

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

«Допущено до захисту»

Оцінка: « _____ »

В. о. зав. кафедри фізики кристалів:
Академік НАН України, доктор
технічних наук, професор, директор
Інституту сцинтиляційних матеріалів
НАН України
Гриньов Б. В. _____
17 травня 2024 р.

Голова ЕК:
Член-кореспондент НАН України,
доктор фіз.-мат. наук, заступник
директора Інституту сцинтиляційних
матеріалів НАН України
Сорокін О. В. _____
24 травня 2024 р.

Лупан Микита Ігорович

**«Вплив рН середовища на про- та антиоксидантні властивості
нанокристалів оксиду церію»**

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього
ступеня «Магістр»
спеціальність 104 – «фізика та астрономія»
освітньо-наукова програма «фізика»

Науковий керівник – старший науковий
співробітник кафедри фізики кристалів, кандидат
фізико-математичних наук Коршак В. Ф.

Консультант – завідувач лабораторії
наноструктурних органічних матеріалів ІСМА
НАН України, старший дослідник, доктор фіз.-мат.
наук Семінько В. В.

Рецензент – член-кореспондент НАН України,
доктор фіз.-мат. наук, заступник директора ІСМА
НАН України Сорокін О. В.

Харків 2024

АНОТАЦІЯ

Лупан М. І. Вплив рН середовища на про- та антиоксидантні властивості нанокристалів оксиду церію.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього рівня «Магістр» за спеціальністю 104 – «фізика та астрономія», за освітньо-науковою програмою «фізика». – Харків: ХНУ ім. В. Н. Каразіна, 2024. – 33 ст. – 1 табл. – 10 рис.

За допомогою методів оптичної спектроскопії були досліджені механізми антиоксидантної активності нанокристалів оксиду церію при різних значеннях рН. Були досліджені: здатність розкласти перекис водню нанокристалом оксиду церію при різних рівнях рН, вміст супероксид-аніонів у розчинах з перекисом водню і нанокристалом церію, був досліджений вміст гідроксил-радикалів при розкладанні перекису водню нанокристалом оксиду церію при різних рН, здатність наночастинок нейтралізувати гідроксил радикали, була досліджена динаміка вмісту тривалентних іонів церію у нанокристалах при розкладанні ними перекису водню при різних рН. Для отримання результатів були зняті спектри люмінесценції 7-гідроксикумарину, фосфіну, тривалентного церію, були зняті спектри поглинання адренохром. На основі отриманих даних було показано, що розкладання перекису водню в залежності від рН відбувається за двома різними механізмами, було показано зменшення здатності нейтралізувати гідроксил-радикали нанокристалом оксиду церію при зменшенні рН водного розчину, в якому ті знаходяться, була показана значна залежність редокс-активних властивостей нанокристалів в залежності від рН.

Ключові слова: оксид церію, рН, редокс-активність, нанокристали, спектр люмінесценції, спектр поглинання.

ABSTRACT

Lupan M. I. Influence of pH on the Pro- and Antioxidant Properties of Cerium Oxide Nanocrystals.

Qualification work for obtaining the educational degree "Master" in specialty 104 – "Physics and Astronomy", under the educational and scientific program "Physics". – Kharkiv: V. N. Karazin Kharkiv National University, 2024. – 33 pages. – 1 table. – 10 figures.

The mechanisms of antioxidant activity of cerium oxide nanocrystals at different pH values were studied using optical spectroscopy methods. The following were investigated: the ability of cerium oxide nanocrystals to decompose hydrogen peroxide at different pH levels, the content of superoxide anions in solutions with hydrogen peroxide and cerium nanocrystals, the content of hydroxyl radicals during the decomposition of hydrogen peroxide by cerium oxide nanocrystals at different pH, the ability of nanoparticles to neutralize hydroxyl radicals, and the dynamics of trivalent cerium ions in nanocrystals during the decomposition of hydrogen peroxide at different pH levels. Luminescence spectra of 7-hydroxycoumarin, phosphine, and trivalent cerium, as well as absorption spectra of adrenochrome, were recorded to obtain the results. The data showed that hydrogen peroxide decomposition occurs via two different mechanisms depending on the pH, there is a decrease in the ability of cerium oxide nanocrystals to neutralize hydroxyl radicals with decreasing pH of the aqueous solution in which they are present, and a significant dependence of the redox-active properties of the nanocrystals on pH was demonstrated.

Keywords: cerium oxide, pH, redox activity, nanocrystals, luminescence spectrum, absorption spectrum.

ЗМІСТ

1.	ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
2.	ВСТУП.....	6
3.	АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ.....	7
4.	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	15
	4.1 Характеризація нанокристалів оксиду церію.....	15
	4.2 Вимірювання спектрів поглинання та люмінесценції	16
5.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	17
6.	ВИСНОВКИ	29
7.	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	32

1. ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АФК	активні форми кисню
РФС	рентгенівська фотоелектронна спектроскопія
НЧ	наночастинка
DNC	нанокристали оксиду церію, вкриті декстраном
СОД	супероксиддисмутаза
ГМТА	гексаметилентетрамин

2. ВСТУП

Майже 20 років тому відбувся сплеск активності, пов'язаний з дослідженнями нанокристалів оксиду церію. Ці кристали виявилися редокс-активними, що поставило їх в один ряд з іншими подібними неорганічними речовинами, які мають перспективу бути використаними як лікувальні препарати. Такими цікавими для дослідження ці кристали робить їхня здатність до збільшення або зменшення активних форм кисню (АФК) у живих клітинах, що в свою чергу може призвести до оксидативного стресу, або ж, навпаки, до захисту клітини від його наслідків.

З-поміж інших подібних речовин оксид церію можна виділити через його здатність варіювати характер редокс-активності через зміну зовнішніх умов, у яких кристал знаходиться (температура, опромінення), та самих параметрів кристалу (розмір, морфологія поверхні). Задачею роботи було проведення дослідження механізмів формування редокс-активності нанокристалів і встановлення шляхів керування їх анти- та прооксидантними властивостями методами оптичної спектроскопії, які, у протиставлення до рентгенівської фотоелектронної спектроскопії, не здатні чинити значний вплив на розчини з нанокристалами оксиду церію. Отримані такими методами результати здатні доповнити картину нашого розуміння будови цих кристалів, а також механізми продемонстрованих у великій кількості експериментів їхніх анти- і прооксидантних властивостей.

3. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД ДЖЕРЕЛ

Оксид церію (CeO_{2-x}) є одним з найбільш вивчених матеріалів з іонами, що можуть змінювати свою валентність. Його унікальність полягає в здатності утворювати ряд проміжних оксидів, склад яких варіюється від Ce_2O_3 до CeO_2 . Це зумовлено особливістю атома церію проявляти в хімічних сполуках валентності 4+ та 3+. У реальних оксидах іони церію співіснують в обох валентних станах, а їх співвідношення визначається зовнішніми факторами, такими як температура та концентрація кисню в оточуючому середовищі. Таким чином, змінюючи умови навколо кристалу або нанокристалу оксиду церію, можна контролювати ступінь відхилення від ідеального співвідношення кисню в його структурі.

Чистий оксид церію (IV) (CeO_2) має структуру, подібну до структури флюориту, з кубічною симетрією (Fm3m). При кімнатній температурі параметр його елементарної комірки $a = 5,41 \text{ \AA}$. У цій структурі іони Ce^{4+} знаходяться в центрі куба, утвореного вісьмома іонами кисню, розташованими в його вершинах. Кожен іон кисню, у свою чергу, оточений чотирма іонами церію, які займають вершини відповідного тетраедра.

Перехід від макроскопічних кристалів до нанокристалів, як правило, приводить до зменшення параметра елементарної комірки. Проте, для деяких оксидних нанокристалів, включаючи нанокристали оксиду церію, спостерігається зворотна тенденція: параметр елементарної комірки зростає зі зменшенням розміру нанокристалу.

Вперше унікальні біологічні властивості нанокристалів оксиду церію були показані у 2005 році у роботі [2], в якій було досліджено здатність нанокристалів оксиду церію збільшувати час життя нейронів у клітинній культурі більш ніж у 5 разів — з 20 днів до більш ніж 100 днів.

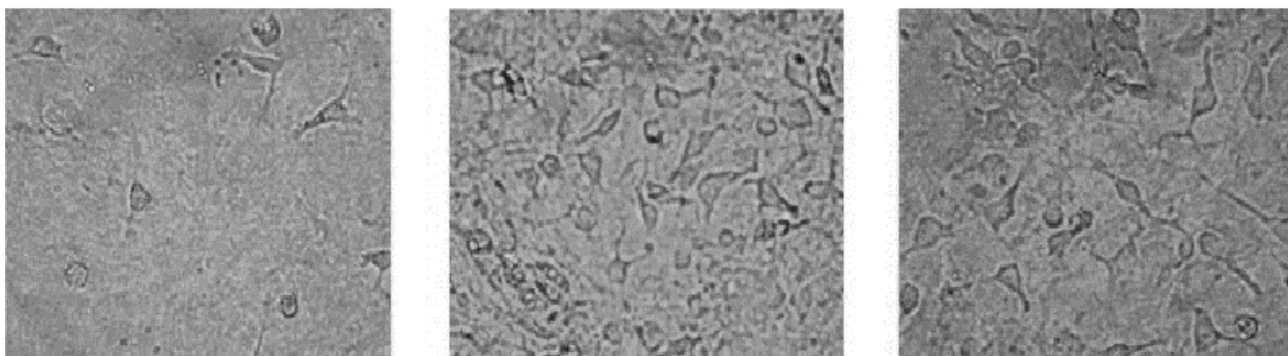


Рисунок 1 - фотографії клітин кісткового мозку щурів без (зліва) та з (посередині) наночастинками оксиду церію після 27 днів з їх виділення. Справа — фотографія клітин з нанокристаллами після 123 днів.

Після публікації результатів роботи відбувся сплеск біологічних досліджень нанокристалів оксиду церію, що потім навіть породило нову гілку знань — наноензимологію, яка досліджує здатність редокс-активних кристалів до поведінки, схожої з ензимами.

Пізніше було показано, що редокс-активність здатна змінюватись, у залежності від рН розчину, в якому знаходиться кристал. Так, у [1] було показано, що при рН 7.4, який спостерігається у здорових клітин, додавання перекису водню викликає окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} , що супроводжується зміною кольору розчину з DNC (нанокристали церію, що вкриті декстраом) з жовтого на помаранчевий. При розкладанні H_2O_2 відбувається зворотнє відновлення Ce^{4+} до Ce^{3+} , і розчин повертає свій початковий колір.

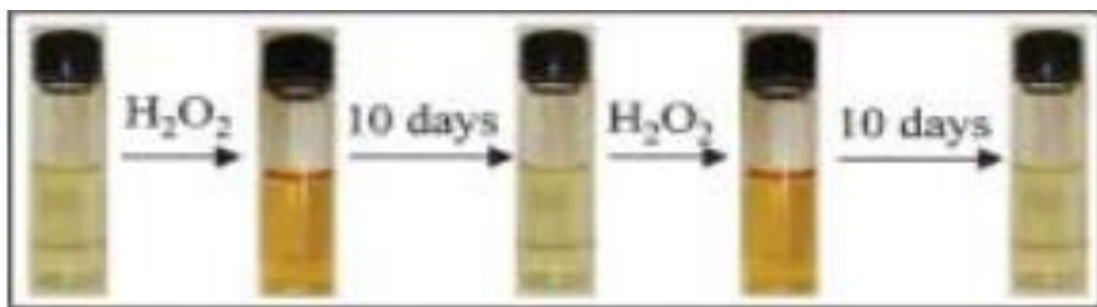


Рисунок 2 - зміна кольору розчину з DNC після додавання перекису водню, $\text{pH} = 7.4$. Спостерігається відновлення початкового кольору через 10 днів після додавання H_2O_2 .

При $\text{pH} = 4$, рівні кислотності, який можна спостерігати у, наприклад, ракових клітинах, окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} було незворотнім — розчин ставав прозорим і автокаталітична активність нанокристалів втрачалась.

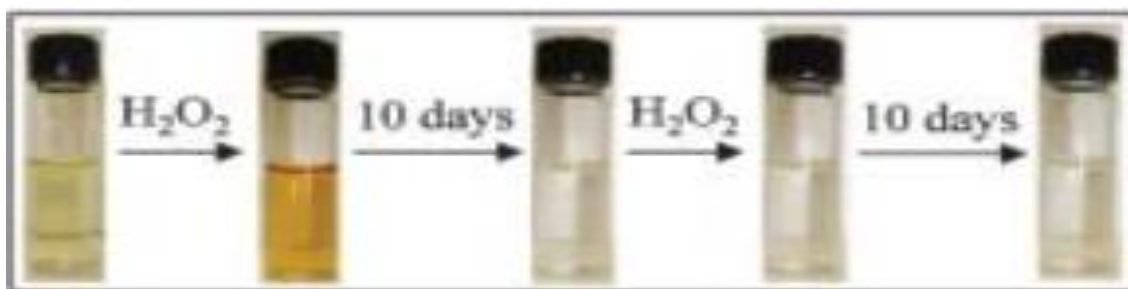


Рисунок 3 - зміна кольору розчину з DNC після додавання H_2O_2 , $\text{pH} = 4$.

Дослідження використання нанокристалів оксиду церію були проведені в [3], де було показано, що введення оксиду церію мишам з індукованою токсичністю печінки призводить до результатів, подібних до лікування N-ацетилцистеїном (NAC), загальним терапевтичним засобом для зниження окислювального стресу. Нанокристали залишалися накопиченими у тканинах і могли знижувати рівень активних форм кисню, що свідчить про його потенціал як антиоксидантного засобу для лікування окислювального стресу.

Подальші дослідження показали, що не лише зовнішні умови, такі як pH , впливають на редокс-активність церію, а й сама структура нанокристалів.

У [4] було досліджено здатність нанокристалів оксиду церію імітувати супероксиддисмутази (СОД) — фермент, що захищає клітини від пошкодження вільними радикалами. У результаті роботи було показано не тільки можливість церію показувати СОД-активність, а й відмінність у результатах для двох типів нанокристалів — у оксиду з більшим співвідношенням $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ була помічена більша активність, ніж у кристалів з меншим значенням $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$. Подібний

результат, який вказував на ключову роль кількості Ce^{3+} йонів отримали й у [5] — за допомогою легування нанокристалів Sm кількість Ce^{3+} йонів зменшувалась, що також призводило до зменшення антиапоптозного ефекту даних кристалів.

Наночастинки CeO_{2-x} при високих значеннях рН проявляють як СОД-подібну активність (перетворення аніонів O_2^- в молекули H_2O_2), так і каталазоподібну активність (розкладання H_2O_2 на воду і кисень). Однак за низьких значень рН спостерігається лише СОД-подібна активність, що з часом призводить до різкого зростання концентрації перекису водню.

Завдяки оксидазо- та пероксидазоподібній активності наночастинок оксиду церію за низьких значень рН, надлишковий перекис водню використовується для окиснення біологічних молекул. Це може призводити до загибелі клітин.

Здатність нанокристалів CeO_{2-x} до селективного захисту нормальних (не ракових) клітин від впливу АФК підтверджується рядом біологічних досліджень [6]. Це відбувається за умов генерації АФК рентгеновським випромінюванням, що моделює процес радіотерапії онкологічних новоутворень. У деяких дослідженнях була показана прооксидантна активність нанокристалів церію у ракових клітинах, що свідчить про сприяння знищенню таких клітин оксидом церію [7]. У інших роботах була помічена тільки антиоксидантна активність нанокристалів церію [8]. Такі розбіжності у властивостях нанокристалів оксиду церію свідчать про ключову роль розмірів наночастинок, їх форми, морфології поверхні та інших факторів.

У роботі [9] було показано, що метод синтезу наночастинок і хімічні властивості поверхні здатні значно змінювати СОД-подібну активність нанокристалів.

Згідно з результатами більшості авторів, каталазоподібна і СОД-активність зворотно пов'язані одна з одним. Каталазоподібна активність слабшає при збільшенні кількості Ce^{3+} , водночас СОД-подібна активність, навпаки, збільшується.

Таким чином, є дуже актуальною задача створення ефективних антиоксидантних матеріалів для контролю рівня активних форм кисню у живих клітинах на основі нанооксидних кристалів змінної валентності. Втім, досі залишається невідомим механізм цієї активності. Незрозуміло, чи взаємодіють активні форми кисню безпосередньо з іонами Ce^{3+} і Ce^{4+} , або ж ці процеси відбуваються за участю кисневих вакансій. Також більшість результатів щодо вмісту Ce^{3+} та Ce^{4+} у наночастинках було отримано завдяки рентгенівській фотоелектронній спектроскопії, що ставить під сумнів коректність результатів при аналізі процесів у водних розчинах нанокристалів оксиду церію.

Припущення про використання оксиду церію як подвійного агента було висунуто у [10] — при низькому рН наночастинки знищували б клітину через оксидативний стрес, при нормальному ж рН клітини були б захищені від нього. Більшість досліджень свідчать про здатність нанокристалів захищати здорові клітини селективно при опроміненні цих клітин рентгенівським випромінюванням, що імітує процес радіотерапії онкологічних новоутворень. При такому опроміненні утворюються активні форми кисню, і, завдяки наявності в здорових клітинах наночастинок церію, клітина здатна не загинути від оксидативного стресу. Втім, деякі дослідження показали і прооксидантну активність нанокристалів оксиду церію при низькому рН — що могло б свідчити не тільки про захист здорових клітин, а й про знищення ракових. Втім, подібні результати зустрічаються у меншості робіт, що може свідчити про різні характеристики досліджуваних нанокристалів. Дослідження процесів взаємодії АФК з наночастинками CeO_{2-x} ускладнюється впливом великої кількості параметрів (рН, концентрація АФК, співвідношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$) на результат і динаміку процесів подібної взаємодії.

На сьогодні існує цілий ряд моделей, створених для пояснення унікальної антиоксидантної активності нанокристалів оксиду церію. Умовно їх можна розділити на чотири категорії (рис. 4).

Перша модель пов'язує антиоксидантні властивості нанокристалів зі значною кількістю кисневих вакансій у матеріалі. Згідно з цією моделлю, ці вакансії грають ключову роль у антиоксидантній активності наночастинок.

Згідно з другою моделлю, редокс-активність кристалів пов'язана з окисненням іонів Ce^{3+} до Ce^{4+} і їх подальшим відновленням на поверхні кристалу.

Третя модель базується на припущенні, що в нанокристалах взагалі відсутній Ce^{3+} , а антиоксидантна активність забезпечується іонами, які вивільняються з наночастинок при їх частковому розчиненні у воді або в інших рідинах.

Четверта модель базується на уявленнях про головну роль комплексів Ce^{3+} - V_o - Ce^{3+} у антиоксидантній активності кристалів (V_o - киснева вакансія).

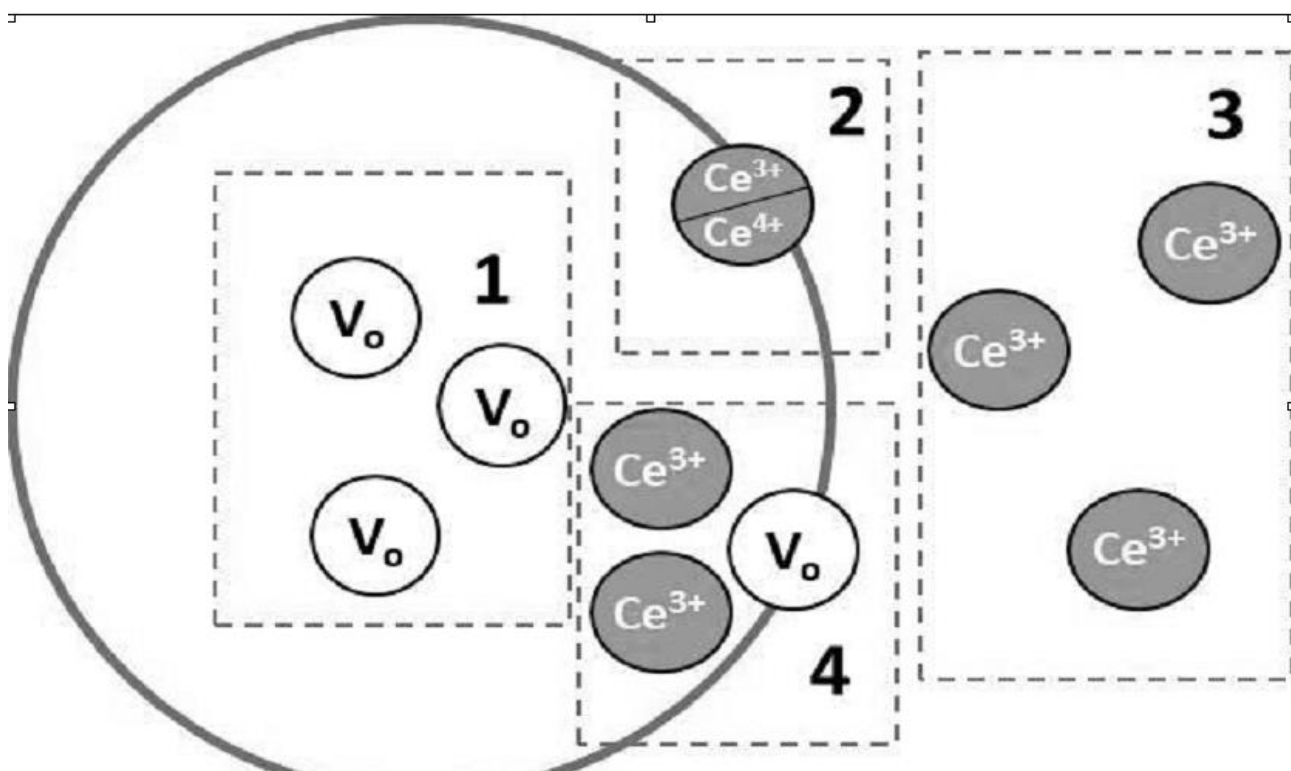
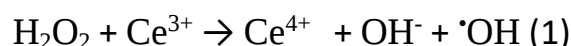


Рисунок 4 – Моделі дефектів, що забезпечують антиоксидантну активність нанокристалів оксиду церію: 1 — кисневі вакансії; 2 — іони Ce^{3+} , Ce^{4+} на поверхні кристалу; 3 — іони Ce^{3+} , вивільнені при розчиненні наночастинок у рідині; 4 — комплекси Ce^{3+} - V_o - Ce^{3+} .

Жодна з цих теорій на сьогодні не змогла повністю пояснити властивості церію, тож не може вважатися абсолютно вірною, але більшість дослідників на сьогодні схилиються до другою моделі, пов'язаної з окисненням окремих іонів Ce^{3+} до Ce^{4+} і їх подальшим відновленням. Втім, взаємодія іонів Ce^{3+} з перекисом водню мала б призводити до генерації небезпечних для клітини гідроксил-радикалів за механізмом Фентона, що суперечило б протекційним властивостям нанокристалів, продемонстрованих у великій кількості робіт:



Загалом, незважаючи на велику кількість публікацій на цю тему, на сьогодні ще не можна говорити із впевненістю про механізм антиоксидантної активності нанокристалів оксиду церію.

Оксид церію є діелектриком з шириною забороненої зони близько 6 еВ, валентна зона якого сформована 2р рівнями кисню, а зона провідності — 5d і 6s станами церію. У забороненій зоні оксиду церію, на 3—3,15 еВ вище стелі валентної зони, знаходиться вузька підзона (від 0,5 до 1 еВ), яка обумовлена 4f0 станами іонів Ce^{4+} . Таким чином, оптичні властивості оксиду церію визначаються переходами з перенесенням заряду з 2р рівнів кисню на порожню 4f оболонку іона Ce^{4+} .

Опромінення нанокристалів оксиду церію випромінюванням з довжиною хвилі, більшою за ширину оптичної забороненої зони, супроводжується формуванням електронно-діркових пар, які можуть або відразу рекомбінувати, або бути захопленими пастками (обумовлені дефектами матеріалу), або мігрувати на поверхню нанокристалу. В останньому випадку, взаємодія електронів та дірок з молекулами води або кисню на поверхні нанокристалу може породжувати каскад хімічних реакцій з генерацією активних форм кисню (АФК), зокрема:





Тільки якщо значення потенціалу краю зони провідності є більш від'ємним за редокс-потенціал пари $\text{O}_2 / \text{O}_2^-$ (-0.2 eV), є можливим відновлення кисню до супероксиданіону, і, відповідно, тільки якщо значення потенціалу краю валентної зони є більш додатнім за редокс-потенціал пари $\cdot\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ (2.1 eV), є можливим окиснення води до гідроксил-радикалів.

Наявні активні форми кисню в результаті даної реакції можуть приймати участь в окисненні органічних молекул, що свідчило б про можливість використання оксиду церію як прооксиданта. Така активність дійсно спостерігалась для нанокристалів оксиду церію, але тільки для відносно великих частинок (>15 нм). Зі зменшенням розмірів кристалу спостерігається зниження прооксидантних властивостей наночастинок і збільшення антиоксидантних властивостей. Для кристалів розмірами $1\text{—}10$ нм антиоксидантні властивості значно переважають прооксидантні [11].

4. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Характеризація нанокристалів оксиду церію

У роботі досліджуються агрегативно стійкі колоїдні розчини нанокристалів CeO_{2-x} контрольованого розміру, синтезовані методом гомогенного гідролізу в присутності гексаметилентетраміна і перекису водню.

Така методика дозволяє отримувати нанокристали оксиду церію, стабілізовані цитратом натрію, що мають надмалий розмір (<10 нм), є стійкими у воді і розчинах у діапазоні рН 1—10 і не виявляють ознак седиментизації при тривалому зберіганні.

Таким самим методом отримують колоїдний розчин оксиду церію з частинками розміром близько 2 нм, які і використовуються у роботі. Цей результат отримується шляхом збільшення кількості гексаметилентетраміна.

Обидва види зразків (як 2 нм так і 10 нм) характеризуються гранецентрованою кубічною ґраткою за структурою флюориту, при цьому не спостерігається наявність інших фаз.

Для отриманих нанокристалів вміст іонів Ce^{3+} становить близько 37 відсотків, що вимірюється рентгенівською фотоелектронною спектроскопією. Факт використання РФС може свідчити про насправді меншу кількість іонів Ce^{3+} , через те, що саме опромінення могло призвести до відновлення іонів Ce^{4+} до Ce^{3+} .

4.2 Вимірювання спектрів поглинання та люмінесценції

Вимірювання спектрів поглинання зразків проводилося за допомогою двопроменевого скануючого спектрофотометра SPECORD 200. Цей спектрофотометр містить монохроматор з голографічними ґратками та сферичною оптикою, що дає змогу використовувати хвилі сканування 190—1100 нм. Основою спектрального комплексу для вимірювання люмінесценції слугує монохроматор СДЛ-1 з двома дифракційними ґратками і довгофокусними дзеркальними об'єктивами. Ця система має високу дисперсію, роздільну здатність, а також слабку залежність цих властивостей від довжини хвилі. Разом з можливістю зміни дифракційних ґраток і великою світлосилою, комплекс здатний проводити дослідження з високою роздільною здатністю в діапазоні 200—6000 нм.

5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Перехід від 5d до 4f люмінесценції іонів Ce^{3+} розкриває можливості контролювання динаміки взаємодії між наночастинками та молекулами оксиду церію за допомогою оптичних методів спектроскопії.

На сьогодні основними прийомами для вивчення змін у валентному стані іонів церію у процесах взаємодії нанокристалів CeO_{2-x} з АФК є методи рентгенівської фотоелектронної спектроскопії та рентгенівської спектроскопії поглинання. Ці методи вимагають опромінення експериментальних зразків рентгенівськими променями у вакуумних умовах, що може призводити до отримання значень вмісту іонів Ce^{3+} та Ce^{4+} , які суттєво відрізняються від реальних значень для наночастинок у колоїдному розчині. Водночас, методи люмінесцентної спектроскопії не потребують ані вакууму, ані використання високоенергетичного випромінювання, і, крім того, дозволяють вивчати процеси взаємодії оксиду церію з АФК у динаміці. Наявність люмінесценції переходу від 5d до 4f іонів Ce^{3+} у нанокристалах оксиду церію відкриває можливості використання люмінесцентної спектроскопії для дослідження процесів взаємодії наночастинок CeO_{2-x} з АФК різних типів.

Редокс-активність нанокристалів оксиду церію і інших оксидів з іонами змінної валентності значною мірою визначається характеристиками навколишнього середовища (включаючи рН та концентрацію кисню). При первних значеннях рН спостерігається перехід від прооксидантної до антиоксидантної активності нанокристалів. Це може бути важливим при розробці нанокристалів для онкологічних застосувань, оскільки рН ракових клітин відрізняється від рН здорових клітин (здорові клітини мають рН = 7.3-7.4, ракові - 6.2-6.9). Таким чином, одні й ті ж наночастинки можуть діяти як прооксиданти в ракових клітинах, одночасно захищаючи здорові клітини від впливу АФК..

Процеси розкладання перекису водню нанокристаллами оксиду церію можуть бути як каталазоподібними (без утворення гідроксил-радикалів), так і йти за

схожим на фентонівський механізмом, що супроводжується утворенням гідроксил радикалів. Розкладення перекису водню за схожим на фентонівський механізм виглядає наступним чином:

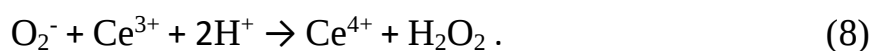


Утворення цих гідроксил-радикалів вкрай небезпечно для живих клітин, адже окиснювальна здатність $\cdot\text{OH}$ значно перевищує окислювальну здатність перекису водню. Через це подібна реакція може призвести до окиснення ліпідних мембран і пошкодження різних органел гідроксил-радикалами.

Інший можливий шлях взаємодії оксиду церію з перекисом водню включає утворення супероксид-аніонів як проміжного продукту:



Цей механізм є менш небезпечним для клітини, адже супероксид-аніони можуть нейтралізовуватись нанокристаллами оксиду церію, так як вони здатні проявляти СОД-подібну активність:



Таким чином, типи активних форм кисню, що утворюються під час розкладання перекису водню нанокристаллами оксиду церію, визначають біологічну активність цих кристалів. Одним з головних чинників, що впливають на реалізацію утворення/нейтралізації активних форм кисню, є рН водного розчину перекису водню з нанокристаллами оксиду церію.

Динаміку розкладання перекису водню нанокристаллами оксиду церію відстежували за допомогою селективного сенсора на перекис воднюДФПФ

(дифеніл-1-піренілфосфін). Цей сенсор, окиснюючись до фосфіну, переходить у флуоресцентну форму з широкою смугою з максимумом у 380 нм.

Під час експерименту 980 мкл водного розчину перекису водню з нанокристаллами оксиду церію, взятого через різний час після введення перекису водню, додавали у кювети з подальшим додаванням 20 мкл розчину ДФПФ-ДМСО (1 мМ). Після витримування протягом 30 хв, для завершення реакції сенсора з перекисом водню, знімався спектр люмінесценції розчину. У такому випадку інтенсивність флуоресценції сенсора була пропорційна до концентрації перекису водню у розчині на поточний момент часу.

Виміри проводили для трьох типів розчинів з різним значенням $\text{pH} = 4$, $\text{pH} = 7.5$, $\text{pH} = 10$. Для розчинів з $\text{pH} = 7.5$, $\text{pH} = 10$ можна чітко побачити два етапи еволюції розчину: на першому етапі спостерігається зменшення концентрації перекису водню у розчині, у той час як на другому концентрація починає поступово збільшуватись. Особливість такої динаміки можна трактувати як поєднання каталазоподібної та СОД-подібної активності нанокристалів оксиду церію. Збільшення значення pH призводить до збільшення швидкості розкладання перекису водню на першому етапі розкладання. Для $\text{pH} = 4$ можна спостерігати той самий ефект, що й у [1] — у роботі показано беззворотнє окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} без подальшого відновлення.

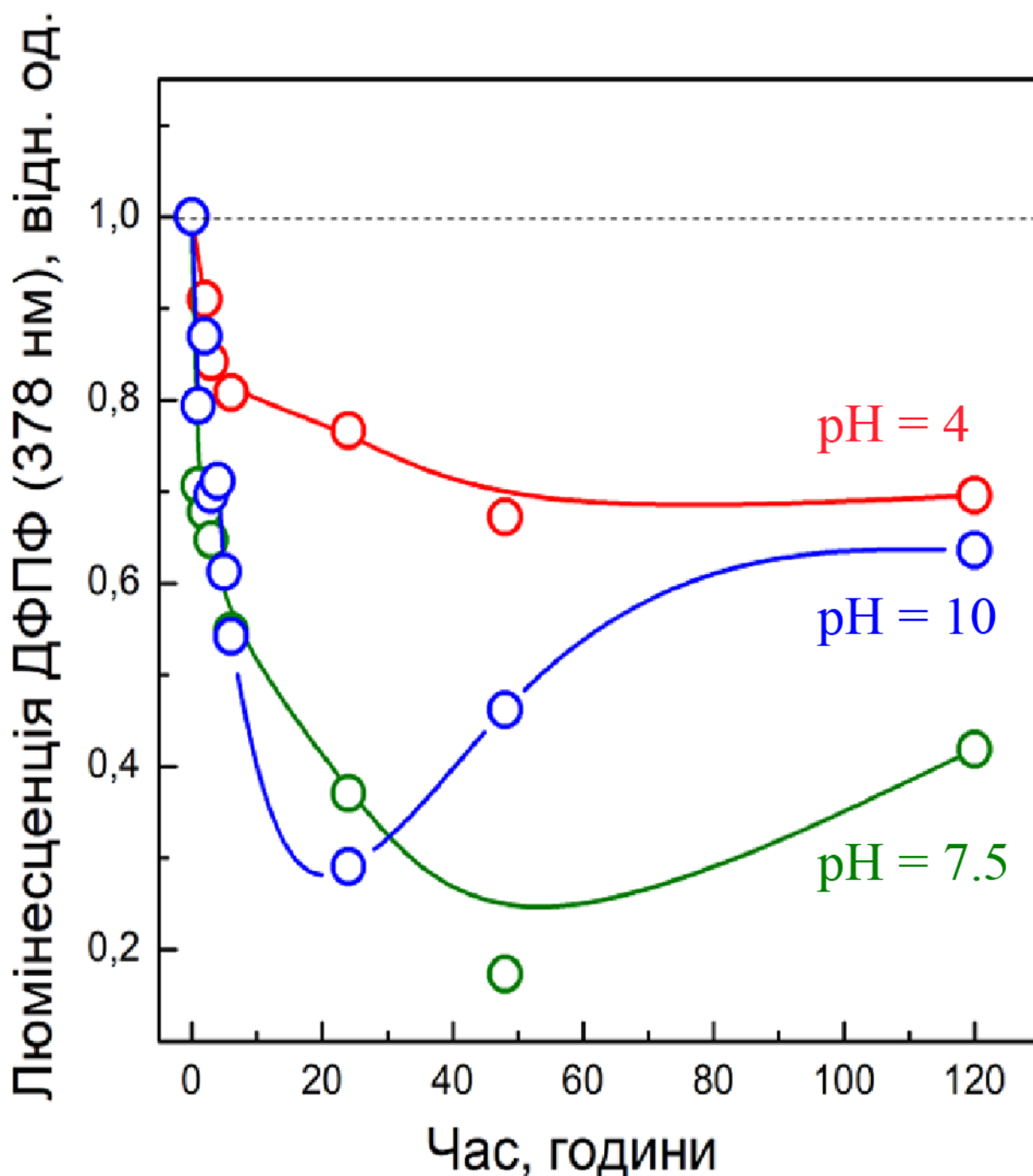


Рисунок 5 — Залежність люмінесценції ДФПФ($\lambda = 378$ нм) в залежності від часу при різних значення рН, виміряна для дослідження динаміки розкладення перекису водню нанокристаллами оксиду церію.

Надалі постає питання з'ясування механізму редокс-активності — чи впливає на це окиснення окремих іонів, або ж захоплення кисню відбувається комплексами $\text{Ce}^{3+} - \text{V}_o - \text{Ce}^{3+}$. Взаємодія молекул перекису водню з комплексами $\text{Ce}^{3+} - \text{V}_o - \text{Ce}^{3+}$ (або $\text{Ce}^{4+} - \text{V}_o - \text{Ce}^{4+}$ в окисненому стані), які є найпоширенішим

типом дефектів на поверхні оксиду церію, забезпечує розкладання перекису водню на воду та кисень без утворення проміжних АФК. Взаємодія ж з окремими іонами $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ має супроводжуватись утворенням активних форм кисню. Таким чином, у результаті розкладання перекису водню, у розчині крім утворення кисню за реакцією (5) можуть з'являтися також і супероксид-аніони (O_2^-). Нанокристали оксиду церію здатні проявляти СОД-подібну активність (тобто перетворювати супероксидні аніони у перекис водню), що, вірогідно, і слугує причиною збільшення концентрації перекису водню на другому етапі розкладання. На цьому етапі утворюється додатковий перекис водню, але його вміст значно менший ніж початкова концентрація перекису водню.

Для дослідження наявності та кількості супероксид-аніонів при розкладанні перекису водню нанокристалами оксиду церію була досліджена зміна спектрів поглинання адреналіну після додавання перекису водню. Одним із продуктів взаємодії адреналіну з аніонами O_2^- є адренохром, смуга поглинання якого знаходиться на 305 нм. Оскільки у звичайних розчинах адреналіну з перекисом водню окиснення адреналіну до аденохрому не відбувається, зміна поглинання на довжині хвилі 305 нм розчину з нанокристалами оксиду церію може свідчити про наявність у цих розчинах супероксид-аніонів.

Додавання нанокристалів оксиду церію приводить до швидкого розкладання перекису водню за реакцією (6), за якою утворюються супероксид-аніони (рис. 6). Вміст аніонів, що утворюються при розкладанні перекису водню залежить від рН, при чому збільшення рівня рН призводить і до збільшення кількості супероксид-аніонів.

Процеси генерації гідроксил-радикалів з перекису водню у присутності нанокристалів оксиду церію визначали за допомогою стандартного кумаринового тесту. Інтенсивність флуоресценції 7-гідроксикумарину (продукт взаємодії молекули кумарину та гідроксил-радикалів) вимірювали під час процесу розкладання перекису водню. Концентрація кумарину у всіх пробах дорівнювала 10^{-4} моль/л. Використовуючи кумарин як сенсор гідроксил-радикалів, досліджували процеси утворення $\cdot\text{OH}$ радикалів при розкладанні

перекису водню нанокристалами оксиду церію при різних значеннях рН. Зниження рН збільшує вміст гідроксил-радикалів, що утворюються при розкладенні перекису водню (рис. 7) у присутності нанокристалів оксиду церію.

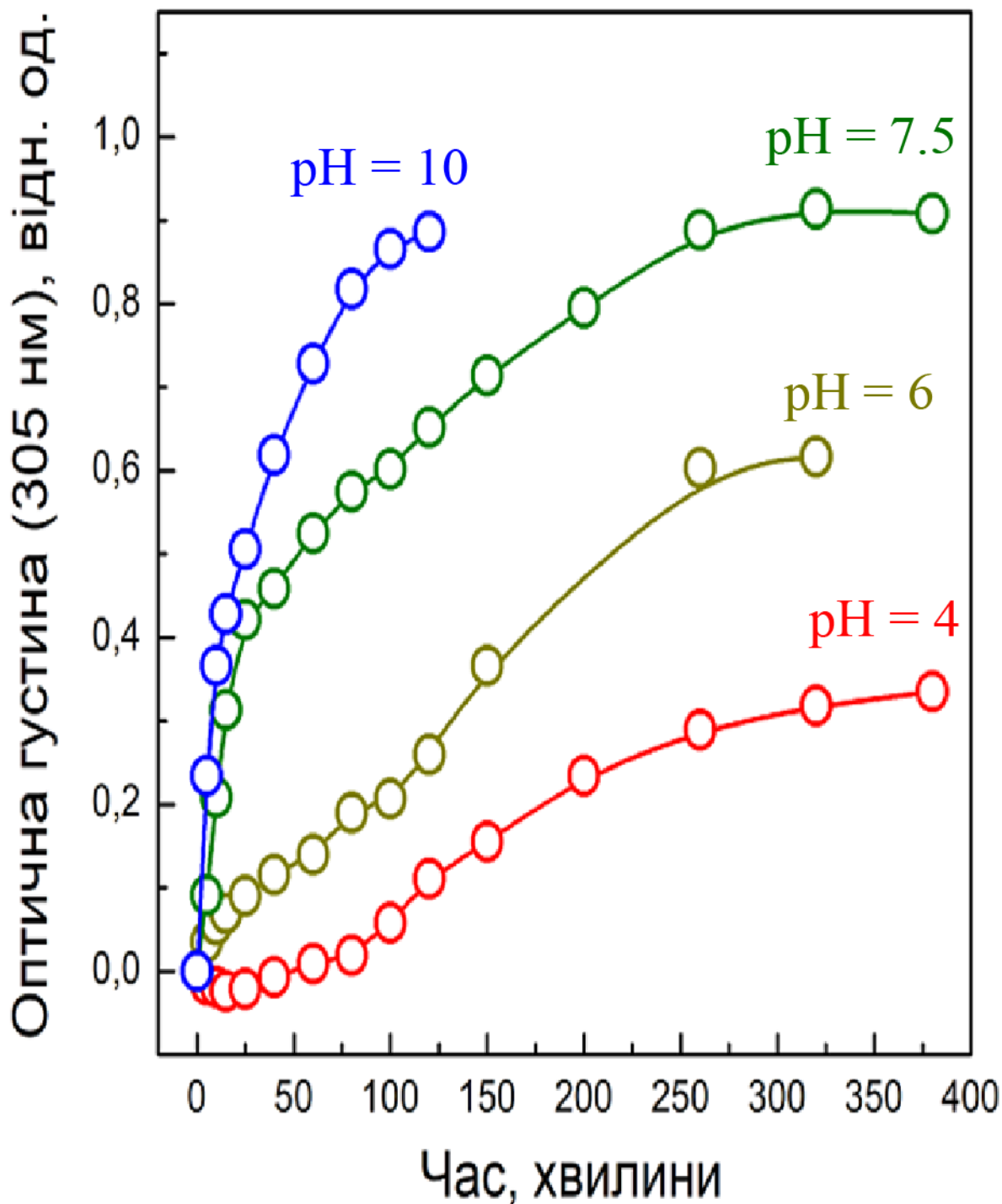


Рисунок 6 — Зміна оптичної густини з часом на довжині хвилі 305 нм використана для дослідження концентрації супероксид-аніонів (O_2^-) у водних розчинах перекис водню - нанокристали оксиду церію з різними значеннями рН.

Нанокристали оксиду церію можуть усувати значну частину гідроксил-радикалів, що утворюються під час розкладення перекису водню. При $\text{pH} = 7$ вміст радикалів у розчині вода-перекис водню був більшим, аніж у такому ж розчині з додаванням нанокристалів протягом усього часу розкладання перекису водню нанокристалами оксиду церію. Існують два фактори зниження концентрації гідроксил-радикалів у розчині з нанокристалами: перший — значна

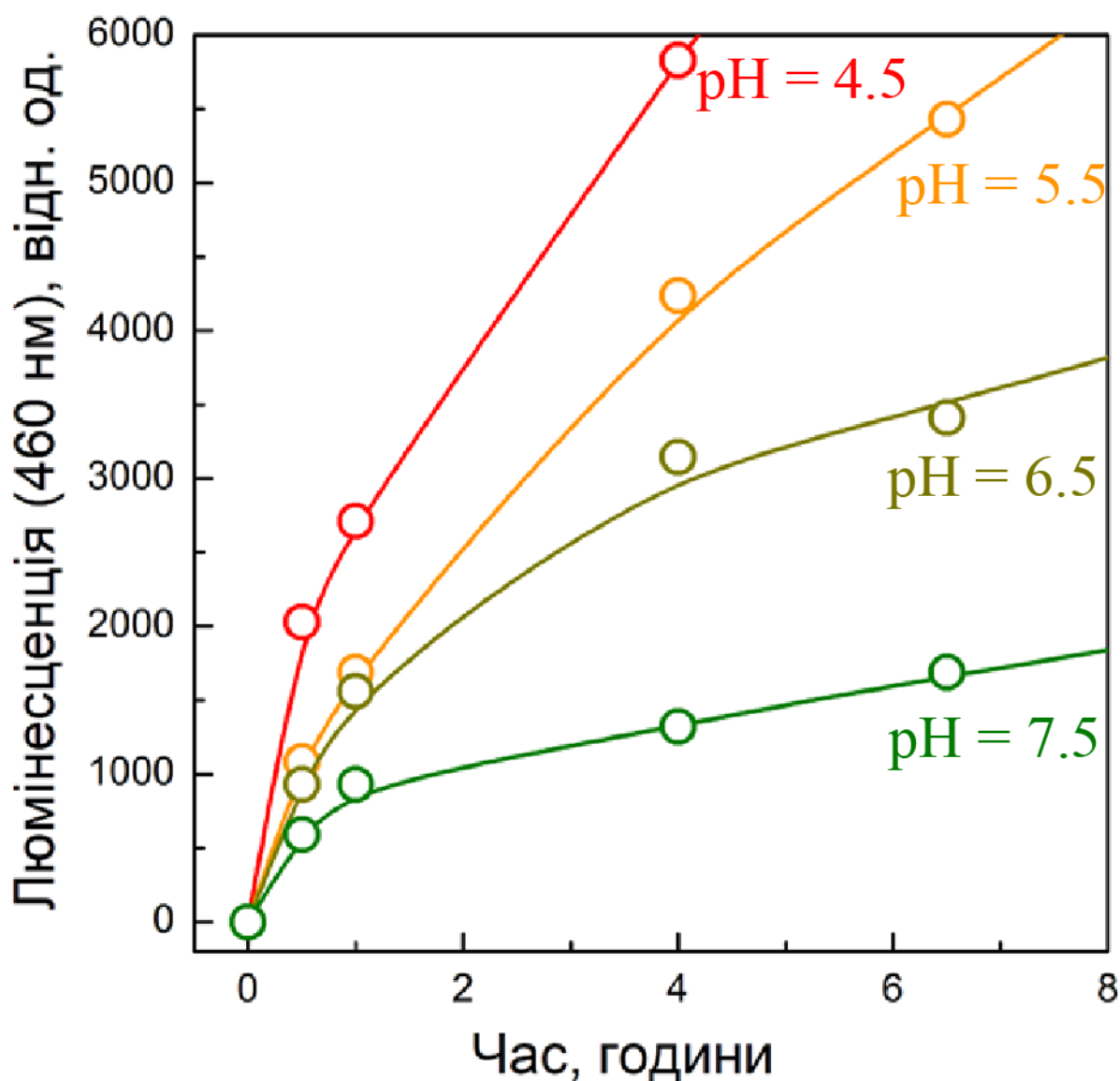


Рисунок 7 — зміна люмінесценції 7-гідроксикумарину ($\lambda = 460$ нм), виміряна для дослідження концентрація гідроксил-радикалів ($\cdot\text{OH}$) у водних розчинах перекис водню—нанокристали оксиду церію з різними значеннями pH.

кількість комплексів $\text{Ce}^{3+} - \text{V}_\text{o} - \text{Ce}^{3+}$ на поверхні кристалів, ці комплекси здатні розкласти перекис водню без утворення гідроксил-радикалів. Другий фактор — безпосередньо висока здатність нанокристалів оксиду церію до нейтралізації самих гідроксил-радикалів.

Для дослідження здатності нанокристалів оксиду церію розкласти гідроксил-радикали використовувалось опромінення рентгенівським випромінюванням. Як відомо, опромінення води приводить до радіолізу води з формуванням гідроксил-радикалів, тому в експерименті водні розчини кумарину з нанокристалом оксиду церію і різними значеннями рН опромінювали рентгенівським випромінюванням ($U = 30\text{kV}$, $I = 20\text{ mA}$). Флуоресценція 7-гідроксикумарину була використана для оцінки кількості гідроксил радикалів у даних розчинах. У результаті дослідження флуоресценції виявилось, що зі зменшенням рН знижується і здатність нанокристалів оксиду церію до нейтралізації гідроксил-радикалів (рис. 8). Спільно з попередньо отриманими результатами можна зробити висновок, що нанокристали оксиду церію здатні як розкласти перекис водню за Фентонівським механізмом, з утворенням гідроксил-радикалів, так і після цього нейтралізовувати їх. Така комбінована дія досліджуваних кристалів при різному рН може спричинювати як прооксидантну дію, так і антиоксидантну.

Для з'ясування домінуючого типу окислювально-відновлювальної дії нанокристалів оксиду церію при різних рН, було порівняно вміст гідроксил-радикалів у водних розчинах з наночастинками оксиду церію і без. Відомо, що генерація $\cdot\text{OH}$ радикалів з перекису водню є можливою навіть без нанокристалів оксиду церію через наявність у воді неконтрольованих домішок. Порівняння зразків з нанокристалом і без них показало, що, незважаючи на здатність нанокристалів утворювати гідроксил-радикали під час розкладання перекису водню, їхня здатність нейтралізовувати ці радикали переважає при майже всіх рівнях рН (рис. 9).

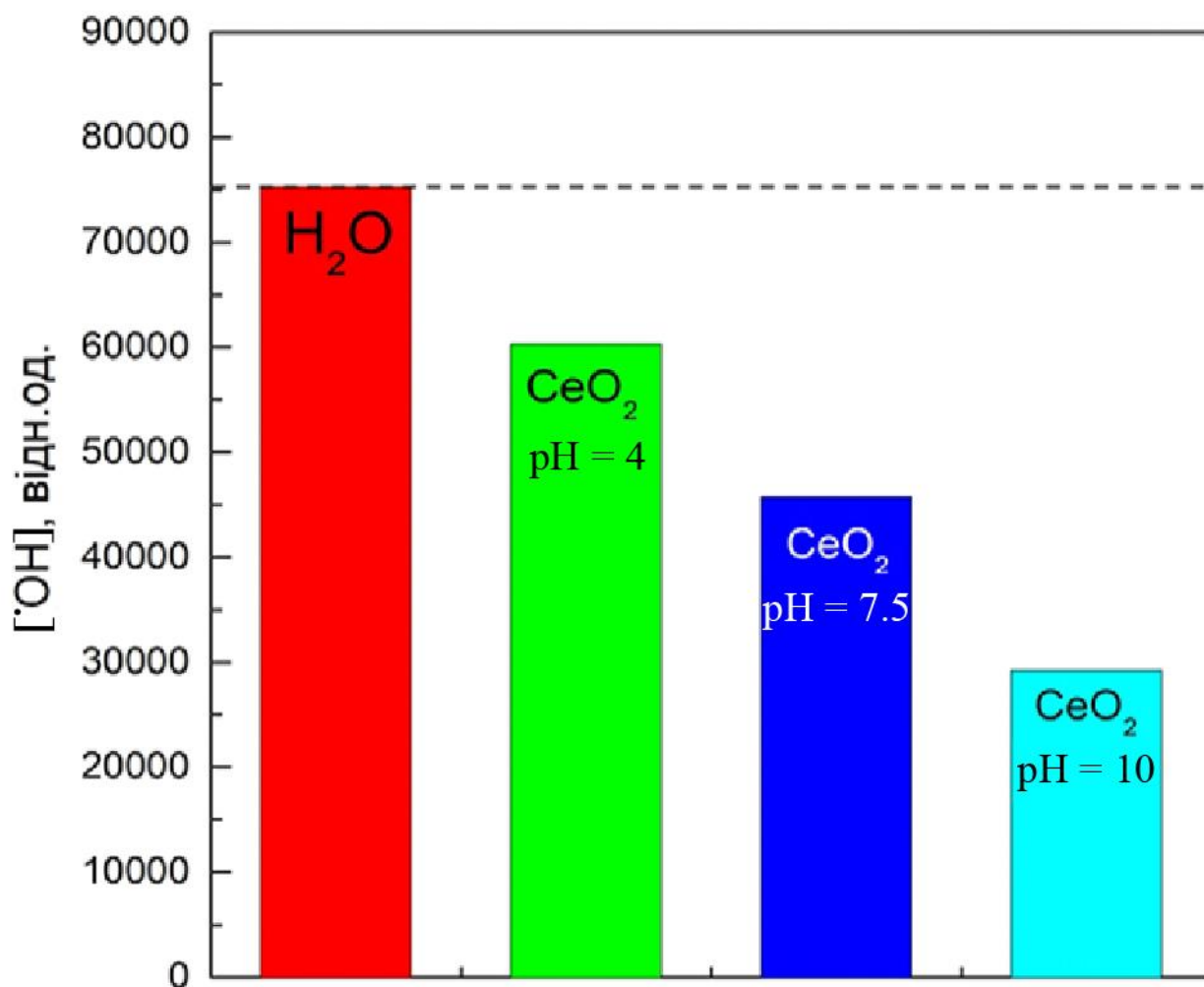


Рисунок 8 - нейтралізація гідроксил-радикалів $·OH$ у водних розчинах, утворених внаслідок опромінення рентгенівським випромінюванням, нанокристаллами оксиду церію.

Зменшення рН розчину призводить до зменшення різниці кількості гідроксил-радикалів у відповідних розчинах з нанокристаллами оксиду церію та без них. Це означає, що зменшення рН середовища призводить до зменшення здатності кристалів захищати клітину від гідроксил-радикалів, а при значенні рН = 4.5 на перших етапах розкладення перекису водню прооксидантні властивості нанокристалів оксиду церію взагалі переважають (рис. 9а), що може слугувати підтвердженням гіпотези про знищення клітин з низьким рН нанокристаллами оксиду церію, хоча відхилення від розчину без нанокристалів і є незначним.

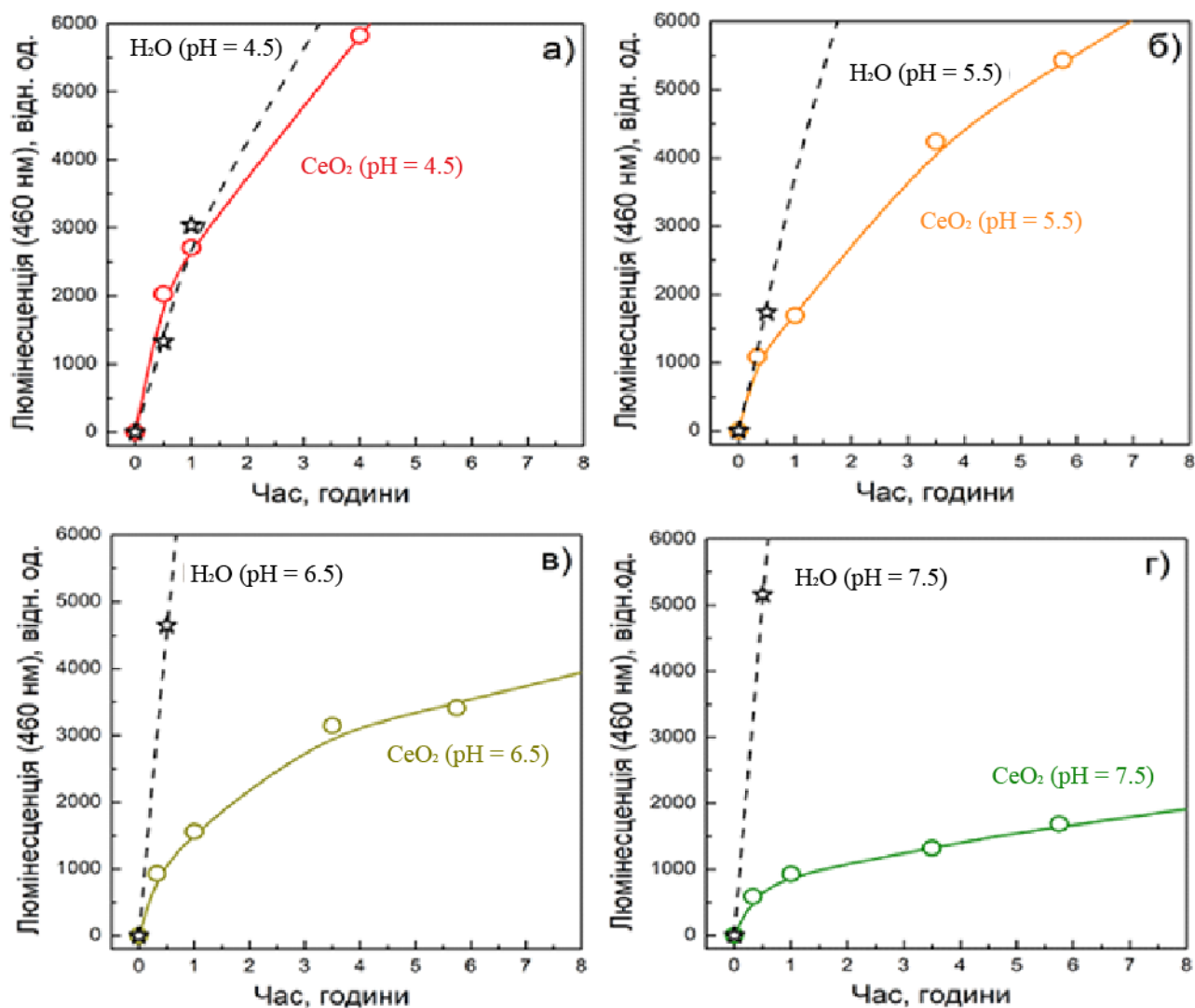


Рисунок 9 — зміна люмінесценції 7-гідроксикумарину, використана для порівняння вмісту гідроксил-радикалів у водних розчинах з нанокристаллами оксиду церію і без них.

На рисунку 10 показано зміну інтенсивності люмінесценції Ce^{3+} ($\lambda = 420$ нм) після додавання перекису водню при різних значеннях pH. При значенні pH = 6, pH = 7.5 спостерігається зменшення інтенсивності люмінесценції Ce^{3+} , що свідчить про швидке окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} . При pH = 10 спостерігається зворотній процес — люмінесценція зростає, відбувається відновлення Ce^{4+} до Ce^{3+} . Для pH = 4 люмінесценція не змінюється, що свідчить про сталість відношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ за цього pH.

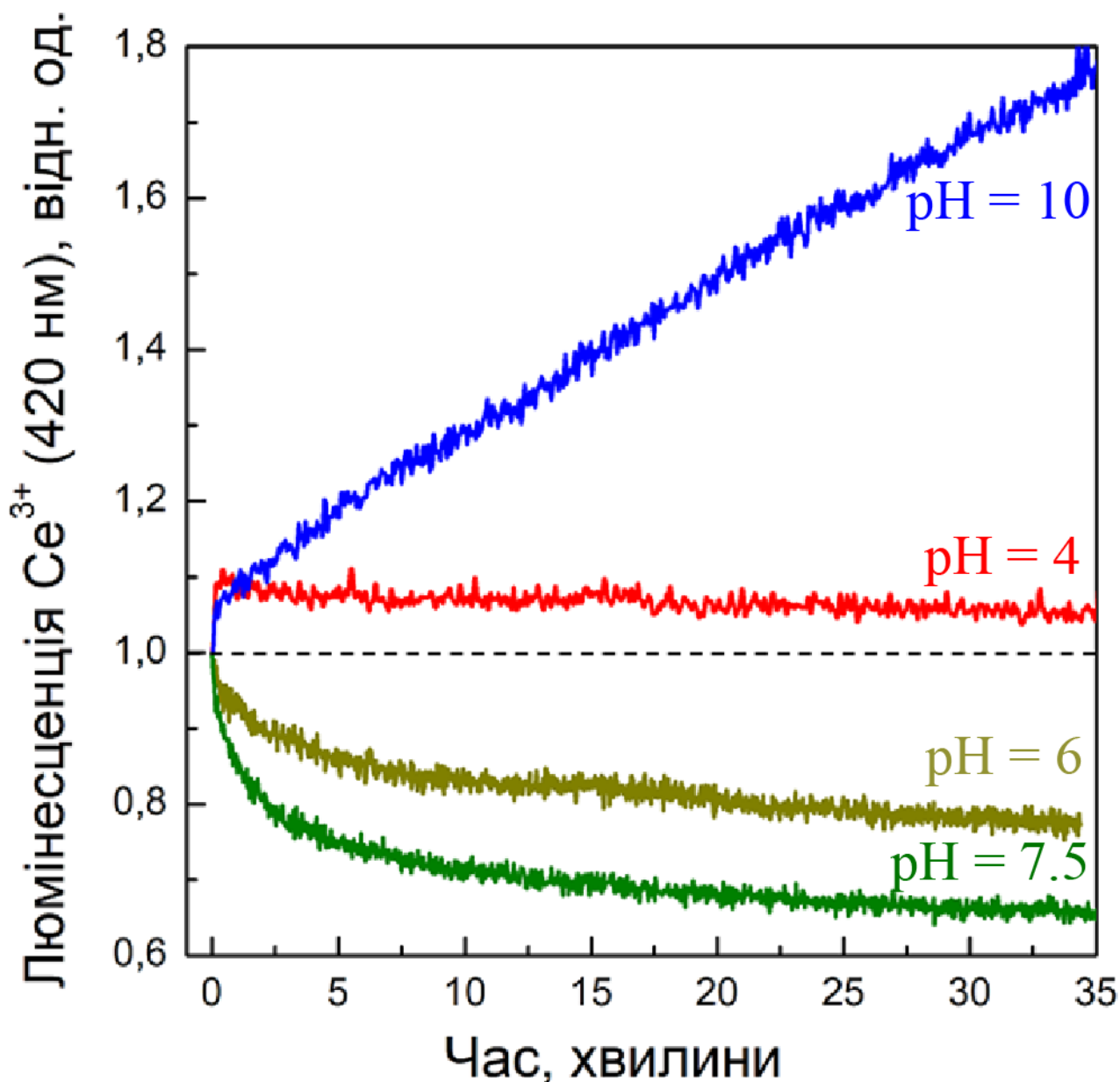


Рисунок 10 — зміна інтенсивності Ce^{3+} люмінесценції після додавання пероксиду водню у розчин з нанокристалом оксиду церію з різним рН.

З рисунка 6 і рисунка 7 видно, що шлях розкладання перекису водню нанокристалом оксиду церію можна контролювати за допомогою рівня рН. Підвищений вміст іонів OH^- ($\text{pH} = 10$) стимулює розкладення за реакцією (6), оскільки ця реакція збільшує кількість H^+ , що компенсує початковий надлишок іонів OH^- . Ця реакція супроводжується утворенням супероксид-аніонів та відновленням іонів Ce^{4+} до Ce^{3+} , що підтверджується даними, поданими на рисунку 6 і на рисунку 10.

У слабо кислому середовищі ($\text{pH} = 6$) надлишок іонів H^+ навпаки, забезпечує більш ефективне розкладення перекису водню за механізмом Фентона, що призводить до утворення аніонів OH^- . Ця реакція також включає утворення гідроксил радикалів та окиснення Ce^{3+} до Ce^{4+} , що пояснює більший вміст $\cdot\text{OH}$ радикалів при нижчих значеннях pH та зниження Ce^{3+} люмінесценції, що продемонстровано на рисунку 7 і на рисунку 10.

Для $\text{pH} = 4$ концентрація гідроксил радикалів є високою, але оборотність окиснювально-відновлювальних реакцій Ce^{3+} та Ce^{4+} порушується через занадто високий вміст H^+ , а отже відношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ залишається майже незмінним.

6. ВИСНОВКИ

У результаті роботи було проведено комплексне дослідження редокс-властивостей нанокристалів оксиду церію методами оптичної спектроскопії. Для цього були досліджені: динаміка розкладання перекису водню нанокристаллами оксиду церію при різних рівнях рН, концентрація супероксид-аніонів і гідроксил-радикалів у розчинах з нанокристаллами церію при різних значеннях рН, досліджена здатність нейтралізації гідроксил-радикалів наночастинками оксиду церію, проведено порівняння вмісту гідроксил-радикалів у розчинах з нанокристаллами церію та без них і було вивчено зміни відношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ при розкладанні пероксиду водню при різній кислотності.

Було визначено, що результуюча динаміка розкладання перексиду водню нанокристаллами оксиду церію при певному значенні рН є результатом двох різних процесів: каталазо-подібної активності з розкладання перекису водню і СОД-подібної активності. Виявилось, що при збільшенні рН у розчині збільшується вміст аніонів O_2^- , що утворюються при розкладанні перекису водню. Через деякий час, при певній концентрації супероксид-аніонів у водному розчині починає переважати СОД-подібна активність нанокристалів оксиду церію, що призводить до утворення додаткового перекису водню (рис.6). Оскільки при $\text{pH} = 10$ вміст супероксид-аніонів є найбільшим, то й найістотніше збільшення кількості перекису водню спостерігається саме при цьому рН. При $\text{pH} = 4$ утворення додаткового перекису водню помічено не було, оскільки при цьому рН розкладання перекису водню відбувається за Фентонівським механізмом з утворенням гідроксил-радикалів, при якому супероксид-аніони не утворюються, а значить і неможлива СОД-подібна активність з утворення H_2O_2 . Беручи до уваги отримані результати, можна зробити висновок, що зміна рівня рН змінює не тільки швидкість розкладання перекису водню нанокристаллами оксиду церію, а й механізму його розкладення.

Таким чином, і швидкість, і механізми розкладення перекису водню нанокристаллами оксиду церію залежать від значення рН водних розчинів

перекису водню з наночастинками. Чим вище значення рН, тим більша швидкість розкладання перекису водню наночастинками.

У результаті досліджень було виявлено два різних механізми розкладання перекису водню нанокристалом оксиду церію: перший з утворенням супероксид-аніонів, що переважає при великих значеннях рН, що, вірогідно, пов'язано з високим вмістом OH^- , і другий, з утворенням гідроксил-радикалів, що починає грати ключову роль при низьких рівнях рН. Не дивлячись на небезпечність гідроксил-радикалів для живих клітин, для клітин з нанокристалом оксиду церію їх утворення може не бути критичним, адже у нейтральному і слабкокислому середовищі нанокристали майже повністю видалили їх із розчину. При низькому ж рН гідроксил-радикали майже не знищуються нанокристалом оксиду церію, що може бути пов'язано з надмірною кількістю H^+ , що пригнічує здатність окислювально-відновлювальних реакцій Ce^{3+} і Ce^{4+} .

Загалом було показано суттєву залежність про- та антиоксидантних властивостей церію від рН водних розчинів з нанокристалом оксиду церію. Ці результати вказують на подальшу необхідність біологічних досліджень досліджуваних кристалів як частинок, які б захищали здорові клітини від оксидативного стресу, адже при нейтральних рН, які властиві здорові клітинам, була показана здатність нейтралізації гідроксил-радикалів і супероксид-аніонів при розкладанні перекису водню. Також була помічена прооксидантна активність кристалів при низькому рН, яка спостерігалась на ранніх етапах розкладення перекису, але, втім, не значно відрізнялась від контрольного розчину.

Під час роботи також досліджувався вміст Ce^{3+} іонів у нанокристалах оксиду церію за допомогою вимірювання інтенсивності люмінесценції. На відміну від більш популярної рентгенівської фотоелектронної спектроскопії, цей метод може виявитися вигіднішим, через можливість самої РФС впливати на концентрацію Ce^{3+} . Дослідження показали, що високий рН призводить до зростання кількості Ce^{3+} , слабкокислий (рН = 6) — навпаки, до зменшення

відношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$, а в сильно кислих середовищах відношення $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ залишатиметься незмінним.

Таким чином, нанокристали оксиду церію показали себе перспективними антиоксидантними агентами, і потребують подальшого дослідження їх властивостей і можливості використання їх як заміну деяких ферментів.

У короткому вигляді висновки роботи можуть бути сформульовані так:

1. Встановлено, що як швидкість, так і специфічні механізми нейтралізації активних форм кисню нанокристалами оксиду церію залежать від значення рН водних розчинів. Збільшення значення рН призводить до збільшення швидкості розкладення перекису водню нанокристалами.
2. Виявлено два різних шляхи розкладення перекису водню нанокристалами оксиду церію: перший з утворенням супероксид-аніонів, що переважає при високих значеннях рН, а другий з утворенням гідроксил-радикалів, що домінує при низьких значеннях рН.
3. Показано зменшення ефективності нейтралізації гідроксил-радикалів нанокристалами оксиду церію при зменшенні значення рН, що приводить до переважання прооксидантних властивостей нанокристалів при низьких значеннях рН.

7. СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Perez, J.M.; Asati, A.; Nath, S.; Kaittanis, C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small* 2008, 4, 552–555
2. Rzigalinski B. A. Nanoparticles and Cell Longevity / B. A. Rzigalinski // *Technology in cancer research & treatment*. – 2005. – 4 (6). – P. 651–659.
3. Hirst SM, Karakoti A, Singh S, Self W, Tyler R, Seal S, Reilly CM. Bio-distribution and in vivo antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in mice. *Environ Toxicol*. 2013 Feb;28(2):107-18. doi: 10.1002/tox.20704. Epub 2011 May 26. PMID: 21618676.
4. Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WT. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chem Commun (Camb)*. 2007 Mar 14;(10):1056-8. doi: 10.1039/b615134e. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17325804.
5. Celardo I, De Nicola M, Mandoli C, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Ce³⁺ ions determine redox-dependent anti-apoptotic effect of cerium oxide nanoparticles. *ACS Nano*. 2011 Jun 28;5(6):4537-49. doi: 10.1021/nn200126a. Epub 2011 Jun 2. PMID: 21612305.
6. Tapeinos C. CeO_{2-x} nanoparticles-loaded pH-responsive microparticles with antitumoral properties as therapeutic modulators for osteosarcoma / C. Tapeinos, M. Battaglini, M. Prato et al. // *ACS Omega*. – 2018. – 3 (8). – P. 8952-8962.
7. Das S. Engineered nanoceria cytoprotection in vivo: mitigation of reactive oxygen species and double-stranded DNA breakage due to radiation exposure / S. Das, C.J. Neal, J. Ortiz et al. // *Nanoscale*. – 2018. – 10 (45). – P. 21069-21075
8. Das S. Engineered nanoceria cytoprotection in vivo: mitigation of reactive oxygen species and double-stranded DNA breakage due to radiation exposure / S. Das, C.J. Neal, J. Ortiz et al. // *Nanoscale*. – 2018. – 10 (45). – P. 21069-21075
9. Heckert E. G. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria / E. Heckert, A. Karakoti, S. Seal et al. // *Biomaterials*. – 2008. – 29 (18). – P. 2705-2709

10. Colon J. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles / J. Colon, L. Herrera, J. Smith et al. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. – 2009. – 5 (2). – P. 225-231
11. Jayaram D.T. Nanoparticle-induced oxidation of corona proteins initiates an oxidative stress response in cells / D.T. Jayaram, S. Runa, M.L. Kemp et al. // *Nanoscale*. – 2017. – 9. – P. 7595-7601.84