Письма в ЖЭТФ, том 107, вып. 4, с. 237 – 241

Влияние структуры оболочки полупроводниковых квантовых точек на тушение их флуоресценции акридиновым лигандом

П. А. Линьков[+*1)], *К. В. Вохминцев*[+], *П. С. Самохвалов*[+], *М. Ларонз-Кохар*[#2)], *Я. Сапи*[#2)], *И. Р. Набиев*[+*]

[+]*Национальный исследовательский ядерный университет "МИФИ" 115409 Москва, Россия*

[*]*Laboratory of Research in Nanosciences, LRN - EA4682, University of Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France*

[#]*Institute of Molecular Chemistry of Reims, Faculty of Pharmacy, University of Reims Champagne-Ardenne, 51100 Reims, France*

Поступила в редакцию 21 декабря 2017 г.

Основным направлением развития современных методов лечения рака является разработка методов ранней диагностики и адресной доставки лекарственных препаратов к раковым клеткам. Конъюгаты, представляющие собой флуоресцентные (ФЛ) полупроводниковые нанокристаллы "квантовые точки" (КТ) типа ядро/оболочка (например, CdSe/ZnS), связанные с противоопухолевым препаратом, например, акридинового ряда, позволяют наблюдать и контролировать процесс его доставки к опухоли в режиме реального времени. Однако при связывании производных акридина с КТ может происходить тушение ФЛ квантовых точек, вызванное переносом электрона от КТ к органической молекуле. В настоящей работе показано, что структура оболочки КТ играет определяющую роль в процессе фотоиндуцированного переноса заряда от КТ к акридиновому лиганду, вызывающего тушение ФЛ КТ. Показано, что оболочки CdSe-ядер КТ, имеющие многокомпонентную структуру ZnS/CdS/ZnS, при своей относительно небольшой толщине, позволяют в значительной степени подавлять снижение квантового выхода ФЛ квантовых точек, по сравнению как с классической тонкой оболочкой ZnS, так и со сверхтолстыми оболочками этого состава. Таким образом, КТ типа "ядро/многокомпонентная оболочка" со структурой CdSe/ZnS/CdS/ZnS могут стать оптимальными ФЛ-метками для создания систем диагностики и лечения рака при использовании противоопухолевых соединений на основе производных акридина.

DOI: 10.7868/S0370274X18040069

1. Введение. Нанотехнологии открывают широкие возможности применения новых материалов в биомедицине [1, 2]. В настоящее время, одним из наиболее перспективных направлений методов лечения злокачественных опухолей является разработка наноразмерных систем ранней диагностики и адресной доставки лекарственного препарата к опухолевым клеткам [3, 4]. Связывание флуоресцентного (ФЛ) визуализирующего агента с распознающей биомаркер молекулой, связанной, в свою очередь, с фармакологическим агентом, позволяет проследить процесс доставки лекарственного соединения к опухоли в режиме реального времени. Квантовые точки (КТ) – это полупроводниковые ФЛ-нанокристаллы (НК) с уникальными параметрами: длиной волны излучения, определяемой размером кристалла; высокой яркостью излучения; способностью сохранять свои оптические свойства в течение долгого времени и отсутствием фотообесцвечивания [5, 6]. Поэтому водорастворимые КТ, покрытые гидрофильными органическими лигандами для обеспечения стабильности и монодисперсности, могут использоваться в биомедицине в качестве эффективных ФЛ-меток для контроля доставки лекарственных препаратов в режиме реального времени [7], а также мониторинга результатов лечения [8].

Гетероциклические азотсодержащие молекулы, такие как производные акридина [9], проявляют сродство к G-квадруплексам – плоским структурам, образуемым однонитевыми теломерными нуклеотидными последовательностями с высоким содержанием гуанина [9], расположенным на обоих концах молекулы ДНК и защищающим хромосому от повреждения [10]. Ранее было показано, что 4,5,9-трехзамещенное производное акридина способно избирательно связываться с G-квадруплексом и эффективно стабилизировать структуру теломера [9, 11], тем самым предотвращая потерю концевой части хромосомы и злокачественное перерождение клеток. Таким образом, акридиновые производные могут использоваться в качестве фармакологической составляющей многофункционального нанозонда на основе его конъюгата с полупроводниковыми

1)e-mail: valinkov@gmail.com
2)M. Laronze-Cochard, J. Sapi

КТ. Однако акридиновые лиганды (АЛ), вследствие своей полиароматической структуры, являются эффективными акцепторами заряда. Известно, что положения энергетических уровней ВЗМО и НСМО 4,5-замещенных производных акридина [12] сравнимы с положениями соответствующих орбиталей полупроводниковых НК [13], что позволяет использовать акридиновые производные в качестве дырочно-транспортного материала при создании перовскитных солнечных элементов [12] и светодиодов [14]. С другой стороны, такой перенос заряда, а именно фотоиндуцированный перенос электронов (ФИПЭ) с квантовой точки на акридин, вызывает тушение ФЛ КТ [15, 16] в ее конъюгате с производным акридина [16]. Данное обстоятельство препятствует использованию акридиновых производных в нанозондах на основе КТ.

В настоящей работе мы подошли к решению этой проблемы с точки зрения исследования влияния структуры и толщины неорганической оболочки КТ с ядром, состоящим из CdSe, на степень тушения ФЛ КТ производным акридина. Для изучения этого явления были синтезированы КТ с ядрами CdSe, покрытыми оболочками различной толщины, состоящими из различных материалов (CdS, ZnS), и проведена серия экспериментов по сравнению степени тушения ФЛ КТ акридиновыми лигандами.

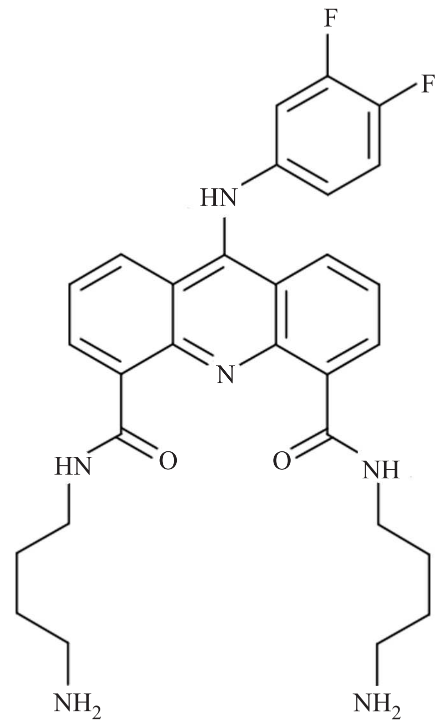

Рис. 1. Структурная формула молекулы акридинового лиганда

2. Материалы и методы. По описанному в работе [9] модифицированному методу было получено из акридина 4,5,9-замещенное производное акридина (рис. 1). Молекулярная структура полученного производного была подтверждена с помощью масс-спектрометрии (MSQ ThermoFinnigan). Оптические характеристики полученного вещества, спектры поглощения и ФЛ приведены на рис. 2a, b.

Синтез КТ с оболочками различной структуры проходил в две стадии. На первой стадии проводился синтез ядер CdSe по методу "горячего впрыска" в растворителе с высокой температурой кипения (1-октадецен). На второй стадии на очищенные и предварительно обработанные ядра [17] наносились оболочки различного типа методом последовательной адсорбции и реакции слоев ионов (SILAR) [18]. Этот метод позволяет с максимальной точностью, последовательно, наращивать заданное число слоев оболочки. В настоящей работе ядра CdSe покрывали следующими типами оболочек: обычная оболочка ZnS толщиной три монослоя (МС), "гигантская" оболочка ZnS толщиной в пять МС, и многокомпонентная оболочка (multishell – MS) ZnS/CdS/ZnS общей толщиной три монослоя. Первый из перечисленных типов – это "классическая" однокомпонентная оболочка с широкой запрещенной зоной. Толщина в три монослоя обеспечивает достаточную локализацию носителей заряда в ядре даже в полярных средах. "Гигантская" оболочка позволяет подавить рекомбинацию Оже и, таким образом, избежать значительных потерь энергии на безызлучательные процессы и свести к минимуму прерывистость (мерцание) ФЛ одиночных НК [19, 20]. Как было показано ранее [21], MS обеспечивает высокую степень локализации зарядов внутри ФЛ ядра при сравнительно небольшой толщине оболочки.

Водорастворимые КТ были получены заменой исходных гидрофобных лигандов на поверхности свежеприготовленных КТ смесью тиоловых производных полиэтиленгликоля (SH-ПЭГ), содержащих гидроксильные и карбоксильные функциональные группы (SH-ПЭГ-OH и SH-ПЭГ-COOH соответственно) в соотношении 9:1. Спектры поглощения и ФЛ синтезированных образцов КТ, диспергированных в фосфатном буфере, показаны на рис. 2a, b.

В проведенных экспериментах пробы растворов КТ каждого типа с концентрацией 1 мкмоль/л, содержащие ~ 1 нмоль КТ, титровали раствором АЛ (1.87 мкмоль/л) в фосфатном буфере (0.05 моль/л, pH 8.0). Пример кинетики тушения ФЛ КТ "ядро/оболочка" с ядром CdSe и многокомпонентной

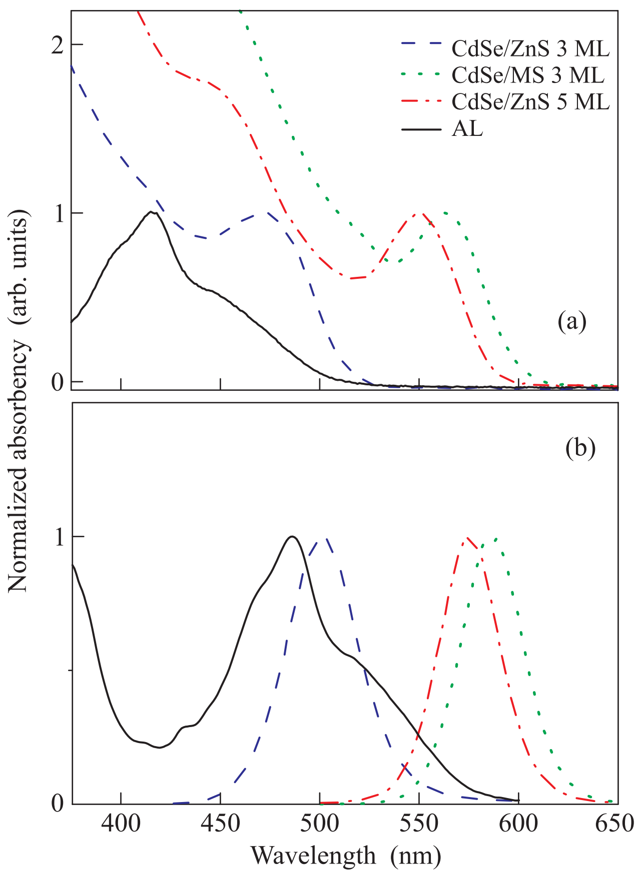

Рис. 2. (Цветной онлайн) Спектры поглощения (a) и флуоресценции (PL) (b) акридинового лиганда (AL) и образцов высоколюминесцентных квантовых точек типа "ядро/оболочка" на основе ядер из CdSe с оболочками разной структуры и состоящими из разного количества монослоев (ML)

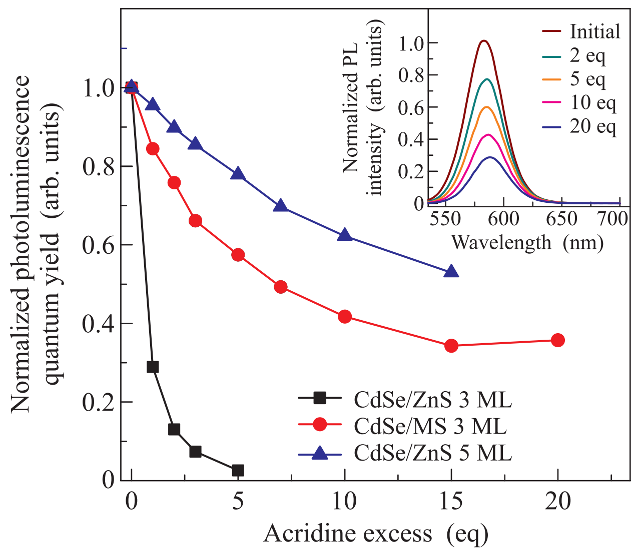

Рис. 3. (Цветной онлайн) Кинетика тушения флуоресценции (PL) различных КТ с увеличением количества добавленного акридинового лиганда (AL). На вставке – кинетика тушения ФЛ КТ с ядром CdSe и с оболочкой CdSe/ZnS/CdS/ZnS различными количествами акридинового лиганда

оболочкой ZnS/CdS/ZnS при титровании их раствора раствором АЛ показан на вставке рис. 3.

3. Результаты и обсуждение. Известно, что полосы поглощения АЛ в спектральной области от 300 до 450 нм связаны с π–π переходами сложной π-конъюгированной системы акридина [22]. Спектры поглощения и флуоресценции АЛ в водном растворе (см. рис. 2) имели максимумы на длинах волн 417 нм (первого экситонного перехода) и 487 нм соответственно, и демонстрировали большой стоксов сдвиг – 70 нм. Водные растворы КТ (рис. 2) имели следующие максимумы поглощения и ФЛ: CdSe/ZnS (3 МС) – 503 и 472 нм, CdSe/ZnS (5 МС) – 572 и 551 нм, CdSe/MS (3 МС) – 584 и 563 нм соответственно. Полная ширина полосы спектра эмиссии ФЛ на полувысоте ее максимума составляла около 40 нм, что говорит о гомогенности исследованных ансамблей КТ. Присутствие некоторого количества карбоксильных групп на поверхности КТ создавало небольшой отрицательный поверхностный заряд (примерно, -10 мВ), который препятствовал агрегации КТ. Гидродинамический размер КТ в фосфатном буфере (0.05 моль, pH 8.0), определяли методом динамического рассеяния света (Malvern Zetasizer Nano ZS). Данная величина находилась в диапазоне приблизительно 10–12 нм, в зависимости от типа квантовых точек, что подтверждает монодисперсность КТ в растворе [6].

Физический диаметр неорганической части КТ (который был рассчитан исходя из размера ядра и толщины оболочки, теоретически предсказанной на основе кристаллографических данных и подробных структурных моделей КТ) был равен 4.3, 7 и 5 нм для КТ CdSe/ZnS (3 МС), CdSe/ZnS (5 МС) и CdSe/MS (3 МС) соответственно. Диаметр ядра CdSe был определен из эмпирической калибровочной зависимости между положением первого экситонного перехода в спектре поглощения света и размером КТ [23].

Титрование раствора КТ раствором АЛ приводило к тушению ФЛ всех изученных КТ. Флюоресценция стандартных КТ CdSe/ZnS ($d \approx 4.3$ нм) с оболочкой из трех монослоев полностью подавлялась при добавлении всего лишь 4-х молярных эквивалентов акридина, тогда как ФЛ КТ с "гигантской" (5 МС) оболочкой ZnS ($d \approx 7$ нм) и MS (ZnS/CdS/ZnS) об-

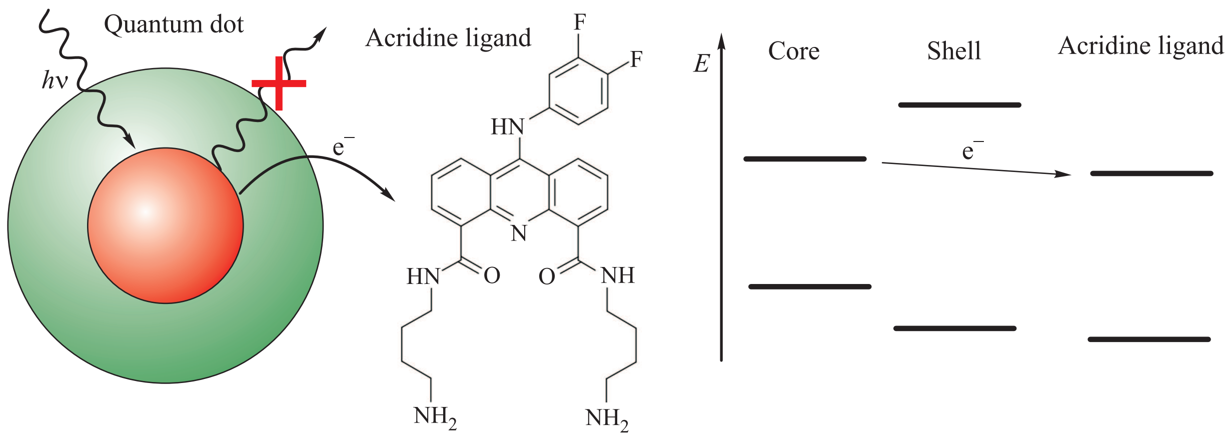

Рис. 4. (Цветной онлайн) Схема механизма фотоиндуцированного переноса электрона от квантовой точки типа "ядро/оболочка" к молекуле акридинового лиганда

щей толщиной 3 монослоя ($d \approx 5$ нм) [24] подавлялась в меньшей степени, даже когда соотношение акридин/КТ достигало 35. Таким образом, и MS, и "гигантская" оболочка обеспечивают более эффективную локализацию возбужденных носителей заряда в ядре КТ от тушащих ФЛ лигандов, чем "классическая" оболочка ZnS. Однако КТ с MS имеют значительно меньший размер, и поэтому предпочтительны в качестве компонентов нанозондов, обеспечивая их лучшее проникновение внутрь клеток.

Перенос заряда от КТ к молекулам лиганда создает на самих КТ заряд и, как следствие, тушит их ФЛ. Мы предполагаем, что в исследуемой системе такое тушение вызвано переносом электронов с КТ на АЛ, который возможен благодаря близости энергетических уровней НСМО этих материалов. Предполагаемый механизм ФИПЭ от КТ типа "ядро/оболочка" к АЛ схематически показан на рис. 4. Уровень НСМО АЛ немного ниже, чем у ядра КТ, состоящего из CdSe, т.е. энергетическое строение молекулы АЛ благоприятствует захвату электрона КТ, появлению заряда КТ и тушению ФЛ. Однако вероятность ФИПЭ различна для КТ с разной структурой оболочки, поскольку у каждого типа оболочки свои энергетический барьер и длина туннелирования электрона. В случае трехслойной "классической" оболочки ZnS, энергетический барьер достаточно высок, чтобы защитить ядро из CdSe от внешних воздействий, но не препятствует ФИПЭ, если он энергетически выгоден, как в нашем случае. У "гигантской" пятислойной оболочки ZnS высота барьера примерно такая же, но длина туннелирования электрона больше. Поэтому интенсивность ФИПЭ в этих КТ гораздо ниже. Что касается КТ CdSe/MS, при достаточно малой толщине внутренней оболочки ZnS/CdS/ZnS реализуется квантово-размерный эффект в монослоях оболочки, который приводит к усилению локализации заряда, по сравнению с толстой оболочкой ZnS, и снижению вероятности ФИПЭ. Полученные данные показывают, что предложенный нами подход к увеличению локализации заряда путем создания многокомпонентной структуры оболочки ZnS/CdS/ZnS позволяет эффективно подавлять ФИПЭ от квантовой точки к противоопухолевому лиганду акридинового ряда и, таким образом, подавлять тушение ФЛ КТ и сохранять их флуоресцентные свойства.

4. Заключение. В настоящей работе показано, что структура оболочки КТ играет ключевую роль при разработке нанозондов, содержащих флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы, квантовые точки и производные акридина. Разработанная нами многокомпонентная структура оболочки КТ (ZnS/CdS/ZnS) позволяет существенно подавить тушение ФЛ, вызванное ФИПЭ, при достаточно малой толщине оболочки. Полученные результаты открывают перспективу создания высокоэффективных наноразмерных конъюгатов для адресной доставки противоопухолевых препаратов, состоящих из КТ типа "ядро/многокомпонентная оболочка" CdSe/ZnS/CdS/ZnS и связанных с ними лекарственных соединений на основе производных акридина, способных проникать в клетки и внутриклеточные компартменты, при сохранении своего высокого квантового выхода флуоресценции, что обеспечивает возможность контроля процесса доставки лекарств и мониторинга результата лечения.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант # 16-34-60253 мол_а_дк) и Реймского университета региона Шампань-Арденны (Франция). Мы благодарим Владимира Ушакова за помощь в подготовке данной статьи.

1. J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, and R. Langer, Nano Lett. **10**, 3223 (2010).
2. A. Sukhanova, K. Even-Desrumeaux, A. Kisserli, T. Tabary, B. Reveil, J.-M. Millot, P. Chames, D. Baty, M. Artemyev, V. Oleinikov, M. Pluot, J. H. M. Cohen, and I. Nabiev, Nanomedicine **8**, 516 (2012).
3. R. Bilan, F. Fleury, I. Nabiev, and A. Sukhanova, Bioconjug. Chem. **26**, 609 (2015).
4. D. Dovzhenko, E. Osipov, I. Martynov, P. Linkov, and A. Chistyakov, Phys. Procedia **73**, 126 (2015).
5. P. Samokhvalov, M. Artemyev, and I. Nabiev, Chem. – Eur. J. **19**, 1534 (2013).
6. P. Linkov, M. Artemyev, A. E. Efimov, and I. Nabiev, Nanoscale **5**, 8781 (2013).
7. J.-Y. Zhao, G. Chen, Y.-P. Gu, R. Cui, Z.-L. Zhang, Z.-L. Yu, B. Tang, Y.-F. Zhao, and D.-W. Pang, J. Am. Chem. Soc. **138**, 1893 (2016).
8. K. D. Wegner and N. Hildebrandt, Chem. Soc. Rev. **44**, 4792 (2015).
9. M. Laronze-Cochard, Y.-M. M. Kim, B. Brassart, J.-F. F. Riou, J.-Y. Y. Laronze, and J. Sapi, Eur. J. Med. Chem. **44**, 3880 (2009).
10. S. Müller, S. Kumari, R. Rodriguez, and S. Balasubramanian, Nat. Chem. **2**, 1095 (2010).
11. A. Artese, G. Costa, S. Distinto, F. Moraca, F. Ortuso, L. Parrotta, and S. Alcaro, Eur. J. Med. Chem. **68**, 139 (2013).
12. A.-N. Cho, N. Chakravarthi, K. Kranthiraja, S. S. Reddy, H.-S. Kim, S.-H. Jin, and N.-G. Park, J. Mater. Chem. A **5**, 7603 (2017).
13. J. Jasieniak, M. Califano, and S. E. Watkins, ACS Nano **5**, 5888 (2011).
14. A. Islam, P. Murugan, K. C. Hwang, and C.-H. Cheng, Synth. Met. **139**, 347 (2003).
15. V. A. Krivenkov, D. O. Solovyeva, P. S. Samokhvalov, R. S. Grinevich, K. I. Brazhnik, G. E. Kotkovskii, E. P. Lukashev, and A. A. Chistyakov, Laser Phys. Lett. **11**, 115601 (2014).
16. J. Bang, J. Park, R. Velu, E. Yoon, K. Lee, S. Cho, S. Cha, G. Chae, T. Joo, and S. Kim, Chem. Commun. **48**, 9174 (2012).
17. P. Linkov, K. V Vokhmintcev, P. S. Samokhvalov, and I. Nabiev, Opt. Spectrosc. **122**, 8 (2017).
18. J. J. Li, Y. A. Wang, W. Guo, J. C. Keay, T. D. Mishima, M. B. Johnson, and X. Peng, J. Am. Chem. Soc. **125**, 12567 (2003).
19. Y. Chen, J. Vela, H. Htoon, J. L. Casson, D. J. Werder, D. A. Bussian, V. I. Klimov, and J. A. Hollingsworth, J. Am. Chem. Soc. **130**, 5026 (2008).
20. N. Razgoniaeva, P. Moroz, M. Yang, D. S. Budkina, H. Eckard, M. Augspurger, D. Khon, A. N. Tarnovsky, and M. Zamkov, J. Am. Chem. Soc. **139**, 7815 (2017).
21. P. Samokhvalov, P. Linkov, J. Michel, M. Molinari, and I. Nabiev, in Colloid. Nanopart. Biomed. Appl. IX. Proceed. SPIE, ed. by W. J. Parak (2014), vol. 8955, p. 89550S.
22. I.-S. Liu, H.-H. Lo, C.-T. Chien, Y.-Y. Lin, C.-W. Chen, Y.-F. Chen, W.-F. Su, and S.-C. Liou, J. Mater. Chem. **18**, 675 (2008).
23. J. Jasieniak, L. Smith, J. Van Embden, P. Mulvaney, and M. Califano, J. Phys. Chem. C **113**, 19468 (2009).
24. P. Linkov, V. Krivenkov, I. Nabiev, and P. Samokhvalov, Mater. Today Proc. **3**, 104 (2016).