

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление (специальность): 03.03.02 – Физика
Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
КОМПЛЕКСЫ НАНОЧАСТИЦ $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ И ПРЕПАРАТА
РАДАХЛОРИН ДЛЯ КОМБИНИРОВАННОЙ
ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Студент 4 курса группы 06-811

«21» июня 2022 г.



(Хусаинова А.И.)

Научный руководитель

к.ф.-м.н., доцент

«21» июня 2022 г.



(Низамутдинов А.С.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«21» июня 2022 г.



(Аганов А.В.)

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	5
1.1 Фотодинамическая терапия.....	5
1.2 Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда.....	10
1.3 Комбинированная фотодинамическая терапия	13
1.4 Ферстеровский перенос энергии	14
1.5 Наночастицы $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$	17
ГЛАВА 2. ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА И СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$	21
2.1 Экспериментальная техника	21
2.2 Синтез наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$	22
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	24
3.1 Характеризация наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$	24
3.2 Спектрально - кинетические характеристики наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$	25
3.3 Расчет критического расстояния	31
3.4 Оценка выживаемости клеток A549 в присутствии наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ и красителя Радахлорин	33
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	40

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих лет человечество исследует развитие онкологических заболеваний, которые появляются вследствие ослабления иммунитета человека. Наш организм устроен таким образом, что некоторые клетки способны превращаться в раковые и затем погибать, благодаря врожденному иммунитету, а некоторые из них не подчиняются данному механизму, развиваясь, образуют злокачественные опухоли.

Для лечения данного заболевания существует перспективный метод фотодинамической терапии, который основан на активации молекул фотосенсибилизатора. Данное вещество способно накапливаться в опухоли. Подвергаясь лазерному излучению, молекула фотосенсибилизатора получает энергию и передает ее кислороду, превращая его в активную синглетную форму. Такая форма кислорода способна повреждать сосудистую систему опухоли посредством некроза или апоптоза клеток. Однако используемое излучение видимого диапазона не способно проникать глубоко в ткани, поэтому для исключения данной проблемы применяется метод комбинированной фотодинамической терапии. Молекулу фотосенсибилизатора связывают с молекулой наночастицы. Спектр поглощения фотосенсибилизатора должен перекрываться со спектром излучения наночастицы. Далее происходит преобразование энергии в генерацию активной синглетной формы кислорода. Данные наночастицы должны достигать размеров десятков нанометров, обладать низкой токсичностью и высоким потенциалом преобразования энергии в видимый диапазон.

Целью настоящей работы являлось исследование спектрально-кинетических характеристик перспективных наноконкомпозитов на основе наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, конъюгированных с препаратом Радахлорин посредством поливинилпирролидона. Была исследована безызлучательная передача энергии от ионов Tb^{3+} к молекулам Радахлорина. Также была оценена

токсичность композитов по отношению к культуре клеток A549 посредством МТТ-теста.

В связи с поставленной целью требовалось выполнить следующие задачи:

1. Синтез наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ методом соосаждения.
2. Характеризация наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$
3. Регистрация спектров люминесценции, рентгенолюминесценции наночастиц.
4. Регистрация кинетик затухания люминесценции коллоида наночастиц в присутствии Радахлорина, а также конъюгированного с препаратом Радахлорин посредством поливинилпирролидона.
5. Оценка времени жизни люминесценции наночастиц и коэффициента передачи энергии от ионов тербия к ионам красителя Радахлорин.
6. Оценка цитотоксичности наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ с помощью МТТ-теста.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Фотодинамическая терапия

В настоящее время лечение раковых заболеваний проводится рядом методов. К ним относятся хирургическое вмешательство, химиотерапия, лучевая терапия, гормональная терапия, иммунотерапия. Данные подходы являются действенными в ряде случаев, но вместе с тем наносят сильный вред организму в целом. Также существует другой метод лечения онкологических заболеваний - метод фотодинамической терапии.

Фотодинамическая терапия - относительно новая и надежная форма лечения рака. Данный метод получил широкое распространение благодаря таким своим преимуществам, как минимальная токсичность для организма, высокая терапевтическая эффективность, также свойство улучшать иммунитет в борьбе с опухолью. В данном методе используют фотосенсибилизаторы, которые являются веществами, увеличивающими светочувствительность. Под воздействием света с длиной волны, близкой к максимуму поглощения красителя [1], фотосенсибилизаторы активируются в присутствии кислорода, генерируя цитотоксически активные формы кислорода. Такая форма кислорода способна повреждать сосудистую систему участка, в котором происходит реакция.

В настоящее время для клинической практики наиболее часто используются следующие фотосенсибилизаторы, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики фотосенсибилизаторов, используемых в клинической практике

Фотосенсибилизатор	Коммерческое название	Длина волны пика поглощения (нм)	Длительность периода фотосенсибилизации
Производные гематопорфирина	Фотофрин, фотогем	630	До 2 месяцев

Продолжение таблицы 1

Бензопорфирин	Вертепорфин	689	1 - 2 дня
Хлорин еб	Фотодиазин, Радахлорин	662	3-7 дней
Фталоцианины	Фотосенс	670	До 2 месяцев
Текзафирины	Лютрин, Антрин, Оптрин	732	3 - 5 дней
Бензопорфирин	Вертепорфин	689	3 - 5 дней
Мета-тетрагидроксифенил хлорин	Фоскан	652	До 6 недель
5-аминолеуволиновая кислота	Аласенс, Левулан	635	1 - 2 дня

В основе фотодинамического эффекта лежат фотохимические реакции. Различают два типа фотохимических реакций, механизмы которых представлены далее в виде схемы электронных переходов в молекуле фотосенсибилизатора и образования синглетного кислорода (см. рисунок 1).

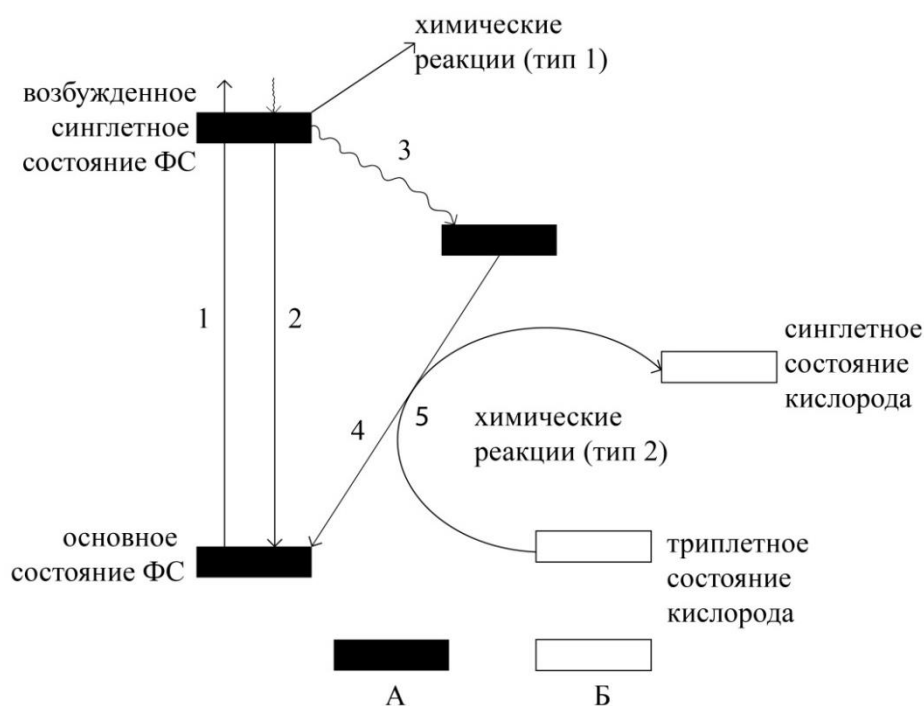


Рисунок 1 – Схема электронных переходов в молекуле фотосенсибилизатора и образования синглетного кислорода. 1 - процесс поглощения, 2 - процесс флуоресценции, 3 - процесс внутренней конверсии, 4 - процесс фосфоресценции, 5 - переход триплетного кислорода в синглетное состояние. А - уровни энергии фотосенсибилизатора, Б – уровни энергии кислорода

Первый тип: при облучении участка, в котором содержится молекула фотосенсибилизатора, светом с длиной волны, соответствующей спектру его поглощения, происходит переход данной молекулы из основного синглетного состояния S_0 в возбужденное S_1 . После перехода в результате релаксации часть молекул высвечивают свою энергию в виде кванта флуоресценции, а остальная часть молекул переходят в возбужденное триплетное состояние T_1 . В этом состоянии молекула фотосенсибилизатора передает энергию соседним молекулам организма. Во втором типе молекула фотосенсибилизатора, находящаяся в таком состоянии, часть энергии передает также триплетному кислороду 3O_2 , после чего образуется синглетный кислород 1O_2 . В возбужденном триплетном состоянии между молекулой фотосенсибилизатора и субстратом, то есть раковой тканью, происходит перенос электронов и водорода, далее образуются промежуточные радикальные продукты, имеющие короткое время жизни (около 1 нс). Эти радикалы вступают в реакции с молекулами воды и кислорода, в результате которых образуются перекись водорода H_2O_2 , супероксид-анион O_2^- и гидроксильный радикал OH . Вследствие всех реакций образуются активные формы кислорода. При этом в биологических тканях начинаются реакции, приводящие к разрушению злокачественных клеток.

Такая передача между молекулами фотосенсибилизатора и кислородом, находящимся в основном триплетном состоянии, может состояться благодаря тому, что они находятся в одинаковых спиновых состояниях. Поэтому образуется синглетная форма кислорода, обладающая более высокой активностью, чем его триплетная форма, синглетный кислород способен окислять большинство компонентов клетки [2].

Фотохимические реакции второго типа доминируют над первым благодаря большому коэффициенту диффузии синглетного кислорода, а также более высоким константам скоростей реакций. Однако в некоторых случаях ключевую роль в фотоокислении клеток играют реакции первого типа. Таким образом, при проведении фотодинамической терапии образуются свободные

радикалы и активные формы кислорода, которые способны разрушать внутриклеточные соединения, приводя к гибели опухолевой клетки.

Биологические ткани состоят из органических соединений, в большинстве случаев характеризующихся основным синглетным состоянием. Однако молекулы кислорода находятся в триплетном состоянии, из которого они могут перейти в возбужденное синглетное. Вследствие чего молекулы фотосенсибилизатора после возбуждения не способны повредить структуру органических соединений, а вступают в реакции лишь с молекулами кислорода, растворенным в цитоплазме.

Разрушение происходит путем реализации таких механизмов действия, как некроз, апоптоз и аутофагия. В случае наличия дефектов клеточной мембраны первоначально включается механизм некроза, в случае целостности клеточной мембраны – апоптоз, аутофагия может быть спровоцирована при повреждении лизосом или эндоплазматического ретикула [3]. Процесс апоптоза характерен гибелью клеток, в результате которой клетка делится на апоптотические тельца, которые затем фагоцитируются, то есть уничтоженные злокачественные клетки поглощаются фагоцитами, "санитарами" организма, тем самым предотвращая развитие воспалительных реакций. В среднем реакция апоптоза продолжается в течение 1-3 часов [2,4]. Некроз подразумевает под собой дефект клеточной мембраны, который вызывает преждевременную гибель клеток путем аутолиза, то есть саморастворением мертвых клеток благодаря собственным ферментам, разрушающих структуру молекул.

Радиус клеточного уничтожения синглетным кислородом не превышает 0,01-0,02 мкм и продолжительность его жизни не более 0,04 мс [5, 6]. Такой маленький радиус обуславливает поражающее воздействие только вблизи молекул фотосенсибилизатора [7]. Также фотодинамическая терапия вызывает изменения в сосудистой системе пораженного участка, они в свою очередь вызывают остановку движения крови в микрососудах, которая называется гемостаз, и понижение содержания кислорода, по-другому гипоксию [8].

Поскольку возможность накопления фотосенсибилизаторов в опухолях гораздо выше чем в здоровых органах и тканях, метод фотодинамической терапии является методом избирательного характера. Причинами такого явления являются: высокая проницаемость сосудов опухоли [9], повышенное содержание макрофагов в опухоли, которые способны накапливать фотосенсибилизатор [10], длительное выведение фотосенсибилизаторов из опухолевой ткани в связи с плохо развитой лимфатической системой [11].

Также в данном методе активируются иммунные процессы, которые развиваются в ответ на фотооблучение: путем фагоцитоза апоптотических телец, образовавшихся в результате апоптоза, опухолевый антиген захватывается клетками, играющими важнейшую роль в функционировании иммунной системы, и в конечном итоге активируется иммунный ответ.

Этот подход применим лишь для заболеваний, которые протекают вблизи кожного покрова по причине того, что используемые красный и инфракрасный свет лежит в области длин волн 600-800 нм, что соответствует полосе поглощения фотосенсибилизатора. Происходит почти полное поглощение красного света и последующее возбуждение фотохимической реакции на глубине приблизительно до 3-8 мм. Глубина проникновения во многом зависит от длины волны используемого света: длинноволновый видимый свет проникает лучше, чем коротковолновый [12].

Синтез фотосенсибилизаторов, поглощающих в ближнем ИК-диапазоне, достаточно сложен и дорогой, также некоторым из них характерны невысокие квантовые выходы генерации синглетного кислорода, поэтому ведется активный поиск новых фотосенсибилизаторов. Используемые фотосенсибилизаторы должны обладать следующими свойствами:

1. Химическая стабильность. Фотосенсибилизатор должен быть однокомпонентным веществом для лучшего контроля вводимой дозы.
2. Хорошая водорастворимость. Данное свойство необходимо для введения вещества в организм человека.
3. Высокий коэффициент поглощения в диапазоне длин волн 650-850 нм.

4. Высокий квантовый выход активных форм кислорода и интенсивный максимум поглощения в красном и инфракрасном диапазонах спектра.

5. Низкая токсичность для снижения вероятности появления побочных эффектов и различных нежелательных реакций.

6. Быстрое выведение из организма человека.

На данном этапе развития медицины существуют более 60 лекарственных препаратов для применения в роли фотосенсибилизирующих веществ. Такие препараты разделяют на три поколения. Фотосенсибилизаторы первого поколения – гематопорфирины и его производные. Данные препараты имеют некоторые недостатки, такие как недостаточное проникновение света в пораженную часть из-за коротковолнового поглощения на длине волны 630 нм, длительный период полураспада и характерная особенность накапливаться в здоровых тканях, что влечет за собой светочувствительную токсичность [13]. Фотосенсибилизаторы, представляющие из себя сложные конъюгаты на основе хлоринового ряда, относятся ко второму поколению. Их характерные особенности: максимумы поглощения в диапазоне длин волн 650-800 нм, что дает возможность увеличить глубину проникновения в ткани; высокие коэффициенты эстинкции; более высокие квантовые выходы активных форм кислорода; адсорбация света в красной области света; избирательное накопление в раковых тканях; относительно быстрое выведение из организма. Также разрабатываются фотосенсибилизаторы третьего поколения, которые отличаются своей особенностью доставлять препарат непосредственно к определенному участку организма, например, с помощью антител опухолевых маркеров, а также активируются светом с большей длиной волны [14].

В данном исследовании были использованы фотосенсибилизаторы второго поколения на основе хлоринов.

1.2 Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда

Фотосенсибилизаторы хлоринового ряда получают химическим синтезом или путем модификации хлорофилла, полученного из растительного сырья.

Природные пигменты имеют максимумы поглощения в диапазоне длин волн 660-740 и 770-820 нм, а также высокие квантовые выходы активных форм кислорода[15].

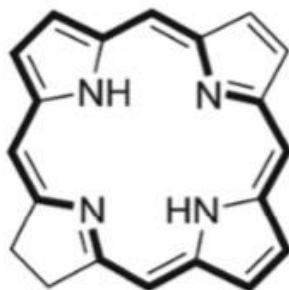


Рисунок 2 – Химическая структура хлорина

Одной из особенностей фотосенсибилизаторов хлоринового ряда является наличие максимумов в спектре поглощения, соответствующие длинам волн 405 и 660 нм.

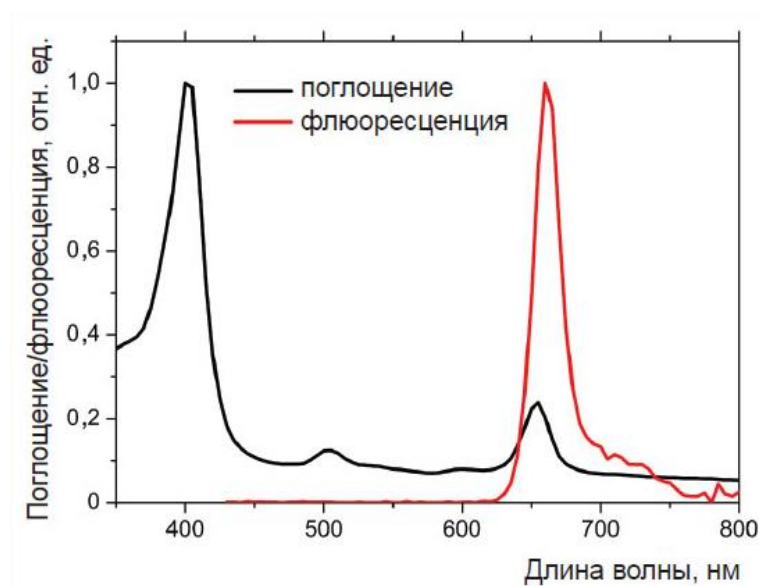


Рисунок 3 – Спектры поглощения и флюоресценции фотосенсибилизаторов хлоринового ряда

Одним из важных производных хлорофилла является хлорин e_6 [1]. Этот сенсибилизатор имеет три кислотных остатка, что обеспечивает хорошую растворимость в воде. На основе хлоринов созданы лекарственные препараты, одним из которых является используемый в данной работе Радахлорин.

Основным компонентом Радахлорина (РадаФарма) является хлорин е₆ (составляет 80-90%), с добавлением пурпурина 5 (составляет 0-15%), и хлорина р₆ (составляет 0-15%). Структурные формулы этих соединений представлены на рисунке 4.

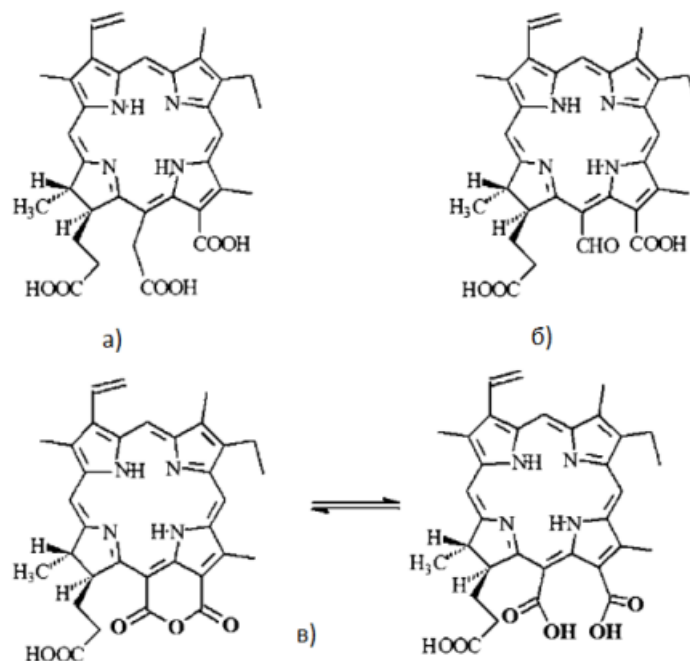


Рисунок 4 – Состав препарата Радахлорин: а – хлорин е₆, б – хлорин р₆, в – пурпурин 5 [16]

Радахлорин имеет несколько полос поглощения, наиболее важными из которых являются полосы с максимумами на длине волны 405 и 660 нм, положения которых могут незначительно изменяться в зависимости от типа растворителя, рН среды и концентрации фотосенсибилизатора [17, 18]. Наибольший коэффициент поглощения фотосенсибилизатора соответствует длине волны возбуждения 405 нм, но в терапевтических целях используется полоса поглощения с максимумом на длине волны 660 нм из-за наличия окна прозрачности тканей в этой области спектра.

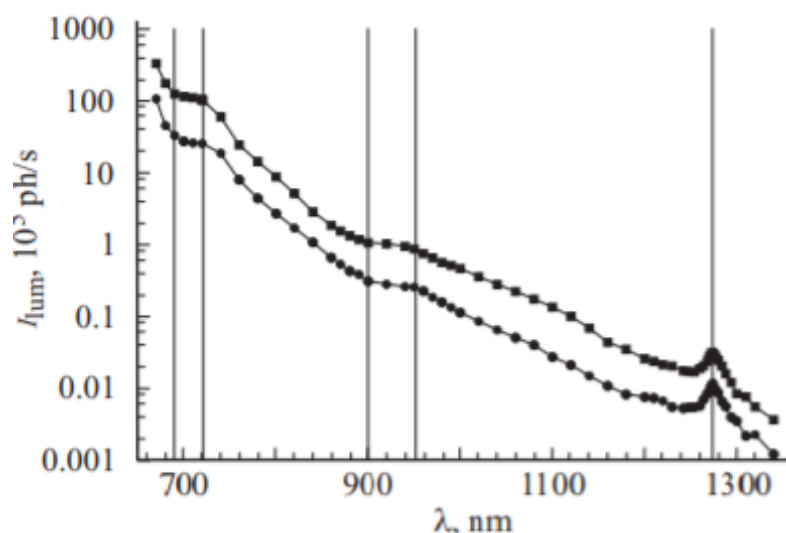


Рисунок 5 – Спектры люминесценции водного раствора ФС при возбуждении на длинах волн 405 нм (квадраты) и 660 нм (кружки) [19]

Вертикальные линии обозначают характерные особенности обоих спектров. Оба спектра имеют схожий характер, это свидетельствует о том, что происходящие процессы релаксации проходят единообразно.

Данный препарат имеет высокий квантовый выход синглетной формы кислорода (75 – 96 %, зависит от химических и физических свойств среды). Максимальное значение накопления препарата происходит через 0.5 часа и держится в течение 5 часов. Данное соединение имеет выраженную фотодинамическую активность, по результатам исследования наилучший результат в виде полного некроза опухоли был достигнут спустя 1 неделю после терапии и отторжение образовавшегося струпа через 1.5 месяца. При испытании на пирогенность на теле кролика и морских свинок было выявлено, что Радахлорин не вызывал местного раздражения и анафилактического шока при внутривенном введении препарата. Поэтому Радахлорин признан малотоксичным веществом [1].

1.3 Комбинированная фотодинамическая терапия

Поскольку применение метода фотодинамической терапии возможно лишь для заболеваний, протекающих вблизи кожного покрова, разрабатывают методы, повышающие селективность препарата. Большинство

фотосенсибилизаторов характеризуются низкой биодоступностью, недостаточной степенью проникновения в клетки.

В дальнейшем было предложено конъюгировать наночастицу к красителю, то есть использовать их в качестве носителей препаратов. Преимуществами такой системы доставки являются хорошая растворимость лекарств благодаря химическому конъюгированию в водной среде, возможность внутривенного введения, хорошее прохождение через щели стенок новообразованных сосудов опухоли, возможность изменения структуры наночастиц, что позволяет контролировать высвобождение препаратов, возможность применения не только в целях терапии, но и для визуализации, то есть проведение тероностики [20, 21].

В проводившемся в 2006 году исследовании наночастица-сцинтиллятор была конъюгирована к красителю, который используется в фотодинамической терапии [22]. Идея заключалась в том, чтобы спектр поглощения красителя перекрывался со спектром излучения наночастицы для дальнейшего преобразования энергии ионизирующего излучения в генерацию активной формы кислорода. В этом случае краситель генерирует активную форму кислорода так же как и в фотодинамической терапии, но при этом наночастица выступает сенсибилизатором для ионизирующего излучения [23]. В исследовательской работе [24] в роли наночастиц выступали CeF_3 и бензопорфирин (препарат VP), в роли ионизирующего излучения – гамма-лучи. Значения квантового выхода генерации $^1\text{O}_2$ были получены на уровне $0,79 \pm 0,05$, получившиеся значения говорят о высокой эффективности и перспективности данного метода.

1.4 Ферстеровский перенос энергии

Фёрстеровский перенос энергии является безызлучательный передачей энергии. Сущность процесса заключается в следующем: частица-донор осуществляет переход в возбужденное состояние, после чего без испускания

фотона передает энергию электронного возбуждения частице-акцептору, которая располагается на расстоянии десятков Å. В результате частица-донор оказывается в основном состоянии, а частица-акцептор – в возбужденном.

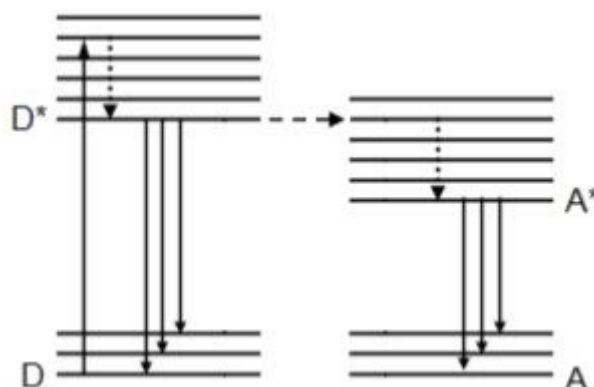


Рисунок 6 – Безызлучательная передача энергии от донора (D) к акцептору (A)

D, A – донор и акцептор в основном энергетическом состоянии, D^* , A^* - в первом возбуждённом. Каждый из этих электронных уровней сопровождается несколькими колебательными. Сплошная стрелка - процессы поглощения донором фотона возбуждающего света и флуоресценция донора и акцептора. Точки - колебательная релаксация возбуждённых частиц с характерными скоростями порядка пикосекунд. Пунктирная стрелка - процесс передачи энергии: переход системы из состояния D^*A в состояние DA^* . Передача энергии реализуется на тот колебательный уровень возбуждённого акцептора, энергия которого равна энергии возбуждённого донора. По этой причине мы говорим о резонансной передаче энергии [25].

Фёрстеровский перенос энергии – механизм переноса энергии от донора к акцептору, который является результатом диполь-дипольного взаимодействия. Данный перенос энергии происходит между основным уровнем маленьких квантовых точек (КТ), которые называются донорами, и возбужденным уровнем больших КТ, акцепторами, с последующей быстрой релаксацией энергии в нижние состояния [26].

При ферстеровском переносе энергии происходит увеличение интенсивности люминесценции и сужение полосы излучения больших КТ, также при этом подавляется излучение донорных точек [27].

Чтобы реализовать фёрстеровский перенос энергии необходимы следующие условия:

1. Спектр излучения флуоресценции донорной молекулы F_d должен перекрываться со спектром поглощения или возбуждения акцептора, который определяется коэффициентом экстинкции ϵ_A . Степень их перекрытия характеризуется спектральным интегралом перекрытия J :

$$J = \int F_d(\lambda)\epsilon_A(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (1)$$

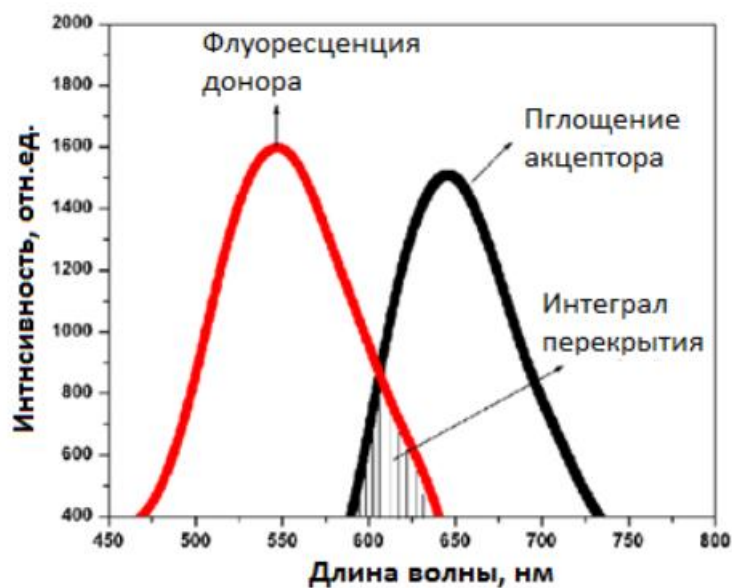


Рисунок 7 – Графическое представление спектрального перекрытия J между спектрами флуоресценции донора (красный) и спектрами поглощения акцептора (черный)

2. Донор и акцептор должны быть на расстоянии друг от друга приблизительно в диапазоне 1-10 нм.
3. Донор и акцептор должны иметь приблизительно параллельные друг другу переходные дипольные моменты. Поэтому ориентационный фактор, являющийся средним значением, проинтегрированным по всем

возможным углам для свободно вращающихся скрепленных акцептора и донора $k^2 = \frac{2}{3}$.

4. Для флуоресцентного резонансного переноса энергии время жизни флуоресценции донора должно быть большим.

Эффективность передачи энергии по Фёрстеру определяется выражением:

$$k = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (2)$$

R_0 – критический радиус Фёрстера, то есть расстояние, на котором эффективность передачи энергии возбуждения донора к акцептору составляет 50 %; r – расстояние, на которое молекула красителя подошла к молекуле наночастицы. Радиус Фёрстера зависит от ориентационного фактора (угловая ориентация диполя каждой молекулы) k^2 , квантовой эффективности люминесценции донора в отсутствие акцептора Q_D , показателя преломления n , спектрального интеграла перекрытия донорно-акцепторной пары J и рассчитывается по формуле:

$$R_0^6 = \frac{2,07}{128\pi^5 N_A} \frac{k^2 Q_D}{n^4} J \quad (3)$$

1.5 Наночастицы $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

Для эффективного проведения фотодинамической терапии используемые наноразмерными сцинтилляторы должны иметь высокий выход радиолюминесценции, должна быть эффективная передача энергии между наночастицами и молекулами красителя – фотосенсибилизатора, по-другому их спектр поглощения фотосенсибилизатора должен перекрываться со спектром излучения наночастиц, также конъюгаты наночастиц и фотосенсибилизатора должны быть стабильными в условиях организма, чтобы избежать излишнюю агрегацию синглетного кислорода.

Размер наночастиц влияет на их способность накапливаться в определенных органах, например, наночастицы размером около 200 нм накапливаются преимущественно в селезенке и печени [28], наночастицы размером от 100 до 200 нм – в почках, сердце, желудке и костном мозге [29], наночастицы размером менее 100 нм – в почечной системе, откуда потом и выводятся [30]. Поэтому наночастицы должны быть размером менее 50 нм для предотвращения быстрой фильтрации в селезенке, но также не слишком малым, чтобы избежать выведения из почек.

Поэтому наночастицы на основе редкоземельных элементов являются наиболее подходящими для проведения фотодинамической терапии, так как они соответствуют описанным выше свойствам.

Использование редкоземельных элементов позволяет наблюдать стоксову и антистоксову люминесценции, так как у трехвалентных ионов редкоземельных элементов оптические свойства определяются схемой энергетических уровней их 4f оболочки, а частично запрещенные 4f-4f переходы проявляются в виде серий узких линий. Метастабильные уровни ионов редкоземельных элементов имеют длительное время жизни, поэтому данные ионы могут иметь антистоксовые полосы излучения, которые обусловлены процессом передачи энергии, способствующим возбуждению на более высокие уровни энергии с минимальными потерями. Например, такое явление характерно для наночастиц фторидов редкоземельных элементов, они имеют достаточно яркое антистоксовое излучение [31]. Такие наночастицы имеют ряд преимуществ: хорошая проникающая способность, стабильность флуоресценции, отсутствие фотообесвечивания [32].

В данной работе были исследованы наночастицы состава $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$. Использование фторидных материалов дает возможность уменьшить вероятность безызлучательных потерь, так как такие материалы имеют узкий фоновый спектр.

Соединение YF_3 , легированное редкоземельными ионами, имеет большую величину запрещенной зоны порядка 10 эВ, поэтому для него

характерна эффективная эмиссия в видимом диапазоне спектра при облучении УФ диапазоном [33], из чего следует, что данный кристалл является хорошим люминофором.

Соединение CeF_3 является эффективным сцинтиллятором, излучающим видимый свет при облучении рентгеновскими или гамма-лучами. Также данное соединение как люминесцентный материал обладает достаточно большим стоксовым сдвигом порядка 1000 см^{-1} , что в совокупности с малым спектральным перекрытием предотвращают резонансный перенос энергии между ионами Ce^{3+} . Следовательно, вероятность концентрационного тушения уменьшается. Ион Ce^{3+} является хорошим радиосенсибилизирующим веществом на $5d \rightarrow 4f$ межконфигурационных переходах. Полосы поглощения и люминесценции находятся в области коротких волн из-за наличия энергетического зазора между основным уровнем - $4f$ и возбужденным - $5d$ размером около $35 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1}$, откуда вытекает высокая эффективность передачи энергии. Благодаря разрешенным $d-f$ - переходам ионы Ce^{3+} имеют большое поглощение в УФ области и относительно короткое время жизни люминесценции, поэтому являются хорошими сенсибилизаторами.

Ион Tb^{3+} является хорошим акцептором для иона Ce^{3+} . Внедрение ионов Tb^{3+} в кристаллическую решетку CeF_3 приводит к люминесценции, данный процесс происходит благодаря высокой эффективности передачи энергии от ионов Ce^{3+} к ионам Tb^{3+} .

Ионы Ce^{3+} и Tb^{3+} имеют спектры возбуждения в УФ и рентгеновской областях, являющимися наиболее подходящими для применения в фотодинамической терапии, поэтому их часто используют в роли люминесцентных легирующих ионов в сцинтилляторах. Со-активация ионами Ce^{3+} и Tb^{3+} под влиянием УФ излучения дает интенсивное излучение зеленого цвета. Это происходит в результате высокоэффективного переноса энергии от ионов Ce^{3+} к Tb^{3+} . Интенсивная люминесценция Tb^{3+} наблюдается за счет возникающей при возбуждении иона Ce^{3+} эффективной передачи энергии Ce^{3+} -

Tb³⁺ и как следствие возникающей перекрестной релаксацией. Схема переноса энергии представлена на рисунке 4 справа.

В одном из исследований [34] были изучены кристаллические наночастицы $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$. Были зарегистрированы спектры и кинетики затухания люминесценции образцов при возбуждении в области 266 нм, что соответствует межконфигурационным переходам 4f-5d как ионов Ce³⁺, так и ионов Tb³⁺.

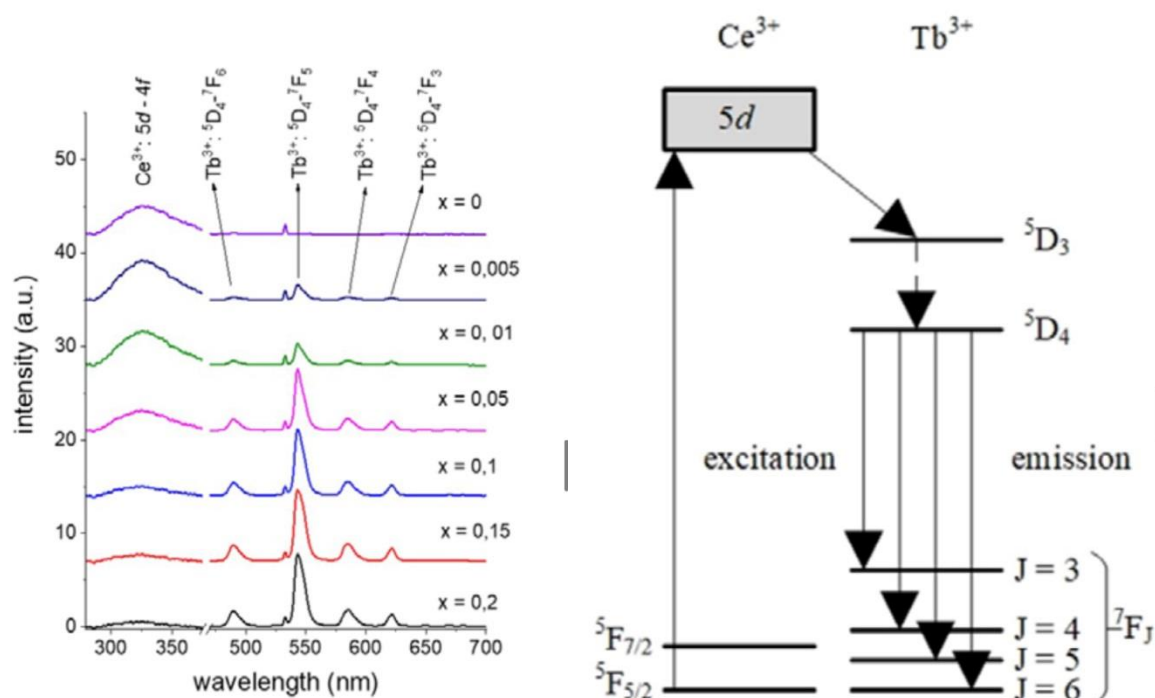


Рисунок 8 – Слева - спектры люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ ($x = 0, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1,0,15, 0,2$) при возбуждении 266 нм. Справа - схема энергетических уровней ионов Ce³⁺ и Tb³⁺

Широкая линия с максимумом около 325 нм соответствует 5d-4f переходам ионов Ce³⁺ в наночастицах CeF₃. При увеличении концентрации ионов Tb³⁺ кристаллическая структура наночастиц не изменяется, а интенсивность 5d-4f люминесценции ионов Ce³⁺ значительно уменьшается [35].

ГЛАВА 2. ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА И СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ

$\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

2.1 Экспериментальная техника

Для наблюдения люминесцентных характеристик образцов была составлена установка, изображенная на рисунке 9.

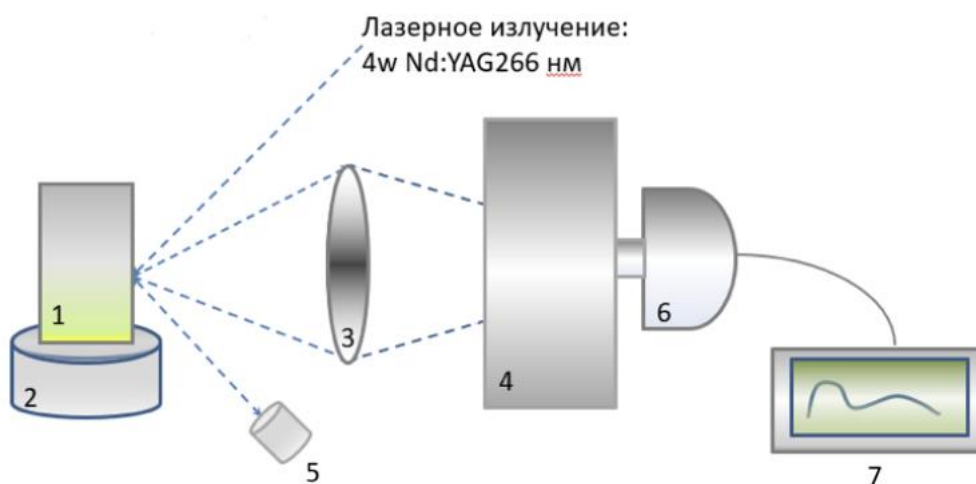


Рисунок 9 – Схема экспериментальной установки для регистрации спектров люминесценции: 1- кювета с образцом, 3- собирающая линза, 4- монохроматор, 5- фотодиод (синхронизация), 6- фотоэлектронный умножитель, 7- осциллограф

В качестве источника лазерного излучения был использован лазер 4-ой гармоника YAG: Nd Lotis Tii LS-2147A, который функционировал в режиме модуляции добротности (длительность импульсов составляла около 10 нс), с преобразованием частоты (длины волны) излучения в 3-ю (355 нм) и в 4-ую (266 нм) гармоники.

Регистрация спектров люминесценции осуществлялась при помощи установки, показанной на рисунке 10. Излучение лазера попадает на плоское зеркало, отражаясь от которого, проходит через сферическую собирающую линзу. Сфокусированный луч снова отражается от плоского зеркала, которое направляет излучение непосредственно на кювету с образцом. Излучение люминесценции фокусируется собирающей линзой на входную щель монохроматора (МДР-23, Ломо), размер которой был установлен 100 мкм.

Также был использован фотодиод, предназначенный для синхронизации. Регистрация кинетик люминесценции осуществлялась с помощью осциллографа (RTE1102, Rhode&Schwartz) и фотоэлектронного умножителя. Далее полученные кинетики были сохранены в текстовом файле, которые затем были обработаны с помощью программы Origin.

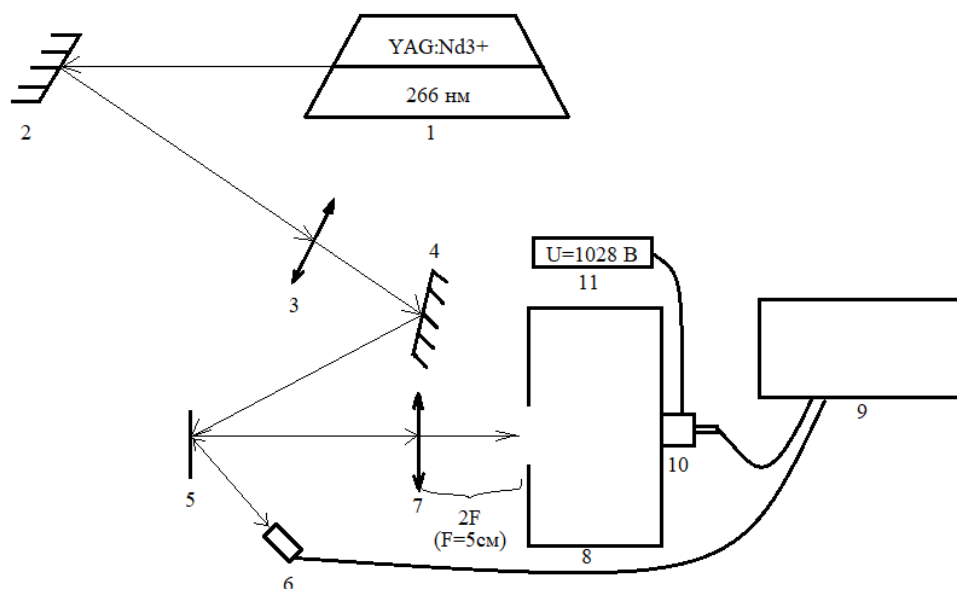
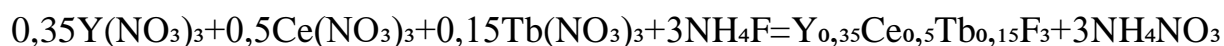


Рисунок 10 – Схема прохождения излучения. 1- источник возбуждения, 2,4- «глухие» зеркала с коэффициентом отражения $R=99,9\%$, 3,7- собирающие линзы, 5- кювета с образцом, 6- фотодиод, 8- монохроматор, 9- осциллограф, 10- фотоэлектронный умножитель, 11- блок питания фотоэлектронного умножителя.

2.2 Синтез наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

Наночастицы фторидов редкоземельных элементов были получены с помощью метода соосаждения по уравнению химической реакции:



Исходными веществами выступали $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, лимонная кислота, раствор аммиака. В качестве фторирующего агента применялся NH_4F .

Синтез наночастиц был проведен в среде цитрата аммония с $\text{pH}=4$. Для этого был приготовлен раствор лимонной кислоты с молярной концентрацией

0,3 моль/л, к которому приливали раствор гидроксида аммония до pH=4 (при перемешивании на магнитной мешалке). Затем навески нитратов иттрия, церия и тербия растворили в растворе цитрата аммония, после чего прикапывали трёхкратный избыток раствора фторида аммония. Далее раствор перемешивали на магнитной мешалке 30 минут, после этого поставили в микроволновую печь на 3 часа. Полученные наночастицы промывали дистиллированной водой при помощи метода центрифугирования 6 раз.

Следующим этапом было покрытие наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ поливинилпирролидоном. Был приготовлен раствор поливинилпирролидона с массовой долей 1 %. Затем раствор был поставлен на магнитную мешалку и к нему прикапывали коллоид наночастиц. Для осуществления покрытия коллоида наночастиц поливинилпирролидоном перемешивали в течение 4 часов.

Для удаления остатков непрореагировавшего поливинилпирролидона было проведено промывание центрифугированием 3 раза.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеризация наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

Образцы наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, полученные методом соосаждения, были исследованы методом рентгеноструктурного анализа при комнатной температуре с помощью дифрактометра Shimadzu XRD7000S. Дифрактограмма, изображенная на рисунке 11, представляет собой линии пространственной группы, характерный для кристаллической структуры CeF_3 .

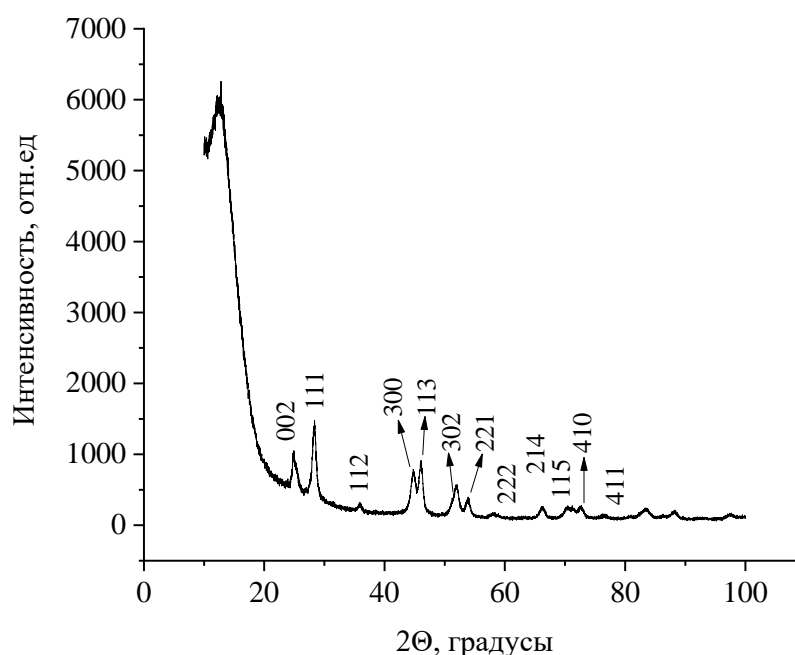


Рисунок 11 – Рентгеновская дифрактограмма наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

С помощью дифрактограммы можно определить параметры кристаллической решетки исследуемых образцов. Для этого необходимо вычислить межплоскостное расстояние по закону Брэгга для каждого положения пика. Далее рассчитываются параметры кристаллической ячейки, подставляя значения индексов Миллера для каждого пика, а также учитывая симметрию кристаллической решетки кристалла CeF_3 . В результате расчетов были получены следующие значения: $a = 7.02 \pm 0.15 \text{ \AA}$, $c = 7.20 \pm 0.14 \text{ \AA}$. Получившиеся величины соответствуют литературным данным ($a = 0.7163 \text{ нм}$, $c = 0.7336 \text{ нм}$) [21].

Также были исследованы морфология и размер наночастиц при помощи просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) Hitachi HT7700 Exalens. Полученные снимки представлены на рисунке 12.

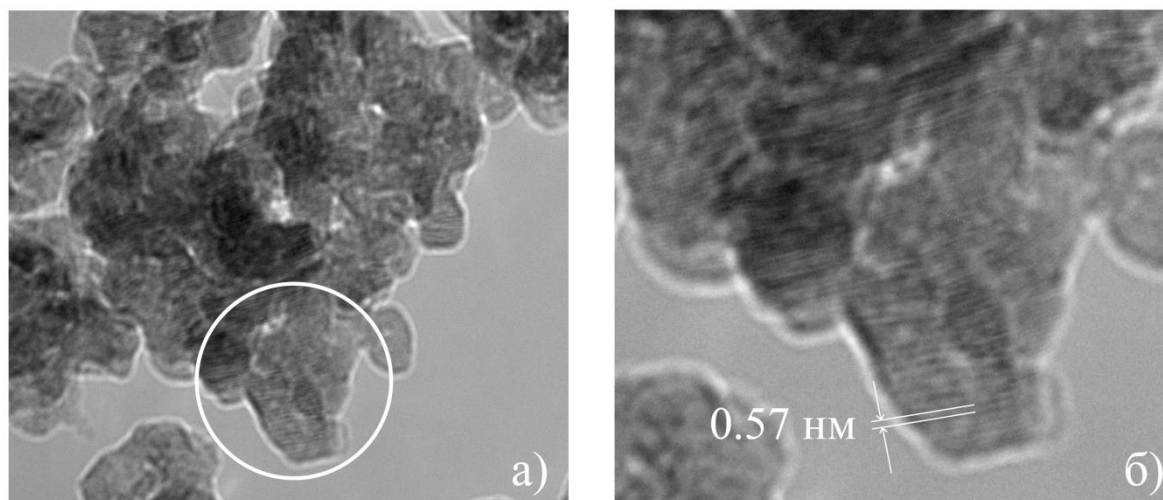


Рисунок 12 – ПЭМ изображения а) наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, б) увеличенное изображение выделенной области ПЭМ изображения

На изображении можно увидеть, что наночастицы эллиптической формы. Их размер достигает примерно 10 нм. Также на рисунке 10 б хорошо видны атомарные слои с расстоянием 0.57 нм.

3.2 Спектрально - кинетические характеристики наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

Были исследованы спектрально–кинетические характеристики синтезированных образцов $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, конъюгированные с Радахлорином посредством поливинилпирролидона.

При возбуждении на длине волны 266 нм получили спектры люминесценции $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, представленные на рисунке 13.

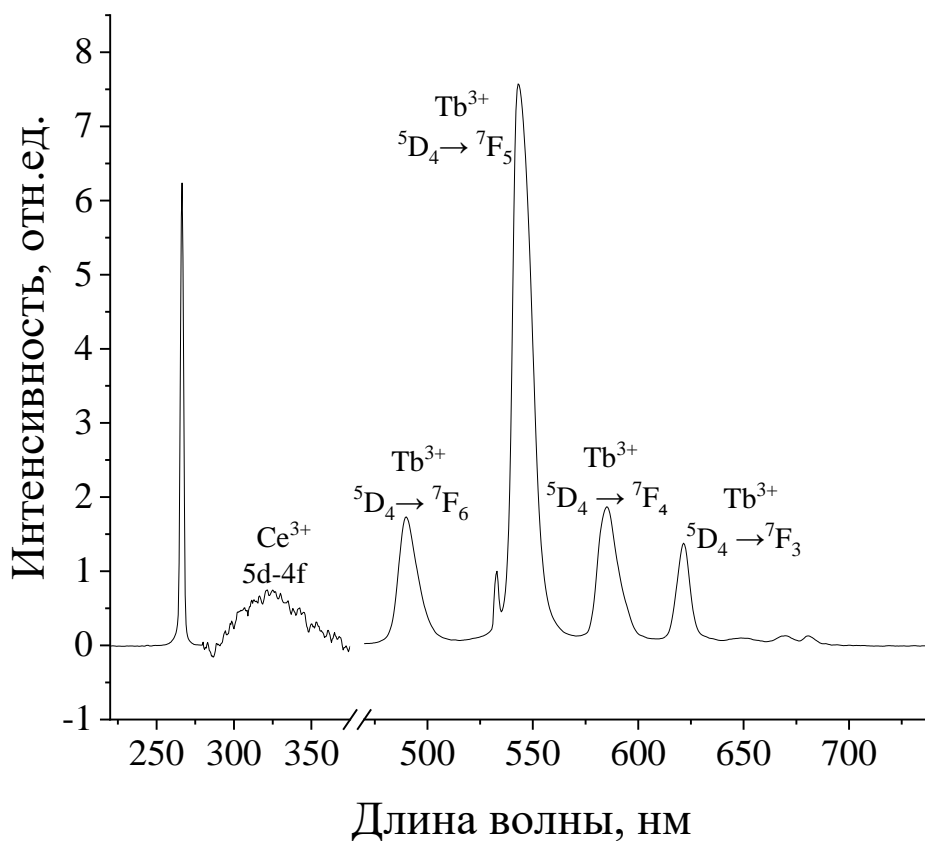


Рисунок 13 – Спектры люминесценции $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$

Линии на рисунке являются характерными для ионов тербия и церия. Видимая широкая полоса люминесценции в области длин волн от 280 до 400 нм обусловлена 5d-4f переходами.

В видимой области спектра наблюдаются линии излучения, обусловленные 4f-4f переходами ионов Tb^{3+} . Наблюдаемая линия излучения при 487 нм соответствуют ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_6$ переходу, при 540 нм соответствуют ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_5$, при 583 нм - ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_4$, при 619 нм - ${}^5\text{D}_4 \rightarrow {}^7\text{F}_3$.

Так как с практической точки зрения фотосенсибилизатором для терапевтического применения является комплекс наночастиц и молекул красителя. Исследование проводилось в два этапа: на первом - рассматривалась возможность конъюгации наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ и красителя Радахлорин без вспомогательных элементов, на втором - возможность конъюгации наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ и красителя Радахлорин посредством поливинилпирролидона.

На первом этапе в исследуемый коллоид наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ был добавлен Радахлорин, разбавленный водой в соотношении 6:50 (0,5 мл воды с 60 мкл Радохлорина) и детектировали кинетику затухания люминесценции ионов Tb^{3+} (рисунок 14). Полученные кинетики затухания люминесценции были обработаны с помощью программы Origin.

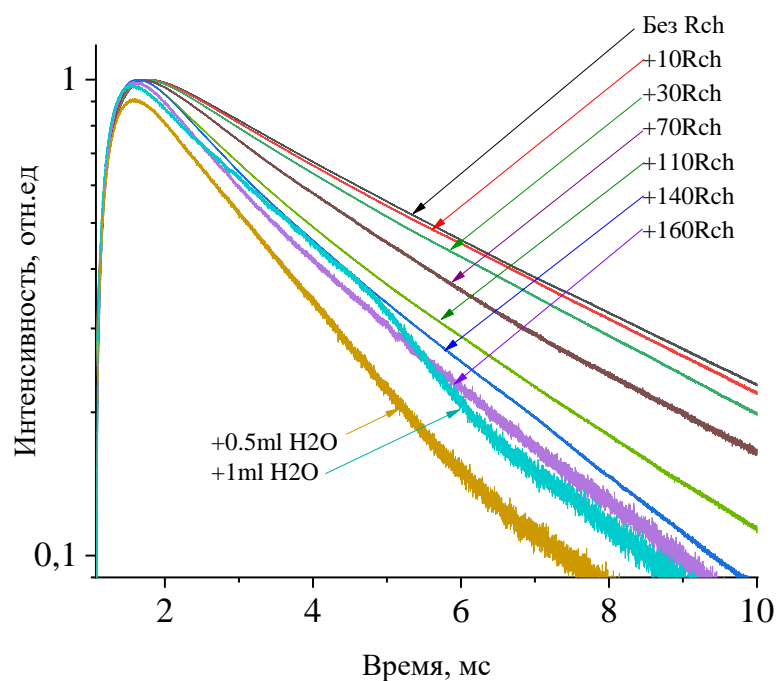


Рисунок 14 – Кинетики люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ для ионов тербия

Можно сделать вывод о том, что увеличение концентрации молекул Радахлорина в исследуемом коллоиде приводит к закорачиванию кинетик люминесценции, то есть мы наблюдаем уменьшение времени жизни люминесценции ионов Tb^{3+} . То есть можем предположить, что это является следствием эффективной безызлучательной передачи энергии от наночастиц к Радахлорину.

Затем были рассчитаны времена затухания люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, а также эффективность безызлучательной передачи энергии от ионов Tb^{3+} к Радахлорину.

Коэффициент передачи энергии k от ионов Tb^{3+} к Радахлорину был получен по формуле:

$$k = 1 - \frac{t^2}{t^1} \quad (4)$$

где t_1 – время затухания люминесценции наночастиц, а t_2 - время затухания люминесценции наночастиц с Радахлорином. Результаты расчета коэффициента передачи энергии энергии k от ионов Tb^{3+} к Радахлорину представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Время затухания люминесценции коллоида наночастиц $Ce_{0.5}Y_{0.35}Tb_{0.15}F_3$ и коэффициент передачи энергии k от наночастиц к Радахлорину

Количество Радахлорина в колбе, мкл	Время жизни, мс	Эффективность, %
0	4.8 ± 0.1	0
10	4.6 ± 0.1	2.9 ± 0.2
30	4.3 ± 0.1	10.7 ± 0.2
70	3.5 ± 0.1	27.6 ± 0.2
110	2.9 ± 0.1	39.8 ± 0.2
140	2.7 ± 0.1	43.1 ± 0.2
160	2.5 ± 0.1	48.5 ± 0.2
160 мкл Рх + 0.5 мл H ₂ O	2.1 ± 0.1	55.4 ± 0.2
160 мкл Рх + 1 мл H ₂ O	3.2 ± 0.1	33.5 ± 0.2

На втором этапе исследования были использованы наночастицы $Ce_{0.5}Y_{0.35}Tb_{0.15}F_3$, покрытые поливинилпирролидоном. Раствор поливинилпирролидона с массовой долей 1 % прикапывали в коллоид наночастиц, непрерывно перемешивая. Затем для удаления остатков непрореагировавшего поливинилпирролидона было проведено промывание центрифугированием 3 раза. В полученный коллоид наночастиц, покрытых поливинилпирролидоном, был добавлен Радахлорин той же концентрации, что и на первом этапе. Детектировали кинетику затухания люминесценции ионов Tb^{3+} (см. рисунок 15).

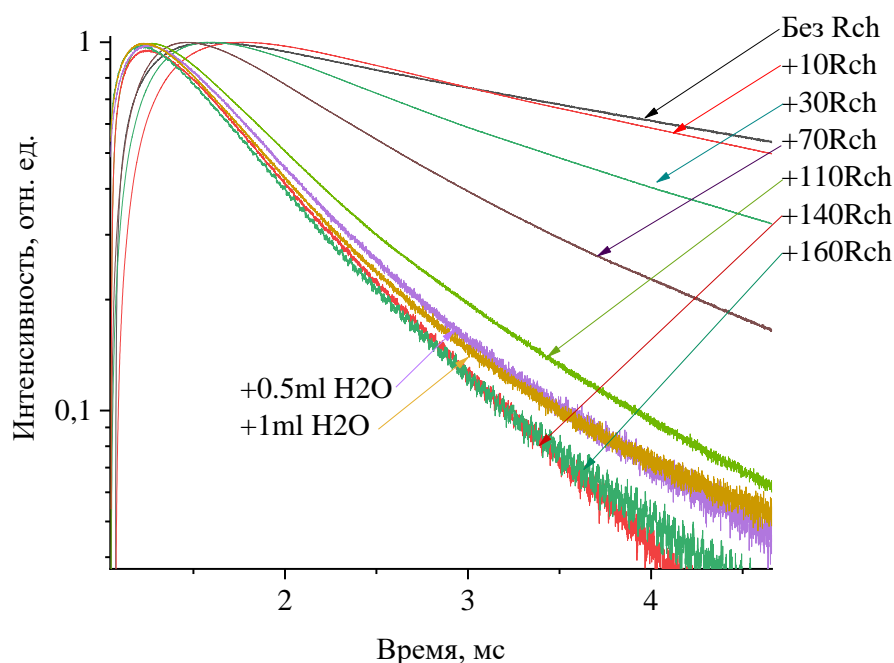


Рисунок 15 – Кинетики люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, покрытых поливинилпирролидоном для ионов тербия

В результате получили отклонение от одноэкспоненциального закона распада. Так же как и в первом эксперименте можем заметить уменьшение времени жизни люминесценции ионов Tb^{3+} и говорить о наличии эффективной безызлучательной передачи энергии от наночастиц к Радахлорину.

Коэффициенты передачи энергии k от ионов Tb^{3+} к Радахлорину представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Время затухания люминесценции коллоида наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, покрытых поливинилпирролидоном и коэффициент передачи энергии k от наночастиц к Радахлорину

Количество Радахлорина в колбе, мкл	Время жизни, мс	Эффективность, %
0	4.0 ± 0.1	0
10	3.5 ± 0.1	11.3 ± 0.2
30	2.1 ± 0.1	47.0 ± 0.2
70	1.3 ± 0.1	66.3 ± 0.2
110	0.9 ± 0.1	78.6 ± 0.2
140	0.7 ± 0.1	81.7 ± 0.2
160	0.7 ± 0.1	81.9 ± 0.2
160 мкл Рх + 0.5 мл H ₂ O	0.8 ± 0.1	80.9 ± 0.2
160 мкл Рх + 1 мл H ₂ O	0.7 ± 0.1	82.2 ± 0.2

При последовательном добавлении Радахлорина к исследуемому коллоиду наночастиц кинетики люминесценции закорачиваются, то есть мы наблюдаем уменьшение времени жизни люминесценции ионов Tb^{3+} . Это происходит вследствие эффективной безызлучательной передачи энергии от наночастиц к Радахлорину. Последующее разбавление исследуемого коллоида водой приводит лишь к незначительным изменениям времени жизни люминесценции, то есть можем говорить о том, что образовался стабильный комплекс.

Рассмотрим зависимость времени жизни люминесценции наночастиц $Ce_{0.5}Y_{0.35}Tb_{0.15}F_3$ от количества молекул Радахлорина в колбе (см. рисунок 16). Как было сказано выше, при увеличении концентрации молекул Радахлорина время жизни люминесценции ионов Tb^{3+} уменьшается, происходит эффективная безызлучательная передача энергии от наночастиц к Радахлорину.

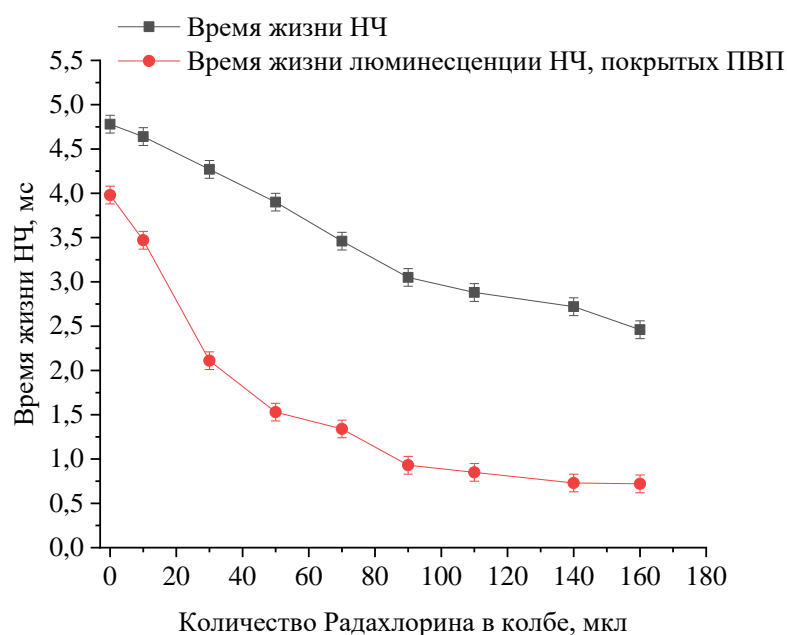


Рисунок 16 – График зависимостей времени жизни люминесценции наночастиц $Ce_{0.5}Y_{0.35}Tb_{0.15}F_3$ от количества молекул Радахлорина в колбе для образцов непокрытых и покрытых поливинилпирролидоном

Сравнивая кривые, построенные на основе результатов двух экспериментов, можем заметить, что при использовании образцов, покрытых поливинилпирролидоном, концентрационное тушение люминесценции

наночастиц начинается при меньших концентрациях красителя. Можем предположить, что вероятность столкновения наночастиц с молекулами Радахлорина повышается, и в результате происходит скрепление молекул, то есть образуется конъюгат.

3.3 Расчет критического расстояния

По полученному спектру поглощения красителя Радахлорин и люминесценции наночастиц, представленному на рисунке 17, можем вычислить критический радиус R_0 , используя выше указанную формулу 3.

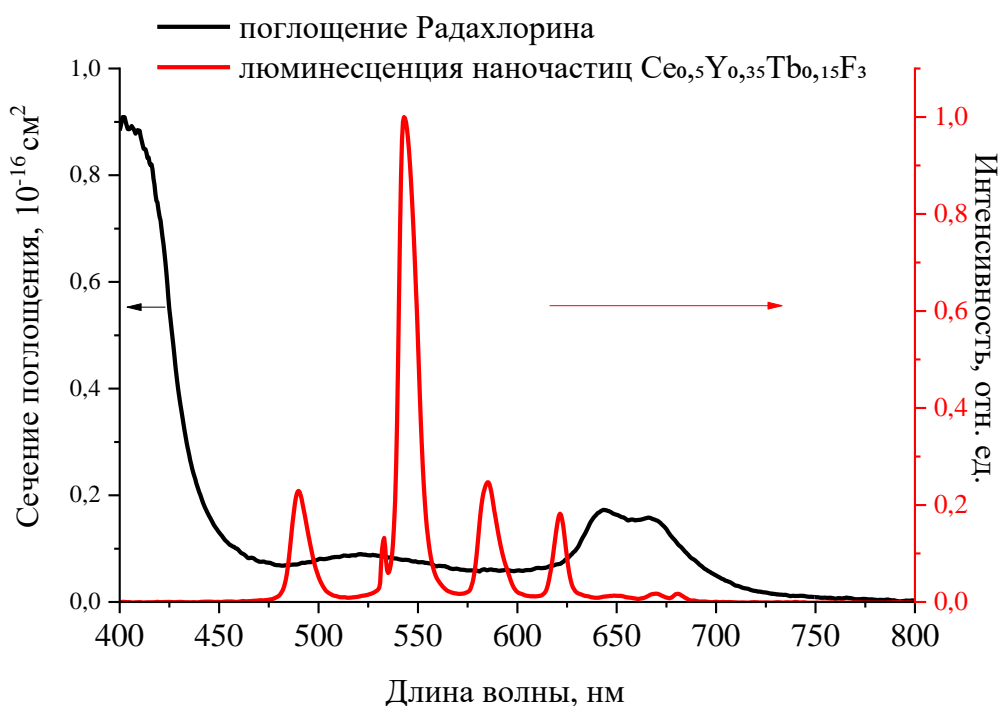


Рисунок 17 – Спектр поглощения Радахлорина и спектр люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0,5}\text{Y}_{0,35}\text{Tb}_{0,15}\text{F}_3$

Значение спектрального интеграла перекрытия J при интегрировании в диапазоне 435-740 нм составило $9,73 \cdot 10^7$. Критический радиус $R_0 = 4,5$ нм.

Подставляя полученные эффективности передачи энергии между исследуемыми наночастицами и молекулами красителя Радахлорин в формулу

2: $k = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$, вычисляем расстояния r между ними, наблюдаемые в эксперименте. Полученные значения представлены в таблицах 4, 5.

Таблица 4 – Расстояния между наночастицами $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ и молекулами Радахлорин

Количество Радахлорина, мкл	Расстояние r , нм
0	-
10	8.1 ± 1.2
30	6.4 ± 1.2
50	5.8 ± 1.2
70	5.9 ± 1.2
90	5.0 ± 1.2
110	4.8 ± 1.2
140	4.7 ± 1.2
160	4.6 ± 1.2
160 мкл Рх + 0.5 мл Н ₂ О	4.3 ± 1.2
160 мкл Рх + 1 мл Н ₂ О	5.0 ± 1.2

Таблица 5 – Расстояния между наночастицами $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, покрытыми поливинилпирролидоном и молекулами Радахлорин

Количество Радахлорина, мкл	Расстояние r , нм
0	-
10	6.3 ± 1.2
30	4.6 ± 1.2
50	4.2 ± 1.2
70	5.0 ± 1.2
90	3.7 ± 1.2
110	3.6 ± 1.2
140	3.5 ± 1.2
160	3.5 ± 1.2
160 мкл Рх + 0.5 мл Н ₂ О	3.5 ± 1.2
160 мкл Рх + 1 мл Н ₂ О	3.5 ± 1.2

Таким образом, по результатам вычислений можем сделать вывод о том, что с увеличением количества молекул Радахлорина в исследуемом коллоиде расстояние между наночастицами и молекулами красителя уменьшается. В случае наименьшей концентрации красителя в коллоиде расстояние между наночастицами и молекулами Радахлорина $r = 8.1$ нм, а для наночастиц,

покрытых поливинилпирролидоном, $r = 6.3$ нм. В случае наибольшей концентрации красителя расстояние между наночастицами и молекулами Радахлорина $r = 4.6$ нм, а для наночастиц, покрытых поливинилпирролидоном $r = 3.5$ нм. Далее при добавлении воды расстояние между наночастицами и молекулами красителя незначительно уменьшается, что говорит об остаточных процессах агломерации между этими молекулами. А при последующем добавлении воды это расстояние не изменяется, следовательно, сформировался устойчивый конъгат.

3.4 Оценка выживаемости клеток A549 в присутствии наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ и красителя Радахлорин

Для того чтобы оценить токсичность наночастиц были использованы клетки карциномы легкого человека (A549). Клетки были культивированы в 25 мкл питательной среды DMEM с добавлением 10%-ой инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки, 2 mM глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина в 5%-ой среде CO_2 при 37°C в инкубаторе. Для теста было использовано 350 тысяч клеток. К сыворотке клетки способны прикрепляться, что удобно для «промывки» емкости. Для получения клеточной суспензии клетки трипсинизировали, затем проводили инактивацию трипсина с помощью добавления полной питательной среды с сывороткой. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. До внесения в планшет клетки суспендируем: вносим клеточную суспензию в лунки. После чего планшет помещаем в CO_2 инкубатор. Предполагаемая цитотоксичность была оценена с помощью МТТ-теста. В каждую лунку планшета с клетками вносили МТТ-реагент. Основой МТТ-теста является реакция восстановления желтой соли тетразолия МТТ митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до пурпурных кристаллов формазана. Они нерастворимы в водной среде обитания клеток. Зная, что количество образовавшегося формазана пропорционально числу клеток с активным метаболизмом в лунках, определили выживаемость клеток. Результаты представлены в виде диаграмм (см. рисунки 18, 19, 20, 21).

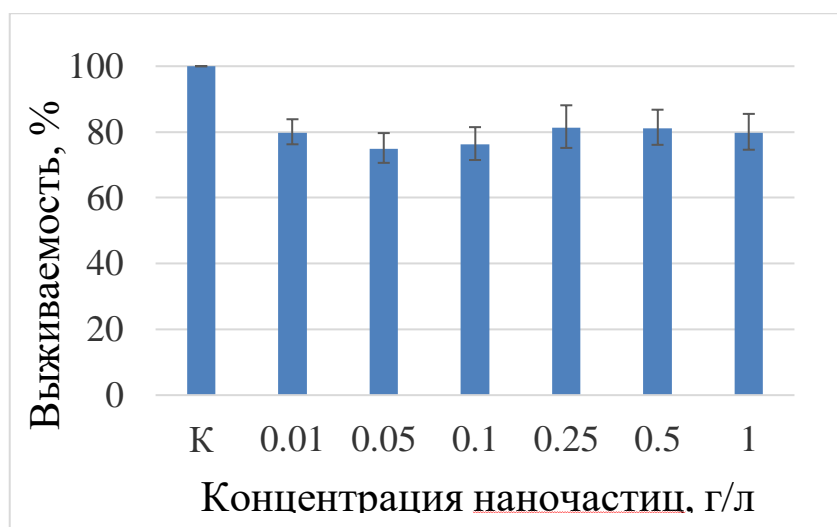


Рисунок 18 – Цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ на клетки A549

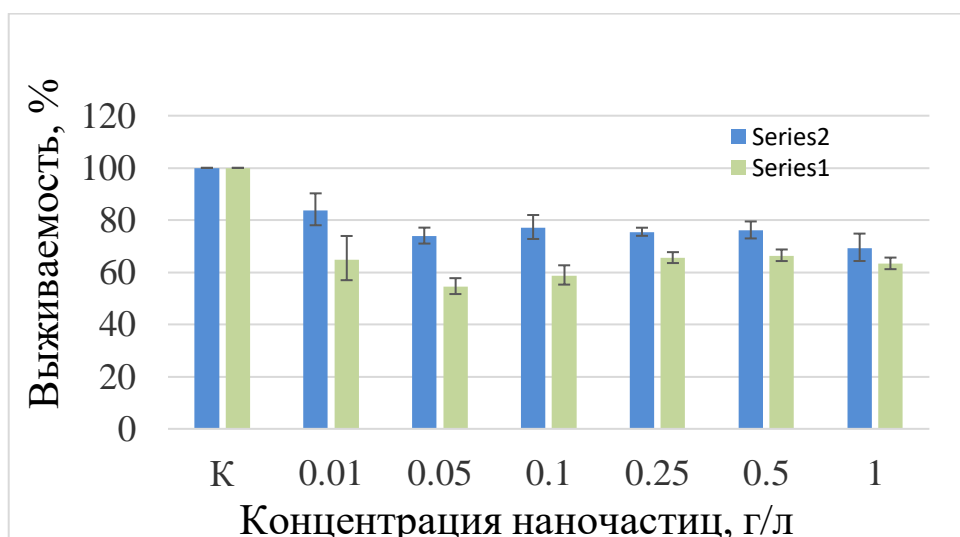


Рисунок 19 – Цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ с поливинилпирролидоном на клетки A549: ряд 1 – без добавления Радахлорина; ряд 2 – с добавлением Радахлорина

По рисунку 18 можно заметить, что при увеличении концентрации наночастиц выживаемость клеток A549 уменьшается. При этом выживаемость клеток в случае наночастиц, покрытых поливинилпирролидоном, не опускается ниже 50%. Для области с большой концентрацией характерно увеличение выживаемости, которая может наблюдаться при образовании крупных агломератов, выпадающих в виде осадка, либо не взаимодействующих с клетками.

Выявили, что при последовательным увеличении числа молекул Радахлорина в коллоиде выживаемость клеток A549 идет на спад (см. рисунок 19). Это вызвано характерным действием Радахлорина - генерировать активную форму кислорода, что ведет за собой уменьшение выживаемости клеток, а также непосредственно воздействием облучения лазером.

Также исследовалась фотоиндуцированная цитотоксичность. Клетки с наночастицами облучали с помощью лазера на длине волны 266 нм (см. рисунки 20, 21), а также с помощью лазерного аппарата «Латус», предназначенного для проведения фотодинамической терапии (см. рисунки 22, 23).

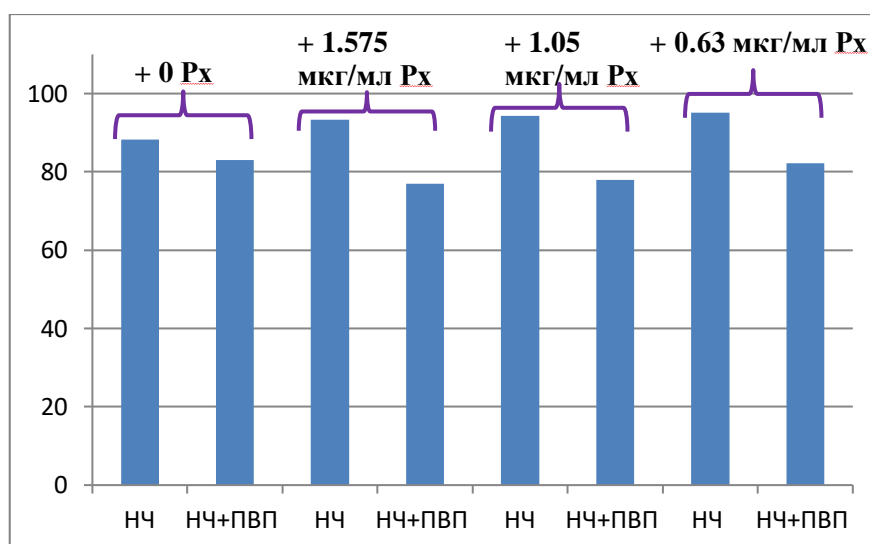


Рисунок 20 – Цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ концентрации 0.1 мг/мл, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, на клетки A549

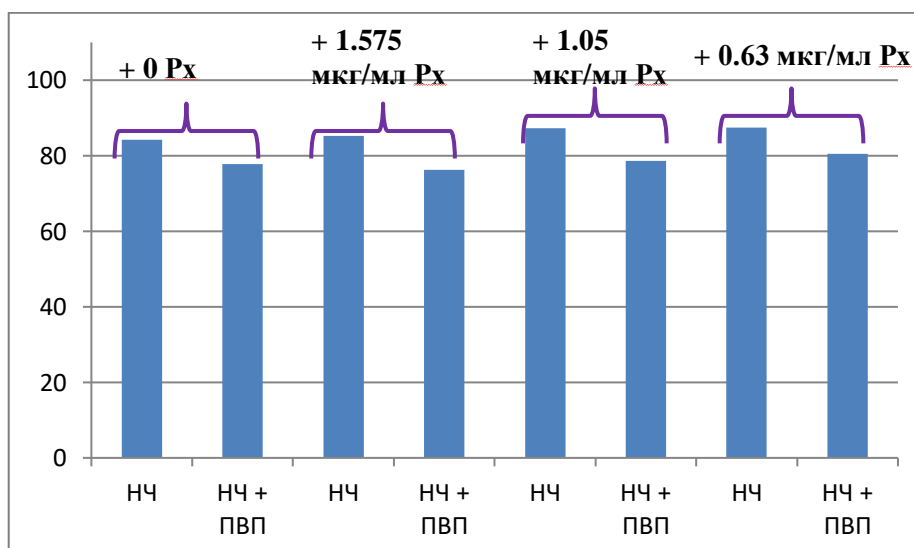


Рисунок 21 – Цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ концентрации 0.5 мг/мл, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, на клетки A549

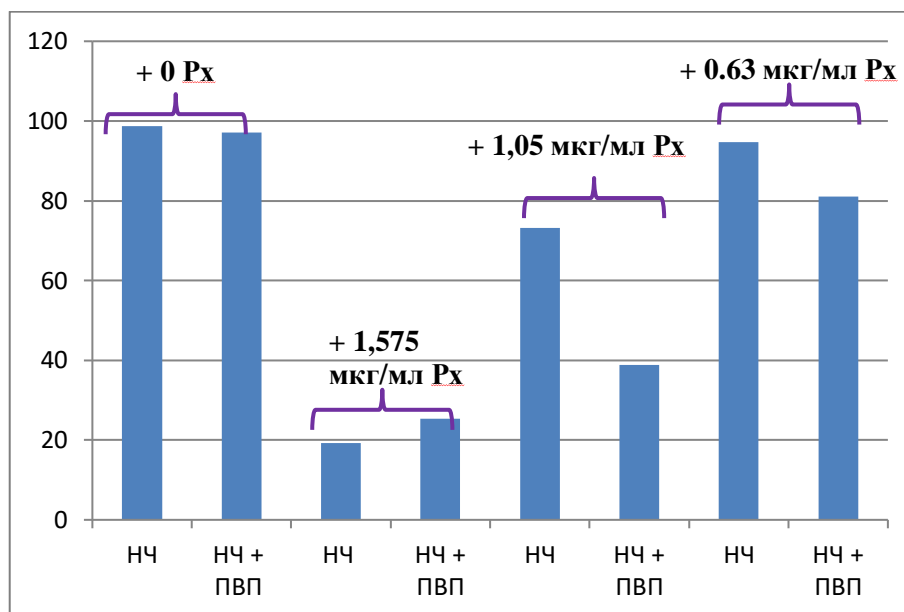


Рисунок 22 – Фотоиндуцированная цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ концентрации 0.1 мг/мл, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, на клетки A549

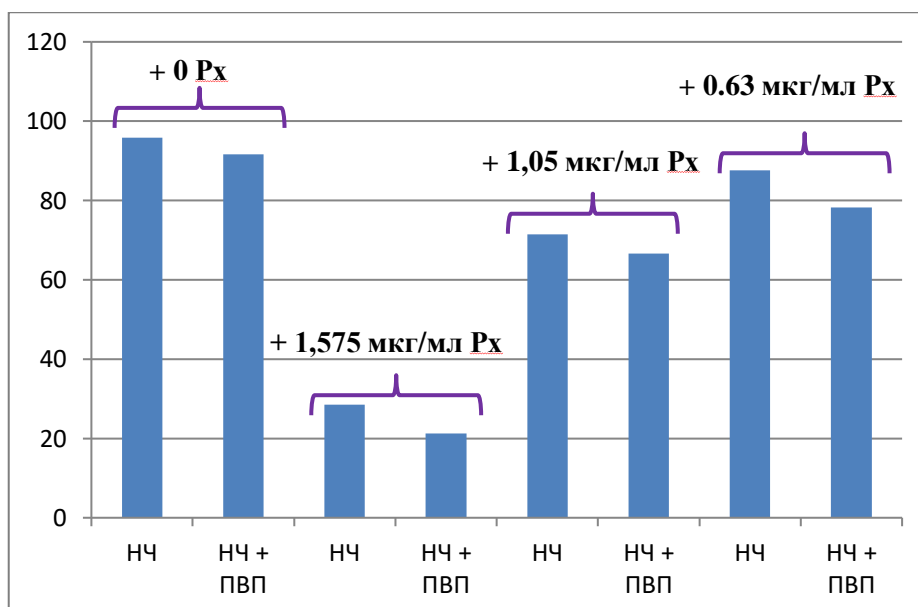


Рисунок 23 – Фотоиндуцированная цитотоксичность наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ концентрации 0.5 мг/мл, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, на клетки A549

Выживаемость клеток A549 с наночастицами $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, ниже чем в случае отсутствия вспомогательных элементов. Предположительно, молекула красителя с наночастицей в присутствии поливинилпирролидона связывается гораздо лучше. Так как безызлучательная передача энергии наиболее эффективна при конъюгации красителя с наночастицей, то это и способствует уменьшению выживаемости опухолевых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был произведен синтез наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$ методом соосаждения. С помощью рентгеновской дифракции и просвечивающей электронной микроскопии были установлены состав, морфология и размер синтезированных образцов. Было выявлено, что все образцы имели кристаллическую структуру CeF_3 , а размеры наночастиц в среднем достигают 10 нм.

В ходе работы исследованы кинетики затухания люминесценции наночастиц $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, конъюгированных с препаратом Радахлорин посредством поливинилпирролидона а также без вспомогательных элементов. Показана эффективная безызлучательная передача энергии от ионов тербия к красителю Радахлорин. Максимальный коэффициент передачи энергии для наночастиц, конъюгированных с Радахлорином посредством поливинилпирролидона, составил примерно 82 %, а без него - около 55 %.

По спектроскопическим данным был вычислен критический радиус $R_0=4,5$ нм. Также выявили, что с увеличением количества молекул Радахлорина в исследуемом коллоиде расстояние между наночастицами и молекулами красителя уменьшается, а при последовательном добавлении воды это расстояние не изменяется, то есть можем сказать, что образовался устойчивый коньгат.

Была оценена токсичность наночастиц с помощью МТТ-теста, в ходе которого выявилось, что при последовательным увеличении числа молекул Радахлорина в коллоиде выживаемость клеток А549 идет на спад. Выживаемость клеток А549 с наночастицами $\text{Ce}_{0.5}\text{Y}_{0.35}\text{Tb}_{0.15}\text{F}_3$, конъюгированных к Радахлорину с помощью поливинилпирролидона, ниже чем в случае отсутствия вспомогательных элементов. Предположительно, молекула красителя с наночастицей в присутствии поливинилпирролидона связывается гораздо лучше. Так как безызлучательная передача энергии

наиболее эффективна при конъюгации красителя с наночастицей, то это и способствует уменьшению выживаемости опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Photodynamic therapy is a way to improve the selectivity and efficiency of the tumor treatment / E.V. Sanarova, A.V. Lantsova, M.V. Dmitrieva [et al.] // *Russian Biotherapeutic Journal*. – 2014. – Vol. 13, Iss. 3. – P. 109–118.
2. Dougherty T.J. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors / T.J. Dougherty // *Critical Reviews in Oncology and Hematology*. – 1984. – Vol. 2, Iss. 2. – P. 83–116.
3. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments / M.J. Garland, C.M. Cassidy, D. Woolfson [et al.] // *Future Medicinal Chemistry*. – 2009. – Vol. 1, Iss. 4. – P. 667–691.
4. Апоптоз и его роль в нарушении функций нейронов / И.В. Рева, Т.Т. Ямамото, И.А. Одинцова [и др.] // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 6. – [С. 1–24].
5. Krasnovskii A.A. Photodynamic activity and singlet oxygen / A.A. Krasnovskii // *Biofizika*. – 2004. – Vol. 49, Iss. 2. – P. 305–321.
6. Krasnovsky A.A. Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases / A.A. Krasnovskii // *Photodynamic therapy at the cellular level*. – A.B.U., Kerala: Research Signpost, 2007. – P. 17–62.
7. Владимиров Ю.А. Физико-химические основы фотобиологических процессов / Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко. – М.: Дрофа, 2006. – 288 с.
8. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy / B. Krammer // *Anticancer Research*. – 2001. – Vol. 21, Iss. 6 B. – P. 4271–4277.
9. Dvorak H.F. Leaky tumor vessels: consequences for tumor stroma generation and for solid tumor therapy / H.F. Dvorak // *Progress in clinical and biological research*. – 1990. – Vol. 354 A. – P. 317–330.
10. Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages / M. Korbelik, G. Krosl, P.L. Olive [et al.] // *British Journal of Cancer*. – 1991. – Vol. 64, Iss. 3. – P. 508–512.

11. Tumour selectivity of photodynamic therapy / J. Moan, B. Cunderlikova, A. Juzeniene [et al.] // Targeted Cancer Therapies – An Odyssey / ed. O.S. Bruland [et al.]. – Tromsø, 2003. – P. 208–213.
12. Moan J. An outline of the hundred-year history of PDT/ J. Moan, Q. Peng // Anticancer Research. – 2003. – Vol. 23, Iss. 5A. – P. 3591–3600.
13. Allison R.R. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review / R.R. Allison, C.H. Sibata // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2010. – Vol. 7, Iss. 2. – P. 61–75.
14. Bullous A.J. Photosensitizer-antibody conjugates for photodynamic therapy / A.J. Bullous, C.M. Alonso, R.W. Boyle // Photochemical and Photobiological Sciences. – 2011. – Vol. 10, Iss. 5. – P. 721–750.
15. MacDonald I.J. Basic principles of photodynamic therapy / I.J. MacDonald, T.J. Dougherty // Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2001. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 105–129.
16. Radachlorin as a photosensitizer / M.A. Neginskaya [et al.] // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE. – Saratov, 2014. – Vol. 9448. – Art. 94480O.
17. Photostability of different chlorine photosensitizers / J. Ferreira, P.F. Menezes, C. Kurachi [et al.] // Laser Physics Letters. – 2008. – Vol. 5, Iss. 2. – P. 156–161.
18. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer radachlorin in different media / F. Vargas, Y. D'iaz, V. Yartsev [et al.] // Ciencia. – 2004. – Vol. 12, Iss. 1. – P. 70–77.
19. Visible to near IR luminescence spectrum of Radachlorin under excitation at 405 nm / V.P. Belik, I.M. Gadzhiev, M.V. Petrenko [et al.] // Chemical Physics Letters. – 2016. – Vol. 665. – P. 127–130.
20. Sun C. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery / C. Sun, J.S. Lee, M. Zhang // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. – Vol. 60, Iss. 11. – P. 1252–1265.
21. Renal clearance of quantum dots / H. Soo Choi, W. Liu, P. Misra [et al.] // Nature Biotechnology. – 2007. – Vol. 25, Iss. 10. – P. 1165–1170.

22. Cooper D.R. Radioluminescence studies of colloidal oleate-capped β -Na(Gd,Lu)F₄:Ln³⁺ nanoparticles (Ln = Ce, Eu, Tb) / D.R. Cooper, J.A. Capobianco, J. Seuntjens // *Nanoscale*. – 2018. – Vol. 10, Iss. 16. – P. 7821–7832.
23. X-ray induced singlet oxygen generation by nanoparticle-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy: determination of singlet oxygen quantum yield / S. Clement, W. Deng, E. Camilleri [et al.] // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – Art. 19954.
24. Щукина А.Л. Флуктуирующая флуоресценция одиночных молекулярных комплексов: дис. ... канд. физ.-мат. наук: 01.04.05 / А.Л. Щукина; Ин-т спектроскопии РАН. – М., 2012. – 149 с.
25. Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz / T. Förster // *Annalen der Physik*. – 1948. – Vol. 437, Iss. 1-2. – P. 55–75.
26. Forster energy transfer in arrays of epitaxial cdse/zns quantum dots involving bright and dark excitons / T.N. Mikhailov, E.A. Evropeitsev, K.G. Belyaev [et al.] // *Physics of the Solid State*. – 2018. – Vol. 60, Iss. 8. – P. 1590–1594.
27. Color tunable YF₃: Ce³⁺/Ln³⁺(Ln³⁺: Eu³⁺, Tb³⁺, Dy³⁺, Sm³⁺) luminescent system: role of sensitizer and energy transfer study / F.N. Sayed, V. Grover, S.V. Godbole [et al.] // *RSC Advances*. – 2012. – Vol. 2, Iss. 3. – P. 1161–1167.
28. Mechanism for energy transfer processes between Ce³⁺ and Tb³⁺ in LaPO₄: Ce, Tb nanocrystals by time-resolved luminescence spectroscopy / V. Pankratov, A.I. Popov, S.A. Chernov [et al.] // *Physica status solidi (b)*. – 2010. – Vol. 247, Iss. 9. – P. 2252–2257.
29. A facile synthesis and photoluminescent properties of redispersible CeF₃, CeF₃: Tb³⁺, and CeF₃: Tb³⁺/LaF₃ (core/shell) nanoparticles / Z.L. Wang, Z.W. Quan, P.Y. Jia [et al.] // *Chemistry of Materials*. – 2006. – Vol. 18, Iss. 8. – P. 2030–2037.
30. Advances in highly doped upconversion nanoparticles / S. Wen, J. Zhou, K. Zheng [et al.] // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9, Iss. 1. – Art. 2415.

31. Multifunctional hydroxyapatite/Na (Y/Gd) F4: Yb³⁺, Er³⁺ composite fibers for drug delivery and dual modal imaging / M. Liu, H. Liu, S. Sun [et al.] // *Langmuir*. – 2014. – Vol. 30, Iss. 4. – P. 1176–1182.
32. Cantor C.R. Biophysical chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function / C.R. Cantor, P.R. Schimmel. – Macmillan, 1980. – 503 p.
33. Chen W. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment / W. Chen, J. Zhang // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2006. – Vol. 6, Iss. 4. – P. 1159–1166.
34. Спектрально-кинетические свойства и передача энергии в наночастицах твердого раствора Y_{0.5-x}Ce_{0.5}Tb_xF₃ / А.С. Низамутдинов, Э.И. Мадиров, Е.В. Лукинова [и др.] // *Журнал прикладной спектроскопии*. – 2020. – Т. 87, № 3. – С. 454–461.