

Винахід належить до галузі нанобіоматеріалів, що містять наночастинки ортованадатів рідкісноземельних елементів з антиоксидантною активністю у вигляді високодисперсних стабільних водних колоїдних розчинів, і може бути використаний у медичних галузях для діагностики патологій та променевої терапії та є інноваційним підходом у терапії злоякісних клітин.

Відомо, що такі найважливіші активні форми кисню (АФК) як супероксид аніон (O_2^-), гідроксильний радикал ($\text{OH}\cdot$), перекис водню (H_2O_2) та синглетний кисень ($^1\text{O}_2$) відіграють ключову роль у функціонуванні клітин, беручи участь як в низці фізіологічних функцій, так і в багатьох патологічних процесах [G. Bodega et al. Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers, *J Extracell. Vesicles* 8 (2019) 1626654]. Отже розвиток різних патологій (включаючи серцево-судинні захворювання та рак) є наслідком підвищення концентрації АФК, що спричинює окислювальний стрес, який формується у результаті дисбалансу між станом антиоксидантного захисту (блокування/знищення АФК) та інтенсивністю дії прооксидантних факторів (збільшення генерації АФК) [M. Valko et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44]. Також відомо, що в ракових клітинах рівень АФК є близьким до порогу загибелі клітин, тому ракові клітини більш чутливі до модуляцій концентрації АФК, на основі чого і було запропоновано різні стратегії, засновані на індукуванні та варіюванні концентрацій АФК за допомогою різноманітних матеріалів, включаючи неорганічні оксидні наночастинки [I.L. Ibanez et al. The redox-active nanomaterial toolbox for cancer therapy, *Cancer Lett.* 359 (2015) 9; L. Tong, C. C. Chuang, S. Wu, L. Zuo, Reactive Oxygen Species in Redox Cancer Therapy, *Cancer Lett.* 367 (2015) 18]. При цьому зазначено, що розміри, структура й властивості поверхні та концентрація дефектів наночастинок оксидів металів (наприклад, TiO_2 , CeO_2 тощо) мають вагомий вплив на антиоксидантну дію самих наночастинок [Y. Li et al. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles, *ACS Nano* 6 (2012) 5164; A. Karakoti et al. Redox-active radical scavenging nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4422].

Відомий спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок [V. K. Klochov et al. Oxidation-reduction processes in CeO_{2-x} nanocrystals under UV irradiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* 364 (2018) 282], який включає ультрафіолетове (УФ) опромінення водного колоїдного розчину наночастинок оксиду церію CeO_{2-x} з розміром ($2\pm0,2$) нм впродовж (30-150) хв., дослідження прояву антиоксидантних властивостей за ступенем фотодеградації сенсора АФК.

Недоліком відомого способу є те, що антиоксидантна активність наночастинок активується УФ-опроміненням протягом досить тривалого часу, що значно обмежує застосування даного способу знищення АФК у експериментах *in vivo* та *in vitro*. При цьому УФ опромінення тканин може призводити до глибоких опіків організму некротичного характеру, що потребує додаткової терапії.

Відомий спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок [W. H. Saputera et al. Revealing the key oxidative species generated by Pt-loaded metal oxides under dark and light conditions, *Applied Catalysis B: Environmental* 223 (2018) 216], який включає приготування водних суспензій комерційно доступних частинок оксиду титану TiO_2 (розміром (25-30) нм), оксиду церію CeO_2 (розміром менш ніж 25 нм), оксиду кремнію SiO_2 (розміром (1-5) мкм) та суспензій тих самих частинок з нанесеними на їх поверхню наночастинок платини Pt розміром (2-4) нм (Pt/TiO_2 , Pt/CeO_2 , Pt/SiO_2) шляхом ультразвукової обробки протягом 15 хв., з наступною витримкою у темряві 50 хв., у герметично закритих реакторах, фільтруванням та дослідженням рівня АФК в отриманих супернатантах за допомогою відповідних сенсорів методами фотолюмінесценції.

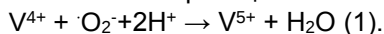
У даному способі використовують комерційно доступні частинки з розмірами (25-30) нм та (1-5) мкм у вигляді порошків, з яких шляхом диспергування у воді отримують суспензії, які можуть бути стабільними впродовж нетривалого часу (від декількох хвилин до декількох годин), що значно обмежує практичне використання таких суспензій в методах *in vitro* та не уможливлює використання у методах *in vivo*. Додаткове нанесення на частинки наночастинок платини Pt технологічно є складним процесом та збільшує геометричний розмір часток, що значно зменшує термін стабільності суспензій та обмежує їх практичне застосування. Метод витримки суспензії у темряві тільки 50 хв., хоча й демонструє тенденцію до знищення АФК (антиоксидантна активність), але не є достатнім для використання у експериментах *in vivo* та *in vitro*.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, у вигляді високодисперсних стабільних водних колоїдних розчинів для застосувань *in vivo* та *in vitro* у методах радіотерапії.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, який включає приготування суспензії частинок, її витримку у темряві, згідно з винаходом, для приготування суспензії використовують стійкі високодисперсні водні колоїдні розчини наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, розміром 2-2,5 нм, її витримку у темряві проводять впродовж 90-96 годин.

Використання стійких високодисперсних водних колоїдних розчинів наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, завдяки тому, що вони є стабільними протягом (6-12) місяців за стандартних умов, дозволяє витримувати їх у темряві необхідний час без додаткової ультразвукової обробки зразків й застосовувати їх *in vivo* та *in vitro* у методах радіотерапії без певних обмежень, що забезпечує високу відтворюваність результатів.

Прояв антиоксидантної активності у наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм пояснюється наявністю в структурі ортованадатів комплексів типу $V^{4+}-V_O-V^{4+}$ (де V^{4+} - іон ванадію у ступені окиснення 4+, V_O - киснева вакансія) та електрон-донорними властивостями самих іонів V^{4+} . У зазначених умовах комплекси $V^{4+}-V_O-V^{4+}$ мають надлишкові локалізовані електрони та є координаційно ненасиченими та можуть створювати специфічні ділянки для зв'язування АФК та полегшення їх взаємодії з локалізованими електронами, тим самим нейтралізуючи АФК, згідно рівнянню хімічної реакції:



Використання частинок з розміром (2-2,5) нм дозволяє збільшити кількість наночастинок з антиоксидантними властивостями, які можна транспортувати до тканин та забезпечити проникнення їх через плазматичні мембрани клітини. Використання частинок з розміром менш ніж 2 нм Використання частинок з розміром менш ніж 2 нм неможливе, оскільки немає технологічних умов їх отримання. Використання частинок з розміром більш ніж 2,5 нм є недоцільним, оскільки такі наночастинки змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм з розміром більше ніж 2,5 нм взагалі не проявляють антиоксидантну активність.

Витримка розчину у темряві впродовж (90-96) год. приводить до проявлення антиоксидантної активності наночастинок у експериментах *in vivo* та *in vitro* впродовж 1 години. Витримка колоїдних розчинів наночастинок у темряві менш ніж 90 год. не дозволяє у повній мірі накопичити носії заряду (електрони e^-) у наночастинках. Витримка колоїдних розчинів наночастинок більш ніж 96 год., є не доцільною, оскільки не приводить до збільшення часу антиоксидантної дії наночастинок.

На Фіг. 1 наведено мікроскопічний знімок зразка колоїдного розчину наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, отриманий за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-125 при напрузі 100 кВ (а) та рентгенограма наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, отримана за допомогою рентгенівського дифрактометра Siemens D500 (б).

На Фіг. 2 наведено діаграму окиснення аскорбінової кислоти: 1 - у водному розчині аскорбінової кислоти (контрольний зразок); 2 - у водному розчині аскорбінової кислоти, який містить наночастинки $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, (концентрація 0,02 г/л), колоїдний розчин яких витримано у темряві (90-96) год.

На Фіг. 3 наведено залежність максимуму поглинання дієнових кон'югатів у водному розчині ліпідів, який витримано при 65 °С, від часу: 1 - контрольний зразок (водний розчин ліпідів); 2 - водний розчин, який містить наночастинки $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, колоїдний розчин котрих витримано у темряві (90-96) год.

На Фіг. 4. наведено діаграму життєздатності клітин L929 (тест MTT) після 2-годинної інкубації: 1 - контрольний зразок (без наночастинок); 2 - з наночастинками $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, колоїдний розчин котрих витримано у темряві (90-96) год.

Приклад

Спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$.

Водний колоїдний розчин наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$ (зі стехіометричним складом рідкісноземельних іонів $Gd:Y:Eu=0,7:0,1:0,2$), розмір яких становить (2-2,5) нм (Фіг. 1), об'ємом 5 мл з концентрацією 0,04 г/л витримують у темряві впродовж 90 год.

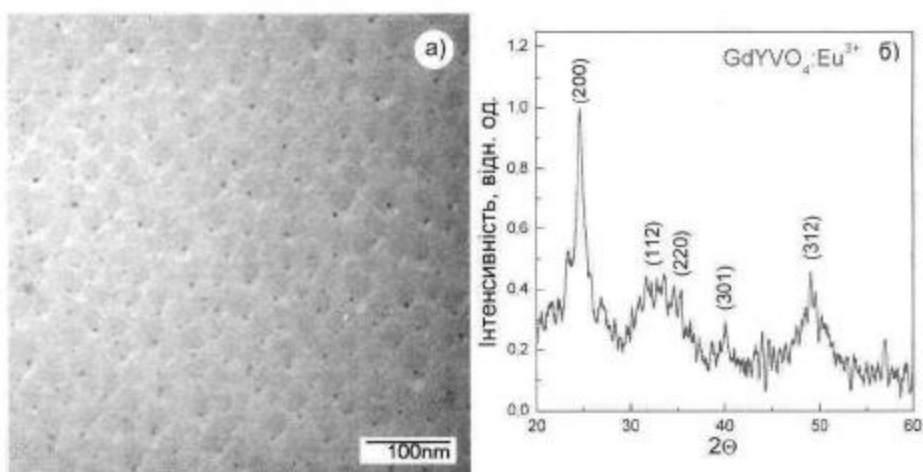
Визначення антиоксидантної активності отриманих наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$ проводять, оцінюючи ступінь окиснення аскорбінової кислоти у колоїдному розчині наночастинок відносно окиснення аскорбінової кислоти у воді з використанням УФ-видимої спектроскопії. Змішують 1 мл кожної проби з 1 мл розчину аскорбінової кислоти (концентрація 0,02 г/л) та отримують кінцеві концентрації наночастинок у розчині на рівні 0,02 г/л та аскорбінової кислоти 0,01 г/л. Окиснення аскорбінової кислоти оцінюють як зменшення характерної смуги поглинання на довжині хвилі 265 нм через 30 хв. Як контрольну пробу використовують водний розчин аскорбінової кислоти об'ємом 2 мл з концентрацією 0,01 г/л та вимірюють спектр поглинання, за яким оцінюють ступінь окиснення кислоти у воді (Фіг. 2, стовп. 1). Дослідження окиснення аскорбінової кислоти у присутності наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, витриманих у темряві, демонструють гальмування процесу окиснення аскорбінової кислоти, тобто дані наночастинки проявляють антиоксидантну активність (Фіг. 2, стовп. 2).

Отримані проби колоїдних розчинів наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$ вводили до розчинів ліпідів L-афосфатиділхоліну з яєчного жовтка (Avanti Polar Lipids, Inc. (США)) (модель ліпідних мембран живих клітин) та аналізували їх вплив на процеси самоокиснення ліпідів (утворення дієнових кон'югатів), яке було ініційоване підвищенням температури до 65 °С (Фіг. 3). Тут наночастинки $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, колоїдні розчини котрих витримано у темряві (90-96) год., проявляють сильну антиоксидантну активність, яка значно інгібує процес окиснення ліпідів (до 80 % впродовж перших 24 год. відносно

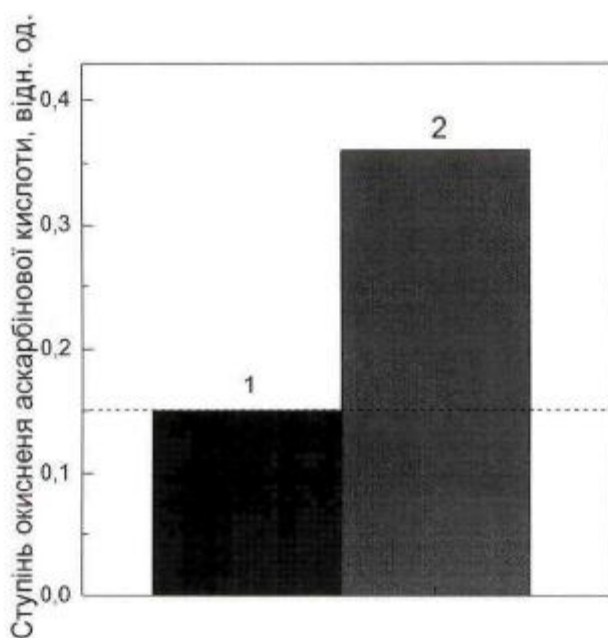
контрольного зразку - водного розчину ліпідів). Через 24 год. відбувається швидке окиснення ліпідів, як наслідок неспроможності зв'язування АФК наночастинок через повний перехід V^{4+} у V^{5+} згідно рівнянню (1).

Отримані проби колоїдних розчинів наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$ вводили у лінії фібробластичних клітин миші L929 та оцінювали життєздатність клітин методом МТТ [T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, Journal of Immunological Methods 65 (1983) 55]. Дослідження показали, що наночастинок $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$, колоїдні розчини котрих витримано у темряві (90-96) год., збільшують життєздатність клітин відносно контрольного зразку (Фіг. 4).

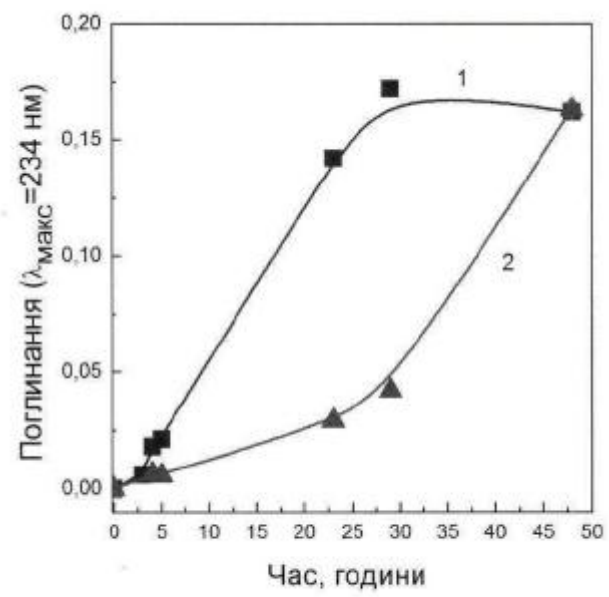
Отримані наночастинок змішаних ортованадатів складу $(Gd, Y)VO_4:Eu^{3+}$ з антиоксидантною активністю розміром (2-2,5) нм мають великий потенціал для застосування у медичній галузі, зокрема, як інноваційний підхід у методах променевої терапії.



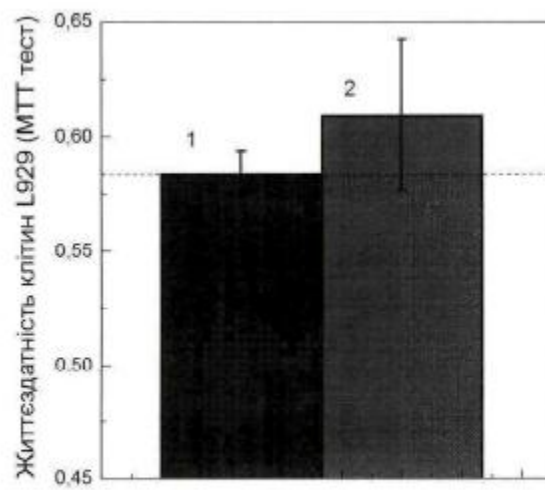
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4