Оригінальна стаття *МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА*

https://doi.org/10.26565/2075-3810-2018-40-01

УДК 577.32:577.359

АГРЕГАЦІЙНА СТІЙКІСТЬ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ В РІЗНОМУ МІКРООТОЧЕННІ ТА БІОЛОГІЧНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

М.Ю. Малюкіна[1], Л.В. Піляй[2], О.О. Сєдих[1], В.К. Клочков[1], Н.С. Кавок[1]

[1]*Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Науки, 60, м. Харків, 61072, Україна*

[2]*Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, 61022, Харків, Україна*

e-mail: ogrammal18@gmail.com

Надійшла до редакції 14 грудня 2017 р.

Прийнята 30 вересня 2018 р.

Актуальність. На сьогоднішній день актуальним завданням сучасної медицини і фармації є створення нових лікарських форм, здатних підвищити терапевтичну ефективність уже відомих лікарських речовин, знизити побічні ефекти, збільшити комфортність лікування для пацієнта. Одним із найперспективніших напрямів у цій галузі є використання різних наноматеріалів, серед яких привертають увагу наноматеріали на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ). В той же час, питання щодо зв'язку біологічної активності наноматеріалів з їх фізико-хімічними властивостями, а також особливостей взаємодії з мікрооточенням в біосистемах залишаються дискусійними.

Мета роботи. Оцінити агрегаційну стійкість наночастинок (НЧ) на основі РЗЕ в інкубаційних середовищах різного складу та роль окремих чинників у стабілізації НЧ в біологічному мікрооточенні.

Методи дослідження. В дослідженнях визначали агрегаційну стійкість наночастинок $GdYVO_4:Eu^{3+}$, $LaVO_4:Eu^{3+}$, CeO_2, $GdVO_4:Eu^{3+}$, для чого використовували методи динамічного та електрофоретичного розсіювання світла. Інкубацію НЧ проводили в 5% глюкозі або буферах: 50 мМ Трис буфер (з різними pH фізіологічного діапазону); середовище Ігла МЕМ; Кребс-Рінгер буфер pH 7,4; HBSS-буфер (HEPES-buffered-saline-solution) pH 7,4, за відсутності або присутності 0,2% БСА, протягом 30 хвилин та 24 годин. Охарактеризовано також вплив окремих компонентів біологічних буферних розчинів (глутатіон окиснений та відновлений) на процеси агрегації.

Результати. Результати показали, що на відміну від стабілізуючого впливу розчину 5% глюкози, в сольових системах відбувається значна агрегація наночастинок. Найбільший ступінь агрегації зазначено в середовищі Ігла МЕМ та Кребс-Рінгер буфера. Додавання до всіх середовищ 0,2% альбуміну перешкоджало агрегації. При взаємодії наночастинок з імуноглобуліном спостерігалося збільшення гідродинамічного діаметру, особливо значне для деяких типів наночастинок вже при найменших з використаних концентрацій білку. Сприяв агрегації всіх типів ортованадатних НЧ в кислому середовищі (Трис-буфері pH=6,7) окислений, але не відновлений глутатіон.

Висновки. Агрегативна стабільність НЧ в сольових інкубаційних середовищах значно підвищується за присутності сироваткового альбуміну, що пов’язано зі змінами співвідношення електростатичного та стеричного компонентів взаємодії НЧ з мікрооточенням.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наночастинки на основі РЗЕ, агрегаційна стійкість, сироватковий альбумін, імуноглобулін.

AGGREGATION STABILITY OF NANOPARTICLES BASED ON RARE-EARTH ELEMENTS IN DIFFERENT MICROENVIRONMENT AND BIOLOGICAL MEDIA

M.Yu. Malyukina[1], L.V. Piliai[2], O.O. Sedih[1], V.K. Klochkov[1], N.S. Kavok[1]

[1]*Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Nauky Ave, Kharkiv, 61072, Ukraine*

[2]*V.N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., 61022, Kharkov, Ukraine*

e-mail: ogrammal18@gmail.com

Background: Development of new pharmacological forms able to increase the therapeutic effectiveness of already known drugs, to reduce side effects, and to increase the comfort of treatment for the patient is an actual task of modern medicine and pharmacy. To solve the problem, one of the most promising directions in this field is the use of various nanomaterials, among which in recent years the main attention was drawn to nanomaterials based on rare earth elements (REEs). At the same time, the question of the

© Малюкіна М.Ю., Піляй Л.В., Сєдих О.О., Клочков В.К., Кавок Н.С., 2018

relation between the biological activity of nanomaterials and their physical and chemical properties, as well as the features of interaction with microenvironments in biosystems, remain controversial.
Objectives: Estimation of the aggregation stability of REE-based nanoparticles (NPs) in incubation media of different compositions and of the role of certain factors in stabilizing NPs in the biological microenvironment.
Materials and methods: Aggregation stability of $GdYVO_4:Eu^{3+}$, $LaVO_4:Eu^{3+}$, CeO_2, $GdVO_4:Eu^{3+}$ NPs was studied using dynamic and electrophoretic light scattering techniques. NPs were incubated in 5% glucose or buffers: 50 mM Tris buffer (with different pH within of physiological values); Igla MEM medium; Krebs-Ringer buffer pH 7.4; HBSS-buffer (HEPES-buffered saline-solution) pH 7.4, in the absence or presence of 0.2% BSA, for 30 minutes and 24 hours. The effect of oxidized and reduced glutathione on the stability of solutions of NPs in Tris buffer at various pH values was also determined.
Results: The results have shown that in contrast to the stabilizing effect of 5% glucose solution significant aggregation of NPs is observed in saline systems. The highest degree of aggregation was observed in the Igla MEM and Krebs-Ringer buffer environment. Addition of 0.2% of albumin to all media prevented aggregation. Interaction of immunoglobulin with NPs leads to increase in hydrodynamic diameter, especially for some types of NPs, already at the smallest of the used protein concentrations. Oxidized but not recovered glutathione promoted aggregation of all types of orthovanadate NPs in acidic medium (Tris buffer pH=6.7).
Conclusions: The aggregative stability of NPs in the salt media increases significantly in the presence of serum albumin due to changes in the ratio of the electrostatic and steric components of the interaction of NPs with the microenvironment.
KEY WORDS: REE nanoparticles, aggregation stability, serum albumin, immunoglobulin.

АГРЕГАЦИОННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАЗНОМ МИКРООКРУЖЕНИИ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

М.Ю. Малюкина[1], Л.В. Пиляй[2], О.О. Седых[1], В.К. Клочков[1], Н.С. Кавок[1]
[1]Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, пр. Науки, 60, г. Харьков, 61072, Украина
[2]Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина
e-mail: ogrammal18@gmail.com

Актуальность. На сегодняшний день актуальной задачей современной медицины и фармации является создание новых лекарственных форм, способных повысить терапевтическую эффективность уже известных лекарственных веществ, снизить побочные эффекты, увеличить комфортность лечения для пациента. Для решения поставленной задачи одним из самых перспективных направлений в этой области является использование различных наноматериалов, среди которых в последнее время привлекают внимание наноматериалы на основе редкоземельных элементов (РЗЭ).
Цель работы. Оценить агрегационную устойчивость наночастиц (НЧ) на основе РЗЭ в инкубационных средах разного состава и роль отдельных факторов в стабилизации НЧ в биологическом микроокружении.
Методы исследования. В исследованиях определяли агрегационную устойчивость наночастиц $GdYVO_4:Eu^{3+}$, $LaVO_4:Eu^{3+}$, CeO_2, $GdVO_4:Eu^{3+}$, для чего использовали методы динамического и электрофоретического рассеивания света. Инкубацию НЧ проводили в 5% глюкозе или буферах 50 мМ Трис буфер (с различными pH в физиологическом диапазоне); среда Игла МЕМ; Кребс-Рингер буфер pH 7,4; HBSS-буфер (HEPES-buffered-saline-solution) pH 7,4, при отсутствии или присутствии 0,2% БСА, в течение 30 минут и 24 часов. Также определяли влияние на стабильность растворов НЧ окисленного и восстановленного глутатиона в Трис буфере при различных значениях pH.
Результаты. Результаты показали, что в отличие от стабилизирующего воздействия раствора 5% глюкозы, в солевых системах происходит значительная агрегация НЧ. Наибольшая степень агрегации происходит в среде Игла МЕМ и Кребс-Рингер буфера. Добавление во все среды 0,2% альбумина препятствовало агрегации и стабилизировало систему. При взаимодействии НЧ с иммуноглобулином наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра, особенно значительного для некоторых типов наночастиц уже при наименьших из использованных концентраций белка. Способствовал агрегации всех типов ортованадатных НЧ в кислой среде (Трис-буфере pH = 6,7) окисленный, но не восстановленный глутатион.
Выводы. Агрегационная стабильность НЧ в биологических инкубационных средах значительно повышается в присутствии сывороточного альбумина, что связано с изменениями соотношения электростатического и стерического компонентов взаимодействия НЧ с микроокружением.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наночастицы на основе РЗЭ, агрегационная устойчивость, сывороточный альбумин, иммуноглобулин.

Особливий інтерес до наноматеріалів пов’язаний з тим, що при переході в нанорозмірний стан відбуваються зміни ряду фундаментальних властивостей речовини. Одним з головних чинників, що визначає фізичні характеристики нанорозмірних об'єктів, є розвинена поверхня, що обумовлює переважання поверхневих явищ.

Площа вільної поверхні матеріалу в ультрадисперсному стані перевищує площу вільної поверхні самої речовини, що зберігає високий ступінь порядку. В результаті в твердому тілі виникають нові фізичні явища і властивості, яких не було раніше і які неможливо передбачити, виходячи з будови і властивостей основної речовини [1, 2].

Наночастинки створюють нові можливості в фармакології та терапії захворювань. Наноматеріали мають перспективу як основа засобів спрямованого впливу на біологічні процеси, доставки лікарських сполук та діагностики, тому вивчення властивостей наночастинок та можливих побічних ефектів є одними з основних проблем для нанофармакології, нанотоксикології та медицини [3].

Наночастинки на основі рідкісноземельних елементів мають низку унікальних властивостей, таких як стійка люмінесценція, висока фотостабільність, відсутність мерехтіння, вузькі емісійні лінії, великий Стоксовий зсув, оборотна окислювально-відновна здатність. Ці властивості дозволяють використовувати НЧ в спектроскопії, а також в магнітно-резонансній томографії [4]. Оборотна окислювально-відновна здатність та біологічна активність НЧ цієї групи дозволяє розглядати їх як перспективні терапевтичні засоби з потенціалом використання для відновлення окислювального гомеостазу при його патологічних порушеннях [5, 6]. Протипухлинна дія та магнітний момент для окремих рідкісно-земельних елементів, становлять особливий інтерес для медицини, що пов'язаний з можливістю лікування раку, діагностики та дистанційного управління НЧ, конструкціями на їх основі при накладенні зовнішнього магнітного поля. Тому дослідження властивостей та відповідних шляхів застосування НЧ є надзвичайно актуальним питанням в сьогоденні.

Важливою характеристикою нананоматеріалів, призначених для медико-біологічного застосування, є їх стабільність [7] і, зокрема, стійкість до коагуляції у біологічних середовищах [8, 9]. Зазначається також, що прояви біологічної активності наноматеріалів значною мірою залежать від взаємодії з окремими компонентами інкубаційного буфера. Тому в даній роботі визначали агрегаційну стійкість НЧ на основі РЗЕ в інкубаційних середовищах різного складу, що використовуються в біологічних дослідженнях. Оцінювали також вплив окремих складових середовища з метою оптимізації умов, що забезпечують стабільність і біосумісність НЧ при контакті з біологічними системами.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

У дослідженнях використовувалися: бичачий сироватковий альбумін фракція V>99% (виробництво MERC KGaA, Германія); γ-глобулін людини (MERC KGaA, Германія); барвник Coomasie Brilliant Blue G-250 (AppliChem GmbH, Германія); глутатіон відновлений та окиснений (AppliChem GmbH, Германія); глюкоза (НПФ «Синбиас» Фарм., Росія); середовище Ігла MEM (Minimum Essential Medium) (ПанЭко, Росія); Тріс (AppliChem GmbH, Германія); HEPES (HBSS) (Acros organics, США), буфер Кребса-Рінгера.

Наночастинки РЗЕ різної форми та розмірів синтезовані в лабораторії нанодисперсних матеріалів ІСМА НАН України (рис. 1): сферичні – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$ (1-2 нм), CeO_2 (1-2 нм і 8-10 нм); веретеноподібні – $GdVO_4 : Eu^{3+}$ (8×25 нм); у формі

стрижнів – $LaVO_4:Eu^{3+}$ (57 × 6-8 нм). Морфологія частинок і розподіл за розмірами були визначені за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа ТЕМ 125K (SELMI), що працює при потенціалі 100 кВ.

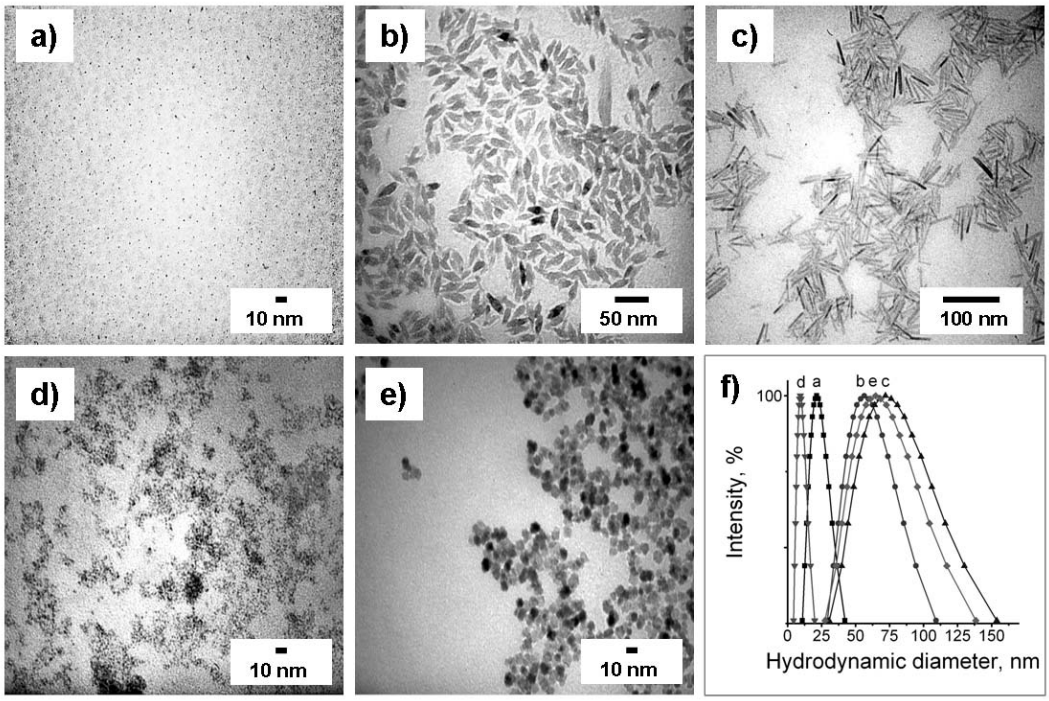

Рис. 1. ТЕМ-зображення наночастинок в колоїдних розчинах: a) – ортованадатні сферичні частинки $GdVO_4:Eu^{3+}$ з середнім розміром 2 нм; b) – ортованадатні веретеноподібні частинки $GdVO_4:Eu^{3+}$ з середнім розміром 8 × 25 нм; c) – ортованадатні стрижнеподібні частинки $LaVO_4:Eu^{3+}$ з середнім розміром 8 × 80 нм; d) сферичні частинки CeO_2 з середнім розміром 2 нм; e) – частинки CeO_2 з середнім розміром 10 нм; f) – розподіл інтенсивності розсіювання за розміром отриманих наночастинок.

Гідродинамічний діаметр вихідних колоїдних НЧ (d_h) контролювався за допомогою аналізатора ZetaPALS (Брукхейвен, Нью-Йорк), який працює на гелієво-неоновому (He−Ne) лазері з довжиною хвилі 657 нм.

Стійкість наночастинок була визначена як функція іонної сили (0,5-6,5 ммоль/л $CaCl_2$). Для кожного експерименту розчин наночастинок поміщали в одноразову пластикову кювету і струшували, щоб добре перемішати вміст перед вимірюванням інтенсивності функції автокореляції вимірів при куті розсіювання 90° [44]. До кожної проби спочатку додавалися білки в колоїдні розчини НЧ з подальшим додаванням буферів. Інкубацію наночастинок здійснювали при температурі 25 °C. У випадку використання буфера МЕМ необхідний рівень pH підтримувався протягом усього експерименту завдяки додаванню 25 мМ HEPES. Всі вимірювання проводились при температурі 25 °C, яка автоматично контролювалася приладом ZetaPALS. Середній діаметр агрегатів мав безперервний моніторинг на місці протягом 45 хв.

На графіках представлені значення діаметра наночастинок в нанометрах плюс-мінус стандартне відхилення. Стандартне відхилення автоматично розраховується програмою при визначенні діаметра наночастинок.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

У розчині НЧ не поводять себе як інертні об'єкти. Вони часто піддаються агрегації і/або агломерації, що призводить до утворення нових молекулярних комплексів. Це

відбувається в силу їх взаємодії при наближенні частинок на малі відстані одна до одної.

Під стійкістю дисперсних систем розуміють сталість їх властивостей в часі. В першу чергу, ступеня дисперсності, розподілу часток дисперсної фази за обсягом системи і взаємодії між частинками. Найбільш характерний і загальний для дисперсних систем тип зміни ступеня дисперсності пов'язаний з коагуляцією, що полягає в склеюванні частинок. Так, навіть в присутності звичайної дистильованої води НЧ здатні агломерувати та збільшуватися в діаметрі з утворенням водної оболонки, в присутності білків – утворювати «білкову корону».

Першим етапом було дослідження процесу агрегації НЧ в різних буферах, які часто застосовуються для інкубації біологічних об’єктів. Розчин НЧ різних типів вносили до сольових середовищ – Ігла МЕМ, Кребс-Рінгера та HBSS-буфер зі значеннями pH = 7,4 та органічних розчинів або буферів – 5% глюкоза, 0,01 % розчин глобуліну або альбуміну, Трис-буфер (pH=6,7; pH=7,4; pH=7,8). На рисунках 1-5 наведено діаграми, з яких видно, як змінюються розміри наночастинок у досліджених буферах та середовищах, що застосовуються в біомедичних дослідженнях порівняно до розмірів у колоїдних водних розчинах. ТЕМ в легендах рисунків – діаметр сухих наночастинок, розрахований за зображеннями отриманими за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії.

Особливо сильної агрегації НЧ зазнавали в присутності середовища Ігла МЕМ та буфера Кребса-Рінгера, в результаті чого гідродинамічний діаметр наночастинок збільшувався в десятки раз для $GdYVO_4:Eu^{3+}$ та в сотні раз для CeO_2 (2 нм) у порівнянні з таким у вихідних водних колоїдних розчинах (рис. 2 та рис. 3). Для наночастинок $GdYVO_4:Eu^{3+}$ агрегація продовжувала зростати зі збільшенням тривалості часу інкубації, тоді як для інших НЧ досягала порогових значень в межах 30 хвилин експерименту.

При інкубації НЧ в буфері HBSS також відбулася агрегація НЧ, але в порівнянні з інкубацією в буферах Ігла МЕМ та Кребса-Рінгера не мала такого вираженого ефекту, можливо, через відсутність у складі фосфатів. Збільшення гідродинамічного діаметра в буфері HBSS відбувалось в межах від 1 до 30 разів відносно до контролю (рис. 4). В якості контролю використовувався гідродинамічний діаметр НЧ у водному колоїдному розчині.

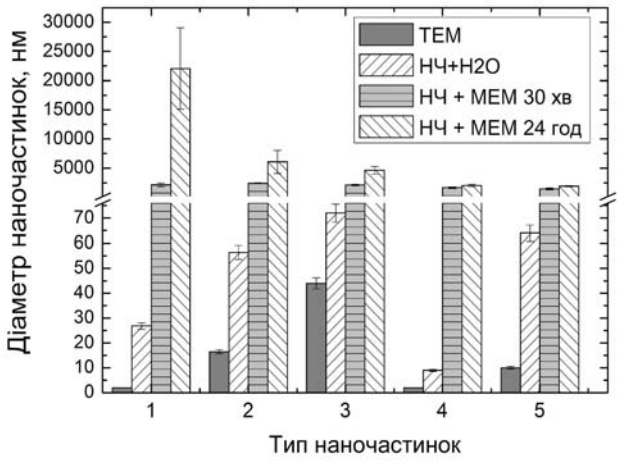

Рис. 2. Зміни розміру НЧ при інкубації в середовищі МЕМ, де:
1 – $GdYVO_4:Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4:Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4:Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

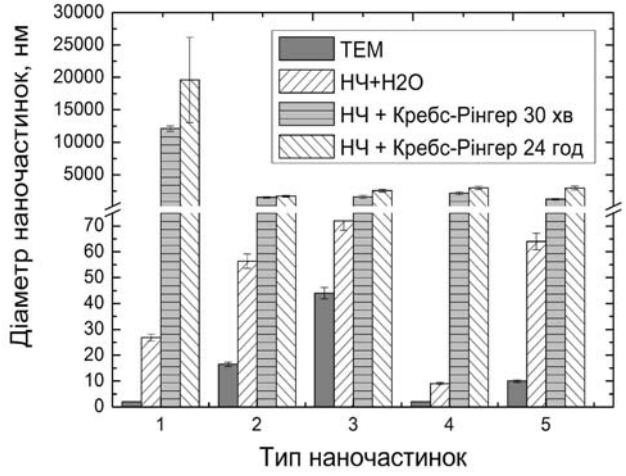

Рис. 3. Зміни розміру НЧ при інкубації в буфері Кребса-Рінгера, де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

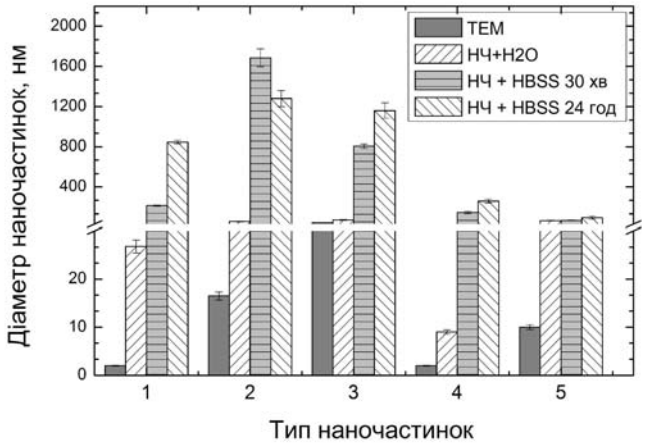

Рис. 4. Зміни розміру НЧ при інкубації в буфері HBSS, де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

В ізотонічному розчині 5% глюкози змін діаметра вихідних колоїдних НЧ не відбувається, що говорить про стабілізаційні властивості глюкози, що є великою перевагою в роботі з біосистемами (рис. 5).

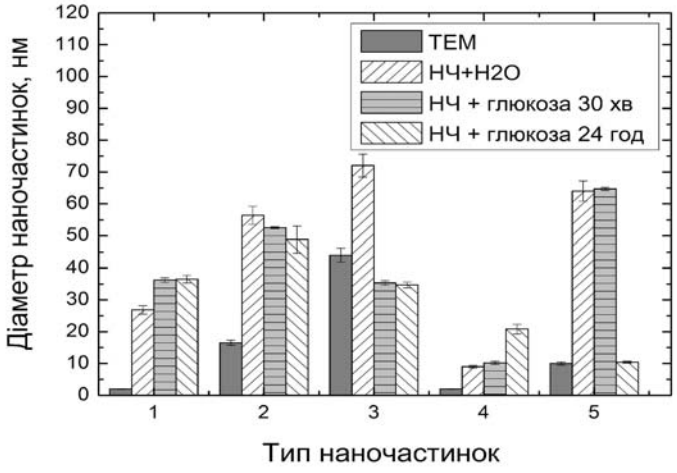

Рис. 5. Розмір НЧ у 5% розчині глюкози, де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

При дослідженні впливу сироваткових білків були використані імуноглобулін та альбумін. Змін гідродинамічного діаметра НЧ в присутності альбуміну не було виявлено, тоді як імуноглобулін спричиняв істотні зміни цих показників. Так, для γ-глобуліну при співвідношенні у розчині 1/10 (білок/НЧ, білок у кінцевій концентрації 0,01%) спостерігалося збільшення діаметру наночастинок в межах від 2 до 6 разів від розміру у вихідних водних колоїдних розчинах. Виключенням є НЧ CeO_2 (2 нм) розміри яких зросли в 16–30 разів у порівнянні з контролем. В якості контролю використовувався гідродинамічний діаметр НЧ у воді (рис. 6).

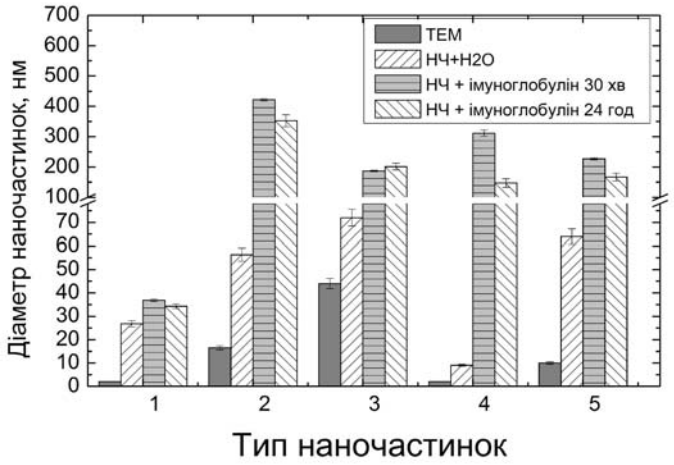

Рис. 6. Вплив 0,01% γ-глобуліну на розміри НЧ, де
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

Щодо взаємодії сироваткового альбуміну з НЧ, то проявляються чітко виражені стабілізаційні захисні властивості. Так, на відміну від імуноглобуліну, у водному розчині 0,01% альбуміну жодним чином не спостерігалося збільшення гідродинамічного діаметра НЧ, а в буферних системах (Кребс-Рінгер, HBSS), які містили 0,2% альбуміну, спостерігалося незначне збільшення діаметру вихідних колоїдних НЧ у порівнянні з тими ж системами, але без альбуміна в загальному складі (рис. 7-9).

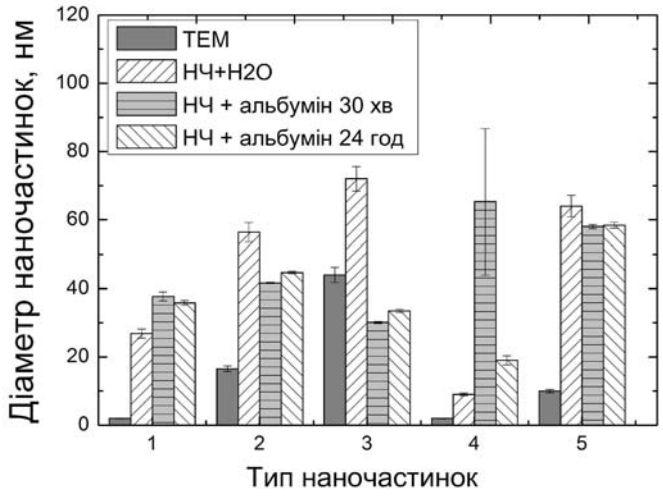

Рис. 7. Вплив 0,01% сироваткового альбуміну на прозміри НЧ, де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

Очевидно, що захисного ефекту альбумін надає завдяки збільшенню міжфазної взаємодії, адсорбуючись на поверхні частинок. Покриваючи їх поверхню адсорбційним шаром і зменшуючи поверхневий натяг, він тим самим сприяє утворенню сольватного

шару. В результаті, поверхня НЧ набуває властивостей речовини-стабілізатора (наночастинки ліофілізуються) і ліофобний золь стає менш чутливим до коагуляції електролітами (завдяки електростатичним, гідрофобним взаємодіям і структурно-механічному фактору стійкості).

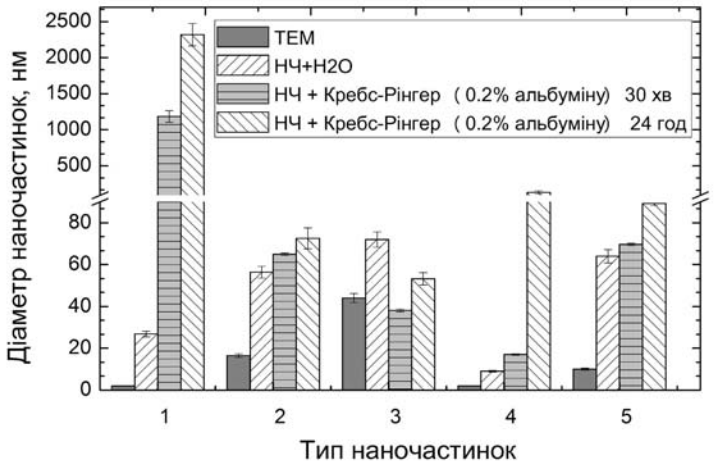

Рис. 8. Розмір НЧ при інкубації в буфері Кребс-Рінгера з додаванням альбуміну (0,2%), де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

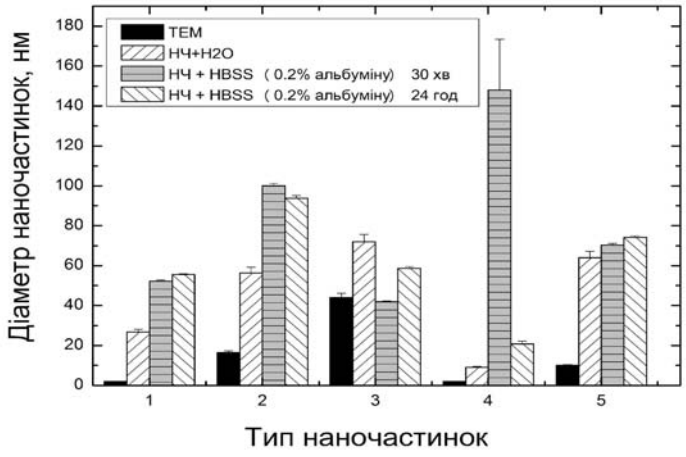

Рис. 9. Розмір НЧ при інкубації в буфері HBSS з додаванням альбуміну (0,2%), де:
1 – $GdYVO_4 : Eu^{3+}$;
2 – $GdVO_4 : Eu^{3+}$;
3 – $LaVO_4 : Eu^{3+}$;
4 – CeO_2 (2 нм);
5 – CeO_2 (10 нм).

Необхідно, однак, зазначити існування відмінностей у захисній дії альбуміну як для різного типу НЧ, так і в залежності від сольового складу використаних буферів. Серед головних відмінностей складу HBSS від Кребс-Рінгер буферу є відсутність солей фосфатів. Саме цей фактор може визначати особливостіі агрегаційної поведінки НЧ як за відсутності (Рис. 3, 4), так і присутності альбуміну (Рис. 8, 9). В присутності альбуміну підвищена агрегаційна здатність субнанометрових ортованадатних НЧ у Кребс-Рінгер буфері зберігається, хоча і в меншому ступені. Можна також зауважити, що субнанометрові частинки діоксиду церія виявляють певну нестабільність в обох буферах (Рис. 8, 9), у той же час у порівнянні з показниками у буферах без додавання альбуміну (Рис. 3, 4) агрегаційна стійкість розчинів НЧ діоксиду церія під впливом альбуміну зростає. Причому, присутність альбуміну з часом інкубації сприяє дисоціації агломератів цих НЧ у HBSS-буфері, але не в буфері, що містить фосфати.

Таким чином, найбільшу нестабільність серед інших проявляють малі частинки ортованадатів в середовищі Ігла МЕМ, та буфері Кребса-Рінгера, що вміщують солі

фосфатів. Внаслідок слабкої взаємодії з білками, вочевидь через малі розміри НЧ, захисний вплив альбуміну на НЧ цього типу у фосфатовмісних буферах менш виразний. На відміну від субнанометрових НЧ ортованадатів, НЧ CeO_2 (2 нм) виявили схильність до взаємодії з білками, у тому числі з альбуміном, що позначилось на їх здатності дисоціювати з агломератів в процесі інкубації в присутності альбуміну в HBSS буфері. Молекулярним механізмом стабілізаційного впливу альбуміну є електростатичні процеси адсорбції білків та стерична взаємодія між цими молекулами, що сприяє дисоціації наночастинок в сольових розчинах. Взаємодія окремих білків з наночастинками та їх вплив на стабільність колоїдних розчинів залежить як від фізико-хімічних властивостей наночастинок, так і природи білків.

Найбільшу нестабільність у сольових буферах виявляють субнанометрові НЧ в залежності від мікрооточення і наявності окремих компонентів у складі буфера. Потрібно зазначити, що в HBSS буфері, вочевидь, через відсутність фосфатів, стабільність усіх НЧ була вищою і не мала таких значних відмінностей ніж в інших буферних системах. Таким чином, серед досліджуваних буферів найбільш сприйнятливим для роботи з клітинами, до яких додаються НЧ, можна вважати HBSS буфер, оскільки навіть за відсутності альбуміну діаметри НЧ мали незначну зміну у порівнянні з іншими досліджуваними системами. Важливим здається також, що 5% глюкоза практично не впливала на агрегативні властивості НЧ, що свідчить на користь цієї колоїдної форми НЧ для біомедичних застосувань.

На другому етапі роботи вивчали вплив pH на агрегаційні властивості НЧ (в фізіологічному діапазоні значень 6,7; 7,4; 7,8) в органічному буфері (Трис-буфер) , а також взаємодію з НЧ глутатіону – важливого компоненту тіолбуферної системи клітини, що входить також до складу багатьох інкубаційних середовищ. При значеннях Трис буферу pH 6,7; 7,4; 7,8 не спостерігалася явна агрегація НЧ, окрім зразків CeO_2 (2 нм), які збільшувалися в діаметрі в кожному з pH. Найбільшої агрегації CeO_2 набули в середовищі з pH=6,7 та часу інкубації 24 год (рис. 10).

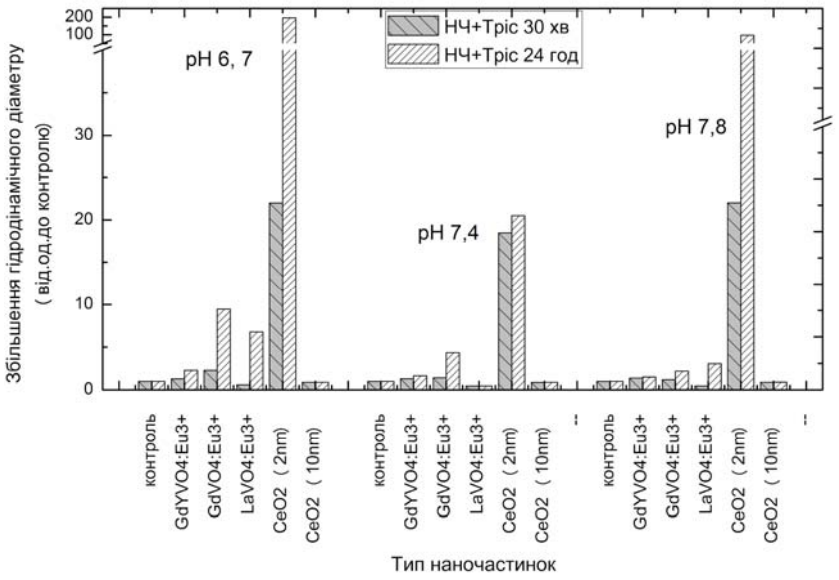

Рис. 10. Зміни гідродінамічного діаметра НЧ при інкубації в Трис-буфері при значеннях pH 6,7; 7,4; 7,8.
Примітка: контроль – діаметр наночастинок в H_2O.

Глутатіон є основним ендогенним антиоксидантом в клітинах, що безпосередньо бере участь в нейтралізації вільних радикалів і реактивних сполук кисню, у підтримці екзогенних антиоксидантів, а також він є регулятором азотно-оксидного циклу і не

тільки. Ці властивості відіграють важливу роль в організмі, тому дослідження його взаємодії з НЧ має особливе значення.

У Трис-буфері з різними значеннями pH додавання відновленого глутатіону не спричинило збільшення гідродинамічного діаметра НЧ проти контролю, тому можна говорити про відносну стійкість дисперсної системи (рис. 11).

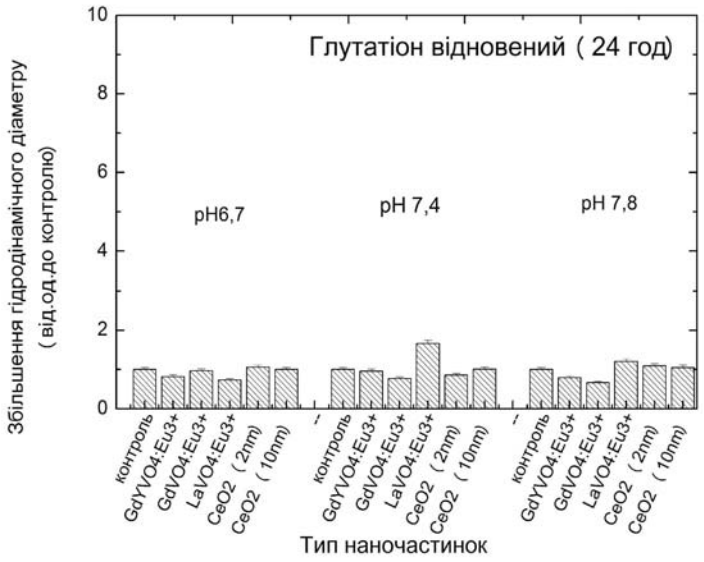

Рис. 11. Зміни гідродинамічного діаметра НЧ в Тріс-буфері при додаванні відновленого глутатіону при значеннях pH 6,7; 7,4; 7,8 та інкубації 24 год.
Примітка: контроль – діаметр наночастинок в Тріс-буфері з відповідним значенням pH.

Усі типи ортованаданих наночастинок $GdYVO_4:Eu^{3+}$, $GdVO_4:Eu^{3+}$, $LaVO_4:Eu^{3+}$ у Тріс-буфері при pH=6,7 в присутності окисненого глутатіону мають явне (в десятки разів) збільшення гідродинамічного діаметра відносно контролю, що свідчить про їх коагуляцію. У той же час, взаємодія НЧ та окисненого глутатіону в системах з іншими pH не показала даного ефекту (рис. 12).

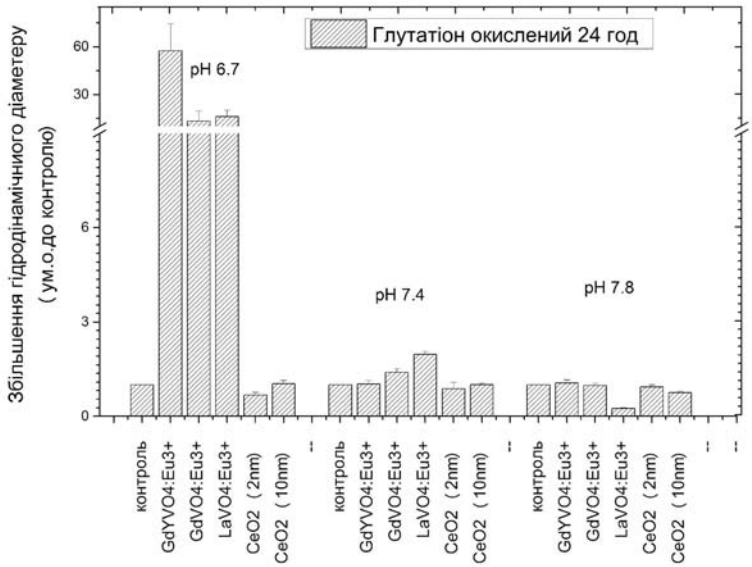

Рис. 12. Зміни гідродинамічного діаметра НЧ в Тріс буфері при додаванні окисленого глутатіону при значеннях pH 6,7; 7,4; 7,8 з часом інкубації 24 год.
Примітка: контроль – діаметр наночастинок в Тріс буфері.

Ймовірно, що у результаті сорбції окисленого глутатіону на наночастинках, зменшення агрегаційної стійкості НЧ може бути пов'язане з великим розміром цього молекулярного комплексу і конформаційною рухливістю його функціональних груп,

що забезпечують можливість утворення зв'язків-зшивок між наночастинками. Це надалі може застосовуватися в наномедицині, беручи до уваги закислення pH-оточення клітин пухлини та порушений баланс глутатіону при онкозахворюваннях.

Крім цього, також визначався електрокінетичний потенціал колоїдної системи. Кореляції між агрегаційними властивостями та дзета-потенціалом частинок в різних буферах не було виявлено, значення дзета-потенціала коливалися в межах від -5 до -26 мВ.

Таким чином, залежності агрегації НЧ від pH середовища в фізіологічному діапазоні не виявлено. Але, в буферній системі Трис незалежно від значення pH розчини НЧ CeO_2 2 нм виявили значну нестабільність, що пояснюється, як і в інших випадках, високою чутливістю колоїдних систем на основі цих субнанометрових НЧ до впливу мікрооточення. При аналізі взаємодії НЧ з окисленим глутатіоном спостерігався явний ефект агрегації в найкислішому буфері серед поданих (pH=6,7). Виявлені особливості взаємодії НЧ з найважливішими компонентами тіольної буферної системи можуть бути використані для pH-залежного націлювання НЧ в умовах онкопатології.

ВИСНОВКИ

У сольових буферах відбувається значна агрегація НЧ, найбільш помітним цей процес є у фосфатовмісних буферах, тоді як додавання 0,2% альбуміну значно підвищує агрегативну стійкість НЧ. В ізотонічному розчині 5% глюкози змін діаметра НЧ не відбувається, що є значною перевагою для подальшої роботи з біосистемами.

Найбільшу агрегаційну нестабільність проявляють субнанометрові ортованадатні НЧ та CeO_2 (2 нм). Ступінь її прояву залежить від іонної сили, наявності солей фосфатів, а також органічних чинників середовища. Для цих типів НЧ виявлені також відмінності у взаємодії з сироватковими білками. Змін гідродинамічного діаметру ортованадатних НЧ у водних розчинах альбуміну та імуноглобуліну не виявлено, тоді як для малого церію CeO_2 (2 нм) в обох випадках відбувається значне збільшення діаметру.

В Тріс-буфері (в фізіологічному діапазоні значень pH) зміни гідродінамічного діаметру НЧ не мали характеру pH залежності. В присутності окисненого глутатіону спостерігався явний ефект агрегації в найкислішому буфері серед досліджуваних (pH=6,7).

ПОДЯКА

Робота виконана в рамках НДР Національної академії наук України, номер проекта 0115U005672C.

КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікта інтересів.

Authors' ORCID ID

M.Yu. Malyukina https://orcid.org/0000-0003-1275-8321
L.V. Piliai https://orcid.org/0000-0002-5762-1030
N.S. Kavok https://orcid.org/0000-0002-2429-2832

REFERENCES

1. Volkov, S.V., Kovalchyk, S.V., Genko V.M., Reshetnyak O.V. (2008). *Nanochemistry. Nanosystems. Nanomaterials.* Kyev: Naukova dumka. (In Ukrainian).
2. Chekman, I. S., Korneykova, Ya. M., Zagorodniy, M. I., Terentiev, A.O. (2008). Kvantovi mitky: klinichni ta farmakolohichni aspekty [Quantum Labels: Clinical and Pharmacological Aspects]. *Mystetstvo likuvannia, 50*(4), 72-74. (In Ukrainian).

3. *Analizatory svoistv chastitc: katalog [Particle properties analyzers: catalog]* (2015). Moskow: SocTrade. (In Russian).
4. Gai, S., Li, C., Yanq, P., Lin, J. (2014). Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications. *Chemical Reviews*, *114*(4), 2343-2389.
5. Narayanan, K. B., Park, H. H. (2013). Pleiotropic functions of antioxidant nanoparticles for longevity and medicine. *Advances in Colloid and Interface Science*, 201, 30-42.
6. Alili, L., Sack, M., von Montfort, C., Giri, S., Das, S., Carroll, KS., Zanger, K., Seal, S., Brenneisen, P. (2013). Downregulation of tumor growth and invasion by redox active nanoparticles. *Antioxid Redox Signal,* 19, 765-778.
7. Soenen, S.J., Parak, W.J., Rejman, J., Manshian, B. (2015). (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, *115*(5), 2109-2135.
8. Strojan, K., Leonardi, A., Breqar, V.B., Krizaj, I., Svete, J., Pavlin, M. (2017). Dispersion of nanoparticles in different media importantly determines the composition of their protein corona. *PLoS ONE*, *12*(1): e0169552. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169552
9. Grygorova, G., Klochkov, V., Sedyh, O., Malyukin, Yu. (2014). Aggregative stability of colloidal ReVO4:Eu3+ (Re = La, Gd, Y) nanoparticles with different particle size. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 457, 495-501.