

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Аверченко Катерина Андріївна

УДК [546.65:577.359-022.532]:577.337

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

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті сцинтиляційних матеріалів Науково-технологічного комплексу "Інститут монокристалів" НАН України

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Єфімова Світлана Леонідівна**, Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, завідувач відділу нанокристалічних матеріалів.

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор **Гордієнко Ольга Іванівна**, провідний науковий співробітник відділу низькотемпературного консервування Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

доктор фізико-математичних наук, **Косевич Марина Вадимівна**, старший науковий співробітник, провідний науковий співробітник відділу молекулярної біофізики Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України.

Захист відбудеться " ____ " _____ 2016 р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий " ____ " _____ 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Берест В.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 наночастинки. Також вважаються перспективними для антиоксидантної терапії інші типи редоксактивних НЧ на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ). Активовані Європійем 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, деполаризація 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 $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) 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, хеміолюмінометрія, 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 [1,8,9] – 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 [2,12-14] – в отриманні спектрів хемілюмінесценції та оцінці здатності НЧ різних розмірів впливати на інтенсивність вільно-радикальних процесів в абіотичних і біотичних системах;

- у роботах [3,10,11,16] – 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 [6,15] – вивчення впливу НЧ на вільно-радикальні реакції в модельних біосистемах.

- у роботі [7] – у аналізі основних механізмів впливу наночастинок 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми дисертаційної роботи, проаналізовано сучасний стан проблем, пов'язаних з її темою, сформульовано мету та основні задачі дослідження, наведено основні наукові та практичні результати, а також дані про апробацію роботи та публікації автора.

Перший розділ «Вплив редоксактивних наночастинок на процеси в біосистемах. Огляд літератури» є оглядовим. У цьому розділі розглянуто та проаналізовано біомедичне використання НМ та галузі використання НЧ на основі РЗЕ. Особлива увага приділяється токсичним та захисним властивостям НЧ на основі РЗЕ. Наведено дані щодо механізмів впливу НЧ на генерацію АФК в біологічних системах. Розглянуто математичні розрахункові моделі, які описують сайти та механізми генерації АФК в МХ. Наведено дані про роль

дисфункції МХ в прояві токсичних ефектів НЧ. Виконано розширений огляд робіт, присвячених ефектам НЧ на тлі окислювального дисбалансу, викликаного дією несприятливих факторів та старінням.

У другому розділі «Експериментальна техніка та методики дослідження» надано опис експериментального обладнання для вимірювання спектрів поглинання, хемілюмінесценції, наведено методику мікрофлуориметрії та мікроспектроскопії, стисло викладено методи синтезу та характеристики НЧ РЗЕ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) і CeO_{2-x} , методи отримання клітин.

В роботі використовували НЧ ортованадатів різних розмірів – $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (1-2 нм), $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (25×8 нм), $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (57×6-8 нм) і НЧ CeO_{2-x} з розмірами 1-2 нм та 8-10 нм. Розміри та морфологію НЧ твердої фази гідрозолів оцінювали за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії на електронному мікроскопі ПЕМ 125К (Selmi, Україна), прискорююча напруга 100 кВ (Рис. 1). Розподіл нанокристалів за розмірами та значення дзета-потенціалу визначали за методом динамічного розсіювання світла на аналізаторі ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., США) при куті розсіювання 90°.

Для виконання роботи використовували білих щурів-самців лінії Вістар 3-х та 20-ти місячного віку. Дослідження проводили згідно з вимогами «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших дослідних цілях» (Страсбург, Франція 1986). Всі маніпуляції з тваринами виконували під поверхневим ефірним наркозом.

Гепатоцити виділяли неферментативним методом. Життєздатність клітин оцінювали за забарвленням вітальним барвником 0.4% трипановим синім. Життєздатність гепатоцитів становила близько 90 – 95 %.

В дисертаційній роботі використовували органічний барвник JC-1 – 5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраетилбензimidазол карбоцианін йодид для оцінки $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів. Спостереження за змінами флуоресценції J-агрегатів зонду дає можливість досліджувати $\Delta\Psi_m$ в динаміці. Зонд JC-1 було синтезовано у відділі нанокристалічних матеріалів ІСМА НАН України (м. Харків). Чистота зонду контролювалася методом тонкошарової хроматографії, структура доведена за допомогою ^1H -ЯМР. Вихідний (1 мМ) розчин барвника в ДМСО розводили безпосередньо перед експериментом до необхідної концентрації. Концентрація зонду в інкубаційному середовищі становила 10^{-6} М. Концентрація клітин становила 5×10^5 кл/мл.

Мікроспектрофлуориметрію поодиноких клітин проводили за допомогою спектрометра USB4000 (Ocean Optics, USA), з'єданого волоконним світловодом з мікроскопом Olympus IX71. Програмне забезпечення – Ocean Optics SpectraSuite® Spectrometer Operating Software.

Флуоресцентний аналіз поодиноких клітин проводили за допомогою інвертованого люмінесцентного мікроскопа Olympus IX71 (Olympus, Tokyo, Japan), оснащеного цифровою камерою (C-5060 Olympus, Tokyo, Japan), програмне забезпечення – DP-soft 5.0 software (Olympus, Tokyo, Japan).

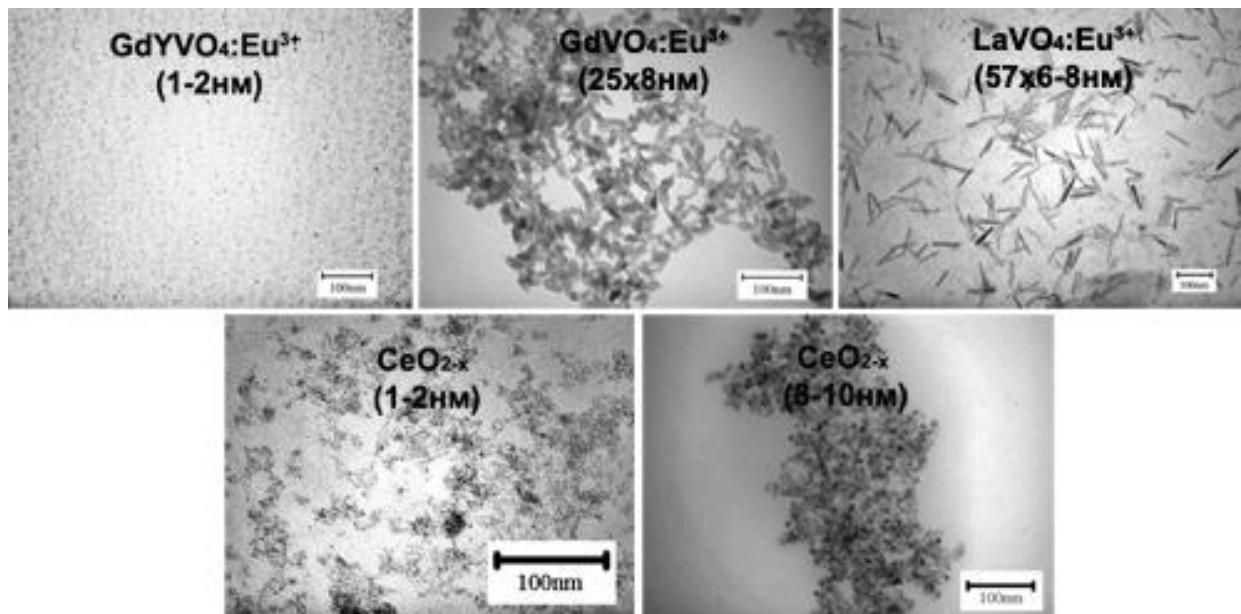


Рисунок 1. ПЕМ зображення НЧ, що досліджувались.

Обробка цифрових зображень здійснювалась за допомогою програми Adobe Photoshop за алгоритмом, що ґрунтується на аналізі гистограми яскравісної складової зображення та дозволяє розраховувати для кожної клітини інтегральну інтенсивність флуоресценції, нормовану відносно фону.

МХ виділяли методом диференційного центрифугування з гомогенату печінки. Дихання мітохондрій визначали полярографічним методом за допомогою закритого кисневого електроду Кларка в термостатованій ячійці (30°C). Субстратами окислення служили глутамат (4 мМ) та малат (4 мМ).

Вплив НЧ на життєздатність клітин оцінювали за допомогою МТТ-тесту. Оцінку впливу НЧ на інактивацію вільних радикалів в абіотичних (без біологічного матеріалу) і біотичних (з вмістом біологічного матеріалу) системах проводили за допомогою люмінол-залежної хемілюмінесценції (ХЛ) з реактивом Фентона, та за рівнем кінцевого продукту окислення ліпідів – малонового діальдегіду (МДА) Спектри ХЛ вимірювали за допомогою хемілюмінометра «Lum-5773», Росія. Оцінювали показники світлосуми ХЛ за 5 хвилин та максимальну амплітуду спалаху ХЛ. Спектри поглинання вимірювались на спектрофотометрі Specord 200 (Analytic Jena, Німеччина) за двохпроменевою оптичною схемою. Використовували кювети з довжиною оптичного шляху 0,2 або 1 см.

Результати вимірювань, виконаних в роботі, виражені у відсотках (за 100 % прийняті показники в кожній досліджуваній системі без НЧ).

Також детально розглянуто обчислювальну кінетичну модель Маркевича та Хоєка, що описує основні комплекси генерації АФК у дихальному ланцюзі МХ, та застосовується у дисертаційній роботі для оцінки механізмів впливу НЧ на МХ.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програм «Statistika v 6.0» (StatSoft, США). При статистичній обробці перевіряли характер розподілу даних у вибірках та проводили дисперсійний аналіз. Дані представлені як середня арифметична і похибка середнього.

Третій розділ «Дослідження здатності наночастинок на основі рідкісноземельних елементів інактивувати радикали в модельних системах» присвячено дослідженню здатності НЧ в залежності від матеріалу та розмірів впливати на баланс вільних радикалів в модельних абіотичних та біотичних системах.

При дослідженнях було виявлено, що дія біологічно активних НЧ в різних модельних системах має різний характер.

В абіотичній модельній системі з реактивом Фентона, всі досліджувані НЧ демонструють антиоксидантну активність незалежно від матеріалу (очікувана для наночастинок CeO_{2-x}) та розмірів (Рис. 2 а).

В модельній системі з ліпопротеїнами яєчного жовтка було встановлено, що найбільш виражені антиоксидантні властивості притаманні CeO_{2-x} розміром 8-10 нм (38 ± 8 % від контролю), та CeO_{2-x} розміром 1-2 нм (53 ± 8 % від контролю) – ці частинки знижували рівень МДА, проте всі ортованадатні НЧ (1-2 нм, 25×8 нм, $57 \times 6-8$ нм) суттєво не вплинули на рівень МДА (97 ± 7 , 86 ± 6 , 79 ± 13 % від контролю, відповідно).

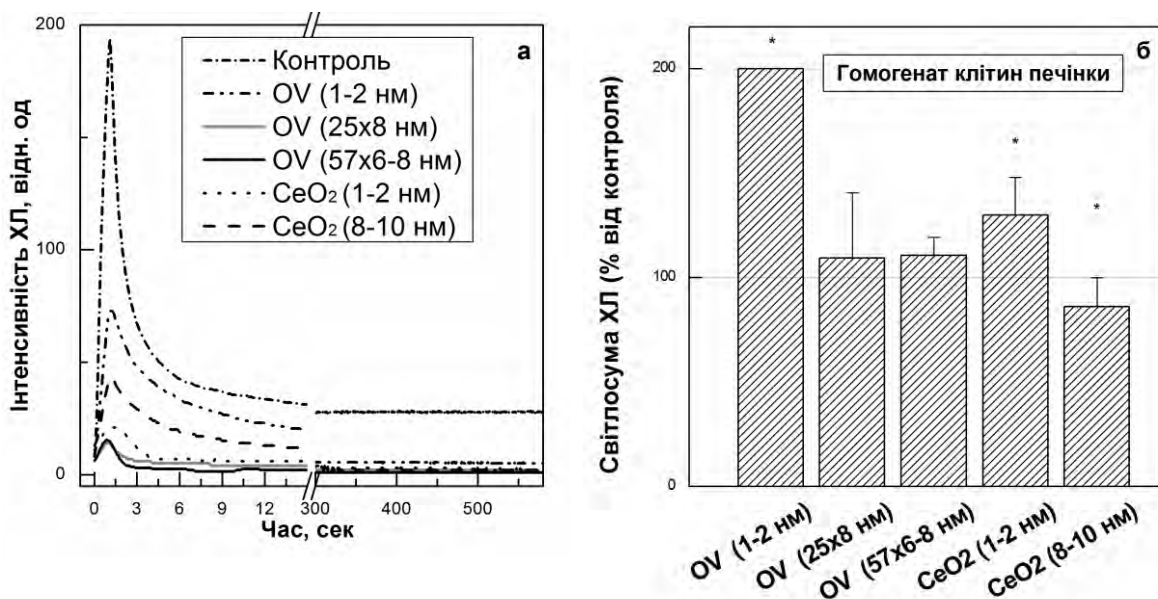


Рисунок 2. Вплив НЧ на баланс радикалів в абіотичній (а) та біотичній (б) модельних системах за показником ХЛ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

В біотичній системі з гомогенатом клітин печінки сферичні ортованадатні НЧ та малі частинки діоксиду церію викликають додаткову генерацію радикалів (Рис. 2 б). Треба підкреслити, що в ізолюваних МХ також

спостерігався виразний прооксидантний ефект малих ортованадатних НЧ – $176 \pm 19\%$ від контролю. В ізольованих гепатоцитах малі сферичні частинки ортованадатів та CeO_{2-x} також чинили прооксидантний вплив – підвищували

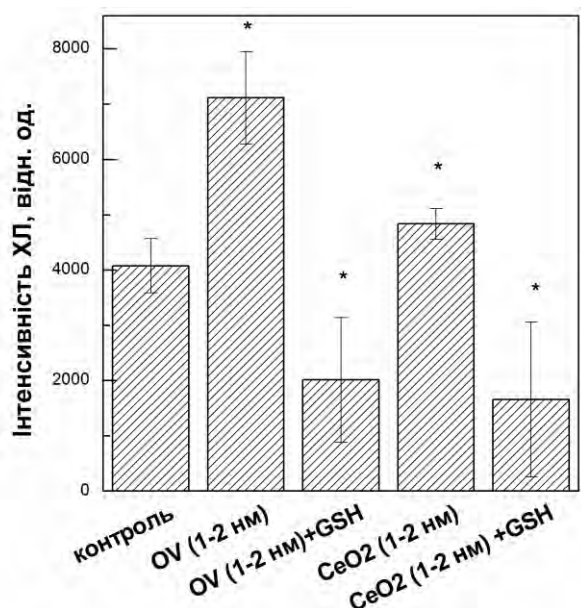


Рисунок 3. Вплив малих сферичних НЧ і відновленого GSH на інтенсивність генерації радикалів в модельній біотичній системі (гомогенат клітин печінки) (показник інтенсивності ХЛ); (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

рівень МДА ($118 \pm 10\%$ та $118 \pm 13\%$, відповідно). Дія ортованадатних частинок більших розмірів виявилася нейтральною (для 25×8 нм – $91 \pm 10\%$ та для $57 \times 6-8$ нм – $102 \pm 23\%$). Таким чином, для малих НЧ в системах, що містять клітинний матеріал, знайдена (особливо виражена для ортованадатних НЧ) здатність підвищувати інтенсивність генерації радикалів.

Слід зазначити, що в усіх досліджуваних системах, які містять МХ відбувається інверсія антиоксидантних ефектів НЧ, і це підтверджує наше припущення, що МХ є основною мішенню для досліджених НЧ. Важливу роль в реалізації прооксидантних ефектів досліджуваних НЧ мають їх фізико-хімічні властивості та розміри. Можна припустити, що зростаюча зі зменшенням розмірів НЧ реакційна

здатність проявляється через взаємодію в біотичних системах на молекулярному рівні з прооксидантними або антиоксидантними ферментними системами та біомолекулами, які беруть участь в регуляції окисного балансу, наприклад, глутатіоном (GSH). GSH відіграє ключову роль в захисті клітин від оксидативного стресу: він не тільки захищає клітину від АФК, а в цілому визначає редокс-статус внутрішньоклітинного середовища.

Як видно на рис. 3, додавання в систему з гомогенатом клітин печінки GSH призводить до того, що НЧ з прооксидантними властивостями – малі ортованадатні і діоксид церію – втрачають здатність посилювати генерацію радикалів. В експериментах на ізольованих гепатоцитах було показано, що прооксидантний вплив НЧ (за накопиченням МДА) залежить від рН середовища. Ефект можна пояснити змінами в системі відновлений / окислений GSH, що залежать від кислотно-лужного балансу. Це є важливим через те, що характер цих змін має визначальну роль в регуляції мітохондріальних процесів.

Четвертій розділ «Вплив наночастинок на мітохондріальний потенціал та процеси дихання і окислювального фосфорилування. Механізми дії наночастинок на мітохондріальні процеси» присвячено дослідженню впливу редоксактивних НЧ різних розмірів на динаміку змін $\Delta\Psi_m$ ізольованих

гепатоцитів та процеси дихання та окислювального фосфорилування ізольованих МХ.

Як було показано в попередньому розділі, вплив НЧ на редокс-процеси визначається як властивостями НЧ, так і властивостями мікрооточення, а також тим, що МХ є мішенню прооксидантної дії НЧ. Тому для визначення впливу редоксактивних НЧ на стан МХ в динаміці оцінювали зміни трансмембранного мітохондріального потенціалу *in situ*. Відомо, що $\Delta\Psi_m$ є показником функціонального стану МХ та значно впливає на генерацію АФК, грає важливу роль у синтезі АТФ, апоптозі. В дисертаційній роботі для оцінки $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів використовували метод мікрофлуориметрії з застосуванням флуоресцентного зонду JC-1. При накопиченні JC-1 в МХ відбувається оборотна зміна кольору флуоресценції з зеленого на жовтогарячий, що пов'язано з утворенням J-агрегатів і появою в спектрі флуоресценції нової довгохвильової екситонної смуги J-агрегатів. При зниженні потенціалу мембрани, відбувається деагрегація барвника і зникнення смуги J-агрегатів.

В даний час залишається відкритим питання про те, як НЧ проникають в клітини. Спостерігаючи за зміною $\Delta\Psi_m$ в присутності нокодазолу і цитохолазіну (інгібіторів ендоцитозного транспорту, $C = 10$ мкМ), можна судити про факт і механізми проникнення НЧ в клітини. Малі частинки ортованадатів викликають падіння потенціалу МХ як за присутності, так і за відсутності інгібіторів ендоцитозу, а це означає, що дані частинки здатні проникати в клітини дифузійно, без участі ендоцитозу (Рис. 4 а).

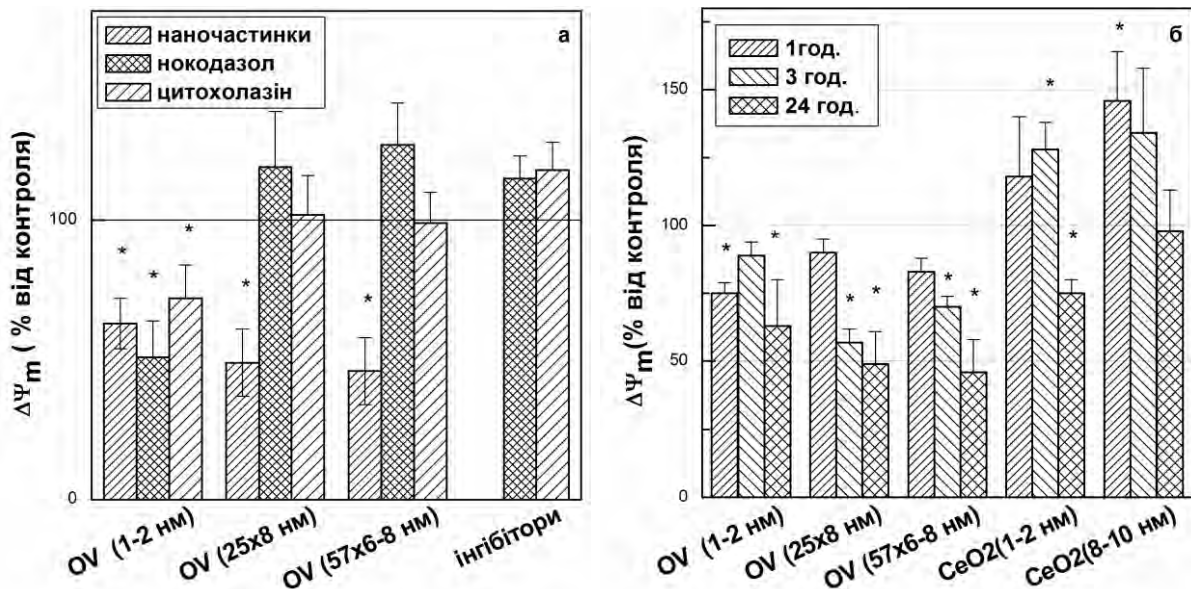


Рисунок 4. Дослідження $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів при впливі НЧ за допомогою зонда JC-1: *а* – оцінка механізмів проникнення НЧ різних розмірів в клітини – зміни $\Delta\Psi_m$ під впливом НЧ при пригніченні ендоцитозу інгібіторами; *б* – зміни $\Delta\Psi_m$ під впливом НЧ в динаміці;

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

Ортованадатні частинки з розмірами 25×8 нм та $57 \times 6-8$ нм після застосування інгібіторів падіння потенціалу не спричинили, а значить, основним шляхом проникнення для частинок з таким розміром є ендоцитоз (Рис. 4 а). Швидкість проникнення малих ортованадатних НЧ пояснює їх здатність порушувати мітохондріальну функцію вже з першої години впливу на ізольовані клітини (Рис. 4 б). Більш повільне пригнічення мітохондріальної функції під впливом ортованадатних частинок більших розмірів (25×8 нм та $57 \times 6-8$ нм), ймовірно, обумовлене їх надходженням до клітин шляхом ендоцитозу. Через 24 години спостерігається зниження мітохондріального потенціалу під впливом усіх НЧ, крім діоксиду церію розміром 8-10 нм (Рис. 4 б), що свідчить про зниження енергізації мембрани МХ, наслідком чого може бути аномальна продукція АФК та розвиток оксидативного стресу у клітинах. Для більш детального вивчення механізму дії НЧ досліджували їх вплив безпосередньо на процеси дихання ізольованих МХ. Визначали такі показники: швидкість субстратного дихання в стані V_2 , швидкість фосфорилуючого дихання V_3 , дихальний контроль (ДК), який є співвідношенням швидкостей V_3/V_2 і характеризує ступінь спряження процесів дихання і окислювального фосфорилування, рівень АТФ в мітохондріях після впливу НЧ.

В даних експериментальних умовах спостерігалось незначне зниження ДК під впливом і сферичних ортованадатних частинок (Рис. 5 а), хоча ці частинки значно знижують швидкість субстратного дихання в стані V_2 та V_3 у порівнянні з контролем. Так, зокрема, швидкість V_2 при додаванні малих частинок ортованадатів знижувалася в 2,5 рази (контрольне значення – $15,62 \pm 0,69$ нат O_2 /хвил \times мг білка, для малих НЧ – $5,9 \pm 0,09$ нат O_2 /хвил \times мг білка), а швидкість V_3 – більш ніж в 3 рази (контрольне значення – $83,95 \pm 4,38$ нат O_2 /хвил \times мг білка, для малих НЧ – $25,41 \pm 1,26$ нат O_2 /хвил \times мг білка).

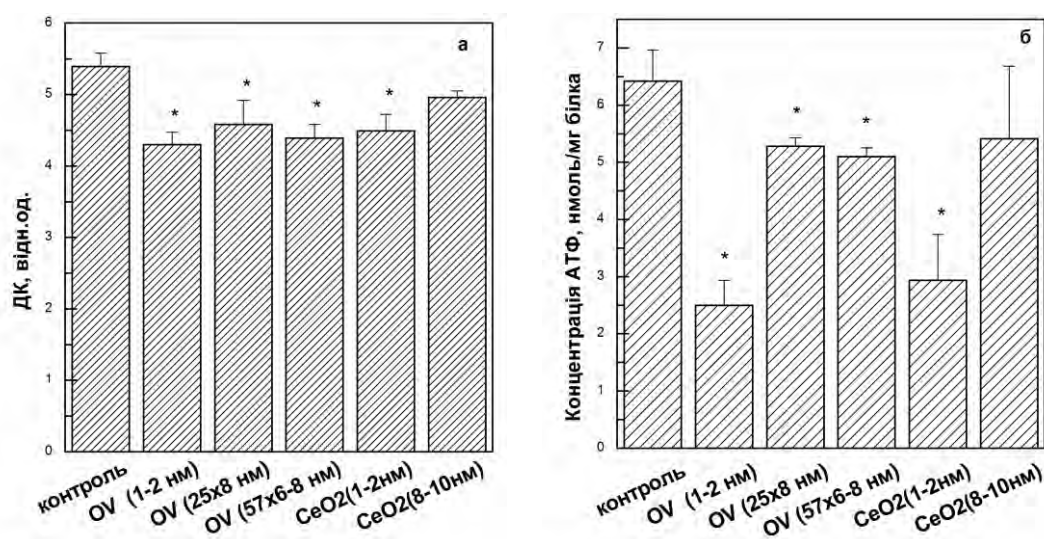


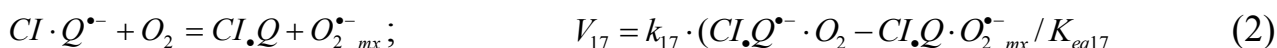
Рисунок 5. Вплив НЧ на основні показники ізольованих мітохондрій: а – дихальний контроль; б – концентрація АТФ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Це пояснюється відносно однаковим за ступенем інгібуванням швидкостей V_2 і V_3 цими частинками. Більші ортованадатні частинки також не чинили суттєвого впливу на ДК, V_2 чи V_3 . CeO_{2-x} розміром 8-10 нм не впливав на ДК, V_2 та V_3 , а менші НЧ діоксиду церію знижують тільки V_3 . Під впливом всіх частинок ортованадатів і малих частинок CeO_{2-x} рівень АТФ в МХ знижений (Рис. 5 б), причому найбільше це зниження виражене у малих сферичних частинок – ортованадатів і CeO_{2-x} . Ефекти, що спостерігаються, можуть бути пов'язані з редоксактивністю НЧ та їх здатністю безпосередньо втручатися в електрон-транспортні процеси в якості пасток або генераторів вільних радикалів. Для малих сферичних частинок, як ортованадатів, так і діоксиду церію, не можна виключати також можливості проникнення до МХ, механічного пошкодження мембран внаслідок їх малих розмірів і високої схильності до агрегації.

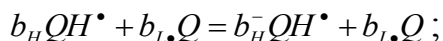
Те, що майже всі НЧ пригнічують мітохондріальне дихання за виключенням CeO_{2-x} розміром 8-10 нм, підтверджує дані, отримані з допомогою зонду JC-1 та свідчить про те, що мішенню в дії досліджуваних редоксактивних НЧ є саме біоенергетичні процеси в МХ.

Таким чином, показано, що дія НЧ, за винятком діоксиду церію розміром 8-10 нм, на біоенергетичні процеси в МХ проявляється в пригніченні і роз'єднанні процесів дихання і фосфорилування, деполяризації мембрани МХ, падінні рівня АТФ, і пов'язана з активацією утворення АФК. Дія НЧ може реалізуватися за участю декількох механізмів: перший механізм – інгібування транспорту електронів НЧ. Молекулярний механізм даного процесу можна пояснити, застосовуючи діючу кінетичну модель, яка описує продукцію супероксидного радикала в електрон-транспортному ланцюзі, запропоновану Маркевичем і Хоеком (N.I. Markevich, J.V. Hoek // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – V. 1847. – P. 656–679). Дана модель описує процеси перенесення електронів в комплексах I і III, збільшення генерації супероксидного радикала при пригніченні цих комплексів інгібіторами, враховує зміни рН і $\Delta\Psi_m$ в генерації АФК. У даній моделі за допомогою ряду реакцій описується перенесення електронів від повністю відновленого флавіну на кисень (реакція 1, (Markevich N.I., 2015)) з утворенням супероксиду, так само передбачається, що семіхінон в комплексі з CI.Q (реакція 2, (Markevich N.I., 2015)) є джерелом генерації супероксиду в комплексі I при дії інгібіторів. Подібний механізм можливий і при дії НЧ. Тобто вбудовування НЧ в мембрани, безпосередня взаємодія з переносниками електронів може призводити до пригнічення транспорту електронів і активації утворення супероксиду та перекису водню.

У відповідності до моделі, зростання швидкості генерації супероксиду під впливом НЧ, насамперед, може бути пов'язано зі зміною констант і швидкостей даних реакцій.



Експериментальні та розрахункові результати моделювання показують, що зворотні реакції на ділянці Q_i можуть відігравати важливу роль у формуванні АФК при інгібуванні комплексу III антимиціном А (реакція 3, (Markevich N.I., 2015)).



$$V_{34} = k_{34} \cdot (b_H \cdot QH^\bullet \cdot b_L^- \cdot Q - b_H^- \cdot QH^\bullet \cdot b_L \cdot Q \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\Psi / R \cdot T)) / K_{eq34} \quad (3)$$

Другий механізм – інтеграція НЧ в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів електронів. НЧ діоксиду церію, відповідно з редокс-потенціалом пари $Ce^{4+}/Ce^{3+} = +1440$ мВ, здатні перехоплювати електрони з дихального ланцюга та переносити їх на гідроксильний радикал з його нейтралізацією $OH^\bullet/HO^- = +1900$ мВ (Рис. 6). Проте виведення електронів з дихального циклу впливає на ефективність фосфорилування. Для НЧ ортованадатів виведення електронів з дихального циклу менш імовірно, оскільки значення редокс-потенціалу допуючої пари Eu^{3+}/Eu^{2+} нижче значень для переносників дихального ланцюга МХ. Однак нейтралізація гідроксильного радикала також можлива, що підтверджується результатами аналізу в безклітинних системах.

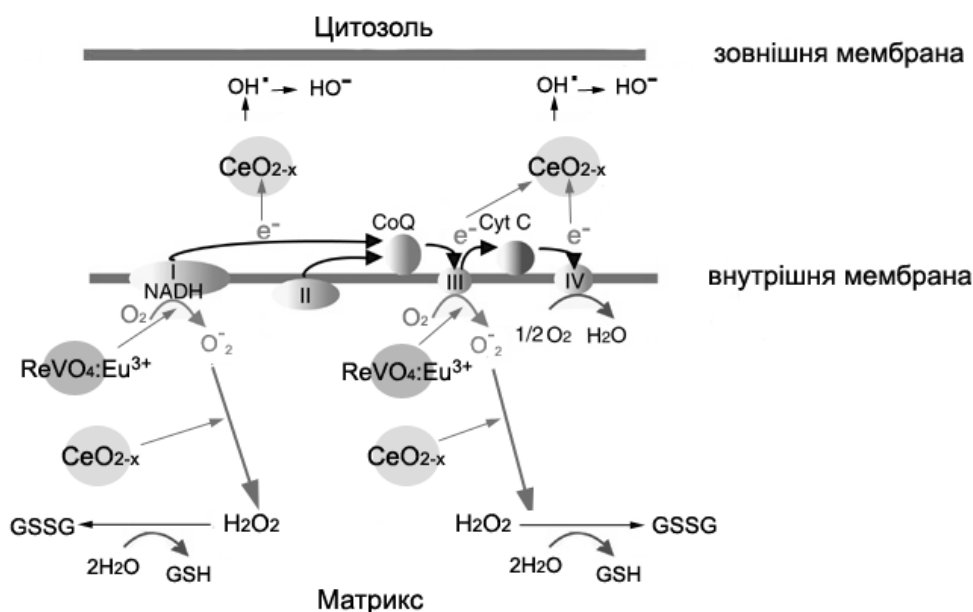


Рисунок 6. Запропонована модель механізмів дії НЧ на біоенергетичні процеси в мітохондріях.

Під впливом ортованадатних НЧ можливе утворення супероксиду в МХ без пригнічення дихального ланцюга – за механізмом редокс-циклінга, з переносом електрона на кисень відповідно до значень редокс-потенціалів пари $O_2/O_2^{\bullet-} = -137$ мВ і допуючого іона $Eu^{3+}/Eu^{2+} = -350$ мВ (Рис. 6).

П'ятий розділ «Вплив наночастинок на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів різного віку» висвітлює особливості впливу НЧ ортованадатів та CeO_{2-x} на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку, а саме 3-

місячних та 20-місячних, та вікові відмінності в ефектах тіольних протекторів та хімічних індукторів оксидативного стресу в присутності НЧ.

Старіння призводить до зниження ефективності антиоксидантної системи клітин і збільшення інтенсивності окислювальних процесів, супроводжується оксидативним стресом. Тому передбачається, що вплив редоксактивних НЧ на МХ, який, як було показано в попередніх главах, залежить від мікрооточення в біосистемах, у гепатоцитах старих щурів буде мати значні відмінності. Проведені дослідження вказують, що найбільші вікові розбіжності виявлені для малих частинок ортованадатів – під їх впливом в гепатоцитах старих тварин через 24 год. відбувається суттєве падіння $\Delta\Psi_m$ (Рис. 7 а,б), причому цей процес має концентраційну залежність: МХ в клітинах старих тварин виявляють чутливість вже до малих концентрацій НЧ. Як ми встановили раніше, в присутності GSH НЧ не чинять прооксидантну дію. Крім того, GSH відіграє ключову роль в регуляції $\Delta\Psi_m$, вікових перебудовах, є субстратом для багатьох ферментів. Тому питання щодо захисту МХ від прооксидантного впливу НЧ тіольними антиоксидантами набуває особливого значення. З літератури відомо, що концентрація GSH в печінці, мозку і серці щурів істотно знижується при старінні; з віком відбувається збільшення концентрації окисленого GSH в МХ печінки, мозку і нирок. Використані в даних експериментах тіолові сполуки GSH та N-ацетилцистеїн мають відмінності у дії проти негативного впливу НЧ.

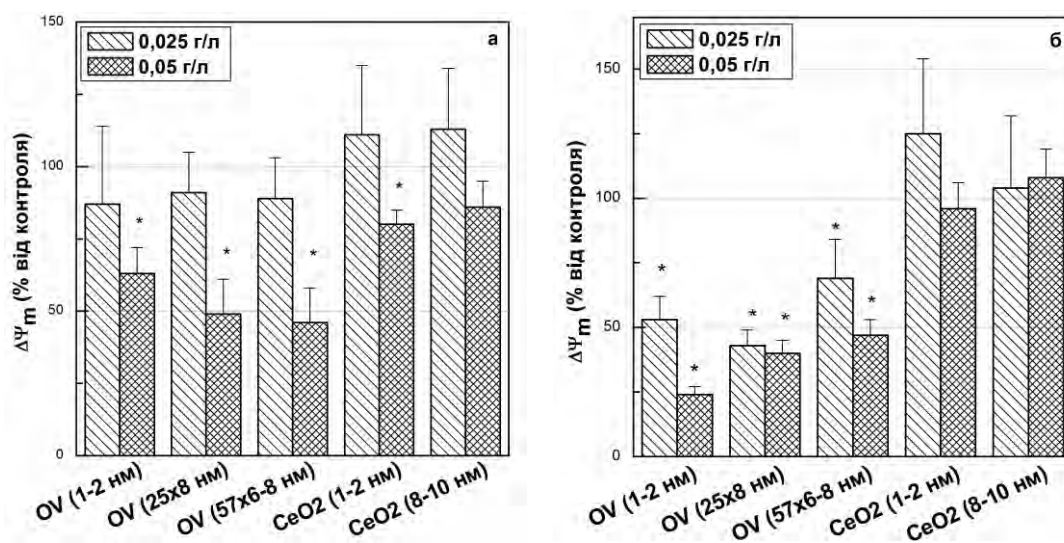


Рисунок 7. Динаміка змін $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку (а – 3 міс. та б – 20 міс.) під впливом НЧ різних концентрацій; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Так, GSH, на відміну від N-ацетилцистеїну, забезпечує повний захист МХ, як в умовах впливу НЧ, так і при дії хімічних індукторів оксидативного стресу. Причому в МХ старих тварин під впливом GSH в окремих випадках спостерігалось підвищення $\Delta\Psi_m$ над рівнем контролю (Таблиця 1). За даними літератури, GSH може транспортуватися всередину клітин в незмінному

вигляді, і безпосередньо захищати внутрішньоклітинні структури, і що надважливо, МХ та ядерний апарат. N-ацетилцистеїн тільки частково захищає МХ від впливу НЧ, оскільки є попередником енерговитратного процесу синтезу GSH, що в умовах порушення мітохондріальної функції та зниження синтезу АТФ може бути недостатнім для нейтралізації ефектів НЧ (Таблиця 1).

Таблиця 1.

Захисний вплив глутатіону (2 мМ) та N-ацетилцистеїну (NAC) (5 мМ) на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку на тлі дії прооксидантів та НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

	$\Delta\Psi_m$, % від контролю	
	3 міс. щури	20 міс. щури
1 мМ H ₂ O ₂ 50 мкМ t-BHP	81±9* 4±1*	108±10 5±1*
GSH	133±6	116±11
GSH + 1 мМ H ₂ O 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

Пояснюючи молекулярний механізм дії НЧ можна припустити, що утворення перекису водню в МХ в присутності НЧ може безпосередньо відбуватися в ферментних комплексах дихального ланцюга, а також за рахунок дисмутації супероксида, який утворюється завдяки власній супероксиддисмутаза-подібній активності НЧ діоксиду церію (Рис. 6). Дані процеси призводять до підвищеного витрачання GSH. Це підтверджується тим, що в роботі ми спостерігаємо захисну дію екзогенного GSH, який є необхідним для роботи ферментів, відповідальних за утилізацію перекису водню.

Парадоксальну стабілізацію $\Delta\Psi_m$ і відсутність токсичного ефекту НЧ було відмічено в гепатоцитах молодих тварин при дослідженні сумарного впливу НЧ та прооксидантів, але в клітинах старих тварин подібний ефект не спостерігався (Рис. 8 а,б). Зважаючи на те що адаптаційні ресурси клітини мобілізуються внаслідок помірної генерації АФК, під впливом прооксидантів в застосованих концентраціях сумарний ефект проявляється як збереження рівня $\Delta\Psi_m$. Вікові

відмінності можуть бути пов'язані з меншою реактивністю захисних антиоксидантних систем та низькою забезпеченістю GSH.

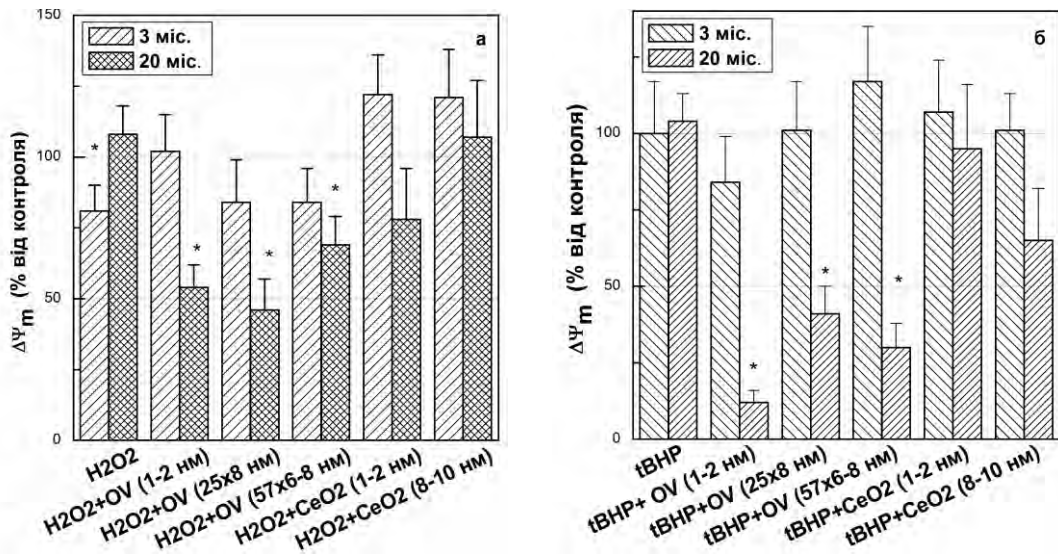


Рисунок 8. Сумарний вплив прооксидантів (а – H₂O₂; б – *t*-ВНР) та НЧ на $\Delta\Psi_m$ гепатоцитів щурів різного віку. Концентрація H₂O₂ становила 1мМ, *t*-ВНР – 5мкМ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем).

Помірна генерація АФК здатна запускати внутрішньоклітинні антиоксидантні системи і є одним з базових механізмів захисту клітин від оксидативного стресу. Цей механізм запропоновано раніше для пояснення ефектів інших типів НЧ на основі РЗЕ. Таким чином, на рівні клітин і організму НЧ можуть діяти як непрямі антиоксиданти. Їх ефекти можуть проявлятися не лише шляхом прямого антирадикального впливу, що ми спостерігали в модельних безклітинних системах, а як активація внутрішньоклітинних сигнальних процесів для відновлення окислювального балансу.

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 ReVO₄:Eu³⁺ (Re = Gd, Y, 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 наночастинки 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 помірною 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.

Перелік опублікованих праць за темою дисертації.

1. Оценка митохондриального потенциала изолированных гепатоцитов при изменении окислительного статуса / **Е.А. Аверченко**, Н.С.Кавок, А.М. Степаненко, И.А.Боровой, М.Ю. Малюкина // *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. Ключков, Ю.В. Малюкин // *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, **К.А. Аверченко**, V.K. Klochkov, S.L. Yefimova, Yu.V. Malyukin // *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 / **К.А. Аверченко**, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, S.L. Yefimova, M.Yu. Malyukina, O.O. Sedyh, S.A. Klimov // *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, В.К. Клочков, М.Ю. Малюкина, С.А. Климов, Е.Н. Ткачева, С.Л. Ефимова // *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 / **К.А. Аверченко**, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, O.O. Sedyh, S.L. Yefimova, Yu.V. Malyukin // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – V. 31, № 2. – P. 138–145.
7. Щодо механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів на редокс-процеси в митохондріях / К.А. Аверченко, Н.С. Кавок, С.Л. Ефімова // *Біофізичний вісник*. – 2016. – Вып. 35, № 1. – С. 10–20.
8. 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.А. Боровой // сборник тезисов школы – семинара «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения». – Харьков (Украина), 2009. – С. 22.
9. Производные JC-1 с различной длиной алкильных цепей для оценки митохондриального потенциала гепатоцитов / **Е.А. Аверченко**, Н.С. Кавок, А.М. Степаненко, И.А. Боровой, О.С. Фильчак // Сборник тезисов Международной молодежной научно-технической конференции «Люминесцентные процессы в конденсированных средах (LUMCOS 2009)». – Харьков (Украина), 2009. – С. 35-36.
10. JC-1 molecular probe-based evaluation of mitochondrial potential changes in single rat hepatocytes exposed to nanoparticles / **К.А. Аверченко**, N.S. Kavok, I.A. Borovoy, V.K. Klochkov, A.I. Malyshenko // *Book of abstracts of the Third “International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM-2011)”*. – Gdańsk (Poland), 2011. – P. 147.
11. Влияние ортованадатов редкоземельных элементов и оксида церия на окислительный баланс изолированных гепатоцитов / **Е.А. Аверченко**, Н.С. Кавок, В.К. Клочков, О.О. Седых, И.А. Боровой // Сборник тезисов Международной молодежной научно-технической конференции «Люминесцентные процессы в конденсированных средах (LUMCOS 2011)». – Харьков (Украина), 2011. – С. 23–24.
12. Nanoparticles influence on the free-radical processes in model system of adrenaline autooxidation / К.А. Аверченко, 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.
13. Oxidative processes in biological systems in the presence of rare-earth doped nanoparticles / **K.A. Averkhenko**, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, O.O. Sedyh, M.Yu. Malyukina. // Book of abstracts of 9-th International Conference “Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9)”. – Lviv (Ukraine), 2013. – P. 130-131.
 14. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles evaluated by chemiluminometry / **K.A. Averkhenko** N.S. Kavok, V.K. Klochkov, O.S. Sedyh, M.Yu. Malyukina // Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”. – Beregove (Crimea), 2013. – P. 173-174.
 15. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles and their complexes in biological systems / **K.A. Averkhenko**, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, O.S. Sedyh, M.Yu. Malyukina // 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.
 16. Evaluation of effects of rare-earth- based nanoparticles on isolated rat’s hepatocytes / **K.A. Averkhenko**, N.S. Kavok, V.K. Klochkov, Yu.V. Malyukin // Book of Abstracts of Ukrainian – German symposium on physics and chemistry of nanostructures and on nanobiotechnology. – Kyiv (Ukraine), 2015. – P. 251.

АНОТАЦІЯ

Аверченко К.А. Механізми впливу редоксактивних наночастинок ($\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ і CeO_{2-x}) на біоенергетичні процеси в мітохондріях. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню механізмів впливу редоксактивних наночастинок (НЧ) на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ) на біоенергетичні процеси в мітохондріях (МХ). Отримані дані вказують на існування значних відмінностей у біологічній активності НЧ на основі РЗЕ в механізмах впливу на функцію МХ. Ці особливості визначаються фізико-хімічними параметрами, розмірами частинок, параметрами мікрооточення і вихідними характеристиками редокс-процесів в біосистемах. Здатність НЧ впливати на інтенсивність генерації радикалів узгоджується з їх здатністю порушувати процеси в МХ: виявлено найбільшу чутливість мітохондріального потенціалу ($\Delta\Psi_m$) клітин і процесів дихання і окислювального фосфорилування до дії всіх, і, особливо, малих НЧ, виключаючи діоксид церію розміром 8-10 нм. Показано, що характер відповіді $\Delta\Psi_m$ на вплив НЧ має вікові особливості і відрізняється за динамікою, ступенем змін і чутливістю до супресії при однакових концентраціях частинок. Знайдені особливості дії НЧ на мітохондріальну активність є підставою і важливим кроком для наступних

етапів дослідження частинок з метою їх застосування в якості діагностичних агентів або терапевтичних препаратів.

Ключові слова: наночастинки, рідкісноземельні елементи, мітохондріальний потенціал, мітохондріальне дихання, окислювальне фосфорилування, генерація радикалів, гепатоцити, тіолові протектори, редоксактивність, біоенергетика, механізми.

ABSTRACT

Averchenko K.A. Mechanisms of influence of redox-active nanoparticles (ReVO_4 : Eu^{3+} and CeO_{2-x}) on the bioenergetic processes in mitochondria. – Right of manuscript.

Thesis for scientific degree of Candidate of Sciences in Physics and mathematics. Specialty 03.00.02 – Biophysics. V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to the study of the basic mechanisms of influence of redox-active nanoparticles (NPs) on the basis of rare earth elements on the bioenergetic processes in mitochondria. The data obtained show the significant difference in biological activity of different rare earth based NPs, and most importantly, difference in their influence on the mitochondrial function. These features are determined by physicochemical properties, size of NPs, parameters of microenvironment and characteristics of the redox processes in biosystems. The ability of NPs to influence on the speed of free radical processes correlates with their ability to disrupt mitochondrial processes: the highest sensitivity of mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) and processes of respiration and oxidative phosphorylation to the action of all types of NPs, especially for small NPs, excluding cerium oxide with sizes of 8-10 nm, has been observed. It has been found that the character of $\Delta\Psi_m$ response on the NPs influence has age features and is different in the dynamics of response, in degree of changes, and sensitivity to suppression at equal concentrations of particles. Determined features of NPs action on the mitochondrial activity provide the basis and present an important step for the next stages of the study of particles for use as diagnostic agents or therapeutics.

Key words: nanoparticles, rare-earth elements, mitochondrial potential, mitochondrial respiration, oxidative phosphorylation, generation of radicals, hepatocytes, thiol protectors, redox-activity, bioenergetics, mechanisms.

АННОТАЦИЯ

Аверченко Е.А. Механизмы влияния редоксактивных наночастиц (ReVO_4 : Eu^{3+} и CeO_{2-x}) на биоэнергетические процессы в митохондриях. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена исследованию основных механизмов влияния редоксактивных наночастиц (НЧ) на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) (диоксида церия и ортованадатов) на биоэнергетические

процессы в митохондриях (МХ). Установлена взаимосвязь между физико-химическими параметрами и размерами НЧ и их влиянием на интенсивность генерации радикалов, способность индуцировать изменения митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в гепатоцитах, а также подавлять процессы дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных МХ. Влияние НЧ с различными размерами на интенсивность образования активных форм кислорода (АФК), антиоксидантные и прооксидантные свойства частиц исследованы с помощью люминесцентных и спектрометрических методов в модельных системах. В биотических системах, в отличие от абиотических, в которых все исследованные НЧ демонстрировали антирадикальные свойства, малые (1-2 нм) НЧ ортованадатов и диоксида церия проявляли способность усиливать интенсивность генерации свободных радикалов, причем данные эффекты зависели от наличия в исследуемой системе МХ.

С помощью флуоресцентного зонда JC-1 зарегистрированы индуцированные НЧ изменения $\Delta\Psi_m$ в изолированных гепатоцитах. Выяснен механизм проникновения НЧ в клетки: малые частицы (1-2 нм) попадают в клетки путем адсорбции-диффузии, а большие (с размерами 25×8 и $57 \times 6-8$ нм) – с помощью эндоцитоза. Несмотря на механизмы проникновения в клетки, все типы ортованадатных НЧ и малые частицы диоксида церия вызывали падение $\Delta\Psi_m$ по завершению эксперимента (24 ч.). Выявлено угнетающее действие всех НЧ (исключая диоксид церия 8-10 нм) на интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования изолированных МХ, особенно выраженное для малых НЧ. Исследована роль тиоловых антиоксидантов в механизмах защиты $\Delta\Psi_m$ от негативного влияния НЧ: экзогенный глутатион предотвращал подавление $\Delta\Psi_m$. Показано, что характер ответа $\Delta\Psi_m$ на воздействие НЧ имеет возрастные особенности: клетки старых животных более чувствительны к действию частиц. При совместном действии прооксидантов и НЧ у молодых крыс происходит стабилизация $\Delta\Psi_m$, что можно объяснить эффектом преадаптации на фоне умеренного образования АФК. На основе кинетической модели предложены механизмы влияния НЧ на редокс-процессы в МХ.

Таким образом, полученные данные указывают на существование существенных различий в биологической активности НЧ и, что особенно важно, в механизмах влияния на функцию МХ. Эти особенности определяются физико-химическими свойствами, размерами частиц, параметрами микроокружения и выходными характеристиками редокс-процессов в биологических системах. Найденные особенности действия НЧ на МХ являются основанием и важным шагом для следующих этапов исследования частиц с целью их применения в качестве диагностических агентов или терапевтических препаратов.

Ключевые слова: наночастицы, редкоземельные элементы, митохондриальный потенциал, митохондриальное дыхание, окислительное фосфорилирование, генерация радикалов, гепатоциты, тиоловые протекторы, редоксактивность, биоэнергетика, механизмы.