

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет ім. В. Н. Каразіна
Фізичний факультет
Кафедра фізики кристалів

До захисту допущено
кафедрою фізики кристалів протокол №17 від 11.06.2026 р.

завідувач кафедри _____
(підпис) (ім'я, прізвище)

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

здобувача першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
ВПЛИВ pH ВОДНИХ РОЗЧИНІВ НА РЕДОКС-АКТИВНІСТЬ ТА
АДСОРБЦІЙНУ ЗДАТНІСТЬ КОМПЛЕКСІВ $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$

Спеціальність 104 «Фізика та астрономія»

Освітня програма «Фізика»

Здобувач



(підпис)

Юлія ЛАБУНСЬКА
(ім'я, прізвище)

Науковий керівник



(підпис)

Віра КОРШАК
(ім'я, прізвище)

Науковий консультант



(підпис)

Владислав СЕМІНЬКО
(ім'я, прізвище)

Харків – 2026

АНОТАЦІЯ

Лабунська Ю. В. Вплив рН водних розчинів на редокс-активність та адсорбційну здатність комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього рівня «Бакалавр» за спеціальністю 104. «фізика та астрономія», за освітньо-науковою програмою «фізика». - Харків: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2026. - 30 с., 5 рис., 1 табл.

Метою роботи є дослідження впливу рН водних розчинів на редокс-активність та адсорбційну здатність ультрамалих (2-3 нм) наночастинок $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$. Об'єкт дослідження: комплекси наночастинок $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$ з молекулами доксорубіцину. Предмет дослідження: вплив рН на прооксидантну активність та адсорбційну здатність комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$.

Досліджено пероксидазоподібну та оксидазоподібну активність наночастинок за допомогою окиснення 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМВ) при різних значеннях рН. Показано, що максимальна прооксидантна активність досягається при рН 4.0. Визначено кінетичні параметри за моделлю Міхаеліса-Ментен: K_m для ТМВ становить 0.406 мМ, $V_{\max}$ - $2.41 \times 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$. Досліджено здатність наночастинок окиснювати тіюли (на прикладі цистеїну). Вивчено адсорбцію протипухлинного препарату доксорубіцину (DOX) на наночастинках при рН 5.0 та 7.4. Показано, що адсорбція описується моделлю псевдо-другого порядку (хемосорбція), а ізотерми адсорбції найкраще описуються моделлю Сіпса ($R^2 = 0.999$), що вказує на гетерогенність адсорбційних центрів (порожнини $\beta\text{-CD}$). Максимальна адсорбційна здатність при рН 7.4 досягає $40 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$. Продемонстровано рН-залежне вивільнення DOX при рН 5.4 (близько 60 % за 24 години), що є перспективним для селективної доставки ліків у ракові клітини (які мають нижче рН порівняно зі здоровими). Отримані результати свідчать про потенціал комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$ як багатофункціональних антиракових агентів для комбінованої АФК- та хіміотерапії.

Ключові слова: оксид церію, циклодекстрин, доксорубіцин, рН-залежне вивільнення, пероксидазна активність, наноензими, адсорбція.

ABSTRACT

Labsunska Yu. V. Influence of pH on the redox activity and adsorption capacity of $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ complexes.

Qualification work for obtaining the educational degree "Bachelor" in specialty 104 — "Physics and Astronomy", under the educational and scientific program "Physics". — Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University, 2026. - 30 pp., 5 figs., 1 table.

The influence of pH on the redox activity and adsorption capacity of ultrasmall (2-3 nm) $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ nanoparticles was investigated. Object of study: complexes of $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ nanoparticles with doxorubicin molecules. Subject of study: influence of pH on prooxidant activity and adsorption capacity of $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ complexes. The peroxidase-like and oxidase-like activities of the nanoparticles were studied using the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) at different pH values. It was shown that the maximum prooxidant activity is achieved at pH 4.0. The kinetic parameters were determined using the Michaelis-Menten model: K_m for TMB is 0.406 mM, V_{max} is $2.41 \times 10^{-8} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$. The ability of nanoparticles to oxidize thiols (using cysteine as an example) was demonstrated. The adsorption of the anticancer drug doxorubicin (DOX) onto nanoparticles was studied at pH 5.0 and 7.4. The adsorption follows pseudo-second-order kinetics (chemisorption), and the adsorption isotherms are best described by the Sips model ($R^2 = 0.999$), indicating heterogeneous adsorption sites ($\beta\text{-CD}$ cavities). The maximum adsorption capacity at pH 7.4 reaches $40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. pH-dependent DOX release was demonstrated at pH 5.4 (about 60% over 24 hours), which is promising for selective drug delivery to cancer cells (which have lower pH than healthy cells). The obtained results indicate the potential of $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ complexes as multifunctional anticancer agents for combined ROS- and chemotherapy.

Keywords: cerium oxide, cyclodextrin, doxorubicin, pH-dependent release, peroxidase-like activity, nanozymes, adsorption.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ	8
1.1 Наночастинки як носії ліків та терапевтичні агенти.....	8
1.2 Нанокристали оксиду церію та комплекси $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$	11
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	15
РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	18
3.1 Характеризація наночастинок $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$	18
3.2 Пероксидазоподібна та оксидазоподібна активність	20
3.3 Адсорбція молекул доксорубіцину на наночастинках	22
3.3.1 Кінетика адсорбції	22
3.3.2 Ізотерми адсорбції	24
3.3.3 Десорбція молекул доксорубіцину з наночастинок	26
ВИСНОВКИ	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	29

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ ТА СКОРОЧЕНЬ

АФК	активні форми кисню
CD	циклодекстрин
DOX	доксорубіцин
РФС (XPS)	рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (X-ray photoelectron spectroscopy)
НЧ	наночастинка
УФ	ультрафіолетовий діапазон
ПЕМ	Просвітлювальна електронна мікроскопія
ТМВ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ВСТУП

Протягом останніх двох десятиліть спостерігається значна інтенсифікація досліджень нанокристалів оксиду церію (CeO_2). Завдяки вираженій редокс-активності ці наноматеріали класифікуються як перспективні неорганічні агенти для біомедичного застосування. Їхній терапевтичний потенціал базується на здатності модулювати внутрішньоклітинний пул активних форм кисню (АФК). Залежно від умов мікрооточення, наночастинки здатні як індукувати оксидативний стрес шляхом генерації АФК, так і виконувати функцію скавенджерів (інактиваторів) вільних радикалів, забезпечуючи цитопротекторний ефект.

Ключовим детермінантом вектора редокс-активності наночастинок CeO_{2-x} є рівень рН середовища. За умов фізіологічного рН (~ 7.4), що є нормою для здорових клітин, нанокристали виявляють високу антиоксидантну активність, захищаючи клітинні структури від оксидативного пошкодження. Натомість у слабкокислому середовищі (рН 5.5–6.5), яке є характерним для мікрооточення пухлин, наноматеріал демонструє прооксидантну активність, що сприяє цитотоксичному ефекту та загибелі ракових клітин. Така рН-залежна активність робить наночастинки оксиду церію перспективною платформою для розробки селективних протипухлинних препаратів.

Подальшого підвищення ефективності можна досягти шляхом модифікації поверхні наночастинок молекулами циклодекстрину (β -CD). По-перше, β -CD виступає ефективним стабілізатором, запобігаючи агрегації наночастинок у біологічних середовищах. По-друге, гідрофобні порожнини циклодекстрину здатні утворювати комплекси включення з протипухлинними препаратами, зокрема доксорубіцином (DOX), забезпечуючи їх контрольоване та рН-залежне вивільнення. Таким чином, метою даної роботи стало

дослідження впливу рН водних розчинів на редокс-активність та адсорбційну здатність комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$.

Для досягнення даної мети були поставлені наступні завдання:

- Дослідити пероксидазоподібну та оксидазоподібну активність наночастинок при різних значеннях рН.
- Визначити кінетичні параметри (K_m , $V_{\max}$) пероксидазної активності за моделлю Міхаеліса-Ментен.
- Дослідити кінетику та ізотерми адсорбції доксорубіцину на наночастинках при різних рН.
- Дослідити рН-залежне вивільнення DOX з комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}@DOX$.

РОЗДІЛ 1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ

1.1 Наночастинки як носії ліків та терапевтичні агенти

Наночастинки для доставки ліків є одним із найперспективніших напрямів сучасної наномедицини, оскільки вони дозволяють підвищити ефективність терапії та зменшити побічні ефекти лікарських препаратів [1, 2]. Завдяки малим розмірам наночастинки здатні транспортувати терапевтичні агенти через біологічні бар'єри, захищати їх від передчасної деградації в організмі та забезпечувати контрольоване вивільнення в потрібному місці. Як носії ліків використовують різноманітні наноматеріали, серед яких найбільш поширеними є ліпідні, полімерні та неорганічні наночастинки. Ліпідні наночастинки відзначаються високою біосумісністю та успішно застосовуються для доставки нуклеїнових кислот, зокрема мРНК. Полімерні наночастинки забезпечують тривале та контрольоване вивільнення лікарських речовин, а також можуть бути модифіковані для специфічного розпізнавання клітин-мішеней. Неорганічні наночастинки, такі як мезопористий кремнезем чи оксиди заліза, поєднують функції носія ліків із додатковими діагностичними або терапевтичними властивостями.

Важливою перевагою наночастинок є можливість як пасивного, так і активного націлювання. Пасивне накопичення відбувається завдяки підвищеній проникності та затримці наночастинок у пухлинній тканині (ефект “enhanced permeability and retention”) [3], тоді як активне націлювання реалізується шляхом приєднання до поверхні наночастинок антитіл, пептидів або інших лігандів, здатних специфічно взаємодіяти з рецепторами клітин-мішеней [4]. Крім того, сучасні наноплатформи можуть бути чутливими до зовнішніх або внутрішніх стимулів, таких як зміна рН, концентрації

глутатіону, дія світла, магнітного поля чи ферментів, що забезпечує контрольоване вивільнення препарату безпосередньо в патологічному осередку [5].

Особливий інтерес викликають редокс-активні наночастинки, які не лише виконують функцію транспортних систем, але й здатні впливати на окисно-відновний баланс клітин. Зокрема, наночастинки оксиду церію можуть брати участь у редокс-процесах завдяки оборотним переходам між різними ступенями окиснення [6]. Це відкриває можливість створення багатофункціональних терапевтичних платформ, у яких доставка лікарського препарату поєднується з модифікацією внутрішньоклітинного рівня активних форм кисню, що є особливо перспективним для протипухлинної терапії. Таким чином, використання наночастинок для доставки ліків дозволяє не лише підвищити ефективність транспортування терапевтичних агентів, але й реалізувати принципово нові підходи до лікування захворювань завдяки поєднанню транспортних, діагностичних та терапевтичних функцій в одній наноструктурі.

На сьогодні ключовим завданням у біомедичній галузі 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 та контрольовано впливати на біохімічні процеси всередині клітини [7]. Попередні дослідження показали, що наявність у нанокристалах іонів зі змінною валентністю робить можливою редокс-взаємодію з активними формами кисню (АФК) різних типів, забезпечуючи анти- або прооксидантну активність нанокристалів [8]. При цьому керування редокс-властивостями нанокристалів потребує глибокого розуміння факторів, що обумовлюють тип та конкретні механізми редокс-взаємодії наночастинок з біологічними молекулами при варіюванні розміру, елементного складу та

форми наночастинок, а також властивостей середовища, в якому відбувається ця взаємодія. Тип редокс-активності нанокристалів з іонами змінної валентністю, зокрема, нанокристалів CeO_{2-x} , безпосередньо залежить від характеристик оточуючого середовища (таких як рН та концентрація кисню) і за певних значень рН має спостерігатися перехід від про- до антиоксидантної активності нанокристалів, що може бути використано для керування типом редокс-активності наночастинок [9].

У низці робіт було запропоновано використання залежності типу редокс-активності нанокристалів від рН оточуючого середовища для селективного знищення ракових клітин. Можливість такої селективної дії забезпечується більш низьким значенням рН ракових клітин у порівнянні з здоровими (не раковими), що є проявом ефекта Варбурга, який полягає в тому, що ракові клітини переважно отримують енергію шляхом інтенсивного гліколізу навіть за наявності достатньої кількості кисню [10]. Як результат, ефект Варбурга тісно пов'язаний зі змінами рН пухлинного мікрооточення. Внаслідок інтенсивного аеробного гліколізу пухлинні клітини споживають великі кількості глюкози та продукують значну кількість лактату і протонів (H^+). У результаті цього формується кисле пухлинне мікрооточення з позаклітинним рН приблизно 6,5–6,9, тоді як у нормальних тканинах він становить близько 7,4.

Для наночастинок це має особливе значення, оскільки знижений рН пухлинного мікрооточення часто використовується як тригер для селективного вивільнення ліків. рН-чутливі наноплатформи можуть залишатися стабільними в кровотоці (рН $\approx$ 7,4), але швидко вивільняти терапевтичний агент після потрапляння в кисле середовище пухлини або ще більш кислі внутрішньоклітинні компартменти (ендосоми та лізосоми з рН 4,5–6,0). Саме тому ефект Варбурга розглядається не лише як метаболічна особливість пухлин, а й як важлива основа для розробки систем адресної

доставки ліків та редокс-активних нанотерапевтичних платформ.

1.2 Нанокристали оксиду церію та комплекси $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$

Оксид церію (CeO_{2-x}) належить до добре вивчених неорганічних матеріалів, ключовою особливістю якого є здатність іонів церію змінювати свій валентний стан [9]. У структурі цього матеріалу співіснують іони Ce^{3+} та Ce^{4+} , а утворення ряду проміжних оксидів дозволяє кристалу гнучко реагувати на зовнішні фактори. Співвідношення цих іонів безпосередньо залежить від умов синтезу, температури, концентрації кисню в навколишньому середовищі, тощо. Це дає змогу цілеспрямовано контролювати структурні та хімічні характеристики нанокристалів. Значний інтерес до біологічного застосування оксиду церію виник у 2005 році після публікації результатів дослідження [11], яке продемонструвало здатність цих наночастинок подовжувати життєздатність нейронних культур більш ніж у п'ять разів — від двадцяти до понад ста днів. Ця робота стала поштовхом до розвитку нового наукового напрямку — наноензимології, що вивчає здатність штучних редокс-активних кристалів імітувати каталітичну поведінку природних ферментів. Згодом було встановлено, що ферментоподібна активність оксиду церію критично залежить від рівня кислотності середовища [12]. У нейтральних умовах із показником рН близько 7.4, що є фізіологічною нормою для здорових клітин, нанокристали діють як ефективні антиоксиданти. При появі перекису водню відбувається окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} , яке після нейтралізації загрози супроводжується зворотним відновленням, дозволяючи матеріалу працювати циклічно. Натомість у кислому середовищі з рН, характерному для пухлинних клітин, перехід до

стану стає незворотним, внаслідок чого нанокристали втрачають свою автокаталітичну здатність і припиняють виконувати захисну функцію [9].

Останніми роками значної уваги набули гібридні системи на основі наночастинок оксиду церію та циклодекстринів (CD) [13]. Циклодекстрини — це природні циклічні олігосахариди, що складаються з 6, 7 або 8 глюкозних залишків (α -, β - та γ -CD відповідно). Розміри молекул CD (зовнішній діаметр 1.4-1.7 нм, діаметр внутрішньої порожнини 0.5-0.9 нм) є співмірними з типовими розмірами молекул ліків.

Фармакологічне значення циклодекстринів насамперед пов'язане з їх здатністю суттєво підвищувати розчинність і біодоступність лікарських речовин, які характеризуються низькою водорозчинністю та обмеженою абсорбцією в шлунково-кишковому тракті. Утворення комплексу включення призводить до збільшення ефективної концентрації розчиненої форми препарату, прискорення швидкості розчинення та, відповідно, покращення фармакокінетичних параметрів. Окрім підвищення розчинності, циклодекстрини виконують функцію стабілізаторів лікарських форм, захищаючи інкапсульовані молекули від гідролітичної, окисної та фотохімічної деградації, а також зменшуючи леткість і сенсорну активність деяких сполук. В сучасних лікарських формах переважно використовуються хімічно модифіковані похідні, такі як гідроксипропіл- β -циклодекстрин та сульфобутилєтер- β -циклодекстрин, які характеризуються підвищеною водорозчинністю, зниженим токсичним профілем і кращою регуляторною прийнятністю для внутрішньовенного застосування.

З точки зору молекулярної фармації циклодекстрини також відіграють важливу роль у створенні систем контрольованого вивільнення та супрамолекулярних лікарських форм, включаючи наногелі, полімерні кон'югати та комбіновані наночастинкові системи. Вони можуть використовуватися як допоміжні компоненти для попереднього

солюбілізуванню активних фармацевтичних інгредієнтів перед їх інкорпорацією в ліпосоми, полімерні або неорганічні наночастинки, а також як елементи host-guest взаємодій у багатофункціональних тераностичних платформах. У контексті наномедицини це дозволяє поєднувати підвищення стабільності та біодоступності препарату з можливістю його адресної доставки та стимул-чутливого вивільнення в патологічному мікрооточенні, включаючи кисле та редокс-активне середовище пухлин.

Дослідження показали, що комплекси CD з доксорубіцином, який є одним з найбільш відомих антиракових препаратів, мають рН-залежну стабільність, яка зменшується при переході від нейтральних значень рН до слабкокислих, що дозволяє використовувати їх як рН-чутливі носії протипухлинних препаратів [14,15]. Особливий інтерес представляє комбінація рН-залежних прооксидантних властивостей наночастинок CeO_2-x та рН-залежного вивільнення ліків з порожнин циклодекстрину. При низьких значеннях рН, характерних для ракових клітин, наночастинки CeO_2-x проявляють пероксидазоподібну активність, що призводить до генерації активних форм кисню та окиснення біологічних молекул [16]. Одночасно, при зниженні рН відбувається протонування аміногруп DOX, що зменшує гідрофобність молекули та сприяє її вивільненню з порожнин β -CD [14,15]. Така комбінована дія може забезпечувати підвищену селективність протипухлинної терапії [17, 18].

У попередніх роботах з даними органо-неорганічними комплексами [19] було отримано стабільні колоїдні розчини наночастинок $\text{CeO}_2-x@ \beta$ -CD розміром 2-3 нм, які проявляли високу антирадикальну активність при нейтральних значеннях рН. Молекули β -CD виступали не тільки як стабілізатори, але й як потенційні "кишені" для зв'язування гідрофобних молекул. Створення комплексів на основі редокс-активних нанокристалів з анти- або прооксидантними молекулами відкриває можливість отримання

синергетичного про-/антиоксидантного ефекту при взаємодії з активними формами кисню у біологічному середовищі. Такі комплекси можуть виконувати подвійну роль як доставщики лікарських засобів та терапевтичні агенти, здатні безпосередньо змінювати окисно-відновний баланс у живій клітині.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Синтез наночастинок $\text{CeO}_{2-x}\text{@}\beta\text{-CD}$

Наночастинки $\text{CeO}_{2-x}\text{@}\beta\text{-CD}$ були отримані колоїдним синтезом, описаним у [9]. Водний розчин 50 мл 0.01 М $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Acros Organics) повільно крапельно додавали до 50 мл 0.01 М β -циклодекстрину ($\beta\text{-CD}$, MW ~1135, Acros Organics) при перемішуванні протягом 30 хв. Потім протягом 4 годин крапельно додавали 1 М водний розчин аміаку (NH_4OH , Sigma-Aldrich), підтримуючи рН на рівні 7.5-8.0. Після того, як рН стабілізувалося, суміш продовжували перемішувати, поступово доводячи рН до 11.0 за допомогою водного аміаку. Розчин перемішували ще 4 години. Нарешті, розчин додатково діалізували протягом 48 годин проти деіонізованої води для видалення надлишку іонів та органічних молекул. Отриманий блідо-жовтий золь був прозорим у прохідному світлі.

2.2 Характеризація наночастинок

Для визначення розмірів та морфології наночастинок використовували просвічуючу електронну мікроскопію (ПЕМ) на мікроскопах JEOL JEM-2100F та JEOL JEM-2100. Рентгенофазовий аналіз (РФА) виконували на порошковому дифрактометрі Bruker D8 Discover ($\text{Cu K}\alpha$ -випромінювання). Ідентифікацію фаз проводили з використанням бази даних ICDD PDF-4+ 2023. Розмір кристалітів визначали методом Рітвельда. Співвідношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ в отриманих наночастинках визначали методом рентгенівської фотоелектронної спектроскопії (РФС). Спектри РФС отримували на плівці наночастинок, висушених на золотій фользі. Використовували монохроматизоване $\text{Al-K}\alpha$ -

випромінювання ($h\nu = 1486.7$ eV) та напівсферичний аналізатор енергії електронів PHIIBOS-150 (SPECS). Калібрування спектрів проводили за лінією C 1s при 284.8 eV. Функціональні групи наночастинок $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ аналізували методом ІЧ-Фур'є спектроскопії на спектрометрі Perkin Elmer Spectrum-One в діапазоні 400-4000 cm^{-1} . Спектроскопічний KBr використовували як фон.

2.3 Дослідження пероксидазоподібної та оксидазоподібної активності

Пероксидазоподібну та оксидазоподібну активність наночастинок оцінювали при кімнатній температурі з використанням субстрату ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Досліджували вплив концентрації наночастинок (0-75 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), концентрації H_2O_2 (0-20 mM) та pH (3.5-7.5) на пероксидазну активність. Типова процедура: 40 мкл розчину наночастинок (1000 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) додавали до 1740 мкл ацетатного буферу (NaAc/HAc, 0.2 M, pH=4.0), потім додавали 200 мкл 0.01 M ТМВ в DMSO та 20 мкл 1 M H_2O_2 . Інкубували 6 хв. Оптичну густину окисненого ТМВ вимірювали при довжині хвилі 652 нм за допомогою УФ-видимої спектроскопії в стаціонарному та часороздільному режимах. Кінетичні дослідження проводили при фіксованій концентрації наночастинок 20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, варіюючи концентрацію ТМВ (0.15, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 0.875, 1.5 mM) при $\text{H}_2\text{O}_2 = 10$ mM, або варіюючи концентрацію H_2O_2 (1.5, 2, 2.5, 5, 10, 15, 20 mM) при ТМВ = 1 mM. Вимірювання проводили на спектрофотометрі Specord 200 (Analytic Jena) в режимі сканування часу (довжина хвилі 652 нм, інтервал 20 с, тривалість 6 хв).

2.4 Адсорбція та десорбція доксорубіцину

Для завантаження доксорубіцину (DOX) наночастинами, розчин наночастинок змішували з DOX у співвідношенні 1:1. Адсорбцію проводили при 37 °C при постійному перемішуванні. Час контакту варіювали від 15 до

1440 хв. Адсорбцію досліджували при рН 5.0 та 7.4. Для досягнення рН 5.0 використовували HNO_3 . Після адсорбції наночастинки відокремлювали центрифугуванням, промивали дистильованою водою. Кількість адсорбованого DOX визначали за зміною оптичної густини при 485 нм за формулою:

$\text{DOX, \%} = [(A_0 - A)/A_0] \times 100\%$,де A_0 та A — початкова та кінцева концентрації DOX у розчині. Десорбцію DOX досліджували у фосфатному буфері (PBS) при рН 5.4 та 37 °С. Через задані проміжки часу (15, 30, 60, 120, 240, 360, 1440 хв) відбирали аліквоти (0.2 мл) та визначали концентрацію вивільненого DOX спектрофотометрично при 485 нм.

2.5 Методи обробки даних.

Кінетичні дані адсорбції аналізували за моделями псевдо-першого порядку та псевдо-другого порядку. Ізотерми адсорбції описували моделями Ленгмюра, Фрейндліха та Сіпса. Кінетику пероксидазної активності аналізували за моделлю Міхаеліса-Ментен з побудовою подвійних зворотних графіків Лайнвівера-Берка.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Характеризація наночастинок $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$

Розмір нанокристалів у комплексах досліджувався за допомогою методів просвітлювальної електронної мікроскопії (ПЕМ) і склав $2,81 \pm 0,23$ нм (рис. 1а). Малий розмір наночастинок забезпечується стабілізуючою дією циклодекстрину, який запобігає агрегації нанокристалів у водних розчинах. Так, згідно з даними динамічного світлорозсіювання, гідродинамічний діаметр наночастинок у колоїдних розчинах становить 30.2 ± 1.4 нм, що значно менше, ніж для частинок, синтезованих без $\beta\text{-CD}$ (близько 200 нм з подальшим швидким осадженням).

Рентгенівська дифрактограма (рис. 1б) відповідає кубічній структурі типу флюориту (JCPDS No. 34-0394, просторова група $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$). Середній розмір кристалітів, розрахований за рівнянням Шеррера, становить 2-3 нм, що узгоджується з даними ПЕМ.

РФС спектри (рис. 1в) підтверджують співіснування іонів Ce^{3+} та Ce^{4+} у наночастинках (на графіку позначені різними кольорами переходи, що відповідають іонам Ce^{3+} та Ce^{4+}). При цьому співвідношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ становить близько 0.25, тобто вміст іонів Ce^{3+} становить $\sim 25\%$.

На ІЧ-Фур'є спектрах (рис. 1г) наночастинок $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ спостерігаються смуги при $\sim 1200\text{-}1029\text{ см}^{-1}$, які відповідають симетричним коливанням глікозидних зв'язків C-O-C та C-O в полісахаридах. Ці смуги підтверджують присутність $\beta\text{-CD}$ на поверхні наночастинок і формування комплексів.

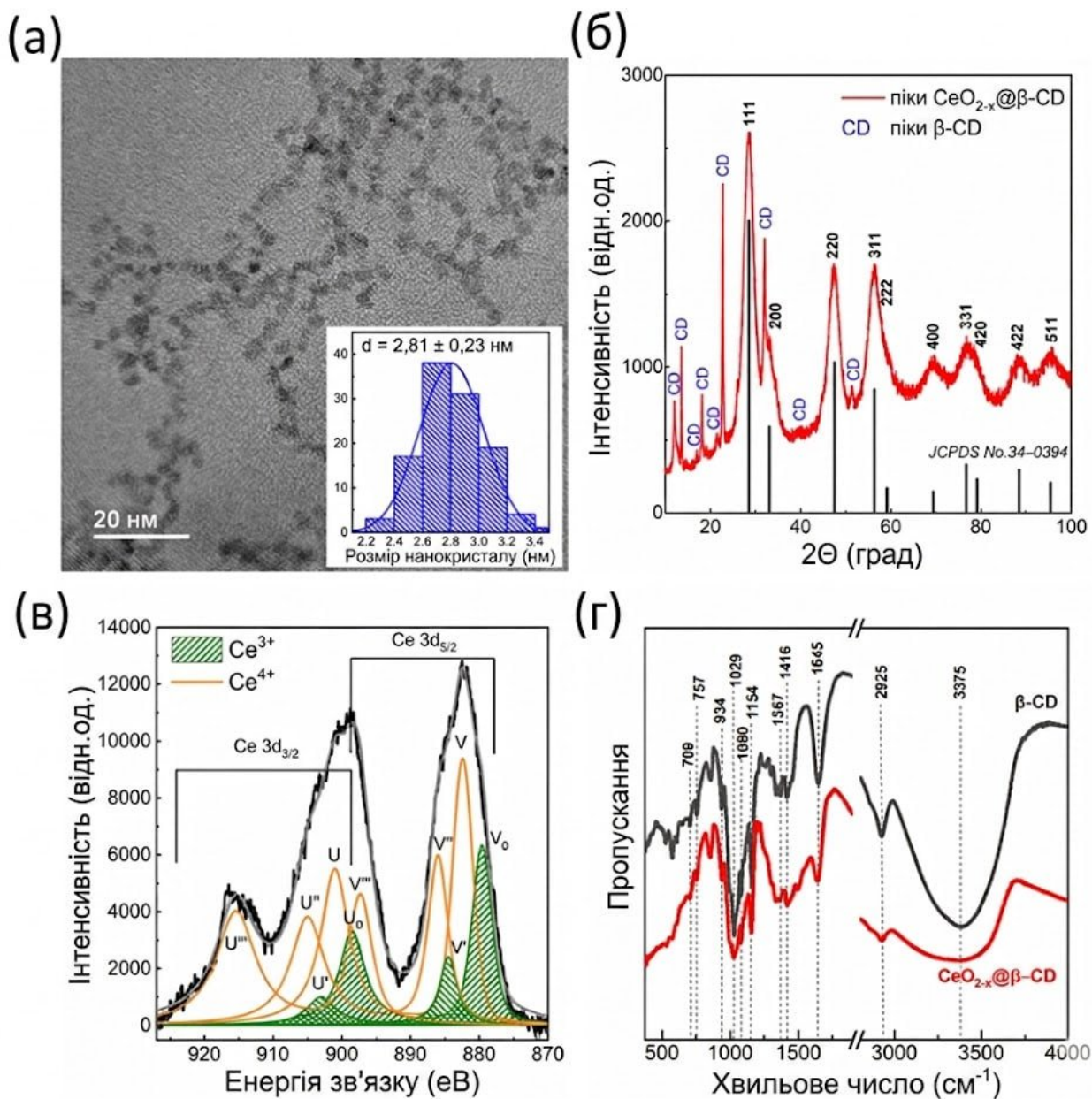


Рис. 1 – ПЕМ-зображення нанокристалів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$ (а), РФА досліджуваних нанокристалів (б), РФЕС-спектри 3d рівнів іонів Ce (в) та ІЧ-Фур'є спектр наночастинок (г).

3.2 Пероксидазоподібна та оксидазоподібна активність

Пероксидазоподібна та оксидазоподібна активність є двома можливими типами прооксидантної активності наноферментів. Головна різниця між пероксидазоподібною та оксидазоподібною активністю полягає в тому, яка саме речовина запускає процес окиснення – перекис водню (пероксидазна активність) чи кисень (оксидазна активність). Для виявлення обох типів прооксидантної активності використовують у якості субстрату молекули 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (ТМВ). Ці молекули можуть зазнавати окиснення активними формами кисню, що утворює прооксидант (в даному випадку, наночастинка), переходячи у радикальну форму, яка взаємодіє з іншою молекулою ТМВ. Результатом цього процесу є забарвлення розчину у яскраво-синій колір із максимумом поглинання на довжині хвилі 652 нм.

На рисунку 2а показано кінетику окиснення ТМВ у різних реакційних системах при рН 4.0. Наночастинки $\text{CeO}_2\text{-x@}\beta\text{-CD}$ демонструють значно вищу пероксидазоподібну активність порівняно з чистим $\beta\text{-CD}$. При цьому помітне окиснення ТМВ спостерігається навіть без додавання H_2O_2 , що свідчить про оксидазоподібну активність. Швидкість окиснення ТМВ зростає зі збільшенням концентрації наночастинок (рис. 2б). Максимальна пероксидазна активність досягається при рН 4.0 (рис. 2в). При рН < 3.0 розчин набуває жовтого кольору, що вказує на повне окиснення ТМВ до його діамінокатіону. Для визначення кінетичних параметрів було проведено стаціонарні кінетичні дослідження з варіюванням концентрацій ТМВ та H_2O_2 . Отримані дані проаналізовано за моделлю Міхаеліса-Ментен. Константи Міхаеліса (K_m) та максимальні швидкості ($V_{\max}$) визначали за подвійними зворотними графіками Лайнвівера-Берка.

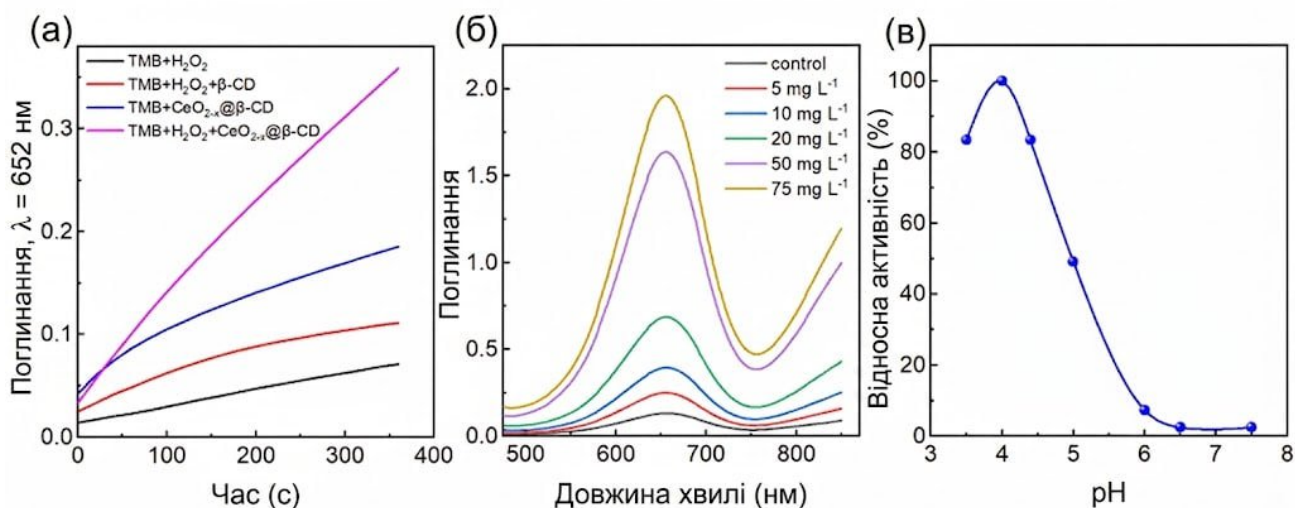


Рис. 2 - Кінетика окиснення ТМВ у різних реакційних системах (а), поглинання ТМВ у системах з різною концентрацією нанокристалів $\text{CeO}_{2-x}\text{@}\beta\text{-CD}$ (б), залежність пероксидазної активності нанокристалів від рівня рН (в).

Отримані кінетичні параметри наведені в таблиці 1. Значення K_m для ТМВ (0.406 мМ) є нижчим, ніж для H_2O_2 (0.937 мМ), що вказує на вищу спорідненість наночастинок до ТМВ. Каталітична ефективність (K_{cat}/K_m) становить $0.148 \text{ с}^{-1}\cdot\text{мМ}^{-1}$ для ТМВ та $0.05 \text{ с}^{-1}\cdot\text{мМ}^{-1}$ для H_2O_2 .

Таблиця 1 – Кінетичні параметри нанокристалів $\text{CeO}_{2-x}\text{@}\beta\text{-CD}$ і нанокристалів, досліджуваних у роботах [20, 21]:

	С, мг/л	ТМВ			H ₂ O ₂		
		K _m , мМ	V _{max} , 10 ⁻⁸ М с ⁻¹	K _{cat(mass)} , 10 ⁻⁸ моль г ⁻¹ с ⁻¹	K _m , мМ	V _{max} , 10 ⁻⁸ М с ⁻¹	K _{cat(mass)} , 10 ⁻⁸ моль г ⁻¹ с ⁻¹
				1			1
CeO _{2-x} @β-CD	20	0.406	2.41	120.5	0.937	1.93	96.5

CeO ₂ нанокуби (13 nm)	25	0.217	8.2	328	153.6	12.2	488	[20]
CeO ₂ нанодрти (10x10x300 nm)	25	0.240	0.4	16	-	-	-	[20]
CeO ₂ октаедри (20 nm)	8.3	0.101	0.7	84.33	2261.4	1.35	162.7	[21]
CeO ₂ нанодрти (10x10x200nm)	8.3	0.243	1.57	189	1132.8	1.98	238.6	[21]
CeO ₂ нанокуби (15-60 nm)	8.3	0.102	4.6	554.2	123.6	2.84	342.1	[21]

Оксидазоподібна активність (без H₂O₂) характеризується значеннями $K_m = 0.082$ мМ, $V_{max} = 1.64 \times 10^{-8}$ М·с⁻¹, що приблизно на третину нижче за швидкість реакції за наявності перекису водню.

3.3 Адсорбція молекул доксорубіцину на наночастинках

3.3.1 Кінетика адсорбції

Для дослідження можливості використання отриманих комплексів як носіїв антиракових препаратів з селективним вивільненням поблизу ракових клітин, були проаналізовані процеси адсорбції та десорбції молекул доксорубіцину (DOX) на отриманих комплексах. Кінетичні криві адсорбції DOX при рН 5.0 та 7.4 показано на рисунках 3а та 3б відповідно. Адсорбційна здатність при рН 7.4 досягає ~ 40 мг·г⁻¹, що значно вище, ніж при рН 5.0 (~ 18 мг·г⁻¹).

Аналіз кривих адсорбції відкриває можливість до кращого розуміння механізмів взаємодії молекул доксорубіцину з комплексами. Так, модель адсорбції псевдо-першого порядку базується на припущенні, що швидкість зміни концентрації адсорбента в часі прямо пропорційна різниці між рівноважною концентрацією та його поточною концентрацією. У випадку каталізу це часто вказує на те, що лімітуючою стадією є фізична дифузія субстрату до поверхні наночастинки. Натомість, модель псевдо-другого порядку базується на припущенні, що швидкість процесу пропорційна квадрату кількості вільних активних центрів на поверхні. У контексті наноферментів адекватність цієї моделі свідчить про те, що лімітуючою стадією є хемосорбція або безпосередньо хімічна реакція.

Аналіз кінетичних даних за моделями псевдо-першого та псевдо-другого порядків показав, що адсорбція DOX краще описується моделлю псевдо-другого порядку ($R^2 = 0.999$ при pH 5.0 та $R^2 = 0.996$ при pH 7.4), що вказує на хемосорбційний механізм.

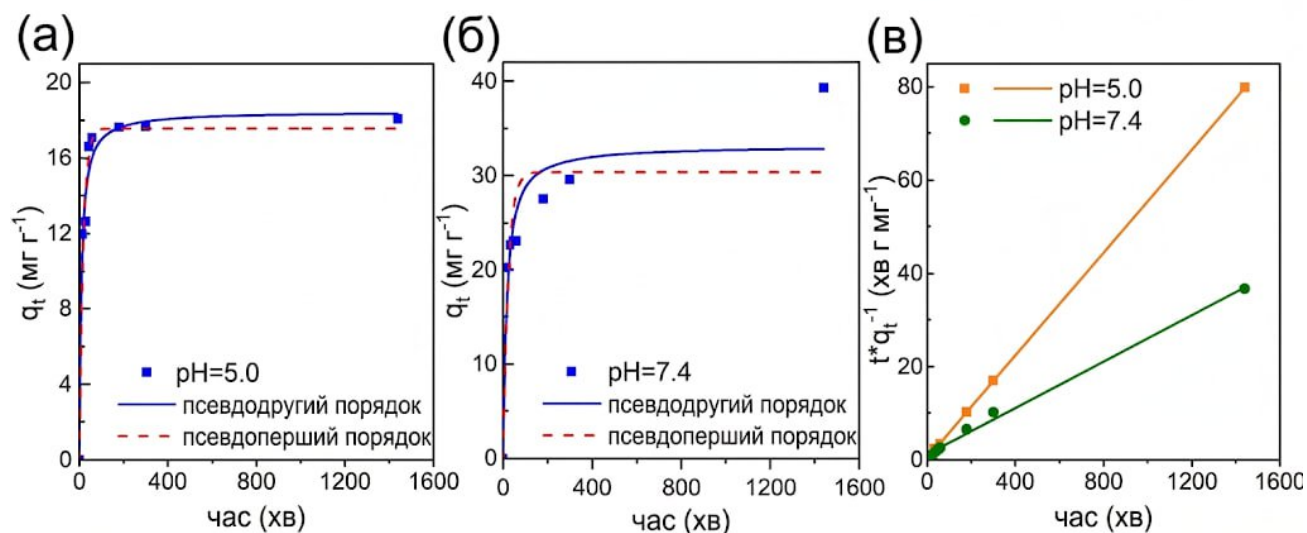


Рис. 3 – Кінетичні криві адсорбції при pH 5.0 (а) та pH 7.4 (б), лінійні форми кривих псевдодругого порядку (в).

3.3.2 Ізотерми адсорбції

Ізотерми адсорбції DOX при рН 7.4 (рисунок 4) були проаналізовані за моделями Ленгмюра, Фрейндліха та Сіпса.

Ізотерми адсорбції дозволяють математично встановити, як саме молекули субстрату розподіляються на поверхні наночастинки [22-24]. За умов моношарової адсорбції, коли всі активні центри є енергетично еквівалентними ізотерма описується моделлю Ленгмюра [23], коли центри на поверхні мають різну активність, і першими заповнюються найвигідніші з них ізотерма описується моделлю Фрейндліха [24], тоді як модель Сіпса [22] описує системи з енергетичною неоднорідністю поверхні, але враховує обмеженість кількості каталітичних центрів (ефект насичення).

Найкраще узгодження з експериментальними даними дає модель Сіпса ($R^2 = 0.999$), що свідчить про гетерогенний характер адсорбційних центрів. Значення коефіцієнта гетерогенності $n_s = 0.29$ вказує на те, що адсорбція відбувається переважно в порожнинах β -CD.

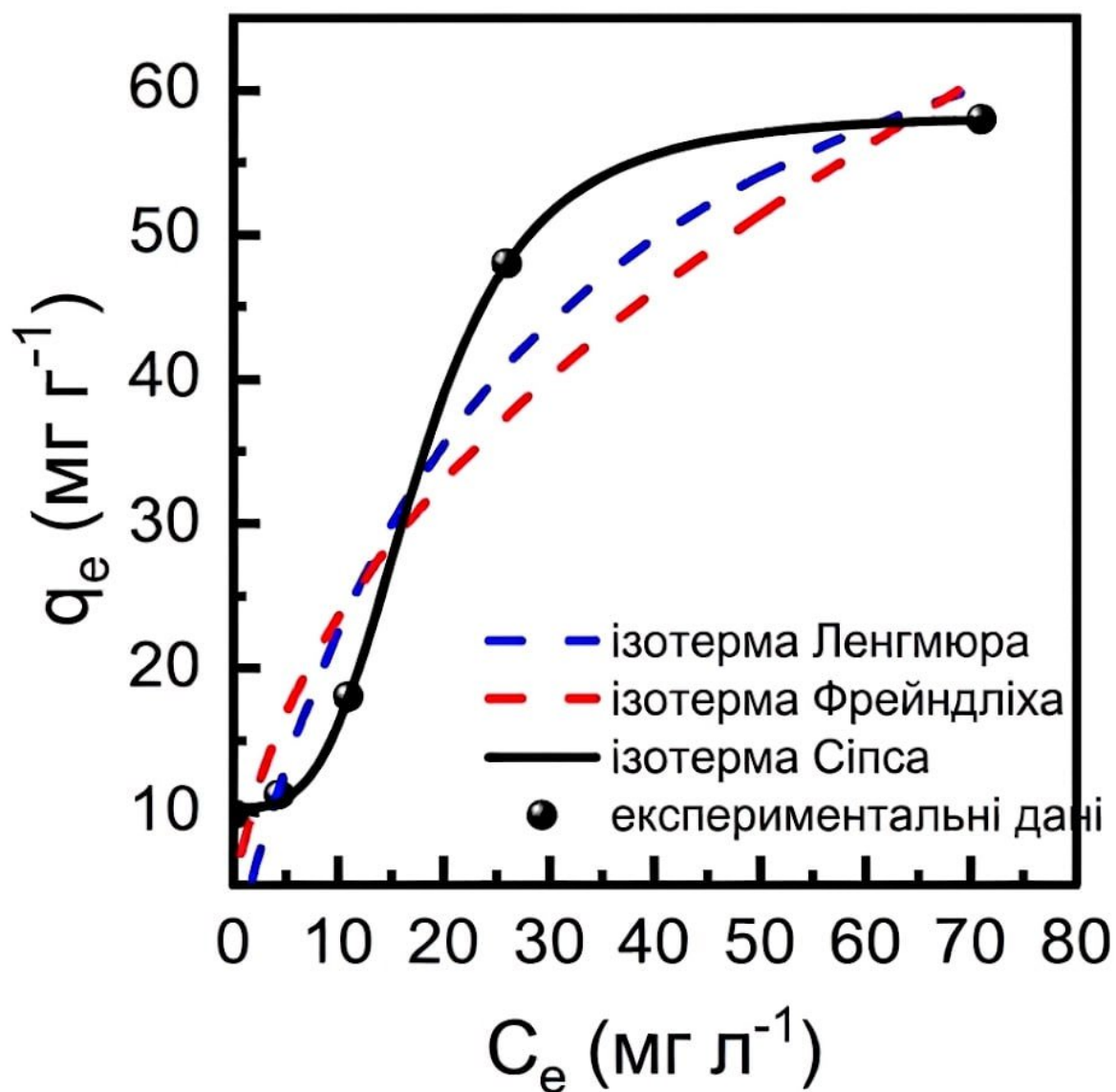


Рис. 4 – Концентраційні залежності адсорбційної здатності комплексів, апроксимовані ізотермами Ленгмюра, Фрейндліха і Сіпса.

3.3.3 Десорбція молекул доксорубіцину з наночастинок

Як очікувалось, отримані в роботі комплекси демонстрували найбільш ефективне вивільнення доксорубіцину за низьких значень рН (типових для мікрооточення ракових клітин).

На рисунку 5 продемонстровано загальну десорбцію DOX з часом після його сорбції при рН 7.4 і переміщення у середовище з рН 5.4. З отриманої залежності видно, що десорбція доксорубіцину відбувається у два етапи – перший швидкий, за якого за перші 15 хвилин з поверхні наночастинок десорбується до 35% DOX і другий повільний – за якого протягом наступних 24 годин десорбується ще порядка 20% початкового доксорубіцину. Таким чином загальна десорбція DOX за перші 24 години становить порядка 55%. Два етапи десорбції можна віднести до двох різних механізмів адсорбції DOX на наночастинок – сорбція на поверхню наночастинок за рахунок електростатичних сил і хемісорбція з утворенням комплексів DOX@ β -CD. Десорбція з поверхні частинок відбувається за рахунок зниження зета-потенцілу нанокристалів при зниженні рН, через що електростатичні сили слабшають і спостерігається різке вивільнення DOX на першому етапі. Подальша десорбція пов'язана зі зниженням стабільності комплексу DOX@ β -CD – протонування аміногрупи DOX при низьких рН призводить до дисоціації комплексу, а відповідно і до вивільнення доксорубіцину.

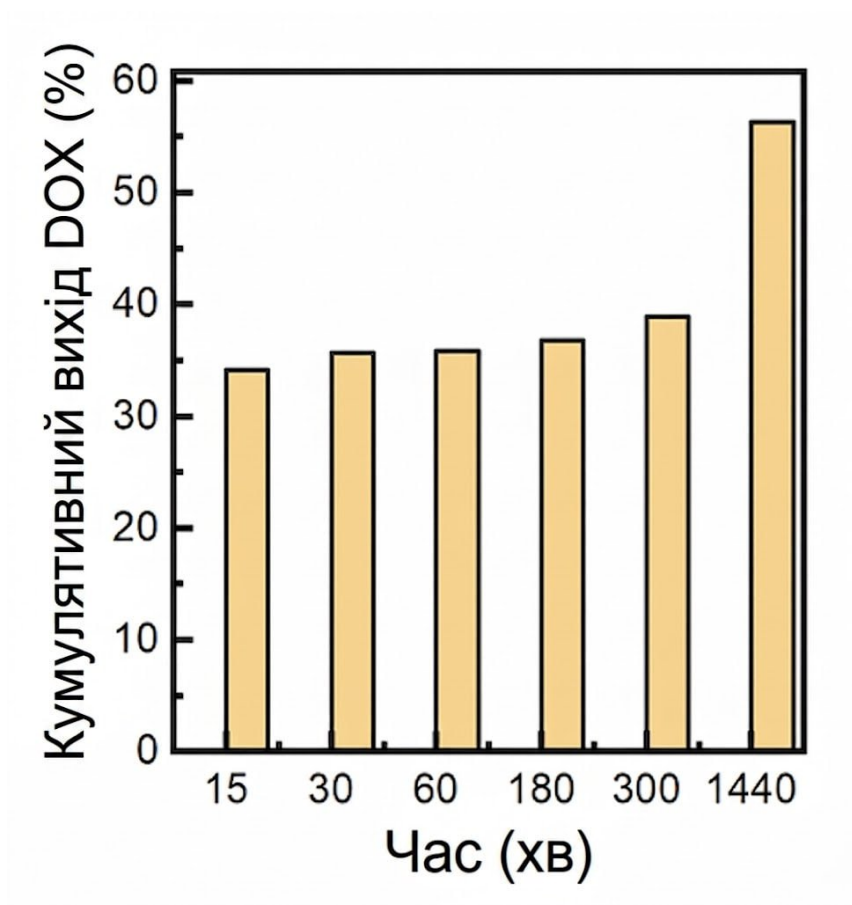


Рис. 5 – Вивільнення DOX з комплексів CeO_{2-x}@β-CD при pH 5.4.

ВИСНОВКИ

У роботі було досліджено вплив рН водних розчинів на редокс-активність та адсорбційну здатність комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$. Отримані результати дозволяють сформулювати наступні висновки:

- Наночастинки $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$ проявляють пероксидазоподібну активність, яка є максимальною при рН 4.0. Кінетичні параметри за моделлю Міхаеліса-Ментен становлять: для ТМВ — $K_m = 0.406 \text{ мМ}$, $V_{\max} = 2.41 \times 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$; для H_2O_2 — $K_m = 0.937 \text{ мМ}$, $V_{\max} = 1.93 \times 10^{-8} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$.
- Адсорбція доксорубіцину на наночастинках є рН-залежною: при рН 7.4 адсорбційна здатність досягає $\sim 40 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$, що значно вище, ніж при рН 5.0 ($\sim 18 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$). Кінетика адсорбції описується моделлю псевдо-другого порядку, що вказує на хемосорбційний механізм.
- Ізотерми адсорбції DOX найкраще описуються моделлю Сіпса ($R^2 = 0.999$), що свідчить про гетерогенний характер адсорбційних центрів, пов'язаний з наявністю порожнин $\beta\text{-CD}$.
- При рН 5.4 (характерному для ракових клітин) відбувається вивільнення близько 60% адсорбованого DOX протягом 24 годин, що забезпечує рН-чутливу доставку ліків.

Отримані результати свідчать про потенціал комплексів $\text{CeO}_{2-x}@\beta\text{-CD}$ як багатофункціональних антиракових агентів для комбінованої АФК- та хіміотерапії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Thorley, A. J., & Tetley, T. D. New perspectives in nanomedicine. *Pharmacology & therapeutics*. 2013. 140(2). P.176-185.
2. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., & Murray, J. C. (). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB journal*. 2005. 19(3). P. 311-330.
3. Wu, J. (2021). The enhanced permeability and retention (EPR) effect: the significance of the concept and methods to enhance its application. *Journal of personalized medicine*. 2021. 11(8). P. 771.
4. Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*. 2016. 6(9). P. 1306.
5. Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature materials*. 2013. 12(11). P. 991-1003.
6. Seminko, V. and Maksimchuk, P. Cerium Oxide Nanocrystals (CeO_{2-x}): Defects, Luminescence and Redox Activity. Springer Nature, 2026, 126 p.
7. Yang, B., Chen, Y., & Shi, J. Reactive oxygen species (ROS) - based nanomedicine. *Chemical reviews*. 2019. 119(8). P. 4881-4985.
8. Huang, Y., Ren, J., & Qu, X. Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chemical reviews*. 2019. 119(6). P. 4357-4412.
9. Grulke, E., Reed, K., Beck, M., Huang, X., Cormack, A., & Seal, S. Nanoceria: factors affecting its pro-and anti-oxidant properties. *Environmental Science: Nano*. 2014. 1(5). P. 429-444.
10. Lebelo, M. T., Joubert, A. M., & Visagie, M. H. Warburg effect and its role in tumourigenesis. *Archives of pharmacal research*. 2019. 42(10). P. 833-847.
11. Rzigalinski B. A. Nanoparticles and Cell Longevity. *Technology in cancer research & treatment*. 2005. 4(6). P. 651-659.
12. Perez J.M., Asati A., Nath S., Kaittanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*. 2008. 4. P. 552-555.

13. Davis M.E., Brewster M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. 3. P. 1023-1035.
14. Tian B., Liu Y., Liu J. Smart stimuli-responsive drug delivery systems based on cyclodextrin: A review. *Carbohydr. Polym.* 2021. 251. 116871.
15. Yuan Y., Nie T., Fang Y. et al. Stimuli-responsive cyclodextrin-based supramolecular assemblies as drug carriers. *J. Mater. Chem. B.* 2022. 10. P. 2077-2096.
16. Singh R.K., Patel K.D., Mahapatra C. et al. Combinatory cancer therapeutics with nanoceria-capped mesoporous silica nanocarriers through pH-triggered drug release and redox activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. 11. P. 288-299.
17. Heckert E.G., Seal S., Self W.T. Fenton-like reaction catalyzed by the rare earth ion complex of cerium. *Environ. Sci. Technol.* 2008. 42(13). P. 5011-5016.
18. Mu J., Zhang L., Zhao M., Wang Y. Catalytic mechanism of peroxidase-like activity of nanoceria. *ACS Catal.* 2014. 4(5). P. 1356-1363.
19. Grygorova G., Seminko V., Maksimchuk P. et al. Stable nanometer-size β -CD@CeO_{2-x} colloidal nanoparticles with high free radical scavenging activity. *J. Mol. Liq.* 2024. 396. 124091.
20. Y. Yang, Z. Mao, W. Huang, L. Liu, J. Li, J. Li, Q. Wu, Redox enzyme-mimicking activities of CeO₂ nanostructures: Intrinsic influence of exposed facets, *Sci. Rep.*, 2016, 6, 35344.
21. Z. Tan, Y.-C. Chen, J. Zhang, J.P. Chou, A. Hu, Y.K. Peng, Nanoisozymes: The origin behind pristine CeO₂ as enzyme mimetics, *Chemistry*, 2020, 26, 10598–10606.
22. Sips R. On the structure of a catalyst surface. *J. Chem. Phys.* 1948. 16(5). P. 490-495.
23. Langmuir I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 1918. 40(9). P. 1361-1403.
24. Freundlich H. Über die Adsorption in Lösungen. *Z. Phys. Chem.* 1907. 57U(1). P. 385-470.