



МАЛЮКІН
Юрій Вікторович — член-кореспондент НАН України, доктор фізико-математичних наук, професор, провідний науковий співробітник відділу наноструктурних матеріалів Інституту скінтіляційних матеріалів НАН України

НОВІТНІ ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ НАНОМАТЕРІАЛИ: ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ, БІОМЕДИЧНІ ТА ТЕХНІЧНІ ЗАСТОСУВАННЯ

За матеріалами наукової доповіді на засіданні Президії НАН України 11 жовтня 2017 року

У доповіді наведено результати досліджень люмінесцентних властивостей нового класу наноматеріалів — поліфункціональних редокс-активних нанокристалів, які можуть брати активну участь у біологічних процесах, що відбуваються на рівні окремих клітин, і водночас характеризуються наявністю власної люмінесценції, інтенсивність якої корелює з про-/анти-оксидантною дією наночастинок. Зокрема, у ролі таких наночастинок проаналізовано нанокристали діоксиду церію та ортованадатів рідкісноземельних елементів, активованих іонами Європію, як найбільш перспективні редокс-активні наноматеріали. Дослідження, проведені за допомогою методів стаціонарної та розподіленої у часі спектроскопії в умовах контрольованої зміни редокс-статусу їх оточення, показали, що зазначені наночастинки можуть як безпосередньо демонструвати анти-/прооксидантну дію, так і відігравати роль проміжної ланки в процесах генерації синглетного кисню молекулами-фотосенсибілізаторами. Показано перспективність використання отриманих нанокристалів для біомедичних застосувань — як матеріалів для потреб фотодинамічної терапії і антиоксидантів.

Ключові слова: нанокристали, антиоксиданти, фотодинамічна терапія.

За останні 10–15 років до переліку медичних засобів, рекомендованих Всесвітньою організацією охорони здоров'я, було включено цілу низку наноматеріалів, які були розроблені для потреб біомедичної галузі і пройшли всі стадії попередніх досліджень — *in vitro*, *in vivo* та клінічні тестування [1]. Цей список включає в себе наноконтейнери для цільової доставки ліків, наночастинки — контрастні агенти (зокрема, для магнітно-резонансної терапії), наносенсиори та біоактивні наночастинки як компоненти біоімплантатів. Значна кількість розробок у цій галузі дозволяє говорити про появу окремого напрямку в медичному матеріалознавстві — *наномедицини* [2].

На сьогодні ключовим завданням наномедицини є перехід від наночастинок як пасивного агента для доставки ліків та візуалізації внутрішньоклітинних процесів до наночастинок, які могли б брати активну участь у метаболізмі живої клітини і контролювано впливати на біохімічні процеси всередині клітини [3]. З цієї точки зору одними з найперспективніших об'єктів є редокс-активні наночастинок, зокрема нанокристали з іонами змінної валентності. Такі нанокристали можуть істотно впливати на окисдаційний баланс живої клітини та/або стабілізувати рівень активних форм кисню (АФК) у клітині, що, в свою чергу, може сприяти подоланню негативних наслідків окисдаційного стресу чи, навпаки, призводити до додаткової генерації АФК і, як наслідок, контролюваного знищення клітини (що актуально, наприклад, при онкологічних захворюваннях) [4, 5].

При цьому однією з ключових проблем, що обмежує використання редокс-активних наночастинок у медицині, є створення механізмів ефективного контролю анти-/прооксидантної активності нанокристалів у живих клітинах. З цього погляду найбільший інтерес становлять нанокристали з іонами змінної валентності, які мають власну люмінесценцію, — насамперед нанокристали, активовані рідкісноземельними (РЗ) іонами. Люмінесценція нанокристалів, активованих РЗ-іонами, характеризується значною фотостабільністю, що уможливує довготривалий моніторинг їх редокс-активності в біологічних зразках.

Наночастинок для контролю рівня активних форм кисню в живій клітині

Проблема боротьби з окисдаційним стресом у живій клітині є надзвичайно актуальною, про що свідчить постійно зростаюча кількість публікацій у міжнародних журналах, присвячених цій тематиці. Як було показано ще наприкінці 90-х років, окисдаційний стрес, зумовлений окисненням клітинних мембран вільними радикалами, не лише є причиною низки тяжких захворювань, а й може розглядатися як

один із ключових механізмів, що призводить до старіння організму [6]. Більш того, як було доведено в публікаціях останніх років, проблема боротьби з окисдаційним стресом є комплексною, що зумовлено подвійною роллю активних форм кисню в процесах метаболізму в живій клітині. Зокрема, було встановлено, що трактування активних форм кисню виключно як побічних продуктів метаболізму, що завдають шкоди клітині, виявилось некоректним. Так, у роботі [7] було показано, що малі концентрації АФК відіграють надзвичайно важливу роль у сигнальних процесах у живій клітині, а також у захисті клітини від зовнішніх факторів (іммунна відповідь).

Отже, якщо надлишкові концентрації активних форм кисню можуть спричинювати незворотне руйнування клітинних компонентів (зокрема, плазматичної мембрани клітини), то надмірне пригнічення процесу вироблення клітиною активних форм кисню може призводити до порушення сигнальних процесів у клітині, а у випадку лейкоцитів — і до неспроможності клітини належно виконувати свої функції щодо імунного захисту. Таким чином, завдання ефективного антиоксидантного захисту живої клітини на сьогодні полягає не стільки в повному знищенні АФК, скільки в ефективному контролі їх концентрації у клітині. Одним із таких методів контролю є створення люмінесцентних міток, люмінесцентні властивості яких значною мірою залежать від концентрації АФК у живій клітині.

Надзвичайно висока антиоксидантна активність нанокристалів діоксиду церію при взаємодії з активними формами кисню неодноразово була показана різними дослідницькими групами.

Наприклад, автори статті [8] дійшли висновку, що нанокристали діоксиду церію розміром 3,8 нм, покриті тонким шаром олеїнової кислоти, мають антиоксидантну активність у 9 разів вищу, ніж найбільш поширений комерційний антиоксидант Trolox.

Можливостям застосування нанокристалів діоксиду церію для боротьби з такими захворюваннями, як рак, хвороба Альцгеймера,

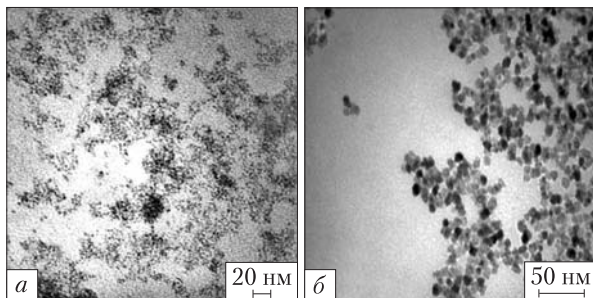


Рис. 1. ПЕМ-зображення наночастинок CeO_{2-x} розмірами: *a* – 3 нм; *б* – 10 нм

серцево-судинні хвороби, присвячено цілу низку досліджень, у яких було отримано надзвичайно обнадійливі результати. Так, у роботі [9] встановлено, що використання нанокристалічного діоксиду церію може значно підвищити ефективність антиракової радіотерапії, оскільки наночастинок CeO_2 селективно концентруються в нормальних клітинах (не потрапляючи в ракові клітини), захищаючи їх від підвищення концентрації вільних радикалів при опроміненні пухлини. Автори статті [10] показали, що діоксид церію забезпечує ефективний захист від оксидативного стресу нейронів спинного мозку щурів. Зниження ступеня ішемічного ураження головного мозку активними формами кисню при введенні нанокристалів діоксиду церію було доведено у статті [11].

Отже, проблема створення ефективних антиоксидантних матеріалів для контролю рівня активних форм кисню в живій клітині наразі є надзвичайно актуальною, і нанокристали діоксиду церію є одними з найбільш перспективних матеріалів для реалізації цього завдання.

В Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України вперше було проведено детальні дослідження взаємозв'язку антиоксидантних властивостей нанокристалів діоксиду церію (CeO_{2-x}) з їх люмінесцентними характеристиками.

Як було показано раніше в ряді робіт [12, 13], антиоксидантні властивості нанокристалів CeO_{2-x} визначаються співвідношенням $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$, яке в свою чергу залежить від концентрації кисневих вакансій у нанокристалі. Для того,

щоб мати можливість дослідити вплив розміру нанокристалів CeO_{2-x} на концентрацію кисневих вакансій, а отже, і на їх антиоксидантні характеристики, було одержано нанокристали CeO_{2-x} розмірами 3; 10 і 50 нм (рис. 1).

Дослідження, проведені за допомогою методів стаціонарної та розподіленої у часі спектроскопії, показали, що люмінесценція нанокристалів CeO_{2-x} визначається $5d \rightarrow 4f$ -переходами іонів Ce^{3+} , люмінесценцією з переносом заряду в комплексах $\text{Ce}^{4+}-\text{O}^{2-}$ та переходами в F^0 -центрах. При цьому інтенсивність $5d \rightarrow 4f$ -смуги люмінесценції іонів Ce^{3+} безпосередньо визначається співвідношенням $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ у цьому нанокристалі. Перехід від окиснювальної до відновлювальної атмосфери зумовлює зростання концентрації кисневих вакансій і, відповідно, збільшення інтенсивності смуги іонів Ce^{3+} на 390 нм. Такий самий ефект спостерігається і в разі зміни розміру нанокристала. Як видно зі спектрів люмінесценції, зменшення розміру нанокристалів CeO_{2-x} від 50 до 3 нм приводить до зростання інтенсивності смуги з максимумом на 390 нм, пов'язаної з $5d \rightarrow 4f$ -люмінесценцією іонів Ce^{3+} , приблизно в 10 разів (рис. 2).

Отже, зменшення розміру нанокристалів CeO_{2-x} від 50 до 3 нм приводить до збільшення концентрації кисневих вакансій приблизно в 10 разів, що має значною мірою впливати на антиоксидантні властивості нанокристалів.

Для дослідження процесів взаємодії нанокристалів CeO_{2-x} з активними формами кисню було одержано нанокристали діоксиду церію у вигляді колоїдних розчинів у воді. В експерименті реєстрували зміну в часі інтенсивності $5d \rightarrow 4f$ -люмінесценції іонів Ce^{3+} в нанокристалах діоксиду церію після додавання пероксиду водню.

На рис. 3 наведено залежності інтенсивності люмінесценції іонів Ce^{3+} від часу для нанокристалів діоксиду церію різних розмірів. Можна бачити, що додавання пероксиду водню веде до поступового зниження інтенсивності $5d \rightarrow 4f$ -люмінесценції іонів Ce^{3+} , що зумовлено переходом іонів Ce^{3+} в Ce^{4+} . Гасіння люмінесценції Ce^{3+} -іонів відбувається в часовому діапазоні

порядку кількох хвилин, що свідчить про те, що ці процеси є дифузійно контрольованими.

Таким чином, при додаванні пероксиду водню до водного колоїдного розчину нанокристалів діоксиду церію спостерігається окиснення не лише приповерхневих іонів Ce^{3+} , а й тих іонів, що знаходяться далеко від поверхні нанокристала. Це відбувається завдяки дифузії кисню, який утворюється при розкладанні молекул води на поверхні діоксиду церію, вглиб нанокристала. Залежність інтенсивності люмінесценції іонів Ce^{3+} від часу для нанокристалів різного розміру засвідчує, що зі зменшенням розміру нанокристалів діоксиду церію зростає частка іонів Ce^{3+} , які внаслідок окиснення переходять у іони Ce^{4+} , що проявляється у більш значному зниженні інтенсивності люмінесценції при додаванні пероксиду водню для менших наночастинок. Отже, наявність $5d \rightarrow 4f$ -люмінесценції іонів Ce^{3+} в нанокристалах CeO_{2-x} дає можливість контролювати процеси їх взаємодії з активними формами кисню методами оптичної спектроскопії [14, 15].

Наночастинки як сенсibilізатори для фотодинамічної терапії

Незважаючи на краще розуміння біології пухлин і вдосконалення діагностичної апаратури за останні роки, рак залишається однією з найбільш небезпечних хвороб. Онкологічні захворювання є другою за значущістю причиною смерті населення в усьому світі. На жаль, традиційне лікування раку має багато недоліків — висока токсичність, вплив на здорові клітини, тканини і органи та інші побічні ефекти.

Фотодинамічна терапія (ФДТ) — це альтернативний підхід до лікування онкологічних захворювань, який клінічно використовується для боротьби з окремими видами раку, передраковими ураженнями та деякими іншими захворюваннями [16, 17]. Однак основним недоліком цього методу, на відміну від традиційних, є невелика глибина проникнення збуджуючого світла в людські тканини (близько 6 мм), причому навіть в інфрачервоному діапазоні (700–1100 нм), де більшість хромофорів

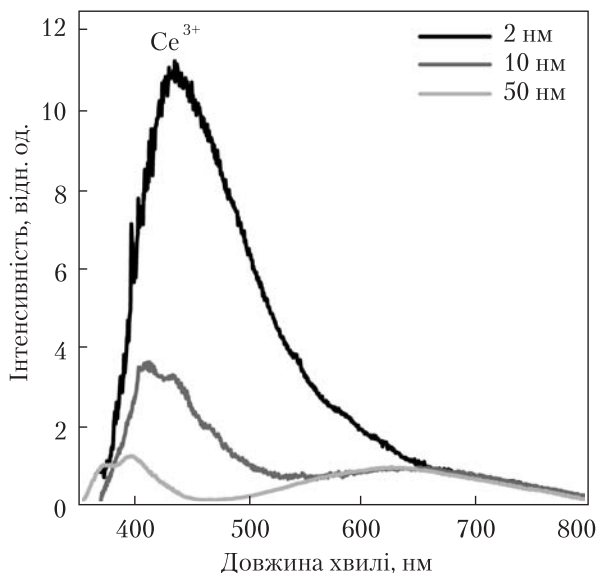


Рис. 2. Спектри люмінесценції нанокристалів CeO_{2-x} різних розмірів

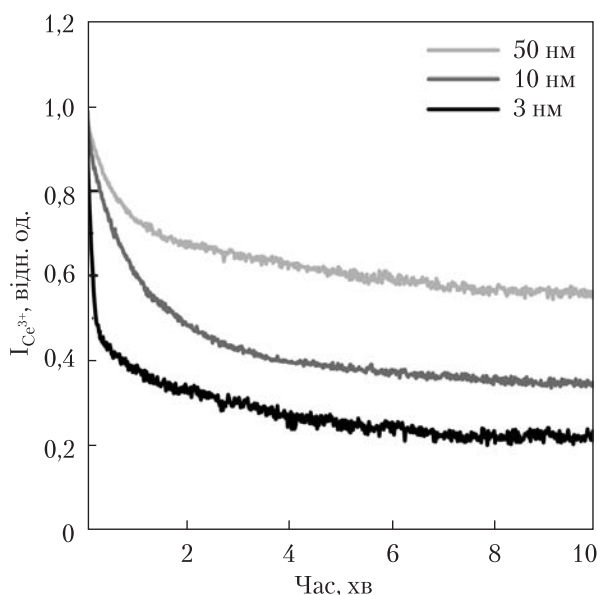


Рис. 3. Залежність інтенсивності люмінесценції іонів Ce^{3+} від часу для нанокристалів CeO_{2-x} різних розмірів

тканини слабо поглинають, а тому необхідне безпосереднє постачання світла для активації ФДТ. Ця особливість обмежує використання фотодинамічної терапії. Її застосовують лише

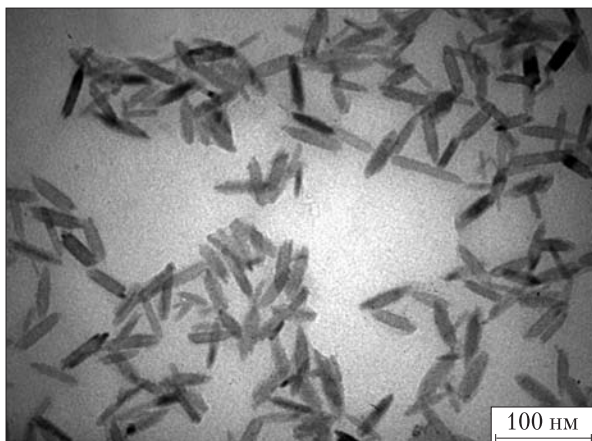


Рис. 4. ПЕМ-зображення наночастинок $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$

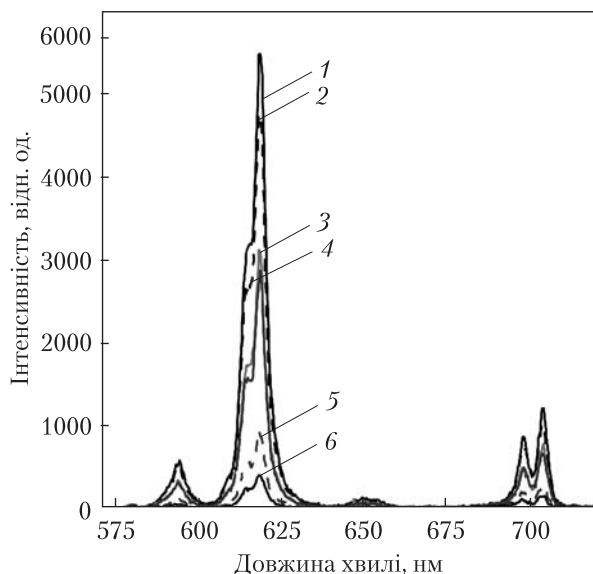


Рис. 5. Залежність люмінесценції донора (наночастинки $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) від концентрації метиленового синього (МС): 1 – $[\text{МС}] = 0 \text{ М}$; 2 – $[\text{МС}] = 1 \cdot 10^{-6} \text{ М}$; 3 – $[\text{МС}] = 5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$; 4 – $[\text{МС}] = 1 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; 5 – $[\text{МС}] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ М}$; 6 – $[\text{МС}] = 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$

в разі наявності поверхневих пухлин. Одним із можливих рішень для подолання цього недоліку є використання сцинтиляційних наночастинок для активації ФДТ [18]. У рамках концепції цієї ідеї рентгенівські промені збуджують фотосенсибілізатор, що складається зі сцинтиляційної і фотосенсибілізуючої частин

з безвипромінювальним переносом енергії від першої частини до другої без проміжного поглинання.

У дослідженнях, проведених в Інституті сцинтиляційних матеріалів (ІСМА) НАН України, як потенційні матеріали для фотодинамічної терапії було запропоновано комплекси наночастинок ортованадатів рідкісноземельних елементів, активованих іонами Європію ($\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$), + молекули метиленового синього [19]. Дотримуючись зазначеної у цій роботі методики синтезу, було одержано добре кристалізовані зерноподібні наночастинки $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ розміром $10 \times 50 \text{ нм}$. Розмір та форма отриманих наночастинок контролювалися за допомогою просвічуальної електронної мікроскопії (рис. 4).

На основі синтезованих наночастинок було отримано комплекси «наночастинки $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ + молекули метиленового синього» у водних розчинах.

Для реалізації завдань фотодинамічної терапії необхідно, щоб між наночастинками та молекулами-фотосенсибілізаторами існував ефективний безвипромінювальний перенос енергії електронного збудження.

У роботі, виконаній в ІСМА НАН України, було вивчено ефективність безвипромінювального переносу енергії між наночастинками $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та катіонним органічним барвником метиленовим синім у водних розчинах під дією УФ-випромінювання. Було показано, що додавання навіть малої кількості метиленового синього спричинює сильне загасання люмінесценції і скорочення часу життя іонів Eu^{3+} (рис. 5).

Було встановлено оптимальну концентрацію метиленового синього, за якої ефективність безвипромінювального переносу енергії електронного збудження становить близько 90%. При цьому, незважаючи на сильне загасання донора (іонів Eu^{3+}), випромінювання акцептора (метиленового синього) не спостерігалось, що можна пояснити високим міжсистемним квантовим переходом для метиленового синього (0,54). Довгий час життя, великий стоксів зсув та вузькі лінії випромінювання зумовлюють перспективність наночастинок

$\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ як джерела збудження фотосенсибілізатора метиленового синього для застосування у фотодинамічній терапії.

Висновки

Неорганічні нанокристали, активовані рідкісноземельними іонами, показали себе як новий перспективний клас матеріалів для біомедичних застосувань.

Нанокристали діоксиду церію (CeO_{2-x}) та ортованадатів рідкісноземельних елементів,

активованих іонами європію ($\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$), отримані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України, характеризуються наявністю власної люмінесценції, інтенсивність якої корелює з про-/антиоксидантною дією наночастинок, що дає можливість контролювати їх біологічну активність за допомогою методів оптичної спектроскопії.

Показано можливість застосування отриманих наночастинок як біологічних антиоксидантів з контрольованою редокс-активністю та матеріалів для потреб фотодинамічної терапії.

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. http://www.who.int/topics/essential_medicines/
2. Wagner V., Dullaart A., Bock A.K., Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*. 2006. **24**(10): 1211. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1006-1211>
3. Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007. **2**(12): 751. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2007.387>
4. Pezzini I., Marino A., Del Turco S., Nesti C., Doccini S., Cappello V., Gemmi M., Parlanti P., Santorelli F.M., Mattoli V., Ciofani G. Cerium oxide nanoparticles: the regenerative redox machine in bioenergetic imbalance. *Nanomedicine*. 2017. **12**(4): 403. <http://dx.doi.org/10.2217/nnm-2016-0342>
5. Korsvik C., Patil S., Seal S., Self W.T. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chemical Communications*. 2007. (10): 1058. <http://dx.doi.org/10.1039/b615134e>
6. Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000. **408**(6809): 239. <http://dx.doi.org/10.1038/35041687>
7. Rhee S.G. H_2O_2 , a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006. **312**(5782): 1882. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1130481>
8. Lee S.S., Song W., Cho M., Puppala H.L., Nguyen P., Zhu H., Segatori L., Colvin V.L. Antioxidant properties of cerium oxide nanocrystals as a function of nanocrystal diameter and surface coating. *ACS Nano*. 2013. **7**(11): 9693. <http://dx.doi.org/10.1021/nn4026806>
9. Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*. 2008. **4**(5): 552. <http://dx.doi.org/10.1002/sml.200700824>
10. Das M., Patil S., Bhargava N., Kang J.F., Riedel L.M., Seal S., Hickman J.J. Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons. *Biomaterials*. 2007. **28**(10): 1918. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.036>
11. Kim C.K., Kim T., Choi I.Y., Soh M., Kim D., Kim Y.J., Jang H., Yang H.S., Kim J.Y., Park H.K., Park S.P. Ceria nanoparticles that can protect against ischemic stroke. *Angewandte Chemie*. 2012. **124**(44): 11201. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201203780>
12. Masalov A., Viagin O., Maksimchuk P., Seminko V., Bespalova I., Aslanov A., Malyukin Y., Zorenko Y. Formation of luminescent centers in CeO_2 nanocrystals. *Journal of Luminescence*. 2014. **145**: 61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2013.07.020>
13. Seminko V., Maksimchuk P., Bespalova I., Masalov A., Viagin O., Okrushko E., Kononets N., Malyukin Y. Defect and intrinsic luminescence of CeO_2 nanocrystals. *Physica Status Solidi B*. 2017. **254**(4): <http://dx.doi.org/10.1002/pssb.201600488>
14. Seminko V., Masalov A., Maksimchuk P., Klochkov V., Bespalova I., Viagin O., Malyukin Y. Spectroscopic Properties of Nanoceria Allowing Visualization of Its Antioxidant Action. In: *Nanomaterials for Security*. (Springer, 2016). P. 149–157.

15. Malyukin Y., Klochkov V., Maksimchuk P., Seminko V., Spivak N. Oscillations of cerium oxidation state driven by oxygen diffusion in colloidal nanoceria (CeO_{2-x}). *Nanoscale Research Letters*. 2017. **12**(1): 566. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2339-7>
16. Macdonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. 2001. **5**(02): 105. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>
17. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003. **3**(5): 380. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>
18. Chen W., Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2006. **6**(4): 1159. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.327>
19. Yefimova S.L., Tkacheva T.N., Maksimchuk P.O., Bespalova I.I., Hubenko K.O., Klochkov V.K., Sorokin A.V., Malyukin Y.V. GdVO_4 : Eu^{3+} nanoparticles—Methylene Blue complexes for PDT: Electronic excitation energy transfer study. *Journal of Luminescence*. 2017. **192**: 975. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2017.08.044>

Yu.V. Malyukin

Institute for Scintillation Materials
of National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv)

NEW LUMINESCENT NANOMATERIALS:
FUNCTIONAL PROPERTIES, BIOMEDICAL AND TECHNICAL APPLICATIONS

According to the materials of scientific report at the meeting
of the Presidium of NAS of Ukraine, October 11, 2017

The report presents the results of investigations of the luminescence properties of a new class of nano-materials – polyfunctional redox-active nanocrystals that can simultaneously take an active part in biological processes occurring at the level of individual cells and are characterized by the presence of their own luminescence, the intensity of which correlates with the pro-/antioxidant activity of nanoparticles. As the most promising redox-active nanomaterials, cerium dioxide nanocrystals (CeO_{2-x}) and orthovanadates of RE elements (ReVO_4 : Eu^{3+}) have been analyzed. Studies carried out with the help of stationary and time-resolved spectroscopy methods involving controlled change of redox-status of NPs surrounding, have shown that they can both directly demonstrate the anti-/prooxidant effect, and act as an intermediate in the processes of generation of singlet oxygen by photosensitizer molecules. The prospect of using nanocrystals for a range of biomedical applications: as materials for the needs of photodynamic therapy and biological antioxidants is shown.

Keywords: nanocrystals, antioxidants, photodynamic therapy.