20

Фотоиндуцированное изменение флуоресцентных свойств $AgInS_2$ квантовых точек: влияние белкового окружения

© В.И. Горбачева [1], И.А. Резник [2], Е.П. Колесова [1]

[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 $AgInS_2/ZnS$ 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. Продемонстрировано, 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 наноносители.

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 A2B6 нашли применение и в биомедицинской области для биологической визуализации, сенсорики, и как эффективные доноры энергии и носителей 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 сенсибилизатор 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 фотоактивируемых систем, фотофизические свойства которых могут меняться в результате взаимодействия со светом. При поглощении внешнего излучения на поверхности частиц происходят фотохимические реакции, а именно фотооксиление 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 наноносители обладают рядом преимуществ, что привело к одобрению Абраксена, который представляет собой коньюгаты 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 $AgInS_2/ZnS$ были синтезированы методом гидротермального синтеза. Коньюгаты 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 также 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 $AgInS_2/ZnS$ (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 $Na_2S{\cdot}9H_2O$ (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 $Zn(CH_3COO)_2$ (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 при 12 000 rpm. После этого образцы перерастворялись в воде и хранились в темноте при температуре 4 °C.

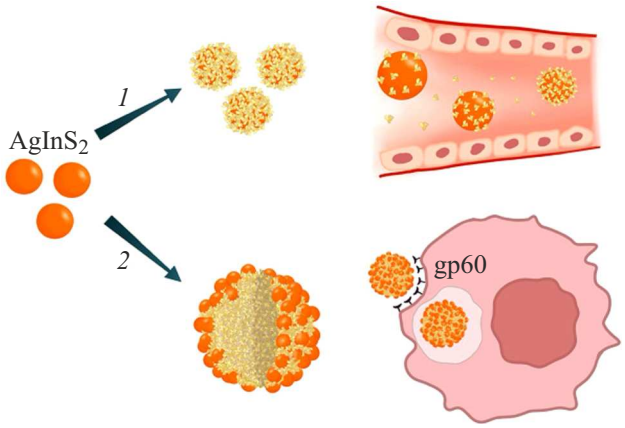

Рис. 1. Схематичное изображение систем на основе КТ и молекул белков, сформированных в настоящей работе: *1* — коньюгаты с ФБС для имитации белковой короны, образующейся на поверхности КТ при попадании в кровоток; *2* — КТ, инкапсулированные в АНЧ, способные адресно доставлять КТ в раковые клетки.

Для формирования коньюгатов 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 коньюгаты 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 глуторальдегида [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

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

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.

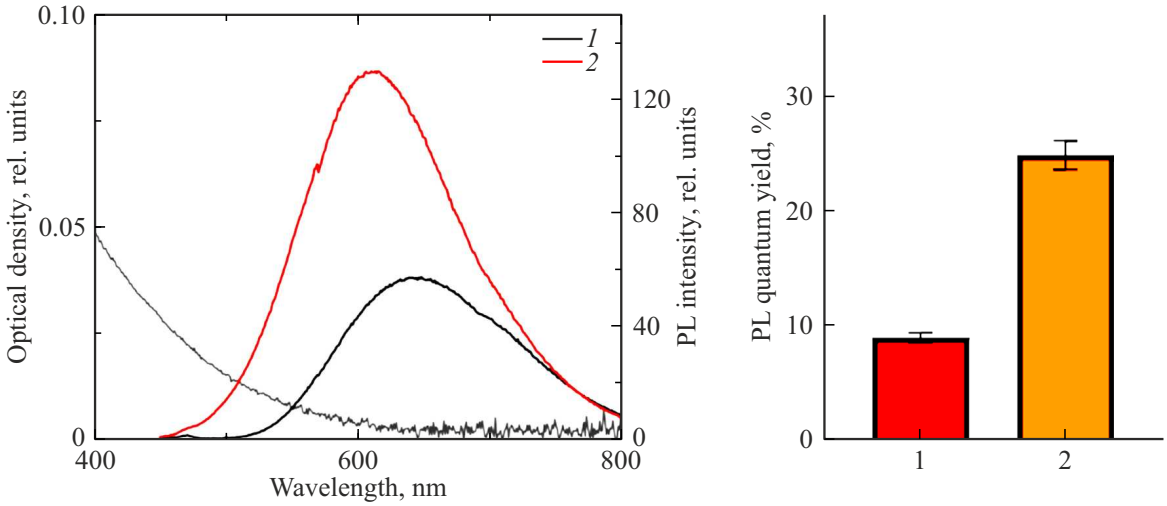

Рис. 2. (*a*) Спектры поглощения и флуоресценции КТ $AgInS_2$ и $AgInS_2/ZnS$. Длина волны возбуждения флуоресценции 405 nm. (*b*) Квантовый выход КТ $AgInS_2$ и $AgInS_2/ZnS$, рассчитанный относительно родамина 6Ж: *1* — КТ $AgInS_2$, *2* — КТ $AgInS_2/ZnS$.

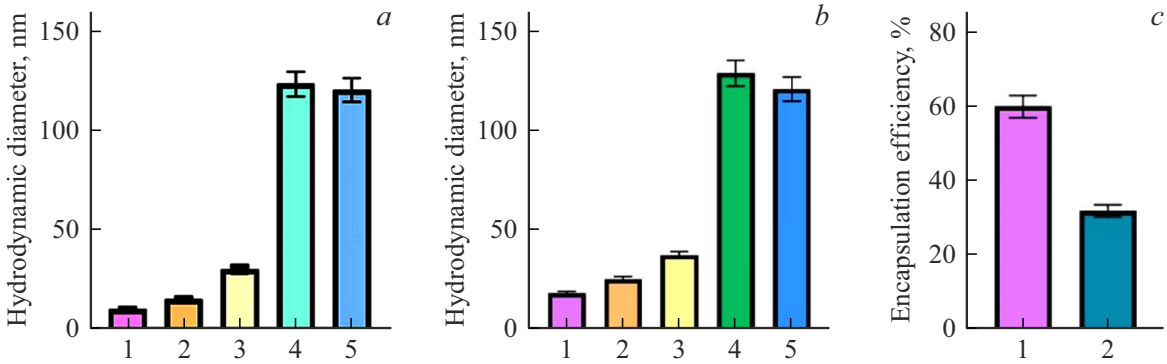

Рис. 3. Гидродинамический диаметр систем на основе КТ $AgInS_2$ (*a*) и $AgInS_2/ZnS$ (*b*): *1* — КТ, *2* — КТ/10ФБС, *3* — КТ/30ФБС, *4* — КТ/АНЧ, *5* — АНЧ; эффективность инкапсуляции КТ в АНЧ: *1* — $AgInS_2$, *2* — $AgInS_2/ZnS$ (*c*).

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 cm^2). Образец периодически перемешивался для равномерного воздействия внешнего излучения на КТ. Суммарная доза падающего излучения составила $\sim 0.75\,J\cdot m^{-2}$. Во время облучения периодически регистрировались спектры флуоресценции КТ и систем на их основе.

Результаты

Влияние фотоиндуцирванных процессов на поверхности КТ на их флуоресцентные свойства оценивалось для трех различных модельных ситуаций: водный раствор КТ после синтеза ($AgInS_2$ и $AgInS_2/ZnS$), коньюгаты КТ с ФБС ($AgInS_2$/ФБС и $AgInS_2/ZnS$/ФБС) и системы с АНЧ ($AgInS_2$/АНЧ и $AgInS_2/ZnS$/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

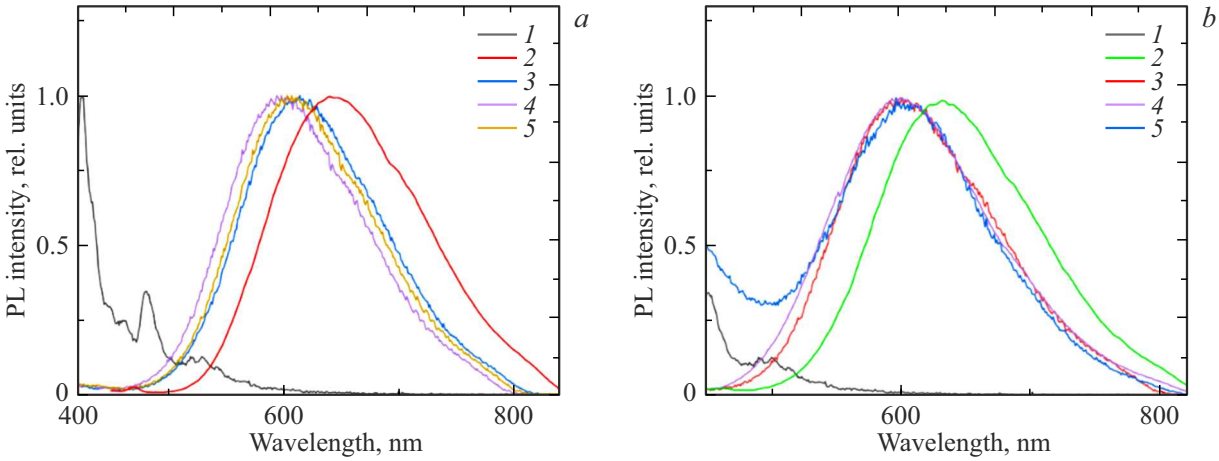

Рис. 4. Спектры флуоресценции систем на основе КТ $AgInS_2$ (*a*) и $AgInS_2$/ZnS (*b*): *1* — АНЧ, *2* — КТ, *3* — КТ/10ФБС, *4* — КТ/30ФБС, *5* — КТ/АНЧ. Длина волны возбуждения флуоресценции — 405 nm.

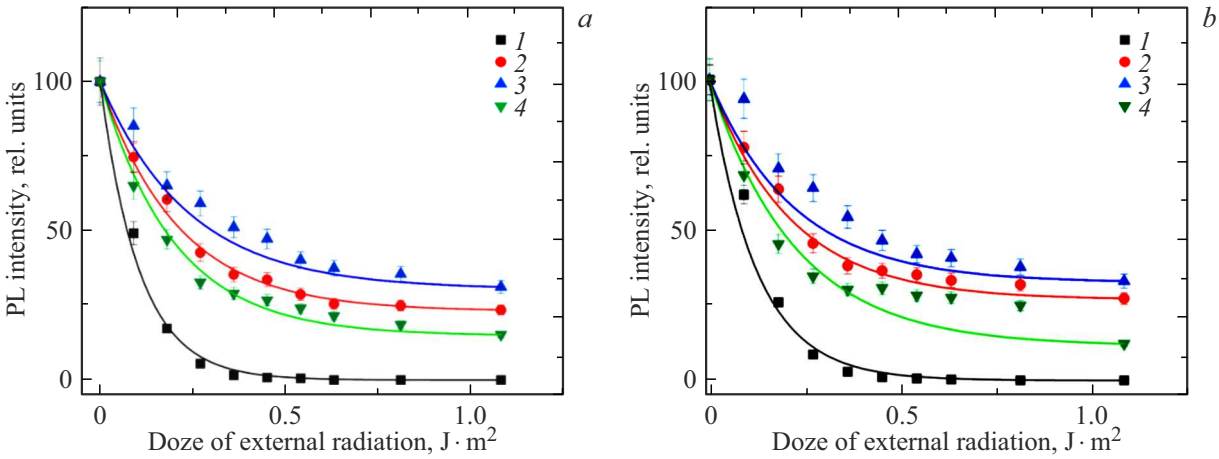

Рис. 5. Изменение флуоресценции КТ в процессе длительного воздействия внешнего излучения для систем на основе КТ $AgInS_2$ (*a*) и $AgInS_2$/ZnS (*b*): *1*— КТ, *2* — КТ/10ФБС, *3* —КТ/30ФБС, *4* — КТ/АНЧ. Данные нормированы на интенсивность флуоресценции в начальный момент облучения.

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 $AgInS_2$ и $AgInS_2$/ZnS.

Как видно из рис. 2, наращивание оболочки приводило к гипсохромному сдвигу спектра флуоресценции КТ $AgInS_2$ 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 в *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 фотофизических 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 $AgInS_2$ 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-биовзаимодействие. В случае систем КТ/АНЧ размер системы определяется размером исходных АНЧ (120 nm), и инкапсуляции КТ приводят к незначительному увеличению гидродинамического диаметра (до 125 и 128 nm) при 60% и 32% эффективности инкапсуляции КТ $AgInS_2$ и $AgInS_2$/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 gp60 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 $15\,\mathrm{mJ\cdot m^2}$. 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 ($0.25\,\mathrm{J\cdot m^2}$), однако и в этом случае КТ быстро теряют флуоресцентные свойства (рис. 5, *b*). Белковое окружение приводит к существенному замедлению этих процессов, что позволит сохранить функциональность КТ в течение долгого промежутка времени. Так, при превышении падающим излучением дозы $0.4\,\mathrm{J\cdot m^2}$ 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, коньюгация 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 кровооообращения и их взаимодействии с клетками, будет оказывать существенное влияние на фотофизические свойства КТ. В частности, коньюгация 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