubert D., Dargusch R., Raitano J., Chan S.-W.* Cerium and yttrium oxide nanoparticles are neuroprotective // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* – 2006. – **342**. – P.86-91.
11. *Zholobak N.M., Olevinskaya Z.M., Spivak N.Y. et al.* In vitro toxicity of aqueous sols of CeO₂ nanoparticles stabilized by LMW polyacrylic acid // *Ukrainian-Hungarian days for the extending of the bilateral cooperation participated countries: Ukraine, Hungary, Slovak Republic, Romania, Czech Republic.* (Uzhhorod, Ukraine, 3 – 4 November 2009). – Uzhhorod, 2009. – P.19..

Отримано 14.04.2009