

Vilniaus universiteto
Fizikos fakulteto
Cheminės fizikos institutas

Rugilė Lukaševičiūtė
BORO NITRIDO NANODALELIŲ IR DOKSORUBICINO KOMPLEKSŲ
SPEKTROSKOPINIAI TYRIMAI

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Gyvybės ir cheminės fizikos
studijų programa

Studentas	Rugilė Lukaševičiūtė
Leista ginti	2022-05-26
Darbo vadovas	dr. Renata Karpič
Konsultantas	prof., habil. dr. Vidmantas Gulbinas
Instituto direktorius	prof., dr. Valdas Šablinskas

Vilnius 2022

Turinys

1. Įvadas.....	3
2. Literatūros apžvalga	5
2.1 Heksagoninis boro nitridas.....	5
2.2 Doksorubicinas.....	6
2.3 Šviesos sugertis ir fluorescencija	7
3. Tyrimo metodika	9
3.1 Boro nitrido kvantinių taškų sintezė.....	9
3.2 Bandinių paruošimas	9
3.3 Spektroskopiniai tyrimų metodai	10
3.3.1 Sugerties spektrų matavimas	10
3.3.2 Fluorescencijos spektrų matavimas	10
3.3.3 IR sugerties spektrų matavimas	10
3.3.4 Fluorescencijos relaksacijos trukmių matavimas	11
4. Rezultatai	12
4.1 Boro nitrido nanodalelių charakterizavimas	12
4.2 Boro nitrido ir doksorubicino kompleksų spektroskopinės savybės	14
4.3 Boro nitrido ir doksorubicino kompleksų susidarymo dinamika ir stabilumas	17
4. Išvados	23
Literatūros sąrašas.....	24
Santrauka.....	26
Summary	28

1. Įvadas

Vėžys yra viena iš sunkiausių ligų visame pasaulyje. Pagal statistiką 2020 metais nuo vėžio mirė beveik 10 milijonų žmonių [1]. Pagrindinis vėžio gydymo būdas yra chemoterapija, tačiau pacientai, vartojantys chemoterapinius preparatus, dažnai kenčia nuo daugybės sekinančių šalutinių efektų. Pagrindinis chemoterapinių vaistų tikslas yra sustabdyti piktybinių ląstelių dauginimąsi. Dauguma vaistų veikia vėžinių ląstelių dauginimąsi pažeisdami ląstelės genetinę medžiagą (DNR arba RNR) [2]. Chemoterapijos metu yra sukeliama tokie genetinės medžiagos pokyčiai, kurie neleidžia ląstelėms toliau daugintis arba jas sunaikina.

Chinonų klasės vaistai tokie kaip doksorubicinas (DOX) ir kt. yra plačiai naudojami vėžio gydyme, bet nepaisant didelio DOX efektyvumo prieš vėžines ląsteles, jo kaupimas organizme gali turėti neigiamų šalutinių poveikių, tokių kaip kardiomiopatija ir širdies nepakankamumas. Šiuo metu vis didėja susidomėjimas mažų dimensijų medžiagomis, kurios gali būti naudojamos kaip vaistų nešėjai priešvėžinėje terapijoje norint pagerinti vaistų pernešimo efektyvumą ir sumažinti nepageidaujamus šalutinius poveikius [2]. Viena iš tokių medžiagų, heksagoninis boro nitridas (h-BN) yra potencialus kandidatas vaistų pernešimui vėžio gydyme [3]. BN pasižymi unikaliomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, kurios užtikrina didelį vaistų pernešimo pajėgumą [4]. BN ir DOX kompleksų susidarymas gali sumažinti citotoksinį DOX poveikį jam cirkuliuojant kraujyje, o kompleksui pakliuvus į vėžinę ląstelę, fizikiniai ar cheminiai efektai (temperatūra, pH, fototerminiai ar fotoakustiniai efektai) paskatinti DOX paleidimą iš komplekso taip atstatant jo toksiškumą ir sukeldami vėžinės ląstelės žūtį [5].

Sėkmingam 2D medžiagų pritaikymui biomedicinoje reikia išspręsti dvi svarbias problemas: jų tirpumą vandenyje ir medžiagų biologinį suderinamumą. Abu aspektai gali būti pasiekti BN modifikuojant atitinkamomis funkcinėmis grupėmis. h-BN yra chemiškai inertiškas ir stabilus, o tai limituoja jo galimą konjugaciją su kitais junginiais ir sudaro kliūtį universaliam pritaikymui. Biologiškai suderinamų, tirpių vandenyje, stabilių fiziologinėje aplinkoje ir galinčių pernešti priešvėžinius vaistus į taikinį nanomedžiagų pritaikymas vis dar yra didelis iššūkis mokslininkams.

Šio tyrimo tikslas yra paruošti stabilus boro nitrido nanokompozitus su priešvėžiniu doksorubicinu ir ištirti šių kompleksų savybes spektroskopiniais metodais.

Darbo uždaviniai:

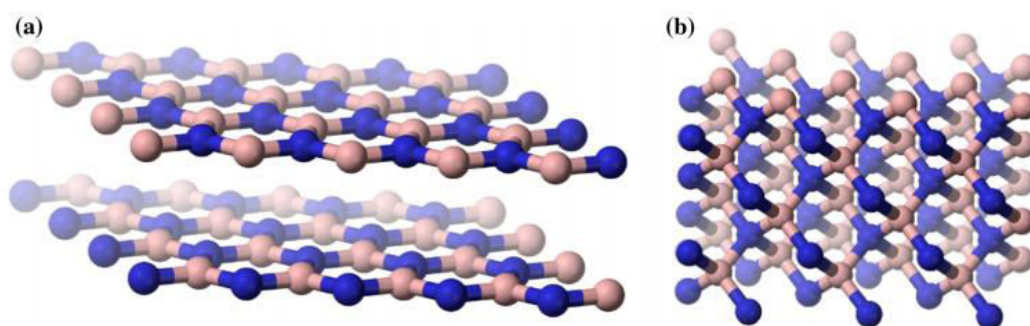
1. Susintetinti BN nanoklasterius ir juos charakterizuoti.
2. Paruošti stabilus BN kompozitus su doksorubicinu.

3. Ištirti BN-DOX kompleksų optines savybes, jų susidarymo dinamiką ir stabilumą.

2. Literatūros apžvalga

2.1 Boro nitridas

Šiomis dienomis boro nitrido (BN) nanomedžiagos yra vienos iš perspektyviausių ir populiariausių neorganinių medžiagų. Struktūriškai jos panašios į anglies sistemas. BN egzistuoja keliomis formomis, plačiausiai paplitusia heksagonine (h-BN) forma, kieta kubine (c-BN) forma ir amorfiniu BN. Heksagoninis boro nitridas ir kubinis boro nitridas yra žinomi kaip reprezentatyvios BN kristalų struktūros, kaip parodyta 2.1 pav. c-BN, kuris yra sunkiausia BN forma su dideliu tankiu, turi panašią kristalinę gardelę į deimantą, ir tai yra antra kiečiausia medžiaga, žinoma iki šiol [6].



2.1 pav. Kristalinės struktūros h-BN (a) ir c-BN (b) [6].

Heksagoninis boro nitridas, dar vadinamas "baltuoju grafitu", yra laikomas stabiliausiu tarp BN polimorfų. Jį sudaro besikeičiantys boro (B) ir azoto (N) atomai, kovalentiškai surišti korio struktūroje, kurios gardelės konstanta yra 2,504 Å. Sluoksnius sudaro grafeno dvisluoksniui būdinga AA' konfigūracija (abiejų sluoksnių anglies atomai turi identiškas šonines koordinates) ir jie surišti silpnomis van der Waals jėgomis, o tarpsluoksninis atstumas yra 3,33 Å [7].

Heksagoninė sluoksniuota BN struktūra yra analogiška grafitui, susidedanti iš kovalentiškai sujungtų B–N žiedų. Nors h-BN struktūra yra panaši į grafeno, jis pasižymi plačia laidumo juosta, o draustinės juostos tarpas (E_g) yra 5,9 eV [8]. Jis taip pat yra termiškai laidas, kas yra patrauklu taikymui elektronikoje.

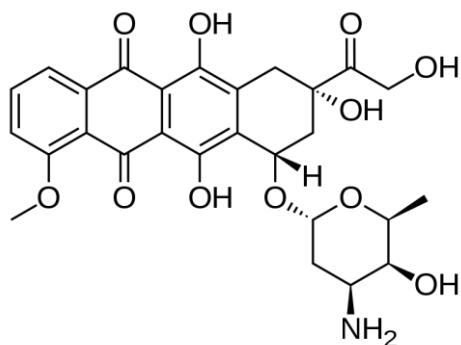
h-BN yra chemiškai inertiškas įvairiose rūgštyse ir tirpikliuose. h-BN netirpsta įprastose rūgštyse, bet tirpsta šarminėse išlydytose druskose ir nitriduose, tokiuose kaip LiOH, KOH ir Li_3BN_2 [9].

Alotropai yra junginiai, sudaryti iš tų pačių elementų, bet turintys skirtingas chemines formules. BN alotropai, ypač h-BN ir boro nitrido kubinė fazė (c-BN), pasižymi dideliu šiluminiu ir cheminiu stabilumu. h-BN yra stabilus ir neskyla esant aukštesnei kaip 1000 °C medžiagos temperatūrai ore, 1400 °C vakuume ir iki 2850 °C inertinėje atmosferoje [9].

2.2 Doksorubicinas

Chinonai yra aromatiniai organiniai junginiai, turintys dvi karbonilo grupes benzeno žiede. Chinonai randami bakterijose, tam tikruose grybuose ir įvairiose aukštesnėse augalų formose bei kai kuriuose gyvūnuose. Chinonų klasės molekulės yra aptinkamos kaip biologiniai pigmentai (biochromai), pavyzdžiui, benzochinonai, naftochinonai, antrachinonai ir policikliniai chinonai [10].

Doksorubicinas (DOX) yra chemoterapinis vaistas, naudojamas vėžiui gydyti. Molekulinė DOX struktūra pavaizduota 2.2 paveiksliuke. DOX veikia prieš įvairias vėžio formas: krūties vėžį, šlapimo pūslės vėžį, Kaposi sarkomą, limfomą ir ūminę limfocitinę leukemiją [11]. Jis dažnai naudojamas kartu su kitais chemoterapiniais vaistais ir vartojamas švirkščiant į veną.



2.2 pav. Doksorubicino molekulinė struktūra [12].

Doksorubicinas yra vienas iš plačiausiai naudojamų agentų įvairių tipų vėžio gydymo terapijoje dėl jo plataus veikimo spektro. Tačiau šio vaisto dozės turi būti kruopščiai kontroliuojamos ir pritaikytos individualiai kiekvienam pacientui, nes nekontroliuojamas chemoterapinio vaisto vartojimas gali привести prie rimtų organų pažeidimų, tokių kaip širdies, smegenų, kepenų ir inkstų pažeidimų.

Dažnai pasitaikantys šalutiniai doksorubicino vartojimo poveikiai yra plaukų slinkimas, kaulų čiulpų slopinimas, vėmimas, bėrimas ir burnos uždegimas [13]. Kitas sunkus šalutinis poveikis gali būti alerginės reakcijos, tokios kaip anafilaksija, širdies pažeidimas, audinių pažeidimas injekcijos vietoje ir su gydymu susijusi leukemija [13]. Taip pat žmonės dažnai pastebi šlapimo spalvos pakitimą į raudoną spalvą praėjus kelioms dienoms nuo vartojimo pradžios [13].

Doksorubicinas yra fluorescuojantis junginys, kuris tarnauja kaip vertinga medžiaga moksliniuose tyrimuose. Jo emisijos signalas yra ties 595 nm žadinant 470 nm lazerio spinduliuote.

2.3 Šviesos sugertis ir fluorescencija

Visų molekulių šviesos fotonų sugertis yra skirtinga ir priklauso nuo molekulės elektroninių būsenų sandaros. Optinės medžiagos savybės nulemia elektronų šuoliai iš išorinės orbitalės (pagrindinės būsenos) į aukštesnes neužpildytas orbitales [14].

Sugerties metu fotonas atiduoda savo energiją molekulės išorinio apvalkalo elektronui ir šis peršoka į aukštesnę orbitalę. Taip molekulė tampa sužadintosios būsenos. Kad įvyktų fotono sugertis, energijos skirtumas tarp užpildytos ir neužpildytų orbitalių turi atitikti fotono energiją [15]:

$$E_{\text{fotono}} = h\nu = E_2 - E_1 = \Delta E \quad (2.1)$$

Čia h – Planko konstanta;

ν – fotono dažnis;

E_2 ir E_1 – molekulių būsenų energijos.

Spektrofotometras – spektrinis prietaisas skirtas matuoti tiriamojo bandinio sugerties spektrus. Užregistruotas sugerties spektras yra tiriamo bandinio optinio tankio priklausomybė nuo sugeriamos šviesos bangos ilgio.

Šviesos sugerties matavimo eksperimentas paremtas Bugerio, Lamberto ir Bero dėsniais. Žinoma, kad optinis tankis priklauso nuo bandinio storio, ekstinkcijos koeficiento bei yra tiesiogiai proporcingas sugeriančių molekulių koncentracijai [15]:

$$A = e \cdot l \cdot c \quad (2.2)$$

Čia A – bandinio optinis tankis;

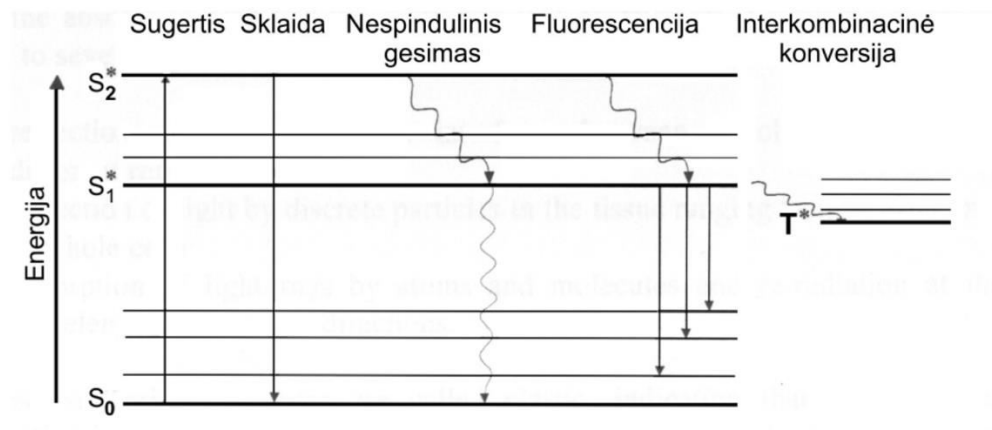
e – molinis ekstinkcijos koeficientas;

l – optinio kelio ilgis;

c – koncentracija.

Sugėrusi fotono energiją molekulė yra sužadinama į aukštesnį lygmenį (S_2^*), iš kurio nespindulinės relaksacijos būdu grįžta į žemesnį sužadintąjį lygmenį (S_1^*). Iš šio trumpai gyvuojančio žemesniojo sužadintojo lygmens gali prasidėti keli vyksmai: nespindulinė relaksacija, fluorescencija arba interkombinacinė konversija (2.3 pav). Kai molekulė iš

žemiausiojo sužadintojo lygmens grįžta energijos perteklių išspinduliuodama į aplinką, vyksta fluorescencija.

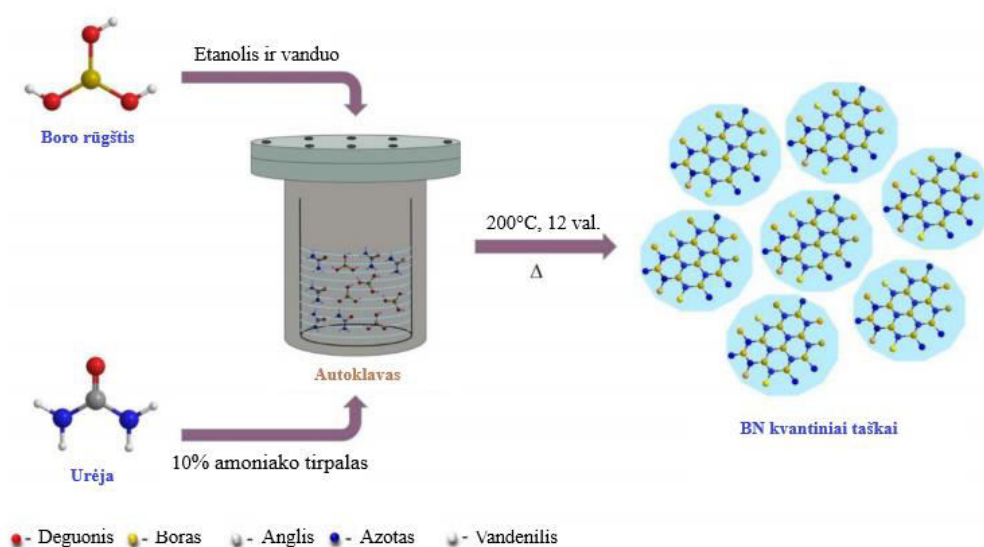


2.3 pav. Molekulės energinių lygmenų schema ir galimi vyksmai [15].

3. Tyrimo metodika

3.1 Boro nitrido kvantinių taškų sintezė

Šiame darbe boro nitrido (BN) kvantiniai taškai buvo susintetinti hidroterminiu metodu panaudojant boro rūgštį ir karbamidą. Mišinys buvo įpiltas į teflono vidinę kamerą, kuri tada buvo įdėta į nerūdijančio plieno autoklavą, gerai uždaryta, įdėta į krosnį ir kaitinama 200°C laipsnių temperatūroje 12 valandų. Po sintezės buvo atliktas gryninimas: (i) didelės dalelės atskirtos filtruojant per 0,22 µm membraną, (ii) tirpiklis buvo išgarintas ir pakeistas vandeniu. Galutinis tirpalas buvo stabili skaidri suspensija be įžiūrimų nuosėdų.



3.1 pav. BN kvantinių taškų sintezės schema. Adaptuota pagal [9].

3.2 Bandinių paruošimas

BN kompleksų sudarymui su DOX tyrimui, BN kvantinių taškų tirpalai buvo sumaišyti su skirtingų koncentracijų DOX tirpalais (10^{-5} , 2×10^{-5} , 4×10^{-5} M). Tirpalai buvo inkubuojami kambario temperatūroje 24 val.

Kompleksų stabilumo tyrime, BN-DOX buvo ištirpinti skirtingų pH verčių acetatiniuose buferiuose, pH 6-8. Tirpalai buvo inkubuojami kambario temperatūroje šešias valandas. Skirtinguose laiko taškuose (0 val, 1 val, 2 val, 3 val, 4 val, 5 val, 6 val) tirpalo mėginys buvo paimamas UV-VIS spektroskopijos analizei.

3.3 Spektroskopiniai tyrimų metodai

3.3.1 Sugerties spektrų matavimas

Spektrofotometras – spektrinis prietaisas skirtas matuoti tiriamojo bandinio sugerties spektrus. Užregistruotas sugerties spektras yra tiriamo bandinio optinio tankio priklausomybė nuo sugeriamos šviesos bangos ilgio.

Tiriamasis tirpalas patalpinamas į kiuvetę bei apšviečiamas tam tikro intensyvumo (I_0) monochromatine spinduliuote. Tirpalui sugėrus šviesą, per jį perėjusios spinduliuotės intensyvumas (I) sumažėja. Perėjusios ir krintančios šviesos intensyvumų santykis yra vadinamas pralaidumu ir žymimas T [15]:

$$T = I/I_0 \quad (3.1)$$

Šio tyrimo metu šviesos sugerties spektrai buvo užregistruoti Jasco V-670 spektrofotometru. Spektrai buvo matuojami 250 – 750 nm diapazone. Matavimams naudotos kvarcinės kiuvetės, kurių optinis kelio ilgis 1 cm.

3.3.2 Fluorescencijos spektrų matavimas

Fluorescencijos spektras gaunamas žadinant molekules šviesos šaltiniu tam tikro bangos ilgio spinduliuote. Molekulių žadinimui pasirenkama tokio bangos ilgio šviesa, kurią sugeria žadinamos medžiagos molekulės. Fluorescencijos spektras matuojamas per visą emisijos intervalą, žadinant vieno bangos ilgio šviesa. Gautas spektras yra fotonų skaičiaus priklausomybė nuo bangos ilgio.

Fluorescencijos spektrai buvo registruojami spektrometru Edinburgh Instruments F900. Sužadinimui buvo naudotas pikosekundinis diodinis lazeris EPL-375, kuris skleidžia monochromatinius 375 nm pikosekundinės trukmės impulsus. Vidutinė impulsų galia 0,15 mW/mm², diafragmos plyšys – 5 nm. Fluorescencijos spektrai buvo registruojami 400 – 750 nm diapazone. Matavimams naudotos kvarcinės kiuvetės, kurių optinis kelio ilgis yra 1 cm.

3.3.3 Infraraudonosios spinduliuotės sugerties spektrų matavimas

Infraraudonųjų spindulių (IR) spektras gali padėti nustatyti nežinomos molekulės cheminę sudėtį ir (arba) jungtį. Infraraudonųjų spindulių spektrofotometrai dažniausiai

naudojami medžiagų charakterizavimui [16]. Šie prietaisai registruoja pro mėginį praėjusių IR spindulių intensyvumo priklausomybę nuo bangos ilgio.

IR sugerties spektrai buvo gauti pasitelkiant Furjė transformacijos infraraudonųjų spindulių spektroskopiją (naudojant ALPHA II FTIR spektrometrą su deimantiniu kristalu ATR, Bruker Co.). Sugerties spektrų matavimai atlikti dviem būdais: (i) 10 μL lašas užlašintas ant ATR kristalo ir paliktas 30 minučių išdžiūti, (ii) sausi milteliai buvo uždėti ant kristalo viršaus ir iškarto pamatuotas spektras. Visi spektrai buvo matuoti 300 sekundžių, o oro spektras panaudotas palyginimui. Spektrai užregistruoti $500\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$ srityje, skiriamoji geba 2 cm^{-1} .

3.3.4 Fluorescencijos relaksacijos trukmių matavimas

Fluorescencijos gesimo trukmių matavimui buvo naudojamas laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo metodas (time-correlated single-photon counting, TCSPC). Lazerio impulsu sužadinta molekulė po tam tikro laiko išspinduliuoja fotoną. Daug kartų žadinant molekulę ir matuojant laikus, gaunamas fotonų išspinduliavimo laikų tikimybinis pasiskirstymas.

Fluorescencijos gesimo trukmės buvo matuojamos su laike koreliuoto pavienių fotonų skaičiavimo spektrometru Edinburgh-F900, ties doksorubicino fluorescencijos maksimumą atitinkančiu bangos ilgiu - 590 nm. Matavimai buvo atliekami 0 – 50 ns diapazone. Matavimuose buvo naudojamas diodinis lazeris EPL-375, žadinantis 375 nm pikosekundiniais impulsais. Vidutinė impulsų galia $0,15\text{ mW/mm}^2$, diafragmos plyšys 5 nm.

4. Rezultatai

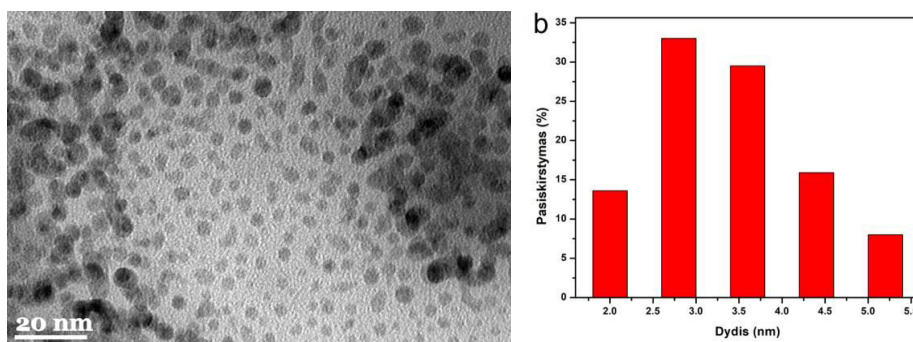
4.1 Boro nitrido nanodalelių charakterizavimas

Charakterizuoti susintetintas nanodaleles svarbu, nes jų optinės ir elektroninės savybės stipriai priklauso nuo dalelių struktūros. Dalelių dydis, cheminė kompozicija ir paviršiaus forma nulemia medžiagos toksiškumą.

Mažesnių nei 100 nm skersmens nanodalelių poveikis kelia nežinomą pavojų organizmui, nes biologinių sistemų atsakas į tokio dydžio naujas medžiagas nėra pilnai ištirtas. Dėl didelio paviršiaus ploto ir tūrio santykio nanodalelės yra ypač reaktyvios ir elgiasi kaip geri katalizatoriai, todėl nanodalelės lengvai prisijungia prie biologinių molekulių, priklausomai nuo jų paviršiaus savybių. Nanodalelių dydis ir paviršiaus krūvis leidžia joms lengviau pasiekti transportą per ląstelių membranas, palyginus su didenėmis dalelėmis.

Vienas iš dažniausiai naudojamų būdų nustatyti dalelių formą ir jų sluoksnių skaičių yra transmisijos elektronų mikroskopija (TEM). Susintetintų boro nitrido dalelių TEM nuotraukos dalelių dydžiui įvertinti pavaizduotos 4.1 (a) paveiksluke. Susintetintas produktas sudarytas iš apskritiminės formos nanodalelių. Susintetintų nanodalelių TEM nuotrauka parodo gerą BN kvantinių taškų dydžio pasiskirstymą. Vidutinis dalelių dydis yra 3,00 nm (4.1 b pav.)

Tokios struktūros BN kvantiniai taškai, kurių paviršiaus struktūra yra apskritiminė, yra tinkami veiksmingam priešvėžinių vaistų pernešimui į vėžines ląsteles.

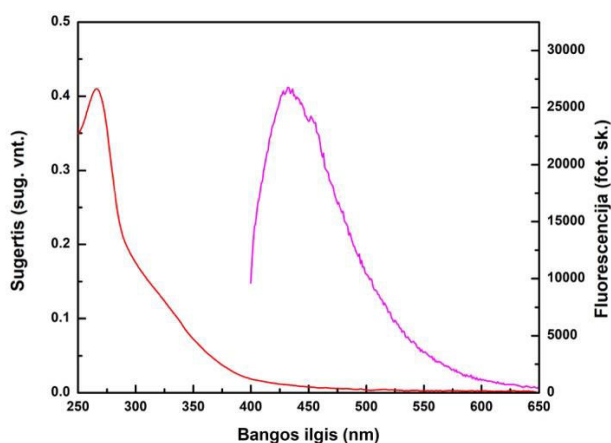


4.1 pav. Susintetintų boro nitrido kvantinių taškų TEM nuotrauka (a) ir dalelių dydžio pasiskirstymas (b).

Optinėms savybėms įvertinti užregistruoti BN nanodalelių šviesos sugerties ir emisijos spektrai (4.2 pav.) UV-Vis sugerties spektras sudarytas iš dviejų maksimumų, ties 256 nm ir ties 312 nm bangos ilgiais.

Daug ankstesnių tyrimų parodė BN dalelių sugerties piką ties 200 nm, kuris yra charakteringas BN nanodariniams [14]. Tačiau dėl prietaiso ribotų galimybių šio maksimumo nepavyko užregistruoti.

Susintetintos BN nanodalelės parodė stiprią mėlyną fluorescenciją UV spektriniame diapazone, žadinant 375 nm spinduliuote. Užregistruotame spektre matyti plati emisijos juosta su maksimumu ties 430 nm (4.2 pav).

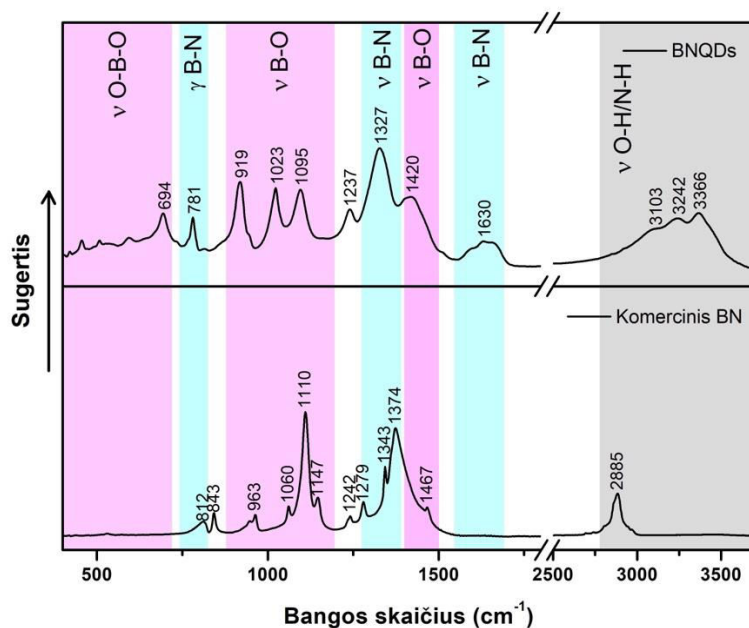


4.2 pav. Boro nitrido kvantinių taškų vandeninių tirpalų šviesos sugerties ir fluorescencijos spektrai. Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

Identifikuoti BN dalelių cheminę kompoziciją ir toliau tirti struktūrą, buvo pasitelkta FT-IR spektroskopija. 4.3 paveiksluke pavaizduoti susintetintų BN dalelių ir komercinių BN dalelių FTIR sugerties spektrai. Komerciškai įsigytas BN charakterizuojamas dviem sugerties juostomis: silpna juosta ties 812 cm^{-1} ir plačia didelio intensyvumo juosta ties 1374 cm^{-1} .

Susintetintų kvantinių taškų FT-IR spektre matomi sugerties maksimumai ties 1327 ir 1630 cm^{-1} dėl B-N valentinių virpesių (4.3 pav). Spektre matoma charakteristinė B-N juosta ties 1327 cm^{-1} dėl h-BN plokštumos vibracijų. Ties 781 cm^{-1} bangos skaičiumi yra matomas maksimumas dėl BN deformacijų [17]. Susintetintų dalelių O-H ir N-H grupės taip pat matyti $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ srityje su plačia sugerties juosta. Šios juostos patvirtina grupių B-N, O-H ir N-H buvimą susintetintuose tirpaluose.

Lyginant susintetinto BN ir komerciškai įsigyto BN sugerties spektrus, yra matomos visos charakteringos smailės. Komercinio BN smailės yra pasislinkusios į ilgesnių bangos skaičių pusę ir jų forma yra smailesnė ir intensyvesnė. Šių dalelių dydis gerokai didesnis ir siekia $100\text{--}200\text{ nm}$ bei jos yra kelių sluoksnių.



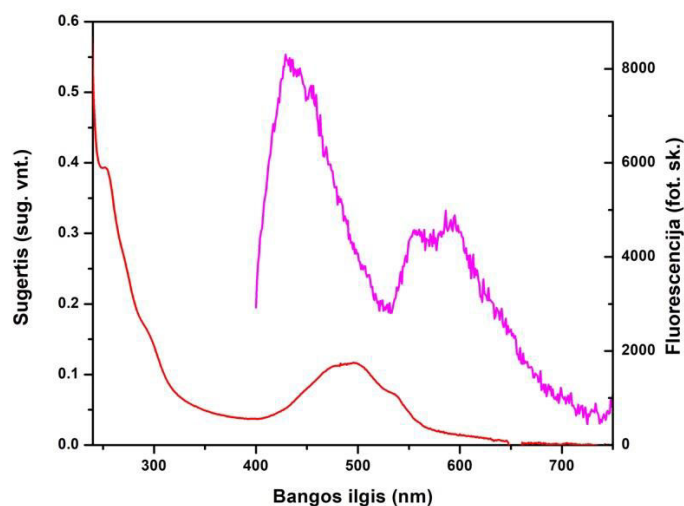
4.3 pav. Susintetintų BN kvantinių taškų ir komerciškai įsigytų BN dalelių FT-IR spektrai.

Atsižvelgiant į visus spektrus galima daryti išvadą, kad buvo gauti kelių arba vieno sluoksnio BN kvantiniai taškai su O-H grupėmis kraštuose. FT-IR spektruose stebimos būdingos B-N, N-H ir O-H sugerties juostos. Kvantinių taškų kraštuose esančios O-H grupės sukuria didelį tirpumą vandenyje nepanaudojant jokių papildomų paviršiaus aktyvuojančių medžiagų.

Išsamus struktūrinis charakterizavimas atskleidė, kad BN dalelės yra vienasluoksnės apskritiminės formos, 3 nm dydžio ir su O-H grupėmis kraštuose. Tokios struktūros ir cheminės kompozicijos dalelės gali būti naudojamos kaip nanonešėjai įvairiems chemoterapiniams vaistams pernešti į naviko ląsteles.

4.2 Boro nitrido ir doksorubicino kompleksų spektroskopinės savybės

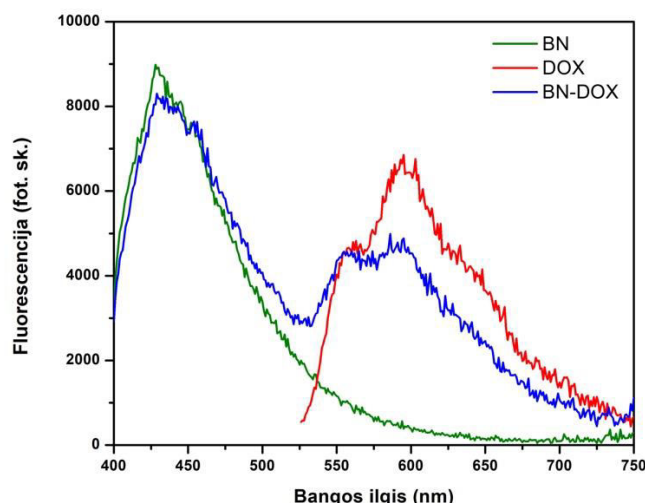
Iš susintetintų BNQDs ir DOX tirpalų, pagaminti BN-DOX kompleksai. Stabilių BN-DOX junginių susidarymas priklauso nuo elektronų tankio traukos aromatinių žiedų vietoje. Užregistruoti pagamintų tirpalų sugerties ir emisijos spektrai naudojant UV-VIS spektroskopiją (4.4 pav).



4.4 pav. BN-DOX kompleksų sugerties ir fluorescencijos spektrai. Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm}$.

Sugerties spektre yra matomas BN sugerties intensyvumo iškilimas ties 280 nm bangos ilgiu ir plati juosta matomosios šviesos ruože nuo 400 iki 550 nm priklausanti doksorubicinui. Spektre taip pat matomas dar vienas, BN-DOX priklausantis, maksimumas ties maždaug 300 nm. Fluorescencijos spektre matomi du maksimumai. Maksimumas ties 430 nm yra priskiriamas BN, o ties 590 nm, priskiriamas doksorubicinui [18].

4.5 paveiksliuke pavaizduoti atskirų komponentų, boro nitrido ir doksorubicino fluorescencijos spektrai, bei iš šių tirpalų pagaminto kompleksų tirpalo fluorescencijos spektras. Buvo pastebėtas priešvėžinio doksorubicino fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas ties 590 nm bangos ilgiu. Tai parodo, kad susidarius kompleksams doksorubicino fluorescencija yra gesinama. Gesinimas paaikškina doksorubicino aktyvumo sumažėjimą jam esant komplekse. Laisvas doksorubicinas stipriai fluorescuoja, bet patekęs į kompleksą yra imobilizuojamas ir silpninamas jo fluorescencijos intensyvumas. Tikėtina, kad fluorescencija yra gesinama statiniu būdu (kontaktiniu būdu): pirmiausia susidaro kompleksas, tada jis yra apšviečiamas spinduliuote [19].

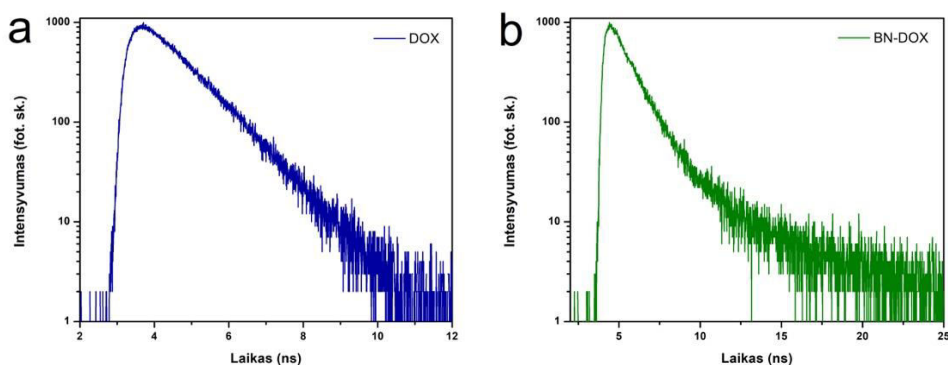


4.5 pav. Laisvų boro nitrido nanodalelių ir doksorubicino tirpalų ir BN-DOX kompleksų fluorescencijos spektrai. Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

Doksorubicino fluorescencijos savybės keičiasi jam prisijungiant į kompleksą. Fluorescencijos intensyvumas ties 590 nm mažėja, nes tirpale mažėja laisvo doksorubicino kiekis. Sugerties bei fluorescencijos spektrų kitimai leidžia spręsti apie DOX koncentracijos pokyčius tirpale, o fluorescencijos relaksacijos trukmės teikia informaciją apie DOX erdvinę konfigūraciją ir sąveikas mikroaplinkoje [20]. Šis tyrimas parodo molekulių savybių pokyčius joms artimoje aplinkoje. Tai yra svarbu žinoti sintetinant nanomedžiagas doksorubicino pernešimui.

Galima palyginti gryno DOX tirpalo bei komplekse esančio DOX tirpalo fluorescencijos gesimo kinetikas. Tyrimų metu fluorescencijos gesimas buvo stebimas ties 590 nm bangos ilgiu, žadinant 375 nm spinduliuote. 4.6 (a) paveiksliuke pavaizduotas laisvo DOX fluorescencijos gesimas, o 4.6 (b) paveiksliuke pavaizduotas komplekse esančio DOX fluorescencijos gesimas.

Laisvo doksorubicino fluorescencijos intensyvumo gesimas gali būti aproksimuotas viena eksponente su 1,01 ns gyvavimo trukme, kuri atitinka literatūroje nurodytą vertę [21]. BN-DOX Fluorescencijos gesimo kinetikos buvo aproksimuotos dviem eksponentėmis (τ_1 , τ_2), iš kurių buvo apskaičiuota vidutinė relaksacijos trukmė (τ_{vid}). BN-DOX komplekse doksorubicino gyvavimo trukmė yra dvigubai ilgesnė, su dviem eksponentėmis (1,61 ns ir 3,26 ns). Tokia dvi eksponentinė funkcija nusako aplinkos heterogeniškumą esantį aplink DOX molekulę [22]. Heterogeniškumas gali kilti dėl specifinės sąveikos tarp DOX ir BN.



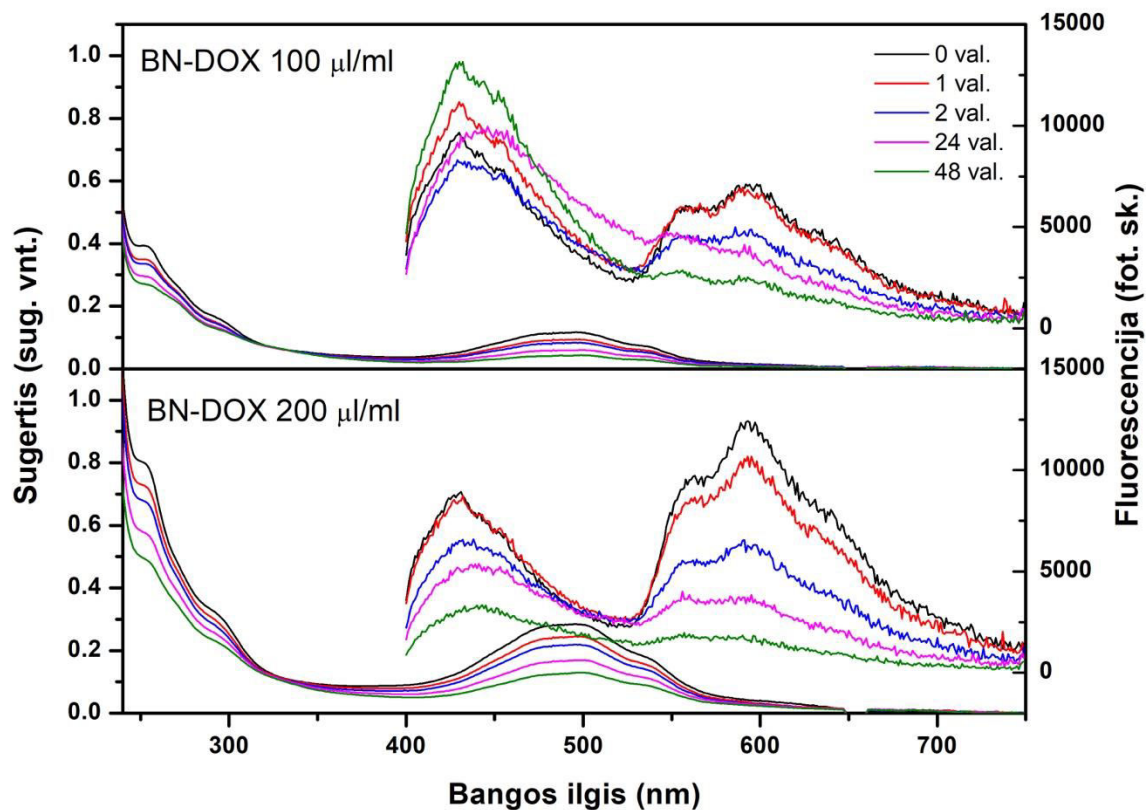
4.6 pav. DOX fluorescencijos gesimas (a) ir BN-DOX fluorescencijos gesimas (b) registruotas ties 590 nm bangos ilgiu, žadinant 375 nm spinduliuote. $[DOX] = 10^{-5}$ M.

Stebimas DOX fluorescencijos gyvavimo trukmių padidėjimas. Tai parodo, kad DOX molekulės yra mažiau polinėje aplinkoje. Taip pat, DOX molekulės laisvai juda ir sukasi buferyje, o komplekse jos yra labiau imobilizuotos ir negali laisvai judėti.

Tirpaluose su BN, dėl pakitusių spektrų formos, yra aiškiai matoma BN daroma įtaka, kuri pasireiškia fluorescencijos gesimo trukmės padidėjimu. Laisvo DOX fluorescencijos gesimo kinetikos ties 590 nm yra intensyvesnės. komplekse esančio DOX gesimo trukmės ir gesimo kinetikų leidimosi forma rodo, kad BN gesina DOX fluorescenciją ir DOX tampa neaktyvus.

4.3 Boro nitrido ir doksorubicino kompleksų susidarymo dinamika ir stabilumas

Norint geriau suprasti kompleksų veikimą ir teisingai vertinti jų tinkamumą priešvėžinių vaistų pernašai reikia ištirti pačias kompleksų susidarymo sąlygas ir jų stabilumą. Yra žinoma, kad BN-DOX kompleksų susidarymo efektyvumas priklauso nuo komponentų koncentracijų ir terpės rūgštingumo. Toliau buvo tiriamos optimalios DOX koncentracija ir jo santykis su BN. Taip pat buvo tiriamas junginių stabilumas keičiant terpės pH.

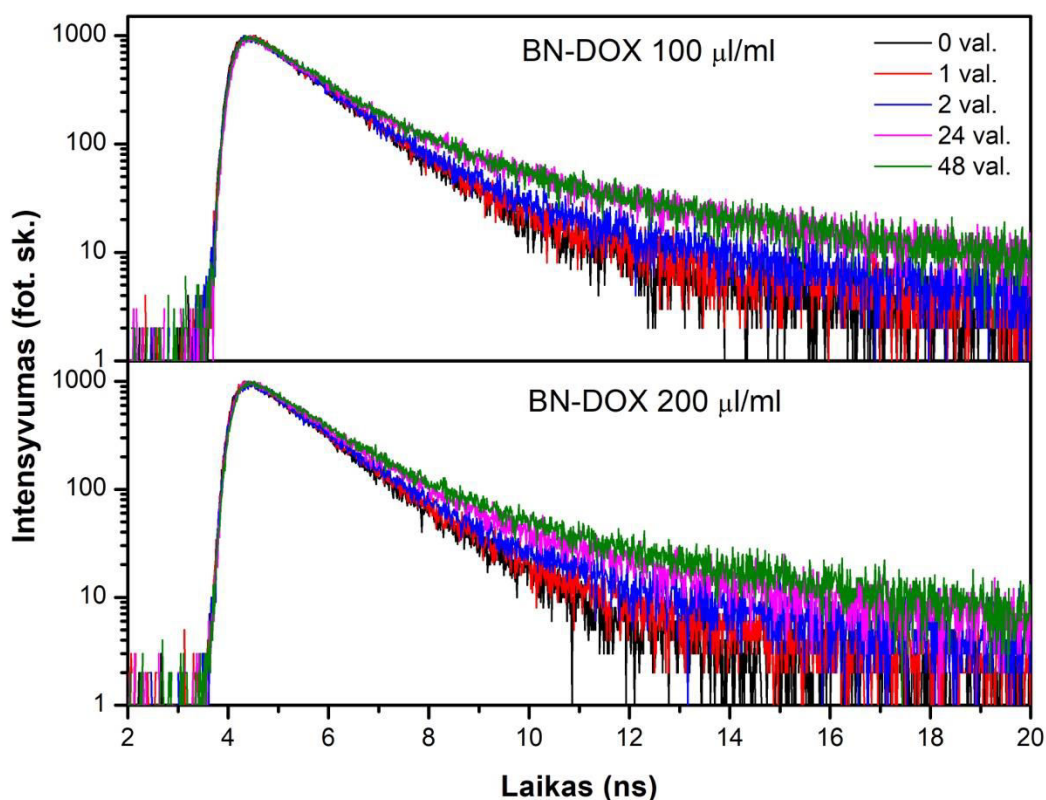


4.7 pav. Skirtingų koncentracijų BN-DOX kompleksų tirpalų sugerties ir fluorescencijos spektrai. Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

4.7 paveiksluke pavaizduoti BN-DOX sugerties ir fluorescencijos spektrai 48 valandų laikotarpyje. Buvo tirti du tirpalai, kuriems pagaminti buvo naudojami dviejų skirtingų koncentracijų doksorubicino tirpalai, 100 ir 200 $\mu\text{g/ml}$. Abiejuose tirpaluose užregistruotas sugerties ir fluorescencijos intensyvumo mažėjimas ties abiem maksimumais pirmomis valandomis po tirpalų pagaminimo. Didesnės DOX koncentracijos tirpale matomas didesnis intensyvumas ties 590 nm, priklausantis DOX, bet tendencija yra ta pati, intensyvumas mažėja einant laikui. Ties 590 nm bangos ilgiu buvo matomas intensyvumo pamažėjimas ir praėjus vienai ir dviem paroms nuo tirpalų paruošimo. Tačiau šiuose laiko tarpuose matomas fluorescencijos juostos pokytis ties 430 nm bangos ilgiu, parodantis, kad laisvų kompleksų tirpale sumažėjo. Nustatyta, kad susintetinti BN-DOX junginiai yra aktyvūs pirmų 24 valandų periode. Vėliau kompleksai pradeda formuoti agregatus, kurie pakeičia fluorescencijos intensyvumus ties visais maksimumais ir tokie kompleksai tampa nebeaktyvūs.

Doksorubicino molekulės pradeda formuoti mažus agregatus, kurie paveikia doksorubicino aktyvumą ir optines savybes. Taip pat doksorubicinas yra chemiškai nestabilus vandeninėse terpėse ir laikui einant yra linkęs į fotocheminę dekompoziciją [23].

Pagamintų kompleksų sugerties ir emisijos intensyvumai priklauso ir nuo komponentų santykio. Buvo nustatytas optimaliausias BN dalelių ir DOX koncentracijų santykis optiniams tyrimams, kuris atitinkamai yra 1:2. Esant šiam komponentų santykiui, susidaro mažiausiai BN-DOX kompleksų agregatų, nes 24 val. laikotarpyje mažiausiai pasikeičia komplekso sugerties intensyvumas bei DOX fluorescencijos juostos intensyvumas. Tai parodo, kad BN-DOX kompleksų agregatai neiškrenta į nuosėdas.



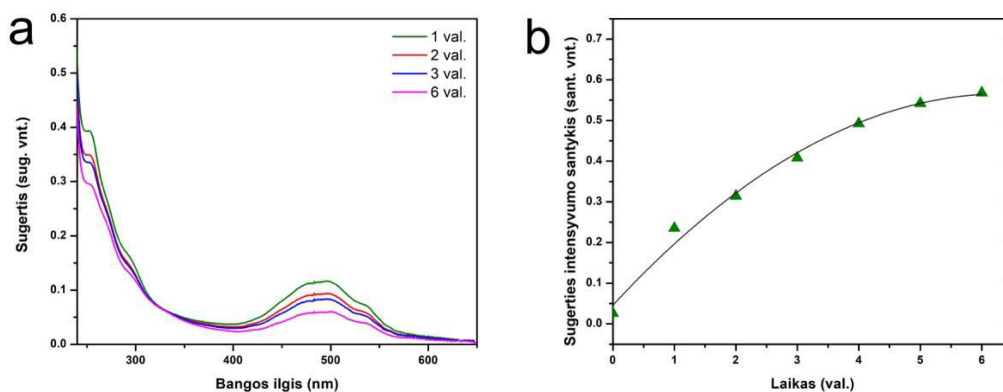
4.8 pav. Skirtingų koncentracijų BN-DOX kompleksų tirpalų fluorescencijos gesimas ties 590 nm bangos ilgiu. Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{\text{ex}} = 375$ nm.

Toliau buvo užregistruotos tų pačių tirpalų fluorescencijos gesimo kinetikos (4.8 pav.) 48 val. laikotarpyje. Fluorescencijos gesimo kinetikos buvo aproksimuotos dviem eksponentėmis, iš kurių buvo apskaičiuota vidutinė relaksacijos trukmė. Abiejuose tirpaluose vidutinės relaksacijos trukmės kito tolygiai: nuo 2,15 ns iki 2,6 ns. Lyginant kitimą priklausomai nuo doksorubicino koncentracijos, vidutinės relaksacijos trukmių vertės yra

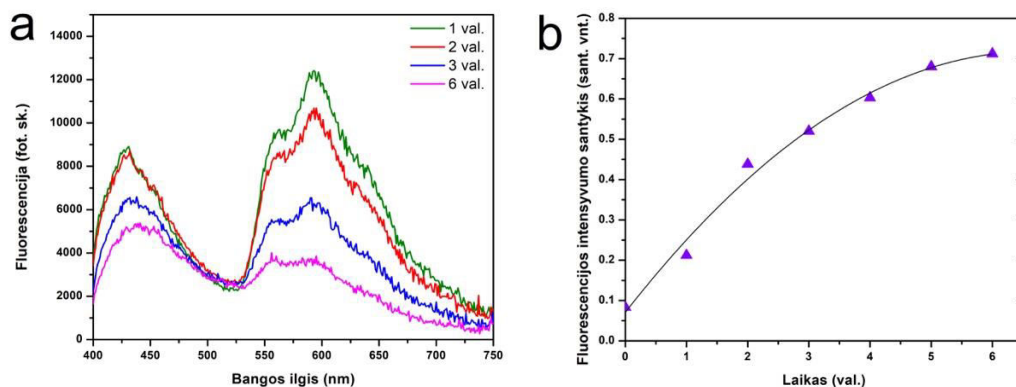
labai panašios ir kito nuo 2,15 ns iki 2,6 ns. Mažesnės koncentracijos DOX tirpale jau 24 valandą po tirpalo pagaminimo τ_{vid} pasiekė maksimalią vertę. Čia kompleksų agregatai susiformavo greičiau ir sustabdė fluorescencijos intensyvumo kitimą. Nustatyta, kad fluorescencijos gyvavimo trukmė nepriklauso nuo doksorubicino koncentracijos.

Toliau buvo tirtas DOX kiekis, prisijungiantis prie BN. Žinant abiejų komponentų koncentraciją, galima paskaičiuoti kokį kiekį priešvėžinio vaisto gali prisijungti susintetintos nanodalelės. DOX kiekis, prisijungęs prie BN dalelių, buvo įvertintas dviem metodais.

Pirmuoju metodu prijungto DOX kiekis nustatytas lyginant intensyvumus UV-VIS sugerties doksorubicino laike ties 480 nm pradinio DOX tirpalo, naudoto kompleksų gamybai, ir susintetintų kompleksų tirpalo supernatanto. Antruoju metodu, DOX kiekis nustatytas matuojant tirpalų fluorescenciją žadinant 375 nm spinduliuote. Emisijos intensyvumai lyginami buvo ties 590 nm bangos ilgiu.



4.9 pav. BN-DOX kompleksų sugerties spektrai užregistruoti skirtinguose laiko tarpuose nuo pagaminimo (a) ir tirpalų sugerties intensyvumo pokytis nuo laiko (b).



4.10 pav. BN-DOX kompleksų fluorescencijos spektrai užregistruoti skirtinguose laiko tarpuose nuo pagaminimo (a) ir tirpalų fluorescencijos intensyvumo pokytis nuo laiko (b). Žadinimo bangos ilgis

$$\lambda_{\text{ex}} = 375 \text{ nm.}$$

Spektrai buvo registruojami kas valandą, 6 valandas nuo tirpalo pagaminimo. Tyrimo eiga atrodė taip: tirpalas buvo inkubuojamas vieną valandą, susidarę agregatai nusėda ant indo dugno ir viršutinė tirpalo dalis paimama spektrų registravimui. 4.9 (a) paveiksliuke pavaizduoti sugerties spektrai praėjus skirtingiems laikams nuo tirpalo pagaminimo. 420-550 nm bangos ilgiuose DOX sugertis mažėja einant laikui, tai reiškia, kad mažėja laisvo DOX koncentracija tirpale. Vis daugiau doksorubicino molekulių prisijungia prie BN dalelių ir dalis BN-DOX kompleksų agreguojasi ir iškrenta į nuosėdas.

DOX prisijungimo greitis geriau matomas iš sugerties intensyvumo santykio priklausomybės nuo laiko (4.9 (b) pav). Sugerties vertės buvo paimamos ties DOX sugerties maksimumu, 590 nm bangos ilgiu ir paskaičiuojamas santykis tirpalo fluorescencijos intensyvumo su laisvo DOX tirpalo intensyvumu ties 590 nm. Laisvo DOX koncentracija yra 0,1 mg/ml. Pirmomis valandomis laisvo DOX kiekis tirpale sparčiai mažėja. Nuo trečios valandos pradeda lėtėti. Šeštą valandą užregistruota laisvo DOX koncentracija tirpale yra 0,045 mg/ml.

Tiriant fluorescenciniu metodu pastebėti labai panašūs rezultatai. Fluorescencijos intensyvumas mažėja einant laikui ties 590 nm bangos ilgiu (4.10 (a) pav).

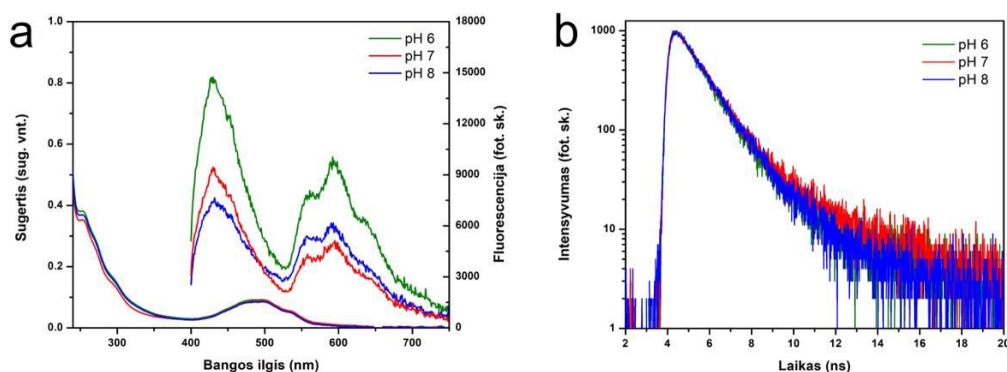
Sudaryta fluorescencijos intensyvumo santykio priklausomybė nuo laiko (4.10 (b) pav). Buvo pamatuotas laisvo DOX tirpalo spektras ir paskaičiuoti santykiai pamatuotų emisijos intensyvumų su laisvo DOX intensyvumu. Pirmas tris valandas fluorescencijos intensyvumas sparčiai mažėja, o nuo trečios valandos pradeda lėtėti.

Pirmas šešias valandas BN-DOX kompleksai formuojasi sparčiai. Didžiausias užregistruotas prie BN prijungto DOX kiekis yra 0,055 mg/ml. Pirmomis valandomis susiformavę kompleksai yra labai aktyvūs, tačiau tirpale dar yra daug likusio laisvo DOX. Pakeitus terpės pH (parūgštinus), fluorescencijos intensyvumas padidėja, nes kompleksai skyla ir padidėja laisvo DOX kiekis tirpale. Toliau einant laikui pradeda formotis kompleksų agregatai, kurie pakeičia fluorescencijos juostos formą. Kompleksai nusėda ant dugno ir tampa neaktyvūs, jų fluorescencijos intensyvumas nebesikeičia keičiant terpės pH.

Kompleksų stabilumui įvertinti BN-DOX kompleksai porą valandų buvo inkubuoti acetatiniame buferyje, skirtinguose pH, 6, 7 ir 8. Po to fluorescencijos spektrai buvo užregistruoti skirtinguose laiko tarpuose nuo tirpalų pagaminimo.

Buvo pastebėta, kad BN-DOX susidarymo efektyvumas ir komplekso stabilumas priklauso nuo terpės pH. 4.11 (a) paveiksliuke pavaizduoti kompleksų sugerties ir fluorescencijos spektrai po inkubacijos skirtinguose pH buferiuose. Visų tirpalų sugerties intensyvumai yra vienodi ir tai parodo, kad tirpalų koncentracijos yra tos pačios. Tačiau

fluorescencijos spektruose pastebimas skirtumas. pH 7 terpėje intensyvumas išliko panašus kaip pradinio tirpalo, dauguma DOX molekulių liko prisijungusios prie nanodalelių. pH 8 terpėje intensyvumas nežymiai padidėjo, o rūgštinėje, pH 6 terpėje, intensyvumas padidėjo beveik 47% ties 590 nm. Tai parodo, kad dalis doksorubicino buvo paleista iš kompleksų į tirpalą ir laisvo DOX koncentracijos padidėjimas tirpale sukėlė fluorescencijos intensyvumo pakilimą. Padidėjęs vaisto išsiskyrimas iš BN-DOX komplekso rūgštinėmis sąlygomis yra siejamas su BN ir DOX elektrostatinės sąveikos pasikeitimu.



4.11 pav. BN-DOX kompleksų sugerties ir fluorescencijos spektrai užregistruoti skirtinguose pH buferiuose (a) ir tirpalų fluorescencijos gesimas ties 590 nm bangos ilgiu (b). Žadinimo bangos ilgis $\lambda_{ex} = 375$ nm.

Yra žinoma, kad vėžinių ląstelių pH yra labiau rūgštinis nei normalių ląstelių. Paprastų ląstelių pH normaliuose audiniuose (smegenų, odos audiniuose ir kt.) yra tarp 7,2 ir 7,5 pH. Tačiau šių audinių vėžinių ląstelių pH yra tarp 6,4 ir 7,0 dėl jose vykstančios abnormalios anaerobinės glikolizės [24].

Lyginant vidutinės fluorescencijos relaksacijos trukmes išmatuotas skirtingo rūgštingumo tirpaluose matomas nežymus pokytis. pH 7 tirpale τ_{vid} yra lygus 2,37 ns, o pH 6 ir 8 tirpaluose trukmės patrupėjo iki 2,1 ns. Neutraliame pH relaksacijos trukmės yra panašios kaip pradinio tirpalo, bet pakeitus tirpalo rūgštingumą relaksacijos trukmės patrupėja.

Šie rezultatai parodo, kad BN-DOX kompleksai yra gana stabilūs neutralioje terpėje. Tuo tarpu DOX yra efektyviai paleidžiamas nuo BN labiau rūgštinėse terpėse, tokiose kurios yra vėžinėse ląstelėse.

4 Išvados

1. Susintetintos BN nanodalelės yra tinkamos priešvėžinių vaistų pernašai dėl savo struktūros ir cheminės kompozicijos.
2. Doksorubicinas esantis BN-DOX komplekse yra neaktyvus ir jo aktyvumą galima įvertinti spektroskopiniais metodais.
3. BN-DOX kompleksai yra stabilūs neutralioje terpėje, bet DOX yra paleidžiamas iš komplekso rūgštinėje terpėje.

Literatūros sąrašas

- [1] Cancer, World Health Organization, (2022). Prieiga per internetą: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>] (Žiūrėta: gegužės 22 d.).
- [2] Cheung-Ong K., Giaever G., Nislow C., DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology, *Chemistry & Biology*, 20(5), 648–659 (2013).
- [3] Aghebati-Maleki A., Dolati S., Ahmadi M., Baghbanzhadeh A., Asadi M., Fotouhi A., Yousefi M., Aghebati-Maleki L., Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers, *Journal of Cellular Physiology*, jcp.29126 (2019).
- [4] E.S. Permyakova, I. V. Sukhorukova, L.Y. Antipina, A.S. Konopatsky, A.M. Kovalskii, A.T. Matveev, O.I. Lebedev, D. V. Golberg, A.M. Manakhov, D. V. Shtansky, Synthesis and Characterization of Folate Conjugated Boron Nitride Nanocarriers for Targeted Drug Delivery, *J. Phys. Chem. C*. 121 28096–28105 (2017).
- [5] Olson R. D., Mushlin P. S., Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses, *The FASEB Journal*, 4(13), 3076–3086 (1990).
- [6] C.R. Dean, A.F. Young, I. Meric, C. Lee et al., Boron nitride substrates for high-quality graphene electronics, *Nat. Nanotechnol*, 5, 722-726 (2010).
- [7] Zheng Z., Cox M. C., Li B., Surface modification of hexagonal boron nitride nanomaterials: a review, *Journal of Materials Science*, 53(1), 66–99 (2018).
- [8] Gnatyuk O. P., Dovbeshko G. I., Yershov A., Karakhim S. O., Ilchenko O., Posudievsky O. Yu, 2D-BN nanoparticles as a spectroscopic marker and drug delivery system with protection properties, *RSC Advances*, 8(53), 30404–30411 (2018).
- [9] Bhimanapati G. R., 2D Boron Nitride, *Semiconductors and Semimetals 2D Materials Volume 95* ||, 101–147 (2016).
- [10] Prieiga per internetą: [Vitamin K | chemical compound | Britannica] (Žiūrėta: gegužės 16 d.).
- [11] Umrao S., Maurya A.K., Shukla V., Grigoriev A., Ahuja R., Vinayak M., Srivastava R.R., Saxena P.S., Oh I.-K., Srivastava A., Anticarcinogenic activity of blue fluorescent hexagonal boron nitride quantum dots: as an effective enhancer for DNA cleavage activity of anticancer drug doxorubicin, *Materials Today Bio*, 1, 100001 (2019).

- [12] Senes-Lopes T. F., López J. A., do Amaral V. S., Brandão-Neto J., de Rezende A. A., da Luz J. R. D. Almeida M. das G., Genotoxicity of *Turnera subulata* and *Spondias mombin* × *Spondias tuberosa* Extracts from Brazilian Caatinga Biome, *Journal of Medicinal Food*, 21(4), 372–379 (2018).
- [13] M. Mobaraki, A. Faraji, M. Zare, Molecular Mechanisms of Cardiotoxicity: A Review on Major Side-effect of Doxorubicin, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 79(3), (2017).
- [14] Zhang X. F., Zhang J., Liu L., Fluorescence Properties of Twenty Fluorescein Derivatives: Lifetime, Quantum Yield, Absorption and Emission Spectra, *Journal of Fluorescence*, 24(3), 819–826 (2014).
- [15] R. Rotomskis, S. Bagdonas ir J. Valančiūnaitė, *Biofotonika*, Vilnius: VU leidykla 66-70, 165 (2007).
- [16] Mohamed M.A., Membrane Characterization Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, 3-19 (2017).
- [17] Sukhorukova I. V., Zhitnyak I. Y., Kovalskii A. M., Matveev A. T., Lebedev O. I., Li X., Shtansky D. V., Boron Nitride Nanoparticles with a Petal-Like Surface as Anticancer Drug-Delivery Systems, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(31), 17217–17225 (2015).
- [18] Shah S., Chandra A., Kaur A., Sabnis N., Lacko A., Gryczynski Z., Gryczynski I., Fluorescence properties of doxorubicin in PBS buffer and PVA films, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 65–69 (2017).
- [19] Fluorescence Quenching. Prieiga per internetą: [https://www.wikilectures.eu/w/Fluorescence_quenching] (Žiūrėta: gegužės 22 d.).
- [20] Zhang L., Peng G., Li J., Liang L., Kong Z., Wang H., Shen J.-W, Molecular dynamics study on the configuration and arrangement of doxorubicin in carbon nanotubes, *Journal of Molecular Liquids*, 262, 295–301 (2018).
- [21] Anand R., Manoli F., Manet I., Daoud-Mahammed S., Agostoni V., Gref R., Monti S., β -Cyclodextrin polymer nanoparticles as carriers for doxorubicin and artemisinin: a spectroscopic and photophysical study, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(8), 1285 (2012).
- [22] Behera S. K., Mohanty M. E., Mohapatra M. A., Fluorescence Study of the Interaction of Anticancer Drug Molecule Doxorubicin Hydrochloride in Pluronic P123 and F127 Micelles, *Journal of Fluorescence* (2020).

- [23] Fülöp Z., Gref R., Loftsson T. A., Permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment, *International Journal of Pharmaceutics*, 454(1), 559–561 (2013).
- [24] Hao G., Xu Z. P., Li L., Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy, *RSC Advances*, 8(39), 22182–22192 (2018).

Santrauka

Rugilė Lukaševičiūtė

Boro nitrido nanodalelių ir doksorubicino kompleksų spektroskopiniai tyrimai

Dvidimensinės (2D) heksagoninės boro nitrido nanodalelės (h-BN) yra patrauklus kandidatas tikslinei vaistų pernašai vėžio gydyme. BN ir doksorubicino (DOX) kompleksų susidarymas gali sumažinti citotoksinį DOX poveikį jam cirkuliuojant kraujyje, o kompleksui pakliuvus į vėžinę ląstelę, fizikiniai ar cheminiai efektai paskatinti DOX paleidimą iš komplekso taip atstatant jo toksiškumą ir sukeliant vėžinės ląstelės žūtį [5].

Šio tyrimo tikslas yra paruošti stabilūs boro nitrido nanokompozitus su priešvėžiniu doksorubicinu ir ištirti šių kompleksų savybes spektroskopiniais metodais.

Darbo uždaviniai:

1. Susintetinti BN nanoklasterius ir juos charakterizuoti.
2. Paruošti stabilūs BN kompozitus su doksorubicinu.
3. Ištirti BN-DOX kompleksų optines savybes, jų susidarymo dinamiką ir stabilumą.

Šio darbo metu buvo sintetintos boro nitrido nanodalelės ir tiriamos jų optinės savybės. Dalelėms charakterizuoti buvo pasitelkta TEM mikroskopija, UV-VIS ir IR spektroskopija. Hidroterminiu būdu susintetintų BN dalelių vidutinis dydis yra apie 3,0 nm. Susintetinti BN kvantiniai taškai parodė stiprią mėlyną fluorescenciją UV spektriniame diapazone žadinant 375 nm spinduliuote. IR spektre stebimos heksagoniniam BN būdingos ir B-N, N-H ir O-H sugerties juostos. OH-grupės kvantinių taškų kraštuose sukuria didelį tirpumą vandenyje nepanaudojant jokių papildomų paviršiaus aktyvuojančių medžiagų. Tai svarbu tolimesniuose biomedicininuose pritaikymuose.

Susidarius BN-DOX kompleksams doksorubicino fluorescencija yra gesinama. Doksorubicino fluorescencijos intensyvumas ties 590 nm bangos ilgiu mažėja formuojantis kompleksams. Laisvas doksorubicinas stipriai fluorescuoja, bet patekęs į kompleksą yra imobilizuojamas ir jo fluorescencijos gesimo trukmės pailgėja.

Pirmas šešias valandas BN-DOX kompleksai formuojasi sparčiai ir susiformavę kompleksai yra aktyvūs. Pakeitus terpės pH (parūgštinus), fluorescencijos intensyvumas padidėja, nes kompleksai skyla ir padidėja laisvo DOX kiekis tirpale. Toliau einant laikui pradeda formotis kompleksų agregatai, kurie pakeičia fluorescencijos juostos formą. Kompleksai tampa neaktyvūs, jų fluorescencija nebeatsistato keičiant terpės pH.

Nustatyta, kad BN-DOX kompleksai yra gana stabilūs neutralioje terpėje. Tuo tarpu DOX yra efektyviai paleidžiamas iš komplekso labiau rūgštinėse terpėse, tokiose kurios yra aptinkamos vėžinėse ląstelėse.

Summary

Rugilė Lukaševičiūtė

Spectroscopic Properties of Boron Nitride Nanoparticles and Doxorubicin Complexes

Two-dimensional (2D) hexagonal boron nitride nanoparticles (h-BN) are very attractive candidates for drug delivery in cancer treatment. BN conjugation with doxorubicin (DOX) can reduce the cytotoxic effects of DOX in blood circulation. When the complex arrives at the cancer cell, the changes of physical or chemical effects can stimulate the release of DOX out of the complex and restore its cytotoxicity and cause the death of the tumor cell [5].

The purpose of this work is to synthesize stable hexagonal boron nitride complexes with doxorubicin and investigate their properties using spectroscopic methods.

Tasks:

1. Synthesize stable BN nanoparticles and characterize them.
2. Prepare stable dispersions of BN-DOX complexes.
3. Investigate optical properties of BN-DOX complexes, their formation dynamics, and stability.

In this work, BNQDs were synthesized via hydrothermal treatment and their optical properties were investigated. Synthesized BNQDs have been characterized using TEM, UV-Vis, and FT-IR spectroscopy. The studies confirmed the formation of stable BNQDs with an average size of 3 nm. The obtained BNQDs showed a strong blue fluorescence under UV light and exhibited emission at 375 nm excitation wavelength. FT-IR characterization confirmed the formation of BNQDs as indicated by functional groups such as B-N, N-H, and O-H. OH-groups on the edges provide high water-solubility of QDs without the usage of additional surfactants. Both features of synthesized BNQDs are extremely important for further biomedical applications.

The fluorescence of doxorubicin is quenched by the formation of BN-DOX complexes. The fluorescence intensity of doxorubicin decreases with complex formation at 590 nm. Free doxorubicin is highly fluorescent, but upon immobilization in the complex, its fluorescence lifespan is prolonged.

For the first six hours, BN-DOX complexes are formed rapidly, and they are active. As the pH of the medium changes to acidic, the fluorescence intensity increases as the complexes decompose and the amount of free DOX in the solution increases. As time goes on, aggregates begin to form, which changes the shape of the fluorescent band. The

complexes become inactive, and their fluorescence intensity does not recover after changing the pH value.

It was determined that BN-DOX complexes are quite stable in neutral pH values whereas, in slightly acidic solutions, found in the tumor cells, DOX is getting effectively released from the complex.