

Фотоиндуцированное изменение флуоресцентных свойств AgInS_2 квантовых точек: влияние белкового окружения

© В.И. Горбачева¹, И.А. Резник², Е.П. Колесова¹

¹ Научно-технологический Университет Сириус,
Краснодарский край, Россия

² Университет ИТМО,
197101 Санкт-Петербург, Россия

e-mail: e.p.kolesova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.11.2024 г.

В окончательной редакции 28.04.2025 г.

Принята к публикации 28.04.2025 г.

Синтезированы полупроводниковые квантовые точки (КТ) AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ и исследовано изменение их флуоресцентных свойств при воздействии внешнего излучения. Для оценки влияния белкового окружения КТ были инкапсулированы в альбуминовые наночастицы и покрыты оболочкой из фетальной бычьей сыворотки для имитации белковой короны. Продemonстрировано, что белковое окружение оказывает значительное влияние на люминесцентные свойства КТ, а именно гипсохромный сдвиг полосы люминесценции и уменьшение квантового выхода люминесценции. Полученные результаты показали, что и оболочка ZnS , и оба типа белковой оболочки приводят к уменьшению скорости фотообесцвечивания флуоресцентных свойств КТ в результате взаимодействия со светом.

Ключевые слова: квантовые точки, флуоресценция, фотоиндуцированные процессы, белковая корона, альбуминовые наночастицы.

DOI: 10.61011/OS.2025.04.60539.7311-24

Введение

С момента первого коллоидного синтеза полупроводниковые квантовые точки (КТ) привлекли внимание исследователей благодаря своим уникальным фотофизическим свойствам и эффекту размерного квантования [1]. Традиционные КТ A_2B_6 нашли применение и в биомедицинской области для биологической визуализации, сенсорики, и как эффективные доноры энергии и носители заряда в комплексах с различными молекулами [2]. Однако данный тип КТ характеризуется высокой токсичностью [3]. Опасения биологов вызывает наличие в составе КТ ионов тяжелых металлов, а именно Cd , Se , Zn и Pb , которые способны вызвать оксидативный стресс и разрушение ДНК [4]. Тройные КТ AgInS_2 ввиду относительно простого синтеза, высокой стабильности и квантового выхода люминесценции стали перспективной альтернативой традиционным КТ для медицинских приложений [5]. Кроме того, данный тип КТ способен самостоятельно генерировать супероксид и выступать как сенситизатор для фотодинамической терапии [6]. Таким образом, платформы на основе AgInS_2 КТ можно будет одновременно использовать как для визуализации клеток и биораспределения систем в организме, так и в качестве терапевтического средства. В обоих описанных случаях функциональность КТ будет связана с результатом взаимодействия КТ с излучением.

КТ относятся к классу фотаактивируемых систем, фотофизические свойства которых могут меняться в результате взаимодействия со светом. При поглощении

внешнего излучения на поверхности частиц происходят фотохимические реакции, а именно фотоокисление поверхности [7]. Для традиционных КТ CdSe на первом этапе происходит увеличение квантового выхода флуоресценции за счет окисления дефектов на поверхности КТ, конкурирующих с их флуоресценцией. Дальнейшее окисление поверхности приведет к образованию новых дефектов, формирование которых приведет к ухудшению флуоресцентных свойств КТ.

В одной из наших предыдущих публикаций, мы показали, что за счет фотоиндуцированных процессов можно увеличить как флуоресцентные свойства КТ, так и их эффективность в качестве донора заряда в системе с наночастицами (НЧ) диоксида титана [8]. Можно предположить, что фотоиндуцированные процессы окажут существенное влияние и на свойства КТ AgInS_2 , однако этот вопрос пока не изучен в должной мере. Особенный интерес для данного типа КТ представляет исследование закономерностей фотоиндуцированных процессов в зависимости от белкового окружения. В случае использования КТ для биологических приложений первый барьер, с которым встретится наноплатформа, это опсонизация, а именно взаимодействие с белками системы кровообращения, в результате которого на поверхности КТ образуется так называемая белковая корона [9]. Формирование белковой короны может оказать влияние на фотофизические свойства НЧ, а также на их функциональность, в частности может снизить возможности адресной доставки за счет поверхностной

модификации НЧ. Белковая корона из молекул бычьей фетальной сыворотки будет использована как модель белкового окружения КТ при попадании в кровоток.

В качестве другой модели белкового окружения будут использованы альбуминовые частицы, которые могут использоваться для внутриклеточной доставки лекарственных средств. Альбуминовые наночастицы обладают рядом преимуществ, что привело к одобрению Абраксена, который представляет собой конъюгаты альбумина и паклитаксела для терапии раковых заболеваний [10]. Инкапсуляция КТ в НЧ альбумина позволит снизить иммунный отклик организма на наноплатформы. Кроме того, позволит добиться адресной доставки КТ в раковые клетки за счет взаимодействия альбумина с gp60 и SPARC-рецепторами раковых клеток [11] и увеличит клеточную интернализацию за счет изменения размера системы и их заряда [12].

Исследование фотоиндуцированных процессов в описанных выше условиях является необходимым условием для оценки перспективности КТ для биовизуализации и фотодинамической терапии.

В настоящей работе КТ AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ были синтезированы методом гидротермального синтеза. Конъюгаты КТ с сывороткой и с альбуминовыми НЧ создавались путем их совместной инкубации в течение 24 h. Показано, что оболочка ZnS приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции КТ и гипсохромному сдвигу спектров флуоресценции. Наличие белков в ближайшем окружении снижает квантовый выход флуоресценции КТ и так же приводит к сдвигам спектров флуоресценции КТ в коротковолновую область. КТ AgInS_2 демонстрируют быстрое обесцвечивание флуоресцентных свойств при воздействии внешнего излучения; и полупроводниковая (ZnS), и белковые (белки фетальной бычьей сыворотки (ФБС)), и альбуминовая оболочки приводят к замедлению скорости этого процесса, что повышает перспективность данных систем в биологии.

Материалы и методы

Водные КТ AgInS_2 (ядра) и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (ядро/оболочка) были синтезированы с помощью гидротермального метода [13]. Для синтеза КТ AgInS_2 в трехгорлую стеклянную колбу к 5 ml H_2O последовательно добавляли 0.052 ml AgNO_3 (0.1 M), 0.104 ml TGA (1 M), 0.0334 ml NH_4OH (5 M), 0.0364 ml InCl_3 (1 M), 0.08 ml NH_4OH (5 M) и 0.052 ml $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1 M). Синтез длился 30 min, после чего для наращивания оболочки ZnS добавляли 0.078 ml TGA (1 M), 0.05 ml NH_4OH (5 M) и $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1.0 M). Температура среды в колбе была установлена на 90°C , оставалась постоянной на протяжении всего синтеза и регулировалась с помощью нагревательного элемента и датчика температуры в водяной бане. После синтеза растворы КТ промывали путем добавления изопропилового спирта в соотношении 1:2 и центрифугировали в течение 3 min

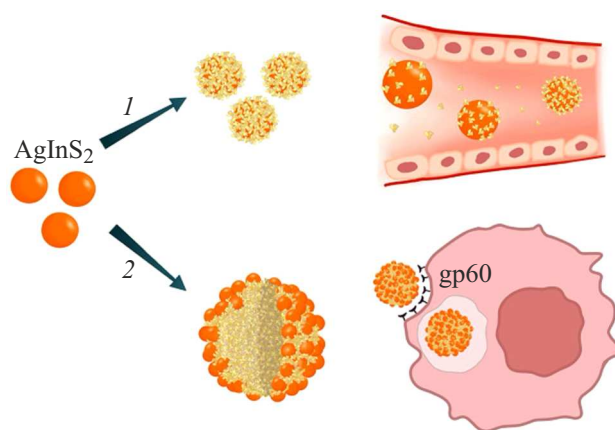


Рис. 1. Схематичное изображение систем на основе КТ и молекул белков, сформированных в настоящей работе: 1 — конъюгаты с ФБС для имитации белковой короны, образующейся на поверхности КТ при попадании в кровоток; 2 — КТ, инкапсулированные в АНЧ, способные адресно доставлять КТ в раковые клетки.

при 12 000 rpm. После этого образцы перерастворялись в воде и хранились в темноте при температуре 4°C .

Для формирования конъюгатов КТ с белками ФБС был приготовлен водный раствор КТ с 10% и 30% содержанием ФБС и концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ M. Полученная смесь оставлялась для совместной инкубации на 15 h в темноте при комнатной температуре. Молекулы альбумина, составляющие большую часть ФБС, имеют отрицательный заряд и будут электростатически связываться с положительно заряженными КТ. Полученные конъюгаты хранились в темноте при температуре 4°C .

Аналогичная методика использовалась для создания систем КТ/Альбуминовые НЧ (АНЧ). АНЧ были синтезированы методом десольвотации и последующим сшиванием с помощью глутаральдегида [14]. Частицы, синтезированные таким образом, имеют отрицательный поверхностный заряд и размер ~ 120 nm. 1 mg частиц добавлялся в водный раствор КТ с концентрацией $5 \cdot 10^{-6}$ M. Совместная инкубация проводилась в темноте при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После этого частицы были центрифугированы в течение 15 min при 12 000 rpm, и свободные КТ оставались в непосадочной жидкости. Осадившиеся системы были перерастворены в деионизированной воде и хранились в темноте при температуре 4°C . Эффективность инкапсуляции КТ оценивалась по формуле

$$E(\%) = (I_{\text{initial}} - I_{\text{supernatant}}) / I_{\text{initial}} \cdot 100\%,$$

где I_{initial} и $I_{\text{supernatant}}$ — интенсивности флуоресценции раствора КТ в нулевой момент инкапсуляции и надосадочной жидкости при осаждении систем при завершении процесса инкапсуляции. Сформированные системы схематично представлены на рис. 1.

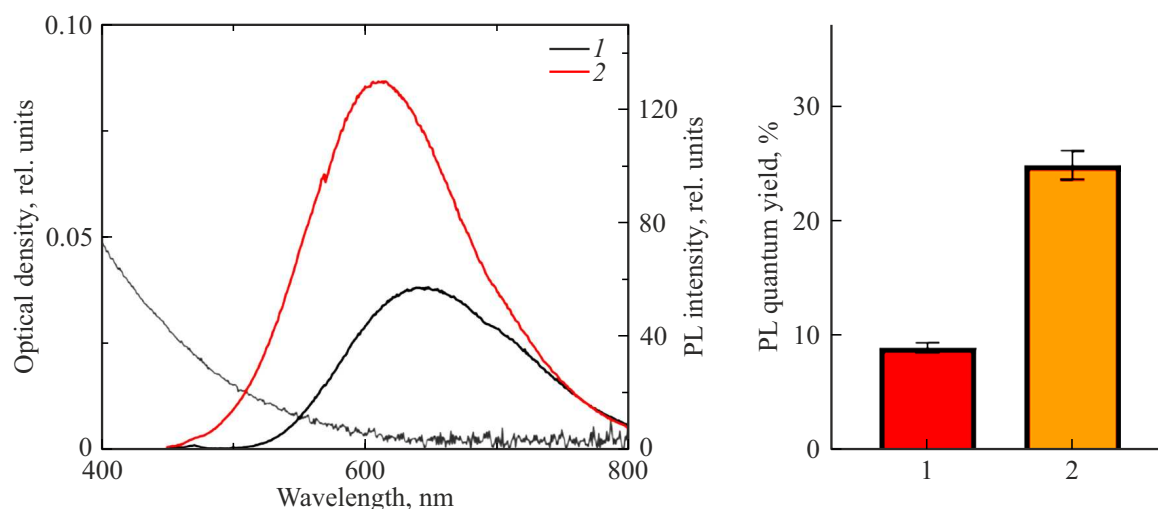


Рис. 2. (а) Спектры поглощения и флуоресценции КТ AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$. Длина волны возбуждения флуоресценции 405 nm. (b) Квантовый выход КТ AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, рассчитанный относительно родамина 6Ж. 1 — КТ AgInS_2 , 2 — КТ $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$.

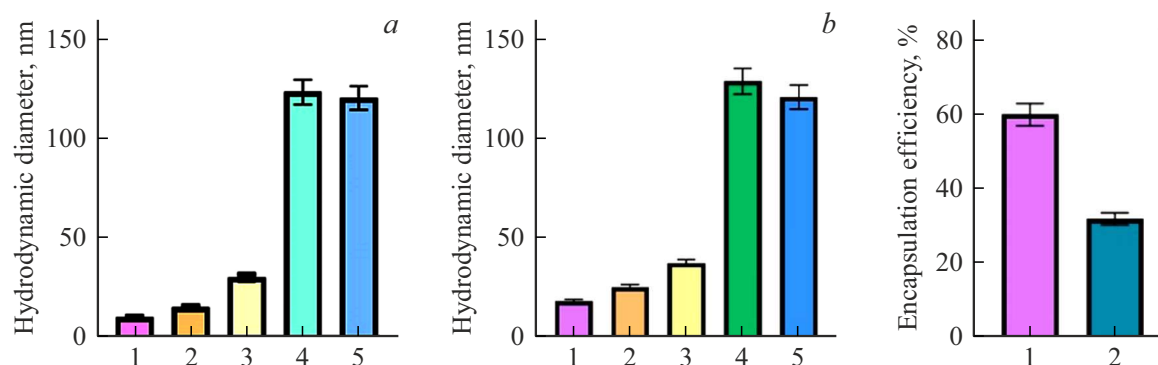


Рис. 3. Гидродинамический диаметр систем на основе КТ AgInS_2 (а) и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (b): 1 — КТ, it2 — КТ/10ФБС, it3 — КТ/30ФБС, 4 — КТ/АНЧ, 5 — АНЧ; эффективность инкапсуляции КТ в АНЧ: 1 — AgInS_2 , it2 — $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (c).

Оценку размеров сформированных в настоящей работе систем проводили с использованием метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Великобритания). Стационарные спектры поглощения и флуоресценции регистрировалась с помощью спектрофотометра Multiskan Sky (ThermoFisher Scientific, США) и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent, США). Квантовый выход флуоресценции оценивался относительно родамина 6Ж.

Для исследования влияния фотоиндуцированных процессов на поверхности КТ на их флуоресцентные свойства образцы подвергались воздействию УФ излучения с длиной волны 365 nm. Падающая на образец мощность составляла 0.3 mW, кювета с образцом равномерно освещалась излучением (площадь сечения кюветы составляла 1 cm²). Образец периодически перемешивался для равномерного воздействия внешнего излучения на КТ. Суммарная доза падающего излучения составила ~0.75 J·cm⁻². Во время облучения периодически реги-

стрировались спектры флуоресценции КТ и систем на их основе.

Результаты

Влияние фотоиндуцированных процессов на поверхности КТ на их флуоресцентные свойства оценивалось для трех различных модельных ситуаций: водный раствор КТ после синтеза (AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$), конъюгаты КТ с ФБС ($\text{AgInS}_2/\text{ФБС}$ и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}/\text{ФБС}$) и системы с АНЧ ($\text{AgInS}_2/\text{АНЧ}$ и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}/\text{АНЧ}$). Каждый образец был охарактеризован и подвергнут воздействию внешнего излучения, в течение которого регистрировались спектры флуоресценции КТ.

Поверхность КТ в результате синтеза характеризуется наличием большого числа дефектных состояний, которые могут выступать как ловушки для носителей заряда и таким образом снижать квантовый выход флуоресценции КТ. Снизить эффективность этих безызлучательных каналов релаксации электронного возбуждения

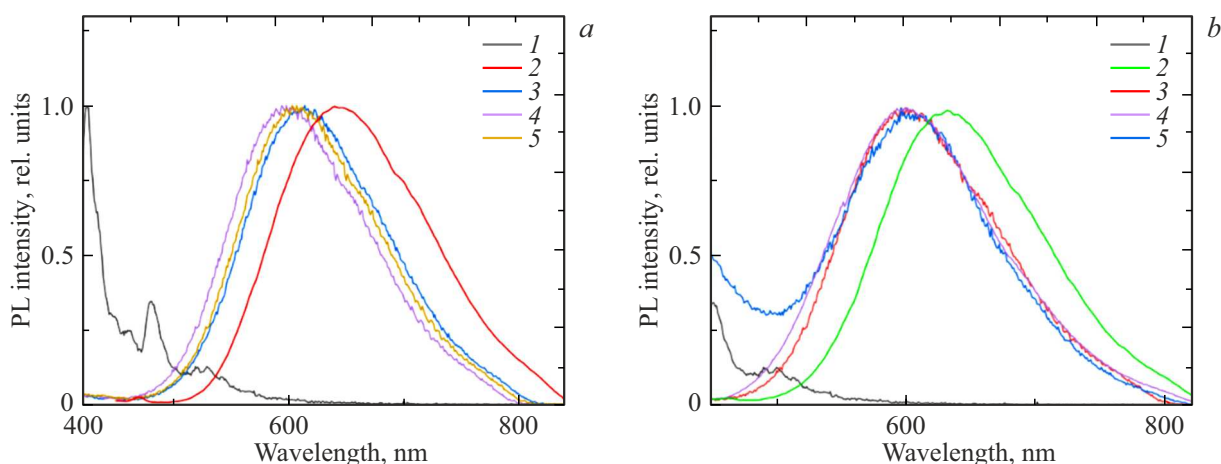


Рис. 4. Спектры флуоресценции систем на основе КТ AgInS₂ (a) и AgInS₂/ZnS (b): 1 — АНЧ, 2 — КТ, 3 — КТ/10ФБС, 4 — КТ/30ФБС, 5 — КТ/АНЧ. Длина волны возбуждения флуоресценции — 405 nm.

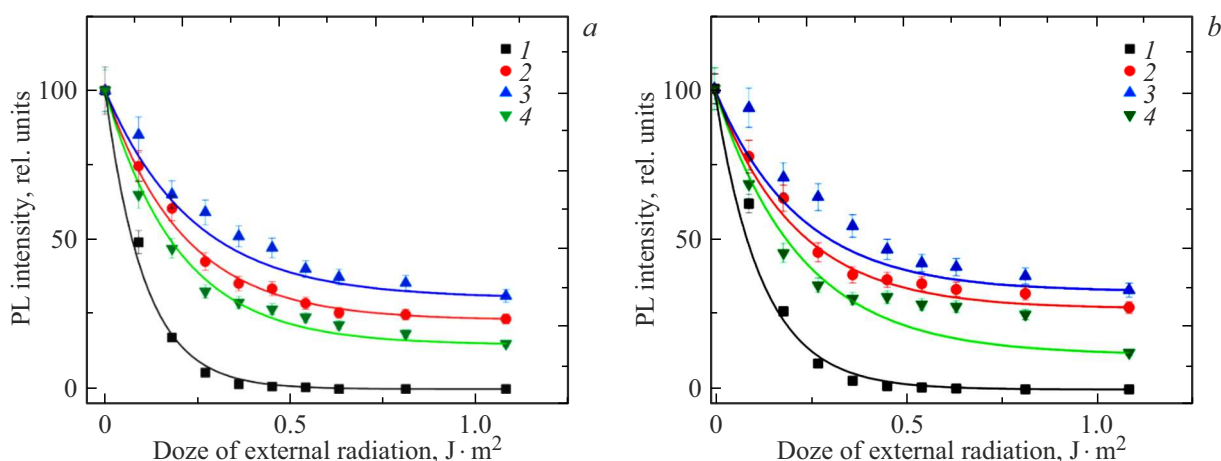


Рис. 5. Изменение флуоресценции КТ в процессе длительного воздействия внешнего излучения для систем на основе КТ AgInS₂ (a) и AgInS₂/ZnS (b): 1 — КТ, 2 — КТ/10ФБС, 3 — КТ/30ФБС, 4 — КТ/АНЧ. Данные нормированы на интенсивность флуоресценции в начальный момент облучения.

возможно пассивируя поверхность КТ с помощью широкозонного полупроводника ZnS, что, согласно литературе, должно привести к увеличению квантового выхода флуоресценции КТ [15]. На рис. 2 представлены спектры поглощения и флуоресценции КТ AgInS₂ и AgInS₂/ZnS.

Как видно из рис. 2, наращивание оболочки приводило к гипсохромному сдвигу спектра флуоресценции КТ AgInS₂ в коротковолновую область с 645 до 630 nm, что сопровождается увеличением квантового выхода флуоресценции больше чем в 2.5 раза — с 9 до 24%, что хорошо согласуется с литературными данными. Однако это приводит к смещению области поглощения КТ от окна прозрачности человеческого организма (650–950 nm), что затруднит их функциональность *in vivo* приложениях. При попадании в систему кровотока поверхность КТ будет покрыта слоем белков, так называемой белковой короной, что может привести к существенному изменению их люминесцентных и фото-

физических свойств. Кроме того, в дальнейшей работе планируется использовать альбуминовые частицы для внутриклеточной доставки КТ для повышения эффективности фотодинамической терапии за счет генерации КТ супероксида.

Методика формирования белкового окружения описана в разделе материалы и методы. На рис. 3 представлены размеры сформированных систем, полученные методом динамического рассеяния света, эффективность инкапсуляции КТ в альбуминовые частицы.

Как видно из рис. 3 при инкубации КТ в растворе, содержащем 10 и 30% ФБС, происходит значительное увеличение размера системы, которое коррелирует с содержанием ФБС в растворе. Так, в случае КТ AgInS₂ размер системы после инкубации в 30% растворе ФБС увеличился в 3 раза — с 10 до 30 nm. В этом случае при внутривенном введении КТ в организм более 70% от объема системы КТ/белковая корона будут состав-

лять белки, и именно они будут определять поверхностные свойства образовавшейся системы и нано-био-взаимодействие. В случае систем КТ/АНЧ размер системы определяется размером исходных АНЧ (120 nm), и инкапсуляция КТ приводит к незначительному увеличению гидродинамического диаметра (до 125 и 128 nm) при 60% и 32% эффективности инкапсуляции КТ AgInS_2 и $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ соответственно. Можно предположить, что КТ были внедрены в приповерхностный слой альбуминовых частиц, и в этом случае все еще возможна адресная доставка КТ в раковые клетки за счет активации транспортировки через рецепторы grb60 и связывания с секретируемым белком SPARC [11].

Можно предположить, что белковое окружение окажет влияние на квантовый выход сформированных систем и на фотофизические свойства КТ. На рис. 4 представлены нормированные спектры флуоресценции систем на основе КТ.

Как видно из рис. 4, белковое окружение приводит к существенному сдвигу спектров флуоресценции в коротковолновую область. Согласно литературе, наблюдаемый гипсохромный сдвиг спектров флуоресценции связан с изменением поверхностного заряда КТ в более отрицательную область [16]. При этом и белковая оболочка на КТ, и альбуминовые частицы приводят к одинаковому изменению спектров, что является подтверждением данной гипотезы. Все сформированные системы были подвергнуты длительному воздействию УФ излучения, в течение которого не наблюдалось существенных спектральных сдвигов полосы флуоресценции КТ. На рис. 5 представлено изменение интенсивности флуоресценции КТ в процессе облучения.

Как видно из рис. 5, облучение КТ приводит к уменьшению их интенсивности флуоресценции. С учетом отсутствия изменения в спектрах поглощения КТ это говорит о уменьшении квантового выхода флуоресценции КТ. Наблюдаемые быстрые изменения для обоих типов КТ свидетельствуют о формировании в результате облучения новых каналов релаксации, конкурирующих с флуоресценцией.

Незначительное увеличение интенсивности флуоресценции ($\leq 5\%$) КТ наблюдалось при суммарной дозе падающего излучения, не превышающей $15 \text{ mJ}\cdot\text{m}^{-2}$. Согласно литературе, природа флуоресценции КТ AgInS_2 носит дефектный характер, что приводит к большим характерным временам затухания флуоресценции [17]. В этом случае быстрое уменьшение интенсивности флуоресценции может говорить о фотохимической пассивации флуоресцентных центров КТ. Оболочка ZnS приводит к незначительному замедлению фотообесцвечивания при малых дозах излучения ($0.25 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$), однако и в этом случае КТ быстро теряют флуоресцентные свойства (рис. 5, б). Белковое окружение приводит к существенно замедлению этих процессов, что позволит сохранить функциональность КТ в течение долгого промежутка времени. Так, при превышении падающим излучением

дозы $0.4 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ КТ демонстрируют полное фотоиндуцированное тушение люминесценции, а в случае наличия белкового окружения интенсивность флуоресценции остается на уровне 25% от исходной и при больших дозах.

Как видно из рис. 5, конъюгация с белками сыворотки крови продемонстрировала большую эффективность в защите от фотоиндуцированного изменения поверхностных свойств КТ, чем их инкапсуляция в альбуминовые частицы.

Выводы

Полученные в настоящей работе данные демонстрируют, что белковое окружение, формирующееся при попадании КТ в систему кровообращения и их взаимодействии с клетками, будет оказывать существенное влияние на фотофизические свойства КТ. В частности, конъюгация с белками крови и инкапсуляция в альбуминовые частицы приводит к гипсохромному сдвигу флуоресценции КТ и уменьшению квантового выхода флуоресценции, что затруднит их использование *in vivo*. Однако белковое окружение позволяет значительно снизить эффективность фотоиндуцированного обесцвечивания флуоресцентных свойств КТ, таким образом сохраняя их функциональность. Для эффективного использования КТ в биологических приложениях необходимо оптимизировать синтез КТ для сдвига спектральной области поглощения в ближнюю ИК область.

Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 24-24-20102.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] D.S. Kumar, B.J. Kumar, H.M. Mahesh. Synthesis of Inorganic Nanomaterials, **59–88** (2018). DOI: 10.1016/B978-0-08-101975-7.00003-8
- [2] F.P. García de Arquer, D.V. Talapin, V.I. Klimov, Y. Arakawa, M. Bayer, E.H. Sargent. Science, **373** (6555), eaaz8541 (2021). DOI: 10.1126/science.aaz8541
- [3] V.K. Sharma, T.J. McDonald, M. Sohn, G.A. Anquandah, M. Pettine, R. Zboril. Chemosphere, **188**, 403 (2017). DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.130
- [4] A. Lin, X.H. Zhang, M.M. Chen, Q. Cao. J. Env. Sc., **19** (5), 596 (2007). DOI: 10.1016/S1001-0742(07)60099-0
- [5] J.Y. Chang, G.Q. Wang, C.Y. Cheng, W.X. Lin, J.C. Hsu. J. Mat. Chem., **22** (21), 10609 (2012). DOI: 10.1039/C2JM30679D
- [6] K.N. Baranov, E.P. Kolesova, M.A. Baranov, A.O. Orlova. Opt. Spectrosc., **130** (5), 336 (2022). DOI: 10.1134/S0030400X22060017

- [7] S.F. Lee, M.A. Osborne. *ChemPhysChem*, **10** (13), 2174 (2009). DOI: 10.1002/cphc.200900200
- [8] E.P. Kolesova, F.M. Safin, V.G. Maslov, Y.K. Gun'ko, A.O. Orlova. *Opt. Spectrosc.*, **127**, 548 (2019). DOI: 10.1134/S0030400X19090157
- [9] W. Kim, N.K. Ly, Y. He, Y. Li, Z. Yuan, Y. Yeo. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **192**, 114635 (2023). DOI: 10.1016/j.addr.2022.114635
- [10] A. Spada, J. Emami, J.A. Tuszynski, A. Lavasanifar. *Mol. Pharmaceutics*, **18** (5), 1862 (2021). DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046
- [11] Q. Ji, H. Zhu, Y. Qin, R. Zhang, L. Wang, E. Zhang, R. Meng. *Frontiers in Pharmacology*, **15**, 1329636 (2024). DOI: 10.3389/fphar.2024.1329636/full
- [12] A.M. Bannunah, D. Vllasaliu, J. Lord, S. Stolnik. *Mol. Pharmaceutics*, **11** (12), 4363 (2014). DOI: 10.1021/mp500439c
- [13] A. Raevskaya, V. Lesnyak, D. Haubold, V. Dzhagan, O. Stroyuk, N. Gaponik, A. Eychmüller. *J. Phys. Chem. C*, **121** (16), 9032 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00849
- [14] E.P. Kolesova, V.S. Egorova, A.O. Syrocheva, A.S. Frolova, D. Kostyushev, A. Kostyusheva, A. Parodi. *Int. J. Mol. Sci.*, **24** (12), 10245 (2023). DOI: 10.3390/ijms241210245
- [15] I.A. Mir, M.A. Bhat, Z. Muhammad, S.U. Rehman, M. Hafeez, Q. Khan, L. Zhu. *J. Alloys and Compounds*, **811**, 151688 (2019). DOI: 10.1016/j.jallcom.2019.151688
- [16] L. Lai, C. Lin, Z.Q. Xu, X.L. Han, F.F. Tian, P. Mei, Y. Liu. *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **97**, 366 (2012). DOI: 10.1016/j.saa.2012.06.025
- [17] C. Rivaux, T. Akdas, R. Yadav, O. El-Dahshan, D. Moodelly, W.L. Ling, P. Reiss. *J. Phys. Chem. C*, **126** (48), 20524 (2022). DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c06849