

## Кремниевые нанокристаллы как фотосенсибилизаторы активного кислорода для биомедицинских применений

В. Ю. Тимошенко, А. А. Кудрявцев<sup>†</sup>, Л. А. Осминкина, А. С. Воронцов, Ю. В. Рябчиков, И. А. Белогорохов, Д. Ковалев\*, П. К. Кашкаров

МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119992 Москва, Россия

<sup>†</sup> Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино, Московская обл., Россия

\* Department of Physics, University of Bath, Bath BA2 7AY, United Kingdom

Поступила в редакцию 13 апреля 2006 г.

После переработки 23 марта 2006 г.

Кремниевые нанокристаллы (nc-Si), диспергированные в воде, были использованы для фотосенсибилизации процесса генерации активного кислорода. Эффективность фотосенсибилизации контролировалась по гашению экситонной фотолюминесценции nc-Si. Эксперименты на раковых клетках фибробластов мыши продемонстрировали значительное (до 80%) уменьшение их числа при контакте с фотовозбужденными nc-Si. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования nc-Si в биомедицинских целях, в частности, для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

PACS: 78.67.-n, 87.83.+a

В последнее время внимание исследователей в области физики наноструктур и нанотехнологий привлечено к полупроводниковым нанокристаллам, поскольку они обладают новыми физико-химическими свойствами, перспективными для многочисленных применений (см., например, [1]). Среди полупроводниковых материалов особое место занимает кремний, который является базовым в современной микроэлектронике, а в форме низкоразмерных структур перспективен также для использования в светоизлучающей оптоэлектронике [2, 3], фотонике [4] и как источник энергии [5]. Помимо этого, недавно было обнаружено, что нанокристаллы кремния (nc-Si) могут также выступать в качестве эффективных фотосенсибилизаторов синглетного кислорода [6, 7]. Данный вид возбужденного молекулярного кислорода отличается высокой химической активностью [8], что обуславливает его применение в биологии, экологии и медицине, в частности, для фотодинамической терапии онкологических заболеваний [9].

Как было установлено, при фотовозбуждении nc-Si с размерами порядка нескольких нанометров возникают экситоны, которые могут эффективно передавать свою энергию молекулам O<sub>2</sub>, адсорбированным на поверхности нанокристаллов. Это обусловлено близостью энергий экситонов в nc-Si к энергиям электронных переходов в молекулах O<sub>2</sub>, в результате чего реализуется процесс резонансной передачи заряда (механизм Декстера) [6, 7]. Известно, что молекула O<sub>2</sub> обладает основным состоянием со спином 1, яв-

ляющимся вследствие этого триплетным и обозначаемым как <sup>3</sup>Σ, и двумя возбужденными состояниями со спином 0, являющимися синглетными, с энергиями 0.98 эВ и 1.63 эВ и обозначаемыми соответственно символами <sup>1</sup>Δ и <sup>1</sup>Σ [8]. Отметим, что использование фотосенсибилизатора для генерации синглетного кислорода необходимо, поскольку прямое оптическое возбуждение состояний <sup>1</sup>Δ и <sup>1</sup>Σ запрещено правилами отбора по спину и орбитальному квантовому числу [8]. В то время как возможность фотосенсибилизации процесса генерации синглетного кислорода при помощи nc-Si зафиксирована уже в ряде работ, в большинстве из них она реализована либо при адсорбции O<sub>2</sub> из газовой фазы [6, 7, 10], либо из неводных растворов [11, 12], что не позволяет судить о перспективах биомедицинских применений nc-Si. В настоящей работе сообщается об использовании nc-Si как фотосенсибилизаторов синглетного кислорода в водной среде, а также продемонстрировано их применение для подавления размножения раковых клеток.

Для получения nc-Si был задействован метод электрохимического травления монокристаллов Si в растворе плавиковой кислоты, являющийся стандартным для формирования слоев пористого кремния [2]. Были использованы пластины c-Si:B с ориентацией поверхности (100) и удельным сопротивлением 10–20 Ом·см. Пластины травилась (анодировались) в растворе HF(48%):C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 1:1 при плотности тока 60 мА/см<sup>2</sup> в течение 1 ч. Сформированные таким образом слои пористого кремния были отделены от

подложки кратковременным увеличением плотности тока до  $800 \text{ mA/cm}^2$ . Затем данные слои высушивались на воздухе в течение 1–2 ч, после чего механически измельчались до получения порошка с максимальными размерами гранул порядка нескольких микрон. При этом средние размеры nc-Si, определенные по данным комбинационного рассеяния света [2] как в исходных слоях, так и в полученном из них порошке, составляли около 3–4 нм. Порошок пористого кремния был использован для приготовления суспензий в дистиллированной деионизованной воде. Суспензии помещались в кварцевую кювету, соединенную с вакуумной системой и резервуаром с молекулярным кислородом, что позволяло проводить их исследования как после насыщения молекулярным  $\text{O}_2$ , так и после удаления (откачки) растворенного газа.

Для возбуждения фотолюминесценции (ФЛ) применялся азотный лазер с длиной волны 337 нм и длительностью импульса 10 нс. Спектры ФЛ измерялись на спектрометре Solar TII, укомплектованном CCD-камерой Hamamatsu MS-101H. Кинетики ФЛ детектировались с использованием монохроматора МДР-12, фотоэлектронного умножителя Hamamatsu R237 и цифрового осциллографа Agilent 54642A.

В биофизических экспериментах использовались раковые клетки линии 3Т3 NIH (модифицированные фибробласты мыши), выращенные стандартной процедурой субкультивации *in vitro* [13] в чашках Петри или в специальных плашках из 96 лунок. Перед добавлением порошка nc-Si питательная среда заменялась на свежую. Исследуемые клетки подразделялись на три группы, в первую и вторую из которых добавлялась водная суспензия, содержащая определенное количество nc-Si, третья группа была контрольной (в контрольную группу nc-Si не добавлялся). Клетки первой и третьей групп освещались в течение 1 ч светом ртутной лампы ДРШ250-2, излучение которой предварительно пропускалось через фильтр из дистиллированной воды (для подавления тепловой составляющей спектра) и стеклянный фильтр с полосой пропускания 350–600 нм. Интенсивность светового потока на образце составляла  $\sim 1 \text{ мВт/см}^2$ . Клетки второй группы не освещались. После проведения эксперимента во всех группах клеток питательный раствор менялся на свежий, клетки помещались в темноту на 20 ч для культивирования, после чего проводилось измерение их числа и состава. На всех этапах воздействия и культивирования клеток поддерживалась температура  $T = 37^\circ\text{C}$  и фиксированный уровень кислотности среды  $\text{pH} = 7.2$ . Для подсчета числа клеток и анализа их состава использовались

несколько стандартных методов. В первом методе клетки окрашивались в 0.2%-ном растворе красителя кристаллический фиолетовый в метиловом спирте и определялась оптическая плотность содержимого лунок по поглощению света с длиной волны 540 нм. Во втором методе клетки в чашках Петри смывали раствором трипсин-ЭДТА и проводили подсчет их числа в гемоцитометре (под микроскопом). Кроме этого выполнялся анализ ДНК клеток в проточном цитофлуориметре (см. детали методов в [14, 15]).

Спектры ФЛ водных суспензий nc-Si представлены на рис.1. Спектры представляли собой широкие

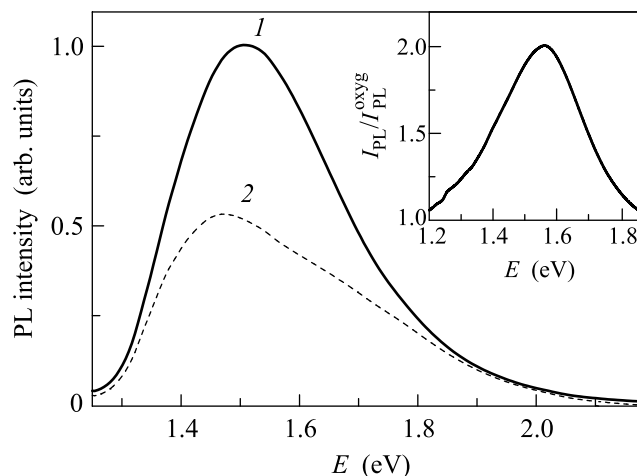


Рис.1. Спектры ФЛ суспензий nc-Si в воде без растворенного кислорода (1) и после ее насыщения кислородом при давлении 760 торр (2). Вставка показывает степень гашения ФЛ после насыщения суспензии кислородом

полосы с максимумом в области 1.5–1.6 эВ, которые типичны для nc-Si с характерными средними размерами 2–4 нм [2, 3], что согласуется с приведенными выше оценками по данным комбинационного рассеяния света. Наблюдаемая ФЛ обычно связывается с излучательной рекомбинацией экситонов в nc-Si [16]. Отметим, что квантовый выход ФЛ для исходных слоев пористого кремния был не менее 1%, а в суспензии при концентрации nc-Si свыше 10 мг/л ФЛ могла легко наблюдаться невооруженным глазом. После насыщения суспензий кислородом происходило гашение ФЛ, степень которого монотонно увеличивалась с ростом давления  $\text{O}_2$ . После откачки растворенного газа интенсивность ФЛ практически возвращалась к исходному уровню. Спектральная зависимость степени гашения ФЛ, определяемая как отношение интенсивности ФЛ суспензии без растворенного газа ( $I_{PL}$ ) к аналогичному значению после ее насыщения  $\text{O}_2$  ( $I_{PL}^{\text{oxyg}}$ ) приведена на вставке рис.1. Видно, что

максимум подавления ФЛ nc-Si располагается в области 1.6 эВ, что близко к энергии перехода  $^3\Sigma \rightarrow ^1\Sigma$  в молекуле  $O_2$ . Это указывает на то, что гашение ФЛ nc-Si происходит в результате передачи энергии к молекуле  $O_2$ , то есть в процессе фотосенсибилизации генерации синглетного кислорода [5]. Анализ разности интегральных по спектру интенсивностей ФЛ nc-Si в суспензиях с растворенным кислородом и после его откачки свидетельствует о том, что на возбуждение молекул  $O_2$  передается около 40% энергии экситонов.

Дополнительная информация об эффективности процесса фотосенсибилизации синглетного кислорода была получена из анализа кинетик ФЛ nc-Si, возбуждаемых лазерными импульсами. На рис.2 показаны

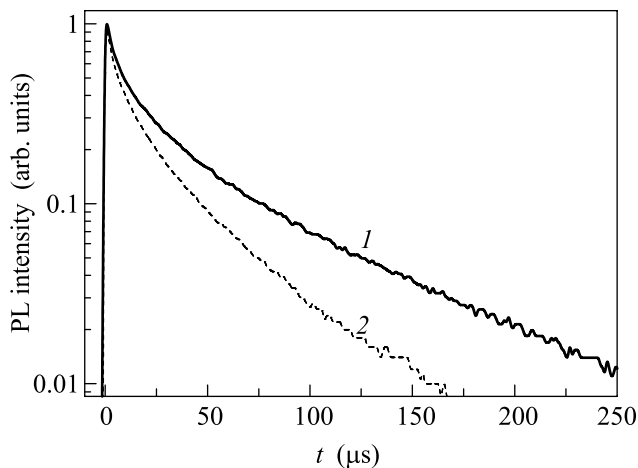


Рис.2. Кинетики ФЛ, измеренные для энергии фотонов 1.6 эВ, в водных суспензиях nc-Si без растворенного кислорода (1) и после насыщения кислородом при давлении 760 торр (2)

типичные нормированные кинетики ФЛ с энергией фотонов 1.6 эВ. Видно, что на временах более 10 мкс после начального неэкспоненциального участка имеет место практически экспоненциальный спад интенсивности ФЛ, характерное время которого зависит как от энергии фотонов, так и от состояния образцов. Время релаксации экспоненциального участка кинетики ФЛ в откачанном растворе составило величину  $\tau \approx 85$  мкс, что близко к значению собственно излучательного времени жизни экситонов в nc-Si, люминесцирующих с энергией 1.6 эВ [16]. Насыщение раствора газообразным  $O_2$  при давлении 760 торр приводило к укорочению времени релаксации ФЛ до значения  $\tau_{ox} \approx 50$  мкс. После откачки растворенного газа время жизни ФЛ возвращалось к своему исходному значению. Отношение  $\tau/\tau_{ox} \approx 1.6$  близко к измеренной степени гашения стационарной ФЛ (см. вставку на рис.1). Все это указывает на то,

что сокращение времени жизни ФЛ nc-Si при насыщении водной суспензии кислородом обусловлено взаимодействием экситонов в nc-Si с окружающими их молекулами кислорода, то есть возбуждением синглетного кислорода. Используя указанные выше значения времен, можно оценить эффективное время передачи энергии от экситона к молекуле  $O_2$ :  $\tau_s = 1/(\tau_{ox}^{-1} - \tau^{-1}) \approx 120$  мкс. Последняя величина сопоставима с излучательным временем жизни экситонов  $\tau$ , что объясняет достаточно высокую эффективность фотосенсибилизации синглетного кислорода. Отметим, что для других энергий фотонов укорочение времени жизни ФЛ nc-Si в присутствии растворенного молекулярного  $O_2$  было меньше, а спектральная зависимость величины  $\tau_s$  в целом повторяла спектр гашения стационарной ФЛ (см. рис.1).

Фотовозбужденные nc-Si были нами использованы для подавления процесса размножения раковых клеток. На рис.3 показаны зависимости числа живых

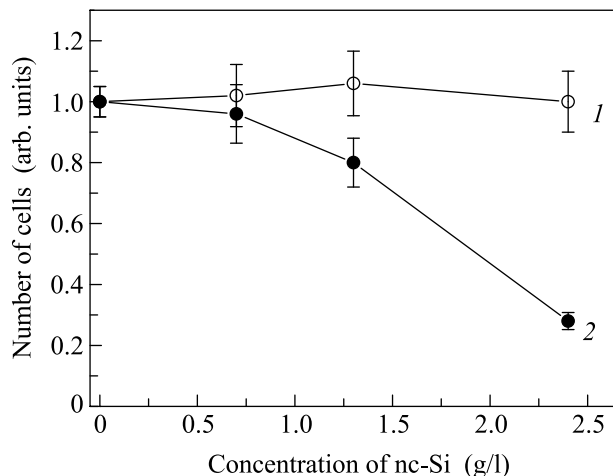


Рис.3. Зависимости числа раковых клеток от концентрации nc-Si после нахождения в течение 1 ч в темноте (1) или после освещения (2), определенные по изменению их оптической плотности и нормированные на значения в контрольной группе, где nc-Si не добавлялся

клеток фибробластов мыши первой и второй групп в конце культивирования, нормированные на значение в контрольной третьей группе, от концентрации nc-Si. Видно, что после освещения при концентрации nc-Si в питательном растворе  $\sim 0.5$  г/л и выше имеет место значительное уменьшение числа живых клеток по сравнению с контрольной группой. При концентрации 2.5 г/л фиксировалась гибель около 80% клеток. В то же время, в темноте влияние nc-Si практически отсутствует во всем использованном диапазоне концентраций. Следовательно, можно сделать вывод о том, что подавление размножения раковых клеток

вызвано воздействием активного кислорода, возникающего при фотовозбуждении nc-Si. Выполненный нами анализ ДНК клеток показал, что после освещения в присутствии nc-Si для концентраций более 0.1–0.5 г/л происходит их гибель по механизму апоптоза, то есть “программируемой смерти” [15], а концентрационная зависимость числа оставшихся клеток близка к представленной на рис.3. По-видимому, гибель раковых клеток связана с воздействием фотосенсибилизированного активного кислорода, в частности, с окислением вещества клеток синглетным кислородом. Кроме этого, возможно влияние других активных форм кислорода, например, так называемого супероксида (ионов  $O_2^-$ ), образование которого наблюдалось в работе [17]. Для выяснения конкретных механизмов влияния фотовозбужденных nc-Si на биологические объекты необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности использования фотовозбужденных nc-Si для подавления процесса размножения раковых клеток. Последнее, очевидно, может найти применение в фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

Работа была поддержана Министерством образования и науки РФ (контракт # 02.434.11.2037), Комитетом по науке Правительства Москвы (грант # 1.1.221), ИНТАС (проект # 05-104-7656), 6-й рамочной программой Европейского Союза (проект # FP6-STRP PSY-NANO-SI, контракт NMP4-CT-2004-013875) и выполнена на оборудовании ЦКП МГУ им. М.В. Ломоносова.

1. *Semiconductor Nanocrystals: From Basic Principles to Applications*, Series: Nanostructure Science &

Technology, Eds. Al. Efros, D.J. Lockwood, and L. Tsybeskov, Springer Publ., 2004.

2. O. Bisi, S. Ossicini, and L. Pavese, *Surf. Sci. Rep.* **38**, 1 (2000).
3. П. К. Кашкаров, М. Г. Лисаченко, О. А. Шалыгина и др., *ЖЭТФ* **124**, 1255 (2003).
4. P. K. Kashkarov, L. A. Golovan, A. B. Fedotov et al., *J. Opt. Soc. Am. B* **19**, 2273 (2002).
5. D. Kovalev, V. Yu. Timoshenko, E. Gross et al., *Phys. Rev. Lett.* **87**, 068301 (2001).
6. D. Kovalev, E. Gross, N. Künzner et al., *Phys. Rev. Lett.* **89**, 137401 (2002).
7. E. Gross, D. Kovalev, N. Künzner et al. *Phys. Rev. B* **68**, 115405 (2003).
8. N.J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Sci. Publ., Sausalito, CA, 1991.
9. J.G. Moser, *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood Academic Publ., Amsterdam, 1998.
10. D. Kovalev, E. Gross, J. Diener et al., *Appl. Phys. Lett.* **85**, 3590 (2004).
11. M. Fujii, M. Usui, S. Hayashi et al., *J. Appl. Phys.* **95**, 3689 (2004).
12. M. Fujii, Sh. Minobe, M. Usui et al., *Phys. Rev. B* **70**, 085311 (2004).
13. W. Kueng, E. Silber, and U. Eppenberger, *Anal. Biochem.* **182**, 16 (1989).
14. О. Е. Гриченко, В. В. Шапошникова, А. А. Кудрявцев, Ю. Н. Корыстов, *Известия АН. Сер. Биологич.* № 3, 274 (2004).
15. H. Steller, *Science* **267**, 1445 (1995).
16. D. Kovalev, H. Heckler, G. Polisski, and F. Koch, *Phys. Stat. Sol. (b)* **215**, 871 (1999).
17. M. Fujii, D. Kovalev, Sh. Minobe et al., *Phys. Rev. B* **72**, 165321 (2005).