

Водорастворимые конъюгаты ZnS:Mn квантовых точек и хлорина е6 для фотодинамической терапии*

© А.К. Вишератина¹, А. Loudon², В.А. Кузнецова^{1,2}, А.О. Орлова¹,
Ю.К. Гунько^{1,2}, А.В. Баранов¹, А.В. Федоров¹

¹ Университет ИТМО,
197101 Санкт Петербург, Россия

² School of Chemistry and CRANN, University of Dublin, Trinity College,
Dublin 2, Ireland

e-mail: a.k.visheratina@gmail.com

Поступила в редакцию 15.02.2018 г.

Сформированы водорастворимые конъюгаты на основе полупроводниковых квантовых точек ZnS:Mn с хлорином е6. Методами оптической спектроскопии установлено, что в полученных конъюгатах наблюдается эффективный (~ 35%) перенос энергии от квантовых точек к хлорину е6.

DOI: 10.21883/OS.2018.07.46272.59-18

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным и деликатным методом лечения онкологических заболеваний. ФДТ основана на способности специальных молекул фотосенсибилизаторов селективно накапливаться в опухолевых тканях и под действием излучения генерировать синглетный кислород, который, в свою очередь, разрушает окружающие раковые клетки [1]. К ярким представителям молекул фотосенсибилизаторов относятся тетрапиррольные соединения и, в частности, хлорин е6 (Chlorin e6, Ce6), который является основным компонентом препарата для ФДТ „Фотодитазин“ [2]. Несмотря на то, что тетрапиррольные соединения в настоящее время широко используются в клинической практике, они обладают рядом недостатков, к которым можно отнести узкие полосы поглощения и, следовательно, необходимость тщательного подбора источника облучения, а также ограниченную способность накопления в раковых клетках, слабую растворимость в воде, медленное выведение из организма и др. [3]. Таким образом, разработка новых лекарственных препаратов для ФДТ, которые обладают улучшенными свойствами, является крайне актуальной.

Использование последних достижений в области нанотехнологий может позволить преодолеть несовершенства и ограничения традиционных фотосенсибилизаторов и тем самым способствовать созданию более эффективных, безопасных и доступных лекарственных препаратов для ФДТ.

Полупроводниковые квантовые точки (КТ) относятся к одним из наиболее перспективных наноматериалов для биологических и медицинских приложений и, в частности, для ФДТ [4]. Уникальные оптические и химические свойства КТ — квантово-размерный эффект,

высокие коэффициенты экстинкции в широком спектральном диапазоне ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), высокие квантовые выходы люминесценции (до 100%), высокая фото- и химическая стабильность и возможность легкой модификации поверхности позволяют формировать на их основе гибридные наноструктуры с молекулами фотосенсибилизаторов [5]. В данных структурах КТ играют роль эффективных доноров энергии, что позволяет значительно расширить диапазон возбуждения фотосенсибилизаторов. Поверхность КТ может быть одновременно функционализирована несколькими молекулами, а также специальными молекулами-линкерами, обеспечивающими адресную доставку всей гибридной наноструктуры в раковые клетки. Следовательно, фотодинамический эффект от применения гибридной наноструктуры может быть значительно выше, чем от свободных фотосенсибилизаторов.

Последнее десятилетие активно ведутся работы, посвященные созданию и исследованию гибридных наноструктур на основе КТ и тетрапиррольных молекул для ФДТ онкологических заболеваний [6–11]. В подавляющем большинстве работ гибридные наноструктуры были сформированы в результате электростатического взаимодействия между функциональными группами тетрапиррольных соединений и молекул-стабилизаторов поверхности КТ. В недавних исследованиях сообщается, что гибридные наноструктуры на основе ZnSe/ZnS КТ и Ce6 электростатического типа демонстрируют удвоенный фотодинамический эффект на клетках асцитной карциномы Эрлиха по сравнению со свободными молекулами Ce6 [12]. Данный результат говорит о перспективности развития данного направления и возможности достижения более ярко выраженного фотодинамического эффекта путем оптимизации фотофизических свойств гибридных наноструктур.

Для *in vitro* и *in vivo* экспериментов целесообразно создавать конъюгаты КТ и молекул — гибридные наноструктуры, в которых компоненты связаны ковалентно.

* The 1st International School-conference for young researchers „Smart nanosystems for translation medicine“, November 28–29, 2017, St. Petersburg, Russia.

Несмотря на относительную сложность формирования конъюгатов, они отличаются высокой стабильностью и устойчивостью к изменениям окружающей среды [13].

Важно отметить, что подавляющее число подобных систем было создано на основе кадмиевых КТ (CdSe, CdS, CdTe), которые могут проявлять высокую токсичность в случае их разрушения в биологических объектах [14]. Очевидно, что для биомедицинского использования КТ должны быть нетоксичными и биосовместимыми. КТ на основе сульфида цинка удовлетворяют данным требованиям, однако их люминесценция находится в УФ области спектра, что делает затруднительным использование данных КТ в качестве доноров энергии в гибридных наноструктурах с фотосенсибилизаторами. Внедрение ионов переходных металлов, например ионов марганца Mn^{2+} , позволяет получать биосовместимые КТ, люминесценция которых наблюдается в видимой области спектра [15]. В настоящее время ZnS:Mn КТ активно исследуются для различных биомедицинских приложений, включая визуализацию живых систем, биосенсоры и ФДТ [16–18].

В настоящей работе были сформированы и исследованы конъюгаты КТ ZnS:Mn с фотосенсибилизатором второго поколения Себ. Исследование фотофизических свойств конъюгатов показало наличие переноса энергии от КТ к молекулам Себ с эффективностью $\sim 35\%$, которая сохраняется при увеличении концентрации Себ в смеси.

Материалы и методы

В работе были использованы КТ ZnS:Mn, полученные методом высокотемпературного металлоорганического синтеза [15], со средним диаметром 5.3 ± 0.7 nm и коэффициентом экстинкции в первой полосе поглощения $2.75 \cdot 10^5 M^{-1} cm^{-1}$. КТ были переведены в водную фазу стандартным методом замещения гидрофобных молекул-стабилизаторов КТ на гидрофильные молекулы цистеина [19].

В качестве тетрапиррольного соединения использовался хлорин еб (Frontier Scientific), который является основным компонентом препарата „Фотодитазин“.

Для формирования конъюгатов КТ и Себ был использован водорастворимый карбодимид (EDC). EDC выполняет активацию карбоксильных групп для последующего связывания с первичным амином с образованием амидной связи [20]. Использование EDC практически не приводит к дополнительному увеличению среднего расстояния между донором и акцептором в конъюгатах. Для стабилизации и увеличения времени активности EDC, т.е. времени, в течение которого он способен связывать аминогруппу с карбоксильной группой, использовался дополнительный реагент — *N*-гидроксисукцинимид (NHS) [20]. Процедура формирования конъюгатов КТ и Себ заключалась в следующем. Для активации карбоксильных групп Себ к его водному раствору добавлялись растворы EDC

и NHS в воде с концентрациями, аналогичными концентрации Себ. Таким образом, соотношение молярных концентраций Себ, EDC и NHS составило 1:1:1. При данных соотношениях реагентов происходит активация в среднем только одной из трех карбоксильных групп Себ, что минимизирует вероятность образования конъюгатов, в которых на одну молекулу Себ приходится несколько КТ. Полученная смесь активно перемешивалась на шейкере 60 min при скорости 600 rpm. Для исследования зависимости спектрально-люминесцентных свойств всех сформированных конъюгатов от концентрации Себ в смешанном растворе микроколичества водного раствора активированного Себ последовательно добавлялись к раствору КТ.

Для регистрации спектров поглощения образцов использовался спектрофотометр UV-Probe 3600 (Shimadzu); спектры люминесценции и возбуждения люминесценции образцов были получены с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian).

Результаты и обсуждение

Главными условиями переноса энергии от КТ к Себ по диполь-дипольному безызлучательному резонансному механизму (FRET) являются: 1) перекрытие спектров люминесценции донора (КТ) со спектром поглощения акцептора (Себ); 2) расстояние между донором и акцептором должно быть достаточно малым и в случае гибридных наноструктур КТ/Себ составлять порядка 1–5 nm [21].

На рис. 1, *a* приведены спектры поглощения и люминесценции растворов ZnS:Mn КТ, а также структурная формула цистеина. Край экситонной полосы поглощения КТ находится в области 300 nm. Видно, что собственная люминесценция КТ полностью потушена в результате переноса энергии на примесные ионы Mn^{2+} , флуоресценция которых наблюдается в обла-

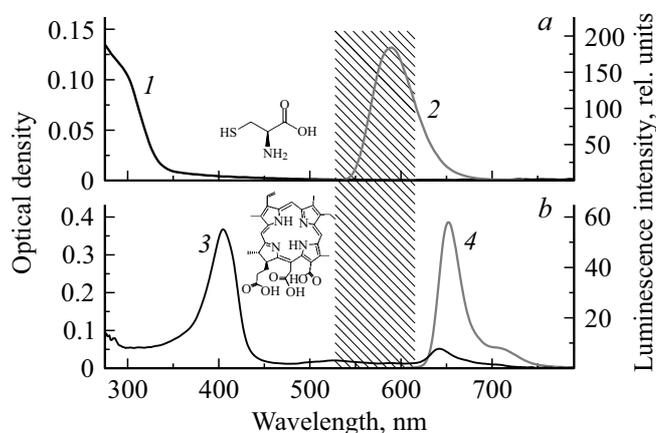


Рис. 1. Спектры поглощения (1 и 3) и люминесценции (2 и 4) водных растворов ZnS:Mn КТ и молекул Себ. На вставках приведены структурные формулы цистеина (сверху) и Себ (снизу). Заштрихованная область показывает область перекрытия спектра поглощения Себ и спектра люминесценции КТ.

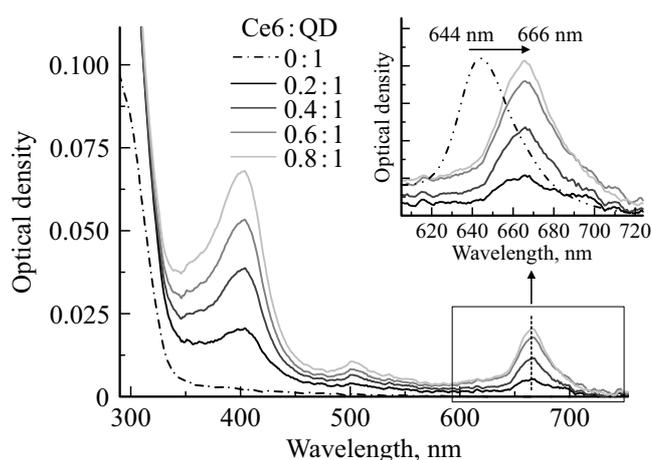


Рис. 2. Спектры поглощения ZnS:Mn КТ и их смешанных водных растворов с активированным Себ при разных соотношениях Себ к КТ.

сти 590 nm [15]. Таким образом, излучательный переход ZnS:Mn КТ представляет собой интеркомбинационный переход $^4T_1 \rightarrow ^6A_1$ между собственными уровнями марганца, времена затухания которого составляют ~ 1.4 ns.

Спектры поглощения, люминесценции и структурная формула Себ приведены на рис. 1, b. Как видно из рис. 1 (заштрихованная область), спектр поглощения Себ хорошо перекрывается со спектром люминесценции КТ, следовательно, в случае образования конъюгатов КТ/Себ может быть реализован эффективный FRET от КТ к молекулам Себ. В силу взаимного расположения спектра поглощения КТ и спектра люминесценции Себ обратный перенос энергии исключен.

На рис. 2 представлены спектры поглощения ZnS:Mn КТ ($C_{КТ} \sim 5 \cdot 10^{-7}$ М) и их смешанных водных растворов с активированным Себ при различных соотношениях компонентов. Добавление раствора Себ к раствору КТ приводит к батохромному сдвигу первой полосы поглощения Себ на ~ 20 nm. Данное изменение в спектре поглощения Себ наблюдалось и ранее в случае гибридных наноструктур КТ/Себ и свидетельствует о связывании Себ с КТ и переходом Себ из димерного состояния в мономерное [22]. При этом видно, что первая полоса поглощения Себ имеет достаточно сложную форму, что указывает на то, что Себ в смеси с КТ может пребывать также в форме димеров и агрегатов более высоких порядков [22].

На рис. 3 приведены спектры люминесценции раствора ZnS:Mn КТ при возбуждении светом с длиной волны 300 nm до и после добавления к нему Себ. При добавлении раствора Себ к раствору КТ наблюдается эффективное тушение люминесценции КТ и появление сенсibilизированной люминесценции Себ. Наблюдаемые изменения фотофизических свойств КТ и Себ (рис. 2 и рис. 3) свидетельствуют об образовании конъюгатов КТ и Себ с эффективным переносом энергии от КТ к Себ. Прямым проявлением переноса энергии от КТ к молекулам Себ также является вклад полосы поглощения КТ в спектр возбуждения люминесценции Себ (рис. 4).

Как видно из рис. 3, форма и положение полосы люминесценции КТ не претерпевают изменений при увеличении концентрации Себ в смешанном растворе. При этом полоса люминесценции Себ испытывает гипсохромный сдвиг при увеличении концентрации Себ в смешанном растворе, что указывает на появление в растворе свободной формы Себ в смеси. Также наблюдается падение интенсивности люминесценции Себ при увеличении его концентрации в смешанном растворе с КТ. При непрямом возбуждении Себ это может быть обусловлено как уменьшением эффективности переноса энергии от КТ, так и снижением квантового выхода люминесценции Себ, связанного с КТ.

На рис. 5 приведена концентрационная зависимость интенсивности люминесценции ZnS:Mn КТ от относительной концентрации Себ в смеси. Экспериментальные

Экспериментальные

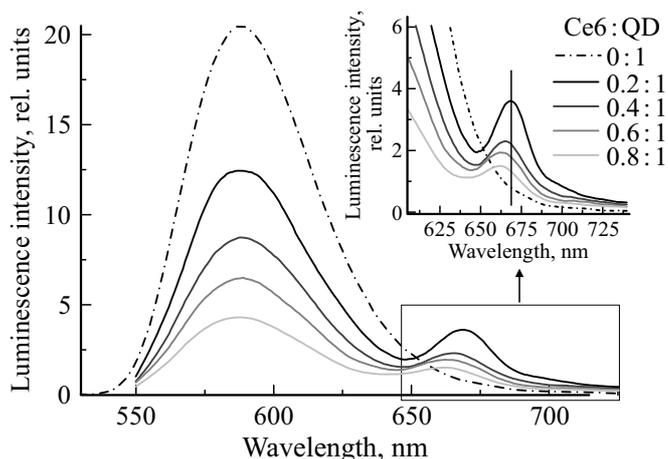


Рис. 3. Спектры люминесценции: ZnS:Mn КТ и их смешанных растворов с Себ. Длина волны возбуждения 300 nm.

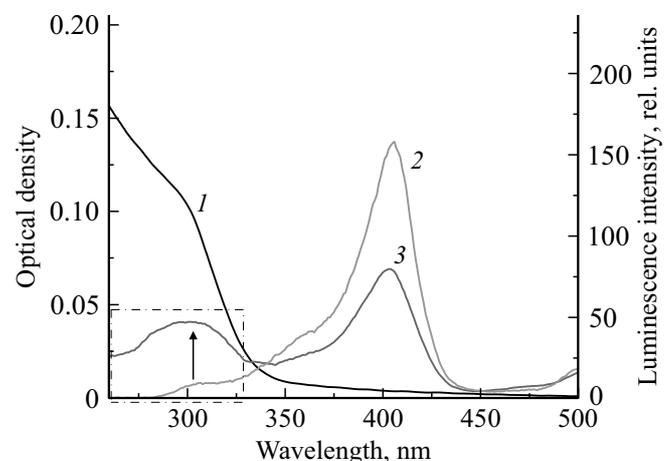


Рис. 4. Спектры КТ и конъюгатов КТ/Себ: 1 — спектр поглощения КТ; 2 — спектр возбуждения люминесценции конъюгатов КТ с Себ ($\lambda_{reg} = 680$ nm); 3 — спектр возбуждения люминесценции Себ ($\lambda_{reg} = 680$ nm).

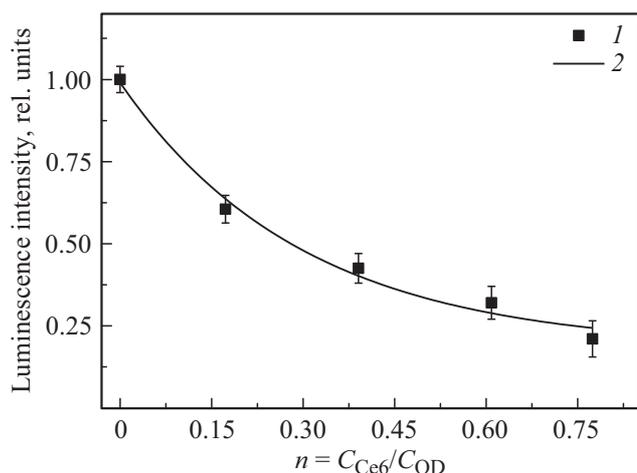


Рис. 5. Зависимость относительной интенсивности люминесценции КТ от соотношения молярных концентраций $C_{\text{Ce6}}/C_{\text{КТ}}$ в смешанном растворе: 1 — экспериментальные данные, 2 — аппроксимация функцией $y = 0.8 \exp(-3n)$.

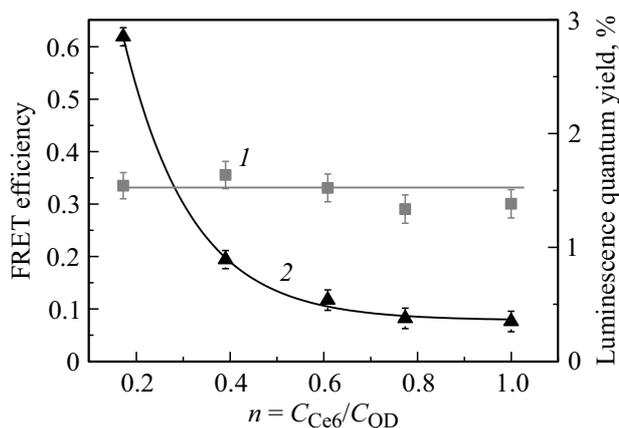


Рис. 6. Эффективность переноса энергии (1) и квантовый выход люминесценции Себ (2) в зависимости от соотношения молярных концентраций $C_{\text{Ce6}}/C_{\text{КТ}}$.

данные аппроксимируются экспоненциальной функцией $y = 0.8 \exp(-3n) + 0.2$, экспоненциальный множитель которой ~ 3 . Это свидетельствует о том, что одна молекула Себ полностью тушит в среднем люминесценцию трех КТ. Учитывая тот факт, что одна молекула Себ тушит люминесценцию одной ZnS:Mn КТ на 60% [23], это свидетельствует об образовании конъюгатов, в которых на одну молекулу Себ приходится в среднем пять КТ. Очевидно, что данная ситуация может наблюдаться в том случае, когда КТ находятся в состоянии агрегатов, в каждом из которых в среднем находится пять КТ.

На рис. 6 приведены зависимости эффективности переноса энергии и квантового выхода люминесценции Себ от относительной концентрации Себ в смешанном растворе. Оценка эффективности переноса энергии от КТ к Себ и квантового выхода люминесценции Себ в данном случае были выполнены аналогично [21]. Эффек-

тивность переноса энергии от КТ оценивалась только к тем молекулам Себ, которые находятся в составе конъюгатов КТ/Себ, т.е. к мономерной форме Себ. Согласно оценкам, выполненным на основании экспериментальных данных, эффективность переноса энергии составляет $\sim 35\%$ и сохраняется при увеличении относительной концентрации Себ, связанного с КТ. Ранее нами были созданы и исследованы гибридные наноструктуры на основе Zn:Mn КТ с Себ с электростатическим типом связывания компонентов, в которых наблюдался перенос энергии от КТ к Себ с эффективностью $\sim 40\%$, которая также сохранялась при увеличении концентрации Себ, связанного с КТ [24]. Вероятно, что эта тенденция является общей для гибридных наноструктур, сформированных на основе ZnS:Mn КТ и Себ вне зависимости от способа связывания КТ и Себ. Важно отметить, что в подавляющем большинстве гибридных наноструктур, сформированных на основе КТ, обладающих экситонной люминесценцией (например, CdSe/ZnS), эффективность переноса энергии падает при увеличении числа акцепторов [21,24]. Таким образом, преимуществом гибридных наноструктур на основе Zn:Mn КТ является не только отсутствие тяжелых металлов в их составе, но и сохранение эффективности переноса энергии при увеличении в комплексах среднего числа акцепторов. Точная причина наблюдаемых различий в зависимости эффективности внутрикомплексного переноса энергии от стехиометрии комплексов на основе допированных КТ от ситуации с классическими КТ на основе кадмия не ясна. Однако, по нашему мнению, сохранение эффективности переноса энергии при увеличении числа акцепторов в комплексах с ZnS:Mn КТ может быть обусловлено тем фактом, что в данного типа КТ вероятность безызлучательной оже-рекомбинации существенно ниже, чем в КТ CdSe [25]. Поэтому увеличение числа акцепторов, которые в данном случае могут фотоиндуцированно передавать КТ заряд [26], не приводит к увеличению вероятности оже-рекомбинации в ZnS:Mn КТ. Проверить данную гипотезу предполагается в продолжении работы.

Как показано на рис. 6, квантовый выход люминесценции Себ при его низких концентрациях в смешанном растворе составляет $\sim 2.8\%$, при квантовом выходе люминесценции свободного Себ $\sim 8\%$. Дальнейшее увеличение относительной концентрации Себ в смешанном растворе приводит к резкому падению квантового выхода люминесценции Себ, связанного с КТ. Уменьшение квантового выхода люминесценции Себ в составе гибридных наноструктур наблюдается достаточно часто и может быть обусловлено переносом заряда между Себ и КТ и/или увеличением константы скорости интеркомбинационного перехода $S_1 \rightarrow T_1$ Себ при связывании Себ с КТ. В пользу последнего фактора свидетельствуют работы, в которых сообщается об увеличении константы скорости интеркомбинационного перехода молекулы и, как следствие, увеличения генерации синглетного кислорода молекулой под влиянием тяжелого атома [27].

Очевидно, что в этом случае падение квантового выхода люминесценции Себ не является недостатком, а свидетельствует о возможности достижения усиленного фотодинамического эффекта.

Заключение

В работе впервые сформированы конъюгаты ZnS:Mn КТ с Себ в водном растворе. Спектрально-люминесцентными методами установлено, что в исследуемых конъюгатах наблюдается перенос энергии от КТ к Себ с эффективностью $\sim 35\%$. Главной особенностью комплексов на основе ZnS:Mn КТ с Себ является сохранение эффективности переноса энергии при увеличении относительной концентрации Себ в смешанном растворе. Это является несомненным преимуществом данных комплексов по сравнению с комплексами на основе недопированных КТ (например, CdSe/ZnS), в которых эффективность переноса энергии значительно снижается при увеличении концентрации Себ в смешанном растворе.

В исследуемых конъюгатах ZnS:Mn КТ с Себ также наблюдается падение квантового выхода люминесценции Себ при увеличении его относительной концентрации в смешанном растворе. Это может быть обусловлено переносом заряда между Себ и КТ и/или увеличением константы скорости интеркомбинационного перехода $S_1 \rightarrow T_1$ Себ при связывании Себ с КТ. Установить точную причину изменения люминесцентных свойств Себ в комплексах с КТ предполагается в ходе дальнейших исследований.

Авторы благодарят Министерство образования и науки Российской Федерации (грант 14.B25.31.0002) и Science Foundation Ireland (грант SFI 12/IA/1300) за финансовую поддержку работы. А. Вишератина выражает благодарность Стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов (2018–2020) за финансовую поддержку.

Список литературы

- [1] Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. // Nature Reviews Cancer. 2003. V. 3. N 5. P. 380–387.
- [2] Каплан М.А., Капинус В.Н., Романко Ю.С., Ярославцева-Исаева Е.В. // Российский биотерапевтический журн. 2004. Т. 3. № 2. С. 50–50.
- [3] Allison R.R., Downie G.H., Cuenca R., Hu X.H., Childs C.J., Sibata C.H. // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2004. V. 1. N 1. P. 27–42.
- [4] Zhou J., Yang Y., Zhang C. // Chem. Rev. 2015. V. 115. N 21. P. 11669–11717.
- [5] Tsay J.M., Trzoss M., Shi L., Kong X., Selke M., Jung M.E., Weiss S. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. N 21. P. 6865–6871.
- [6] Zenkevich E.I., Sagun E.I., Knyukshto V.N., Stasheuski A.S., Galievsky V.A., Stupak A.P., Blaudeck T., von Borczyskowski C. // J. Phys. Chem. C. 2011. V. 115. N 44. P. 21535–21545.
- [7] Zenkevich E.I., Gaponenko S.V., Sagun E.I., von Borczyskowski C. // Rev. Nanosci. Nanotechnol. 2013. V. 2. P. 184–207.
- [8] Charron G., Stuchinskaya T., Edwards D.R., Russell D.A., Nann T. // J. Phys. Chem. C. 2012. V. 116. N 16. P. 9334–9342.
- [9] Kuznetsova V., Orlova A., Martynenko I., Kundelev E., Maslov V., Fedorov A., Baranov A., Gun'ko Y. // Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care V. International Society for Optics and Photonics. 2016. V. 9887. P. 988738.
- [10] Rotomskis R., Valanciunaite J., Skripka A., Steponkiene S., Spogis G., Bagdonas S., Streckyte G. // Lithuanian J. Phys. 2013. V. 53. N 1.
- [11] Skripka A., Valanciunaite J., Dauderis G., Poderys V., Kubiliute R., Rotomskis R. // J. Biomed. Opt. 2013. V. 18. N 7. P. 078002–078002.
- [12] Martynenko I.V., Kuznetsova V.A., Orlova A.O., Kanaev P.A., Maslov V.G., Loudon A., Zaharov V., Parfenov P.S., Gun'ko Y., Fedorov A.V. // Nanotechnology. 2015. V. 26. N 5. P. 055102.
- [13] Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. // Nature Materials. 2005. V. 4. N 6. P. 435–446.
- [14] Kirchner C., Liedl T., Kudera S., Pellegrino T., Muñoz Javier A., Gaub H.E., Stölzle S., Fertig N., Parak W.J. // Nano Lett. 2005. V. 5. N 2. P. 331–338.
- [15] Yu J.H., Kwon S.H., Petrášek Z., Park O.K., Jun S.W., Shin K., Choi M., Park Y., Park K., Na H.B., Lee N., Lee D.W., Kim J.H., Schwillie P., Hyeon T. // Nature Materials. 2013. V. 12. N 4. P. 359–366.
- [16] Manzoor K., Johny S., Thomas D., Setua S., Menon D., Nair S. // Nanotechnology. 2009. V. 20. N 6. P. 065102.
- [17] Geszke M., Murias M., Balan L., Medjahdi G., Korczynski J., Moritz M., Lulek J., Schneider R. // Acta Biomaterialia. 2011. V. 7. N 3. P. 1327–1338.
- [18] Kuznetsova V.A., Visheratina A.K., Ryan A., Martynenko I.V., Loudon A., Maguire C.M., Purcell-Milton F., Orlova A.O., Baranov A.V., Fedorov A.V., Prina-Mello A., Volkov Y., Gun'ko Y.K. // Chirality. 2017. V. 29. P. 403–408.
- [19] Moloney M.P., Govan J., Loudon A., Mukhina M., Gun'ko Y.K. // Nature Protocols. 2015. V. 10. N 4. P. 558–573.
- [20] Valeur E., Bradley M. // Chem. Soc. Rev. 2009. V. 38. N 2. P. 606–631.
- [21] Visheratina A.K., Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Baranov A.V., Fedorov A.V. // European Conference on Biomedical Optics. Optical Society of America. 2015. P. 95372.
- [22] Kundelev E.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Baranov A.V., Fedorov A.V. // Nanophotonics VI. International Society for Optics and Photonics. 2016. V. 9884. P. 988433.
- [23] Visheratina A.K., Orlova A.O., Martynenko I.V., Maslov V.G., Fedorov A.V., Gun'ko Y.K., Baranov A.V. // iNOW International Nano-Optoelectronics Workshop. 2014. P. 112–113.
- [24] Visheratina A.K., Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A.V., Baranov A.V., Gun'ko Y.K. // J. Opt. Technology. 2014. V. 81. N 8. P. 444–448.
- [25] Whitham P.J., Knowles K.E., Reid P.J., Gamelin D.R. // Nano Lett. 2015. V. 15. N 6. P. 4045–4051.
- [26] Zenkevich E.I., Blaudeck T., Milekhin A., Von Borczyskowski C. // International J. Spectroscopy. 2012. V. 2012.
- [27] Kim S., Ohulchanskyy T.Y., Bharali D., Chen Y., Pandey R.K., Prasad P.N. // J. Phys. Chem. C. 2009. V. 113. № 29. P. 12641–12644.