

УДК 546.655

МУЛЬТИФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ МАЛЬТОДЕКСТРИНОМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ, ДОПИРОВАННЫХ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

© 2024 г. Н. Ю. Офицерова^а, *, И. Н. Бажукова^а

^аУральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002 Россия

*E-mail: n.ofitserova@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Нанокристаллический диоксид церия является перспективным материалом с точки зрения биомедицинских применений благодаря своей способности выполнять функции различных ферментов и инактивировать свободные радикалы. Одним из способов тонкой настройки физико-химических свойств наночастиц и проявляемой активности является модификация структуры кристаллической решетки в результате допирования ионами трехвалентных редкоземельных элементов. В работе изучены пероксидазная и оксидазная активности, а также способность инактивировать гидроксильный радикал для чистых и допированных наночастиц диоксида церия, покрытых стабилизирующей мальтодекстриновой оболочкой.

Ключевые слова: наноматериалы, диоксид церия, редкоземельные элементы, допирование, мальтодекстрин, свободные радикалы

DOI: 10.56304/S2079562924050348

ВВЕДЕНИЕ

Достижения нанотехнологий в настоящее время находят все больше применений в биологических системах. Многообещающим материалом с точки зрения использования в биомедицинских целях, таких как защита организма от окислительного стресса, редокс-терапия злокачественных новообразований, системы доставки лекарственных средств в агрессивных средах, создание хемо- и биосенсоров, является нанокристаллический диоксид церия (НДЦ).

Перспективы его применения обусловлены физико-химическими свойствами: наличием смешанных валентных состояний Ce^{3+} и Ce^{4+} и кислородных вакансий в структуре кристаллической решетки, что делает наночастицы способными выполнять роль ферментов естественной антиоксидантной системы организма и нейтрализовать активные формы кислорода и азота, являющиеся причиной окислительного стресса организма, злокачественных новообразований, старения.

Для специфического биологического применения важна правильная настройка физико-химических свойств наночастиц. Одним из способов модификации структуры поверхности и изменения содержания кислородных вакансий в

кристаллической решетке НДЦ является допирование трехвалентными ионами редкоземельных элементов (RE). Увеличение числа кислородных вакансий и отношения $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ в результате допирования было показано многими авторами для разных трехвалентных редкоземельных элементов, таких как лантан, самарий, эрбий, европий, неодим, празеодим и др. [1–4]. Для допированных образцов в литературе встречаются противоречивые данные о проявляемой биокаталитической активности: наряду с большим количеством работ, свидетельствующих о повышении антиоксидантного потенциала для частиц, допированных европием, эрбием, лантаном, самарием, неодимом [1, 3–5], существуют работы, свидетельствующие о его снижении, например, при допировании наночастиц ионами гадолиния [6], самария [7]. В некоторых работах отмечается даже, что допированные наночастицы обладают повышенной антибактериальной активностью, становясь источником АФК и индуцируя гибель микроорганизмов: например, такая активность описана для частиц, допированных самарием [2] и неодимом [8].

Таким образом, имеющиеся данные недостаточно систематизированы, разрознены и зачастую противоречивы, механизмы проявления той или иной активности малоизучены, поэтому про-

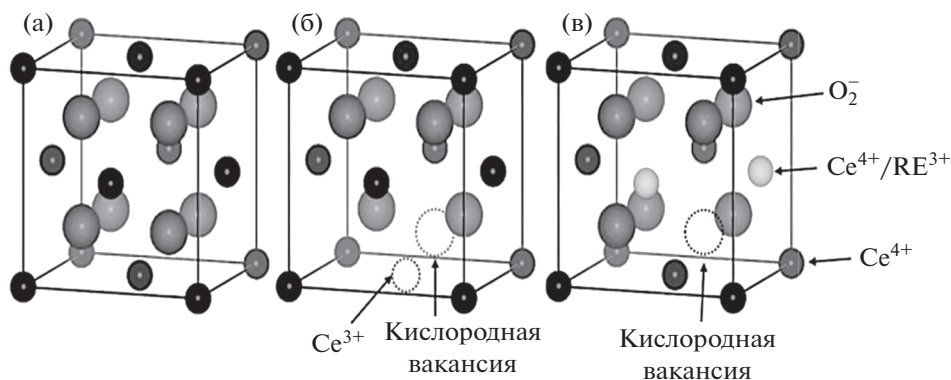


Рис. 1. Кристаллическая структура диоксида церия: (а) стехиометрический крупнокристаллический CeO_2 , (б) нестехиометрический нанокристаллический CeO_{2-x} , (в) допированный трехвалентными РЗЭ $\text{Ce}_x\text{RE}_{1-x}\text{O}_y$.

блема исследования модификации биокаталитической активности наночастиц диоксида церия в процессе допирования является актуальной.

Целью работы является изучение влияния допирования наночастиц диоксида церия трехвалентными редкоземельными ионами Er^{3+} , Yb^{3+} , Sm^{3+} на проявляемую ими пероксидазную и оксидазную миметические активности, а также на способность инактивировать гидроксильный радикал.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Методика синтеза наночастиц диоксида церия

Исследуемые в работе наночастицы диоксида церия были получены путем химического осаждения. Для синтеза использовались следующие прекурсоры: водный раствор нитрата церия (III) $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ с концентрацией Ce 0.01 М; водные растворы нитратов допирующих веществ: $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Sm}(\text{NO}_3)_3$ в концентрациях 0.216 М, 0.223 и 0.436 М, соответственно; водный раствор мальтодекстрина 0.04 М с декстрозным эквивалентом DE 10-12; водный раствор аммиака NH_4OH с массовыми концентрациями 5 и 25%; изопропиловый спирт абсолютный; дистиллированная вода. Все реагенты – ЧДА, доля примесей составляет не более 0.05%. Допирование производилось ионами Er^{3+} , Yb^{3+} , Sm^{3+} в молярной концентрации 5%. Выбранные катионы-допанты имеют ионные радиусы больше, чем Ce^{4+} (0.0970 нм), но меньше, чем Ce^{3+} (0.1143 нм): Yb^{3+} (0.0985 нм), Er^{3+} (0.1004 нм), Sm^{3+} (0.1079 нм). Методика синтеза подробно описана в работах [1, 9].

Наличие в структуре кристаллической решетки смешанных валентных состояний Ce^{3+} и Ce^{4+} и кислородных вакансий делает наночастицы диоксида церия способными участвовать в окислительно-восстановительных реакциях.

Допирование кристаллической решетки ионами меньшей валентности, чем Ce^{4+} , приводит к еще большему увеличению числа кислородных вакансий и соотношения $\text{Ce}^{3+}/\text{Ce}^{4+}$ в кристаллической решетке наночастиц [10]. Образование вакансий происходит с целью поддержания электронейтральности системы в результате двух процессов: восстановления ионов Ce^{4+} до Ce^{3+} и замещения ионов Ce^{4+} в решетке редкоземельными трехвалентными катионами RE^{3+} (рис. 1) [3].

1.2. Методы аттестации синтезированных наночастиц диоксида церия

Информация о структуре поверхности и размере наночастиц была получена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием электронного микроскопа X-Act ADD + JSM-5900LV (Jeol, Япония), оснащенного системой волнодисперсионного микроанализатора, шлюзовой камерой и устройством для подавления электромагнитных помех INCA Energy 250 и INCA Wave 500 (Oxford Instruments, Великобритания). Микрофотографии поверхности получали с использованием детекторов обратно-рассеянных электронов (режим BSE) и вторичных электронов (режим SE). В качестве источника электронов использовался W катод, ускоряющее напряжение – 10 кВ.

Морфологический анализ проводился с помощью просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения (ПЭМ-ВР). Изображения были получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM 2100F (катод Шоттки, электронный пучок 200 кВ), оснащенного программным обеспечением JEMS (Jeol, Япония).

Кристаллическая структура образца была проанализирована методом рентгеновской дифракции с использованием автоматического рентгеновского дифрактометра Rigaku D/MAX-2500 (Rigaku Corporation, Япония) в диапазоне углов 2θ

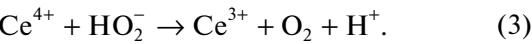
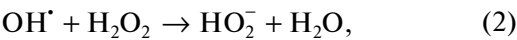
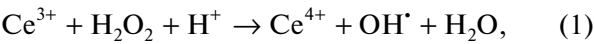
Таблица 1. Концентрации реагентов

Пероксидазная активность	Реагент	ТМБ	H ₂ O ₂ (3%)	CeO ₂ (5 мг/мл)
	Концентрация, mM	0.416	24.704	0.580
Оксидазная активность	Реагент	ТМБ	CeO ₂ (5 мг/мл)	
	Концентрация, mM	0.416	0.580	
Инактивация гидроксильного радикала	Реагент	FeSO ₄ (10 мг/мл)	H ₂ O ₂ (3%)	CeO ₂ (5 мг/мл)
	Концентрация, mM	0.987	3.088	2.900

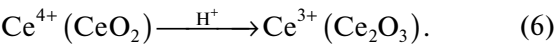
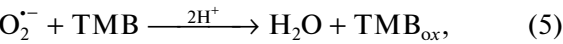
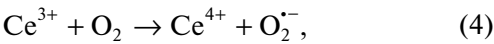
от 10° до 90°. Скорость съемки составляла 5°/мин, шаг 0.02°. Длина волны излучения источника CuK_α, на которой регистрировалась дифрактограмма, составила 1.54056 Å. Первичная идентификация фазового состава проводилась с помощью карточки ICSD (inorganic crystal structure database).

1.3. Методы исследования ферментоподобной активности наночастиц диоксида церия

Методики оценки пероксидазной и оксидазной активности основаны на изменении цвета хромогенным субстратом 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (ТМБ) с бесцветного на бирюзовый с максимумом окисления при 652 нм. Проявление пероксидазной активности наблюдается при окислении субстрата пероксидом водорода в присутствии суспензии наночастиц. Осуществляется обратимый переход между состояниями Ce³⁺ и Ce⁴⁺: реакции (1)–(3) [11].



Оксидазная активность проявляется в кислой среде непосредственно в результате взаимодействия хромогенного субстрата с суспензией наночастиц. В основе реакции лежит генерация супероксидного анион-радикала O₂^{•−}, который окисляет молекулы ТМБ: реакции (5)–(6) [3].



В основе метода оценки способности наночастиц инактивировать гидроксильные радикалы лежит способность красителя метилового фиолетового обесцвечиваться под действием этих радикалов. Максимум поглощения красителя приходится на длину волны 582 нм. Гидроксильный радикал, генерируемый в реакции Фентона, обесцвечивает метиловый фиолетовый, что приводит к уменьшению поглощения на длине волны 582 нм. Введение в реакционную среду наночастиц диоксида

церия приводит к частичной инактивации гидроксильных радикалов по механизму, представленному реакцией (7) [3].



Исследование активности суспензий наночастиц проводили методами оптической спектроскопии с использованием спектрофотометра ПЭ-5400УФ (ЭКРОСХИМ, Россия). Регистрацию оптического поглощения проводили на длине волны 652 нм для оценки пероксидазной и оксидазной активностей, на длине волны 582 нм — для оценки способности наночастиц инактивировать гидроксильный радикал. Концентрации реагентов для определения активности каждого типа приведены в табл. 1.

2. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Характеристика синтезированных наночастиц диоксида церия

Анализ СЭМ-изображений нанопорошка, представленных на рис. 2а, показал, что он состоит из агломератов порядка нескольких сотен мкм. Большую часть агломерата составляют полисахаридные цепочки мальтодекстрина (декстрин, глюкоза, мальтоза), на поверхности которых располагаются нанокристаллы диоксида церия, что обеспечивает пространственное разобщение наночастиц и стабильность суспензии.

ПЭМ-ВР изображения (рис. 2б) свидетельствуют о том, что наночастицы представляют собой сферические объекты, встроенные в матрицу мальтодекстрина. Средний размер нанокристаллов 3–5 нм. Нанокристаллический диоксид церия имеет кубическую гранецентрированную упорядоченную структуру типа флюорита.

Дифрактограмма наночастиц диоксида церия, отожженных при температуре 400°С, приведена на рис. 3. Подтверждена кубическая кристаллическая структура типа флюорит с пространственной группой *fm3m*: дифракционные пики при значениях 2θ 28.61°, 33.14°, 47.57°, 56.35° и 59.13° соответствуют плоскостям (111), (200), (220), (311) и (222). Фазовая чистота нанопорошка подтверждена отсутствием дополнительных дифракционных пиков.

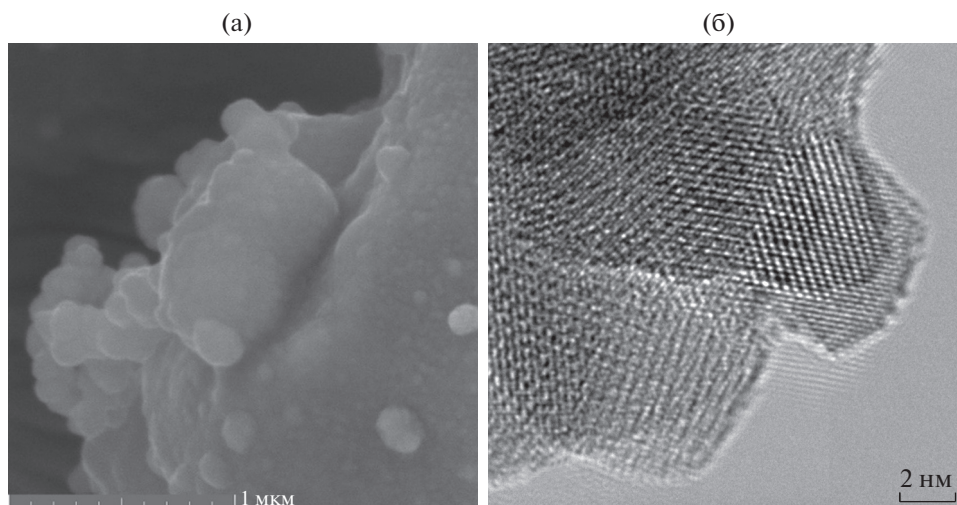


Рис. 2. Микрофотографии нанопорошка CeO_{2-x} , стабилизированного мальтодекстрином: (а) СЭМ, (б) ПЭМ-ВР.

2.2. Исследование ферментоподобной активности наночастиц диоксида церия методом оптической спектроскопии

Для характеристики протекающих реакций пероксидазо- и оксидазоподобной миметической активности наночастиц регистрация оптической плотности на длине волны 652 нм, соответствующей максимуму поглощения продукта окисления ТМБ, проводилась в течение 2 минут. Полученные кинетики для чистого и допированных образцов представлены на рис. 4а, 4б для пероксидазной и оксидазной активности соответственно.

Возрастание оптической плотности растворов со временем свидетельствует об образовании продукта окисления ТМБ, то есть о протекании ферментоподобной реакции.

В случае (а) ТМБ окисляется пероксидом водорода в присутствии наночастиц CeO_2 , в случае (б) ТМБ окисляется непосредственно наночастицами в кислой среде (рН 4.0). Таким образом, показано, что наночастицы CeO_2 способны выпол-

нять функции ферментов пероксидазы и оксидазы соответственно.

Значение тангенса угла наклона начального участка графиков характеризует скорости протекания соответствующих реакций. Как следует из рис. 4а, допирование наночастиц ионами трехвалентных редкоземельных элементов приводит к замедлению реакции окисления субстрата, что свидетельствует о снижении пероксидазной активности. Подобный результат может объясняться тем, что включение катионов-допантов в структуру решетки может затруднять переход между валентными состояниями Ce^{3+} , Ce^{4+} , тем самым приводить к понижению скорости окисления субстрата.

Оксидазная активность, напротив, выше для допированных образцов. Предполагаемым ключевым звеном протекания реакции окисления при проявлении наночастицами функций фермента оксидазы является генерация супероксидного анион-радикала. В результате допирования увеличивается количество кислородных вакансий и доля ионов Ce^{3+} , что приводит к интенсивному восстановлению адсорбированного на поверхности решетки кислорода до супероксид-аниона, следовательно, повышает скорость окисления субстрата.

Для оценки способности наночастиц инактивировать гидроксильный радикал была зарегистрирована оптическая плотность растворов на длине волны 582 нм через 5 минут после внесения в раствор пероксида водорода. Полученные результаты отражены столбчатой диаграммой на рис. 5.

Как следует из рис. 5, в контрольном образце без наночастиц CeO_{2-x} происходит практически полное обесцвечивание красителя под воздействием гидроксильных радикалов. Присутствие наночастиц диоксида церия защищает краситель

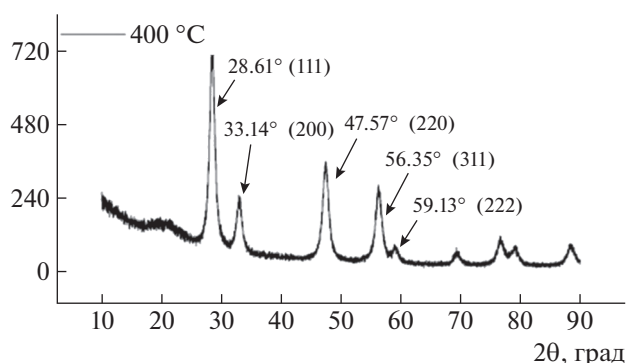


Рис. 3. Дифрактограмма нанопорошка CeO_{2-x} .

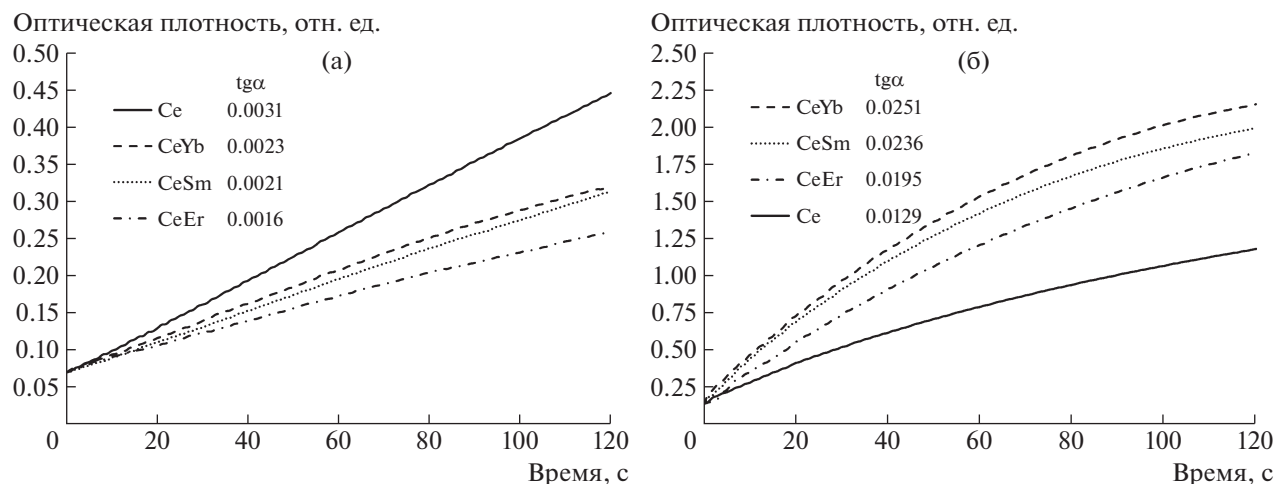


Рис. 4. Спектры оптического поглощения контрольного (без НДЦ) и опытного раствора: (а) пероксидазная активность, (б) оксидазная активность.

от обесцвечивания. Оптическая плотность для всех образцов, допированных трехвалентными элементами, выше, чем для чистых образцов, что свидетельствует об увеличении способности инактивировать гидроксильный радикал вследствие допирования. Повышенная антиоксидантная активность у допированных образцов может объясняться локализацией молекулы гидроксильного радикала

на кислородных вакансиях рядом с активными Ce^{3+} центрами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что допирование, внося изменения в кристаллическую решетку наночастиц диоксида церия, модифицирует проявляемую ими окислительно-восстановительную активность. Для оксидазоподобной активности и способности инактивировать гидроксильный радикал было показано повышение вследствие допирования. Результаты оценки способности наночастиц выполнять функции фермента пероксидазы показали снижение данного типа активности для допированных образцов по сравнению с чистыми.

Полученные результаты могут являться основой для уточнения механизма допирования наночастиц диоксида церия ионами трехвалентных редкоземельных элементов и последующего направленного синтеза наночастиц под конкретные биомедицинские цели.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Е.О. Бакшееву и М.А. Машковцеву за образцы, предоставленные для исследования; А.С. Фарленкову и Н. Пизуровой за помощь в проведении экспериментальной работы по аттестации исследуемых объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Gupta A., Das S., Neal C., et al. // J. Mater. Chem. 2016. V. 4 (19). P. 3195–3202.
2. Balamurugan A., Sudha M., Surendhiran S. // Mater. Today: Proc. 2019. V. 26 (1). P. 1–7.

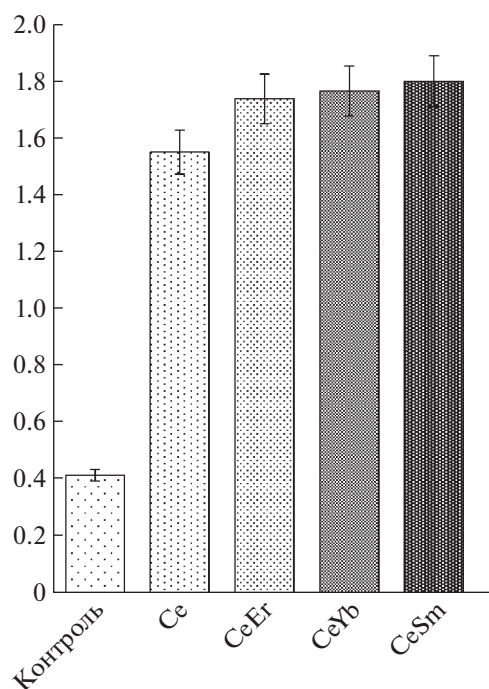


Рис. 5. Обесцвечивание красителя метилового фиолетового под действием OH^* -радикалов без наночастиц и в присутствии наночастиц с различными допантами.

3. *Vinothkumar G., Rengaraj S., Arunkumar P., et al.* // J. Phys. Chem. 2018. V. 123 (1) P. 541–553.
4. *Vinothkumar G., Amalraj R., Babu K.S., et al.* // Ceram. Int. 2017. V. 43 (7). P. 5457–5466.
5. *Hernández-Castillo Y., Margarita C.-H., Marure A., et al.* // Ceram. Int. 2019. V. 45 (2). P. 2303–2308.
6. *Dunnick K.M., Pillai R., Pisane K.L., et al.* // Biol. Trace Elem. Res. 2015. V. 166 (1). P. 96–107.
7. *Celardo I., Nicola M., Mandoli C., et al.* // ACS Nano. 2011. V. 5 (6). P. 4537–4549.
8. *Gunasekaran S., Dinesh A., Silambarasu A., et al.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2019. V. 19 (7). P. 3964–3970.
9. *Baksheev E.O., Pronina M.O., Mashkovtsev M.A., et al.* // AIP Conf. Proc. 2019. V. 2174 (1). P. 020156.
10. *Ortega P.P., Hangai B., Moreno H.P., et al.* // J. Alloys Compd. 2021. V. 888. P. 161517.
11. *Vinothkumar G., Lalitha A.I., Babu K.S.* // Inorg. Chem. 2018. V. 58 (1). P. 349–358.

Multienzymatic Activity of Maltodextrin-Coated Cerium Dioxide Nanoparticles Doped with Rare Earth Elements

N. Yu. Ofitserova¹, * and I. N. Bazhukova¹

¹*Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620002 Russia*

*e-mail: n.ofitserova@mail.ru

Received May 30, 2023; revised June 6, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—Nanocrystalline cerium dioxide is a promising material for biomedical applications due to its ability to perform the functions of various enzymes and inactivate free radicals. One of the ways to tune the physicochemical properties of nanoparticles and its biocatalytic activity is to modify the crystal lattice structure by means of doping with trivalent rare earth ions. Peroxidase, oxidase activity, and the ability to inactivate the hydroxyl radical by pure and doped maltodextrin-coated cerium dioxide nanoparticles are studied in the present paper.

Keywords: nanomaterials, cerium dioxide, rare earth elements, doping, maltodextrin, free radicals