

УДК 547.535.36

СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ГАММА-АКТИВИРОВАННЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЦИНКА

И.Д. Федорец¹, Н.П. Хлапова¹, Н.П. Дикий², А.Н. Довбня², Е.П. Медведева²,
Ю.В. Ляшко², Н.С. Луцай¹, Д.В. Медведев², В.Л. Уваров²

¹Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина
61077, Харьков, пл. Свободы, 4

²Национальный научный центр «Харьковский физико-технический институт»
Украина, 61108, Харьков, ул. Академическая, 1
E-mail: fedorets@univer.kharkov.ua

Поступила в редакцию 20 сентября 2010г.

Проведена активация наночастиц оксида цинка тормозным γ -излучением на сильноточном электронном ускорителе ННЦ ХФТИ при энергии электронов 22 МэВ и токе 500 мкА. Методом рентгеновской дифрактометрии проведен анализ компонентно-фазового состава и состояния кристаллической структуры активированных и исходных наночастиц ZnO. Проанализированы особенности структурных превращений в γ -активированном ZnO и показано, что в структуре ZnO не произошло существенных изменений: активированные наночастицы оксида цинка сохраняют монофазность и кристалличность исходного состояния. Эффективность воздействия наночастиц ZnO на биообъекты проверялась на асцитных клетках карциномы Эрлиха. Показано, что наночастицы ZnO могут быть использованы в качестве действенного фактора, способного вызвать гибель опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наночастицы оксида цинка, ускоритель электронов, γ -активация, рентгеновская дифрактометрия, биообразцы.

STRUCTURE AND PROPERTIES OF GAMMA ACTIVATED NANOPARTICLES OF ZINC OXIDE
I.D. Fedorets¹, N.P. Khlapova¹, N.P. Dikiy², A.N. Dovbnya², E.P. Medvedeva², Yu.V. Lyashko², N.S. Lutsay¹,
D.V. Medvedev², V.L. Uvarov²

¹N.V.Karasin Kharkiv National University
Svobody sq. 4, Kharkiv, Ukraine, 61077

²National Scientific Center "Kharkiv Institute of Physics and Technology"
Akademicheskaya st. 1, Kharkiv, Ukraine, 61108

Activation of nanoparticles of magnetite is carried out by slowing-down γ - radiation on high-current electronic accelerator in NSC KIPT at energy of electrons 22 MeV and a current 500 μ A. The analysis of component-phase structure and state of crystal structure of activated and initial nanoparticles ZnO was carried out by X-ray diffractometry methods. The transformations have been analysed and it was shown that there were no essential changes in structure of ZnO: activated nanoparticles of magnetite keep monophasic state and crystallinity of initial state. To study influence nanoparticles ZnO on adenocarcinoma Ehrlich cells. It was demonstrated, that nanoparticles ZnO can be used as effect factor for destruction of adenocarcinoma Ehrlich cells.

KEY WORDS: nanoparticles oxide zinc, electron accelerator, gamma-activation, X-ray diffractometry, biological sample.

СТРУКТУРА І ВЛАСТИВОСТІ ГАММА-АКТИВОВАНИХ НАНОЧАСТИНОК ОКСИДУ ЦИНКУ
І.Д. Федорець¹, Н.П. Хлапова¹, М.П. Дикий², А.Н. Довбня², О.П. Медведева², Ю.В. Ляшко², Н.С. Луцай¹,
Д.В. Медведев², В.Л. Уваров²

¹Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
61077, Харків, пл. Свободи, 4

²Національний науковий центр «Харківський фізико-технічний інститут»
Україна, 61108, Харків вул. Академічна, 1

Проведена активація наночастинок оксиду цинку гальмівним γ -випромінюванням на потужнострумівому електронному прискорювачі ННЦ ХФТИ при енергії електронів 22 Мев і струмі 500 мкА. Методом рентгенівської дифрактометрії проведений аналіз компонентно-фазового складу і стану кристалічної структури активованих і початкових наночастинок ZnO. Проаналізовані особливості структурних перетворень в γ -активованому ZnO і показано, що в структурі ZnO не сталося істотних змін: активовані наночастинок оксиду цинку зберігають монофазність і кристалічність вихідного стану. Ефективність дії наночастинок ZnO на біооб'єкти перевірялася на асцитних клітинах карциноми Ерліха. Показано, що наночастинок ZnO можуть бути використані як дієвий чинник, здатний викликати загибель пухлинних кліток.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: наночастинок оксиду цинку, прискорювач електронів, γ -активація, рентгенівська дифрактометрия, біофракти.

Оксид цинка, благодаря огромному числу потенциальных областей применения, давно находится под пристальным вниманием. Это уникальный многофункциональный полупроводниковый материал с большой шириной запрещенной зоны (3,36 эВ) и материалы на его основе могут быть использованы в качестве компонентов газовых сенсоров, люминесцентных материалов, катализаторов, топливных элементов, полупроводниковых устройств и т.д. [1]. С другой стороны, ZnO - это амфотерный оксид, обладающий разнообразным воздействием на организм. Хорошо известно, что оксид цинка оказывает

© Федорець І.Д., Хлапова Н.П., Дикий М.П., Довбня А.Н., Медведева О.П., Ляшко Ю.В., Луцай Н.С.,
Медведев Д.В., Уваров В.Л., 2010

противовоспалительное и адсорбирующее действие. Во многих лекарственных препаратах ZnO является ведущим компонентом, а в ряде комплексных дерматологических и косметических препаратах - основной составляющей.

Следует отметить, что в последние годы наблюдается возрастающий интерес к наноматериалам на основе оксида цинка. Альтерации электрических, магнитных, структурных, морфологических, химических и физических параметров в наноматериале ZnO, по размерам сопоставимым с природными биомолекулами, делает его чрезвычайно востребованным для новых приложений и в технических и биологических областях [2]. Так, наноструктурированный ZnO оказался идеальным материалом для нанооптоэлектроники и пьезоэлектрических наногенераторов [3]. Благодаря своим оптическим свойствам – прозрачности, отражающей и рассеивающей способности в видимом диапазоне и абсорбированию УФ - излучения наноразмерные частицы ZnO – уже успешно используются в косметике и в качестве биосенсоров [2]. Наряду с этим всесторонне исследуется возможность использования этого наноматериала в биологических приложениях следующего поколения, включая антимикробные агенты, доставку лекарства, воспроизведение изображения при зондировании и лечение рака [4, 5]. Заметим, что наноматериалы оксида цинка, как и нанокристаллические оксиды других металлов (CaO, MgO, TiO₂ и др.), могут быть препарированы с чрезвычайно высокой площадью поверхности и максимально соответствуют для биологических приложений. Есть сообщения о повышенной антибактериальной активности наноразмерного ZnO, которая приписывается генерации большой поверхностью наночастиц большого числа химически активных кислородосодержащих соединений [5]. К большим достоинствам этих наноматериалов, по сравнению с органическими антибактериальными средствами, относятся большая долговечность, меньшая токсичность, лучшая избирательность и термостойкость.

В качестве антимикробного средства, такие полупроводниковые материалы, как ZnO и TiO₂, на протяжении последних лет экстенсивно изучаются благодаря их фотокаталитической активности, возбуждаемой УФ-светом [6,7]. Однако, несмотря на то, что о биологической активности ZnO представлено достаточно много исследований, большинство из них касается антимикробного эффекта объемного ZnO с большим размером частиц. Результаты одного из немногих исследований [8], посвященных изучению бактериальной активности ZnO с различными размерами частиц в диапазоне 0.1-1мкм, ясно показывают, что наночастицы ZnO и качественно и количественно демонстрируют лучшие антибактериальные свойства, чем ZnO с размером частиц в 1мкм. Кроме этого, авторы [8] также отмечают, что наноразмерный ZnO, являясь намного более эффективным антимикробным средством, по сравнению с объемным ZnO, обнаруживает интенсивное воздействие даже в том случае, когда применяется в очень небольших количествах. Как нам известно, это - первое систематическое исследование, в котором наноразмерные и объемные частицы ZnO сравнивались относительно инактивации/деструкции бактерий. С учетом перспективности применения наноразмерных материалов оксида цинка особый интерес представляет разработка методов их контролируемой активации для создания структур с заданными свойствами.

Цель настоящей работы заключалась в изучении оптимальных условий получения гамма-активированного нанопорошка ZnO и рассмотрение возможности его использования в качестве противоопухолевого препарата.

Для активации образцов оксида цинка использовалось тормозное γ -излучение линейного ускорителя электронов ННЦ ХФТИ. Определение содержания примесных элементов в наночастицах оксида цинка выполнено при помощи гамма-спектрометрии. Экспериментальные данные о фазовом составе и кристаллической структуре ZnO исследовали с помощью рентгеновской дифрактометрии. Показано, что наноразмерные образцы оксида цинка после воздействия тормозного γ -излучения сохраняют высокий уровень кристаллическости и монофазность. Эффективность воздействия наночастиц ZnO на биообъекты проверяли на асцитных клетках карциномы Эрлиха. Полученные результаты предполагают, что наночастицы ZnO могут быть использованы в качестве одного из возможных факторов, способных вызвать гибель опухолевых клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТ

В качестве исходных материалов использовали порошки с размерами частиц в микро- и нано- диапазоне оксида цинка фирмы Sigma-Aldrich (Product of USA). Для активации образцов ZnO использовалось тормозное γ -излучение линейного ускорителя электронов ННЦ ХФТИ с энергией электронов 22 МэВ и током 500 мкА. Спектр γ -излучения регистрировался Ge(Li)-детектором с энергетическим разрешением 3,25 кэВ по линии 1333 кэВ. Активация образцов проводилась на воздухе, температура образцов в процессе активации не превышала 35°C. Максимальная поглощенная доза при γ -облучении ($E_\gamma \sim 1,5-2$ МэВ) ZnO составила ~ 20 МГр. Исходные и γ -облученные порошки ZnO исследовались методом порошковой рентгеновской дифракции. Спектры регистрировались на дифрактометре ДРОН-2 на медном излучении ($\lambda_{CuK\alpha} = 1,54178 \text{ \AA}$) при напряжении 30 кВ и токе 10 мА. Сканирование осуществлялось в диапазоне углов от 20 до 120° при скорости сканирования 1°/мин. Присутствие кристаллической фазы ZnO определяли сравнением полученных результатов съемки рентгеновских дифрактограмм исследуемых образцов с результатами съемки эталонных образцов ZnO с использованием базы данных JCPDS. Полученные дифрактограммы обрабатывались прямым методом по программе Fituk. Кристаллическость образцов оценивали по сумме площадей выбранных пиков. Эксперименты по изучению влияния наночастиц ZnO на жизнеспособность биообъектов проводились на

асцитных клетках карциномы Эрлиха. Концентрация клеток составляла $1.8 \cdot 10^6$ кл/мл, жизнеспособность – 80%. Были приготовлены две концентрации раствора ZnO (5 и 12 мг/л) в растворе гелофузина (100 мг/л) - для улучшения биосовместимости и стабилизации коллоидных растворов. В течение 5 мин. проведены сонификация (100 ± 6 кГц) и продолжительное вращательное перемешивание на шейкере (S-3.02.10M) этих растворов для предотвращения агломерации и седиментации наночастиц. Приготовленные суспензии ZnO были инкубированы с опухолевыми клетками в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов. В каждую пробу вводилось 0,03 мл пенициллина (180 ед/мл) и 0,03 мл стрептоцида (~300 мкг). После инкубации пробы трижды промывались деионизованной водой. Для контроля использовали опухолевые клетки без наночастиц ZnO, подвергнутые аналогичным манипуляциям. Оценку жизнеспособности опухолевых клеток проводили с помощью красителя - трипанового синего - в камере Горяева под микроскопом МББ-1. Подсчет клеток проводили через 5 минут после добавления красителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен γ -спектр образца нанопорошка оксида цинка.

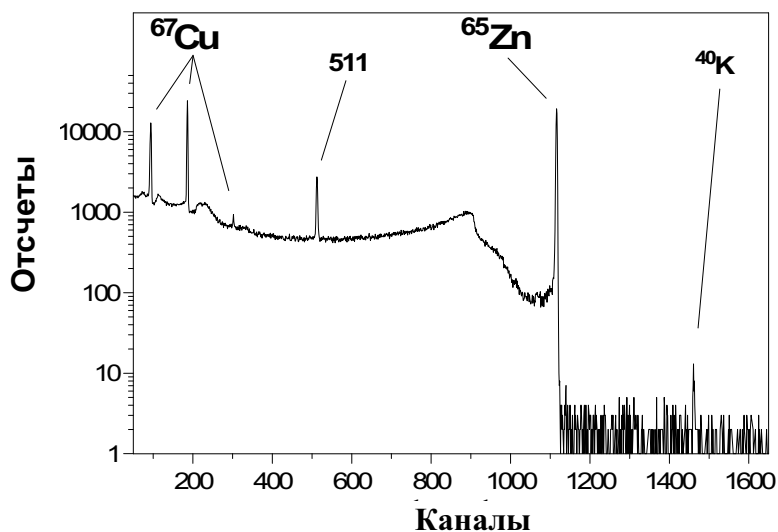


Рис.1. γ -спектр образца нанопорошка ZnO через 9 дней после активации на ЛУЭ. Ge(Li) детектор с $V=50\text{см}^3$ и разрешением $3,25\text{кэВ}$ по 1333кэВ линии ^{60}Co

Как видно из рис. 1, в γ -спектре оксида цинка, наряду с характерными для Zn γ -линиями из реакции $^{66}\text{Zn}(\gamma, n)^{65}\text{Zn}$ (наиболее интенсивная линия $1115,5$ кэВ), дополнительно наблюдаются и линии изотопа меди $^{68}\text{Zn}(\gamma, p)^{67}\text{Cu}$ (линии с энергией $93, 184,5, 300$ кэВ, соответственно).

На рис.2 (кривые *a, б, в, г*) представлены дифрактограммы порошков оксида цинка в исходном состоянии и после облучения. Вид этих дифрактограмм - характер расположения интерференционных максимумов, их ширина и интенсивность - указывают на высокую кристалличность исследуемых образцов.

На всех спектрах рис. 2 можно наблюдать, характерные для монофазного оксида цинка дифракционные максимумы – группу из трех интенсивных пиков в начале спектра при брэгговских углах $2\theta = 31,7; 34,4$ и $36,2^\circ$, небольшой пик при $2\theta = 47,6^\circ$ и три пика средней интенсивности, отстоящих друг от друга на небольшом расстоянии при $2\theta = 56,6; 62,9$ и $68,2^\circ$. Действительно, форма и расположение дифракционных максимумов на рентгенограммах, являются характерными для кристаллических плоскостей оксида цинка гексагональной структуры с периодами решетки $a = 3,25 \text{ \AA}$, $c = 5,21 \text{ \AA}$. Показанная вдоль оси X линейчатая диаграмма из справочных данных для фазы цинкита ZnO (JCPDS, 36-1451) полностью индексируются с экспериментальными данными. Никаких пиков, относящихся к какой-либо другой фазе ZnO или примеси, не наблюдалось, что указывает на высокую чистоту исследуемых порошков ZnO. Отметим, что в образцах ZnO не обнаружено присутствие и металлического цинка - пик, соответствующий дифракции на кристаллической структуре цинка, обычно наблюдается при $2\theta = 44,5^\circ$.

В соответствии с проведенным РСА - анализом установлено, что содержание кристаллической фазы ZnO в порошках составляет примерно 99%.

Анализируя рентгенограммы образцов ZnO до и после воздействия γ -излучения, особо следует отметить факт их близкого сходства. При сравнении спектров на рис. 2 (кривые *a, б, в* и *г*) не обнаружено ни сдвигов максимумов, ни искажений их формы. Однако при более детальном анализе были замечены небольшие различия в рассматриваемых дифрактограммах, связанные с изменением интенсивности линий некоторых базисных отражений. Поскольку более отчетливо эти изменения наблюдаются в спектрах нанопорошков ZnO,

на рис. 3 показаны фрагменты рентгенограмм этих образцов в диапазоне углов от 20 до 80°.

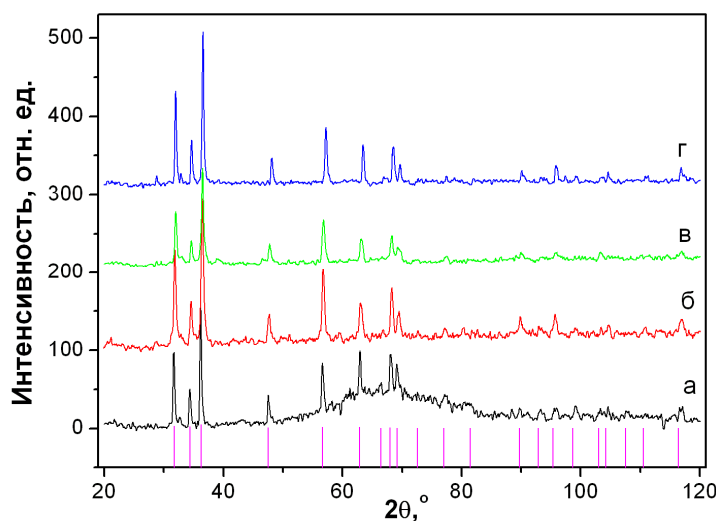


Рис.2 Дифрактограммы оксида цинка в исходном состоянии и после облучения до поглощенной дозы 20 МГр
а,г - микрочастицы ZnO до и после облучения, б,в - наночастицы ZnO до и после облучения

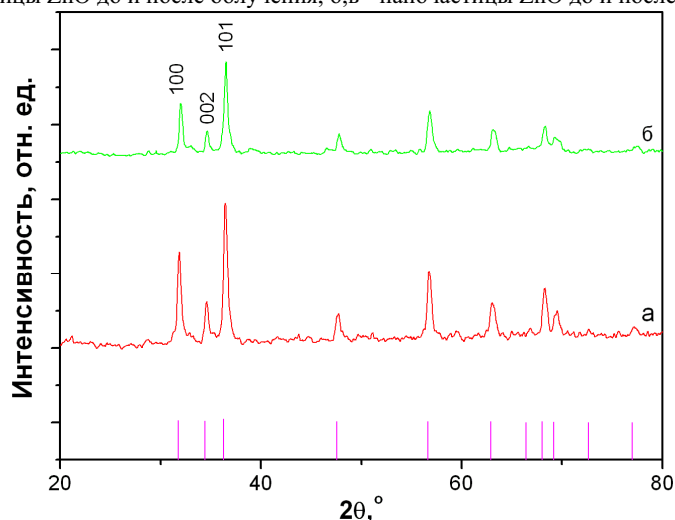


Рис.3. Дифрактограммы наночастиц ZnO в исходном состоянии и после облучения до поглощенной дозы 20 МГр
а, б - наночастицы ZnO до и после облучения

Как видно из рис. 3, после облучения нанопорошков ZnO наблюдается понижение интенсивностей всех трех пиков в начале спектра $2\theta = 31,7; 34,4$ и $36,2^\circ$, а также пика при $2\theta = 47,6^\circ$. При этом наиболее значительное уменьшение интенсивности - почти 1,3 раза - наблюдается в максимуме при $2\theta = 34,4^\circ$. По характеру наблюдаемых изменений, можно утверждать, что замеченное уменьшение интенсивности интерференционных линий может быть следствием частичного искажения кристаллической решетки ZnO, в частности, в результате смещения атомов из идеальных положений.

Далее, для определения значений общих уширений в спектре наноразмерного оксида цинка было проведено математическое описание дифракционных максимумов (100), (002) и (102) и по формуле Шеррера проведен расчет размеров областей когерентного рассеяния (ОКР):

$$L = 0,9\lambda / B \cos \theta,$$

где λ — длина волны рентгеновского излучения (0,154056 нм), B — физическое уширение дифракционного максимума (в единицах радиан), θ — положение дифракционного пика. По результатам расчета средний размер ОКР тестируемого нанопорошка ZnO составил ~ 57 нм. Следует отметить, что практически определить размеры ОКР по формуле Шеррера можно в пределах от ~ 1500 - 2000 Å до 15 - 20 Å, причем в различных кристаллографических направлениях (используя линии с разными индексами). Однако этот метод является достаточно приближенным, с точностью до аппроксимационных функций, и значения L могут отличаться в 1,5-2 раза. Более корректным считается определение относительных изменений дисперсности частиц в зависимости от какого-либо фактора. В связи с этим, нами были определены относительные изменения размеров ОКР в

нанопорошке оксида цинка после его облучения. Согласно соотношению Шеррера, ширина пиков обратно пропорциональна размерам кристаллитов и структура спектров, представленных на рис.3, позволяет оценить изменения в дисперсности нанопорошка ZnO. Так, сравнение пиков при $2\theta = 31,7; 34,4$ и $36,2^\circ$ до и после облучения свидетельствует об их небольшом сужении, и указывает, таким образом, на уменьшение дисперсности нанопорошка ZnO после облучения. Однако по результатам расчета изменение размеров ОКР в нанопорошке оксида цинка после облучения не превысили 10%. Несколько больший размер ОКР нанопорошка оксида цинка, подвергнутого облучению, может быть объяснен тем, что при облучении возможно возникновении локальных микронапряжений и, как следствие деформирование кристаллитов.

Таким образом, можно утверждать, что облучение нанопорошков ZnO, хотя и вносит некоторую дефектность в структуру ZnO, однако не приводит ни к изменению фазового состава, ни к разрушению кристаллической структуры материала.

Эксперименты по изучению влияния наночастиц оксида цинка на жизнеспособность асцитных клеток карциномы Эрлиха проводились с использованием двух концентраций раствора ZnO (5 и 12 мг/л). Жизнеспособность клеток ($C = 1,8 \cdot 10^6$ кл/мл) до тестирования составляла 80%. Оценка жизнеспособности опухолевых клеток после инкубации суспензий наночастиц ZnO с опухолевыми клетками при температуре 37°C в течение 24 часов, показала, что количество жизнеспособных клеток, проинкубированных с суспензией наночастиц ZnO (5 и 12 мг/л) составило 73% и 41%, соответственно, относительно контроля. Полученные результаты предполагают, что наночастицы ZnO могут быть использованы в качестве действенного фактора, способного вызвать гибель опухолевых клеток. Полные данные о влиянии γ -активированных образцов ZnO на жизнеспособность клеток будут представлены в отдельной публикации.

ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования мощных пучков электронов для активации наночастиц оксида цинка тормозным γ -излучением на сильноточном электронном ускорителе ННЦ ХФТИ с энергией электронов 22 МэВ и током 500 мкА.

2. Методом рентгеновской дифрактометрии проведен сравнительный анализ фазового состава и состояния кристаллической структуры образцов ZnO до и после гамма-активации. Показано, что образцы оксида цинка, исходные и после воздействия тормозного γ -излучения, представляют собой поликристаллический монофазный оксид цинка и содержат дифракционные пики, характерные для кристаллических плоскостей оксида цинка гексагональной структуры с периодами решетки $a = 3,25 \text{ \AA}$, $c = 5,21 \text{ \AA}$.

3. Проведено тестирование эффективности воздействия наночастиц ZnO на жизнеспособность асцитных клеток карциномы Эрлиха. Полученные результаты показывают, что наночастицы ZnO могут быть использованы в качестве одного из возможных факторов, способного вызвать гибель опухолевых клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузьмина И.П., Никитенко В.А. Оксид цинка. Получение и оптические свойства. – М.: Наука, 1984. – 203 с.
2. Padmavathy N. and Vijayaraghavan R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study // *Sci. Technol. Adv. Mater.* – 2008. – Vol. 9. – P. 1-7.
3. Song J., Zhou J. and Wang Z.L. Piezoelectric and Semiconducting Coupled Power Generating Process of a Single ZnO Belt/Wire // *Nano Lett.* . – 2006. – Vol. 6. – P. 1656.
4. Wang Z.L. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications // *J. Phys.: Condens. Matter.* – 2004. – Vol. 16. – P.829-858.
5. Hanley C., Thurber A., Hanna C. et. al. The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1409-1421.
6. Hajime D. Morphologies of zinc oxide particles and their effects on photocatalysis // *Chemosphere.* – 2003. – Vol. 51. – P.129.
7. Banerjee S., Copal J., Muraleedharan P. et. al. Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide // *Current Science* – 2006. – Vol.90. – P. 1378 – 1383.
8. Yamamoto O. Influence of particle size on the antibacterial of zinc oxide // *Int. J. Inorg. Mater.* – 2001. – Vol.3. – P. 643-646.