



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126299** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)**C09K 15/02** (2006.01)**C01G 31/00****C01F 17/30** (2020.01)**A61K 33/244** (2019.01)**A61K 103/32** (2006.01)**A61K 103/34** (2006.01)**A61P 39/06** (2006.01)**B82B 3/00****B82Y 40/00**НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21)	Номер заявки:	а 2020 04160	(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Revealing the key oxidative species generated by Pt-loaded metal oxides under dark and light conditions / W. H.Saputera and et al. // Applied Catalysis B: Environmental. - 2018. - Vol. 223. - P. 216- 227 Untangling the mechanisms of GdYVO ₄ :Eu ³⁺ nanoparticle photocatalytic activity / S.L.Yefimova, P.O.Maksimchuk, K.A.Hubenko, V.K.Klochkov, I.A.Borovoy, A.V.Sorokin Yu.V.Malyukin // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. - 2019. - Vol. 577. - P. 630-636 Reactive oxygen species generation in aqueous solutions containing GdVO ₄ :Eu ³⁺ nanoparticles and their complexes with methylene blue / K. Hubenko and et al. // Nanoscale Research Letters. - 2018. - Vol. 13(100). - 10 p. Multifunctional rare-earth vanadate nanoparticles: luminescent labels, oxidant sensors, and MRI contrast agents / M. Abdesslem and et al. // ACS Nano. - 2014. - Vol. 8. - № 11. - P. 11126-11137
(22)	Дата подання заявки:	08.07.2020		
(24)	Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	15.09.2022		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	26.10.2020, Бюл.№ 20		
(46)	Публікація відомостей про державну реєстрацію:	14.09.2022, Бюл.№ 37		
(72)	Винахідник(и): Малюкін Юрій Вікторович (UA), Єфімова Світлана Леонідівна (UA), Клочков Владимир Кирилович (UA), Максимчук Павло Олегович (UA), Губенко Катерина Олександрівна (UA), Беспалова Ірина Ігорівна (UA), Омєласва Валерія Валеріївна (UA)			
(73)	Володілець (володільці): ІНСТИТУТ СЦИНТИЛЯЦІЙНИХ МАТЕРІАЛІВ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, пр. Науки, 60, м. Харків, 61072 (UA)			

(54) СПОСІБ КЕРУВАННЯ АНТИОКСИДАНТНОЮ АКТИВНІСТЮ НАНОЧАСТИНОК (Gd,Y)VO₄:Eu³⁺**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі нанобіоматеріалів, може бути використаний у медичних галузях для діагностики патологій та променевої терапії. Спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, включає приготування суспензії наночастинок розміром 2-2,5 нм та її витримку у темряві впродовж 90-96 годин. Отримані наночастинки змішаних ортованадатів складу (Gd,Y)VO₄:Eu³⁺ з

UA 126299 C2

антиоксидантною активністю розміром 2-2,5 нм мають великий потенціал для застосування у медичній галузі, зокрема, як інноваційний підхід у методах променевої терапії.

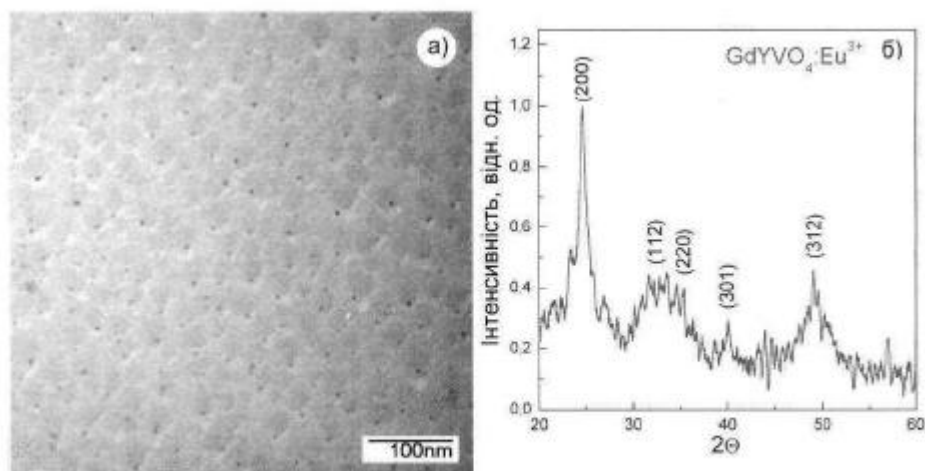


Fig. 1

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 ($O_2^{\cdot-}$), гідроксильний радикал ($\cdot OH$), перекис водню (H_2O_2) та синглетний кисень (1O_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 модуляції 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 ($2 \pm 0,2$) 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 уможливорює 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*.

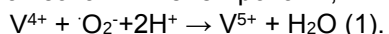
В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, у

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 наночастинок 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 наночастинок. 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)VO₄:Eu³⁺, отриманий за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ПЕМ-125 при напрузі 100 кВ (а) та рентгенограма наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺, 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 наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺, (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 наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺, колоїдний розчин котрих витримано у темряві (90-96) год.

На Фіг. 4. наведено діаграму життєздатності клітин L929 (тест МТТ) після 2-годинної інкубації: 1 - контрольний зразок (без наночастинок); 2 - з наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺, колоїдний розчин котрих витримано у темряві (90-96) год.

Приклад

Спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺.

Водний колоїдний розчин наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺ (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)VO₄:Eu³⁺ 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)VO₄:Eu³⁺, витриманих у темряві, демонструють гальмування процесу окиснення аскорбінової кислоти, тобто дані наночастинок проявляють антиоксидантну активність (Фіг. 2, стовп. 2).

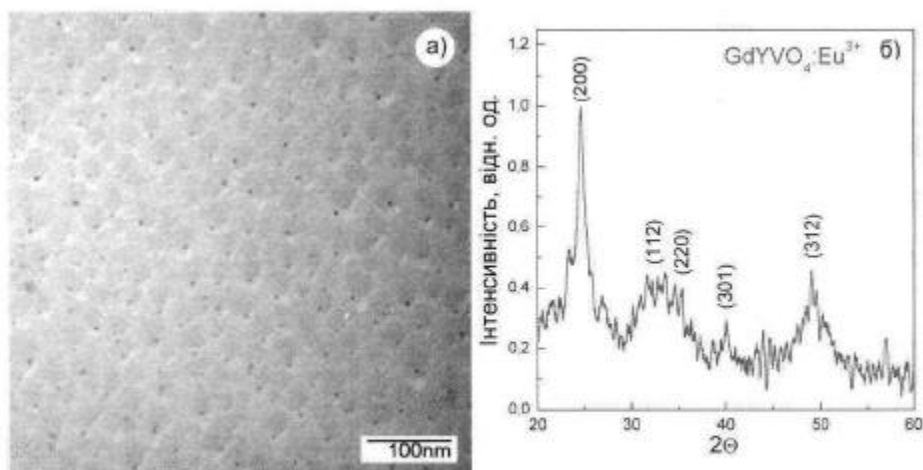
Отримані проби колоїдних розчинів наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺ вводили до розчинів ліпідів L-афосфатиділхоліну з яєчного жовтка (Avanti Polar Lipids, Inc. (США)) (модель ліпідних мембран живих клітин) та аналізували їх вплив на процеси самоокиснення ліпідів (утворення дієнових кон'югатів), яке було ініційоване підвищенням температури до 65 °С (Фіг. 3). Тут наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺, 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 V⁴⁺ у V⁵⁺ згідно рівнянню (1).

Отримані проби колоїдних розчинів наночастинок (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺ вводили у лінії фібробластичних клітин миші L929 та оцінювали життєздатність клітин методом МТТ [Т. 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)VO₄:Eu³⁺, колоїдні розчини котрих витримано у темряві (90-96) год., збільшують життєздатність клітин відносно контрольного зразку (Фіг. 4).

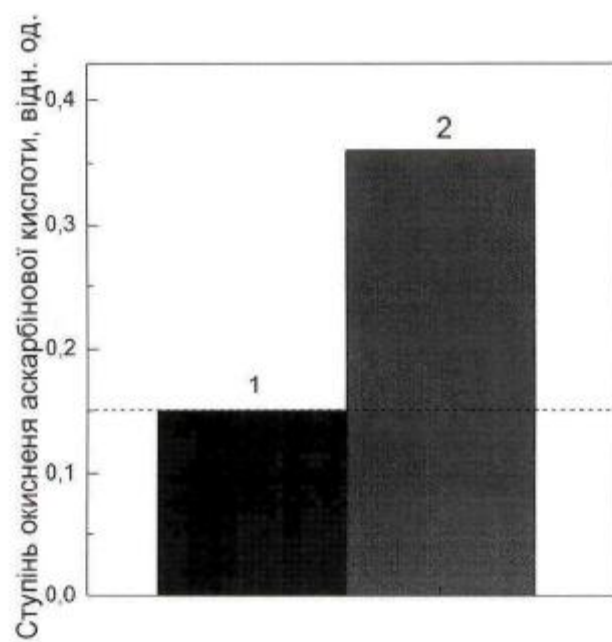
Отримані наночастинок змішаних ортованадатів складу (Gd, Y)VO₄:Eu³⁺ з антиоксидантною активністю розміром (2-2,5) нм мають великий потенціал для застосування у медичній галузі, зокрема, як інноваційний підхід у методах променевої терапії.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

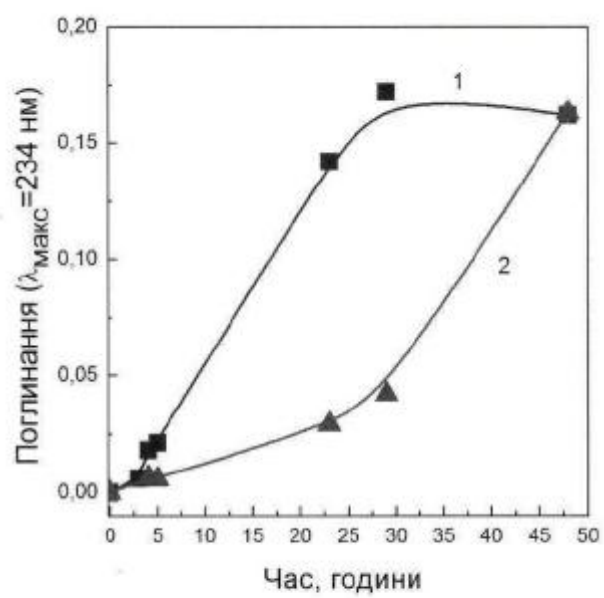
Спосіб керування антиоксидантною активністю наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, який включає приготування суспензії наночастинок, її витримку у темряві, який **відрізняється** тим, що для приготування суспензії використовують стійкі вискодисперсні водні колоїдні розчини наночастинок змішаних гадоліній-ітрієвих ортованадатів, активованих європієм, розміром 2-2,5 нм, а її витримку у темряві проводять впродовж 90-96 годин.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

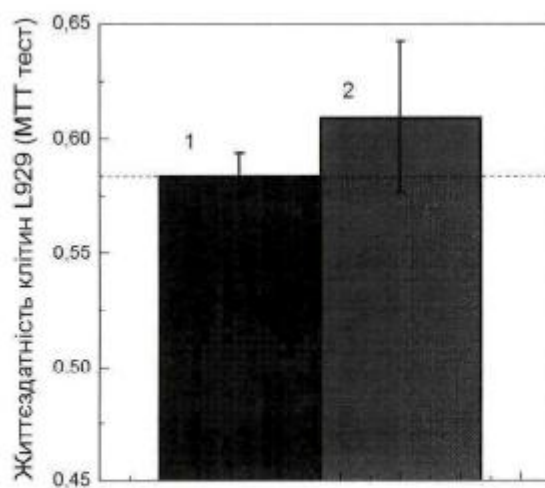


Fig. 4