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

П. А. Линьков<sup>+\*1</sup>, К. В. Вохминцев<sup>+</sup>, П. С. Самохвалов<sup>+</sup>, М. Ларонз-Кохар<sup>#2</sup>, Я. Сапи<sup>#2</sup>, И. Р. Набиев<sup>+\*</sup>

<sup>+</sup>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 ( $\Phi$ Л) полупроводниковые нанокристаллы "квантовые точки" (KT) 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 KT может происходить тушение  $\Phi$ Л квантовых точек, вызванное переносом электрона от KT к органической молекуле. В настоящей работе показано, что структура оболочки KT играет определяющую роль в процессе фотоиндуцированного переноса заряда от KT к акридиновому лиганду, вызывающего тушение  $\Phi$ Л KT. Показано, что оболочки CdSe-ядер KT, имеющие многокомпонентную структуру ZnS/CdS/ZnS, при своей относительно небольшой толщине, позволяют в значительной степени подавлять снижение квантового выхода  $\Phi$ Л квантовых точек, по сравнению как с классической тонкой оболочкой ZnS, так и со сверхтолстыми оболочками этого состава. Таким образом, KT типа "ядро/многокомпонентная оболочка" со структурой CdSe/ZnS/CdS/ZnS могут стать оптимальными  $\Phi$ Л-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 (KT) – 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

<sup>&</sup>lt;sup>1)</sup>e-mail: valinkov@gmail.com

<sup>&</sup>lt;sup>2)</sup>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 HCMO 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.

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 массспектрометрии (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 (MC), "гигантская" оболочка ZnS толщиной в пять MC, и многокомпонентная оболочка (multishell – MS) ZnS/CdS/ZnS общей толщиной три монослоя. Первый из перечисленных типов – это "классическая" однокомпонентная



Рис. 1. Структурная формула молекулы акридинового лиганда

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-ОН и SH-ПЭГ-СООН 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 (а) 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)

оболочкой  $\rm ZnS/CdS/ZnS$  при титровании их раствора раствором AЛ показан на вставке рис. 3.

3. Результаты и обсуждение. Известно, что полосы поглощения АЛ в спектральной области от 300 до 450 нм связаны с  $\pi - \pi$  переходами сложной  $\pi$ 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 MC) – 503 и 472 нм, CdSe/ZnS (5 MC) – 572 и 551 нм, CdSe/MS (3 MC) – 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



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

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 MC), CdSe/ZnS (5 MC) и CdSe/MS (3 MC) 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 KT раствором АЛ приводило к тушению ФЛ всех изученных KT. Флюоресценция стандартных KT 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 KT с "гигантской" (5 MC) 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 KT 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  $\Phi \Pi$ , вызванное  $\Phi \Pi \Pi \Im$ , 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.

- J. Shi, A. R. Votruba, O. C. Farokhzad, and R. Langer, Nano Lett. **10**, 3223 (2010).
- 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).
- R. Bilan, F. Fleury, I. Nabiev, and A. Sukhanova, Bioconjug. Chem. 26, 609 (2015).
- D. Dovzhenko, E. Osipov, I. Martynov, P. Linkov, and A. Chistyakov, Phys. Procedia 73, 126 (2015).
- P. Samokhvalov, M. Artemyev, and I. Nabiev, Chem. Eur. J. 19, 1534 (2013).
- P. Linkov, M. Artemyev, A. E. Efimov, and I. Nabiev, Nanoscale 5, 8781 (2013).
- 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).
- K. D. Wegner and N. Hildebrandt, Chem. Soc. Rev. 44, 4792 (2015).
- 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).
- S. Müller, S. Kumari, R. Rodriguez, and S. Balasubramanian, Nat. Chem. 2, 1095 (2010).
- A. Artese, G. Costa, S. Distinto, F. Moraca, F. Ortuso, L. Parrotta, and S. Alcaro, Eur. J. Med. Chem. 68, 139 (2013).
- 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).

- J. Jasieniak, M. Califano, and S. E. Watkins, ACS Nano 5, 5888 (2011).
- A. Islam, P. Murugan, K. C. Hwang, and C.-H. Cheng, Synth. Met. **139**, 347 (2003).
- 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).
- 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).
- P. Linkov, K. V Vokhmintcev, P. S. Samokhvalov, and I. Nabiev, Opt. Spectrosc. **122**, 8 (2017).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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.
- 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).
- J. Jasieniak, L. Smith, J. Van Embden, P. Mulvaney, and M. Califano, J. Phys. Chem. C 113, 19468 (2009).
- P. Linkov, V. Krivenkov, I. Nabiev, and P. Samokhvalov, Mater. Today Proc. 3, 104 (2016).

7