

Термическая денатурация яичного белка при наносекундном импульсном лазерном нагреве наночастиц золота

Ю.П.Мешалкин, И.Н.Лапин, В.А.Светличный

Исследована термическая денатурация яичного белка в присутствии наночастиц золота путем их нагрева на длине волны плазмонного резонанса импульсным излучением второй гармоники Nd:YAG-лазера (532 нм). Получена экспериментальная зависимость времени денатурации белка от средней мощности лазерного излучения. Приведен расчет температуры нагрева среды, содержащей наночастицы золота. Численные оценки температуры нагрева среды, содержащей белок и наночастицы золота (к моменту денатурации белка – 45.3 °C), хорошо совпадают с литературными данными по его термической денатурации и с данными пирометрических измерений (42.0 ± 1.5 °C). Яичный белок может успешно использоваться для исследования особенностей процессов лазерного нагрева белков в присутствии наночастиц металлов при их возбуждении на длине волны плазмонного резонанса.

Ключевые слова: яичный белок, наночастицы золота, излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера, плазмонный резонанс, термическая денатурация белка.

1. Введение

Термическое разрушение клеток путем нагрева наночастиц металла лазерным излучением на длине волны плазмонного резонанса было впервые предложено в 2003 г. Питсилидисом [1] в качестве нового перспективного метода лечения, в первую очередь онкологических заболеваний. С этого времени в многочисленных работах, посвященных данной теме, решались различные частные задачи: от изучения распределения наночастиц в клеточных структурах [2] и их адресной доставки к патологическим клеткам [3, 4] до получения частиц в виде стержней с заданным аспектным отношением для сдвига длины волны плазмонного резонанса в ИК область [5, 6].

Фотоиндуцированная гибель клеток в присутствии наночастиц под действием лазерного излучения была продемонстрирована на клеточных культурах путем подсчета погибших после облучения клеток [7, 8], а также на патогенных бактериях [9]. В экспериментах *in vivo* изучалась динамика торможения роста опухоли животных в процессе лечения.

Непосредственный нагрев лазерным излучением наночастиц металла в тканях изучен меньше. Излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера (532 нм), чаще всего используемое для нагрева сферических наночастиц золота на длине волны плазмонного резонанса (520–550 нм), практически не проникает в биологические ткани. С дру-

гой стороны, технология получения металлических наностержней, для нагрева которых можно использовать более длинноволновое излучение, остается достаточно дорогостоящей и сложной, а сами наностержни существенно хуже проникают внутрь клетки, чем сферические наночастицы. Считается, что в клетки лучше всего проникают наночастицы размером 30–50 нм [10], тогда как наностержни, как правило, обладают большими размерами. Кроме того, при лазерном нагреве наностержни быстро трансформируются в наносферы, в их спектре поглощения пропадает полоса продольного плазмонного резонанса (reshaping) [11] и они перестают быть эффективным конвертером лазерного ИК излучения в тепло.

Работа с тканями требует использования гистологических методов, которые в случае исследования тепловых воздействий на образцы не дают однозначного ответа, т. к. в процессе их подготовки используется проводка в горячем парафине. Кроме того, чтобы изображение было получено именно из области воздействия, при подготовке срезов необходимо решить проблему маркировки области облучения.

В последнее время обсуждаются два основных механизма повреждения патологических клеток при лазерном нагреве наночастиц:

- 1) термическая денатурация внутриклеточных белков за счет тепла нагретых лазерным излучением наночастиц;
- 2) испарение тонкого слоя жидкости вокруг нагретой наночастицы с образованием микропузырьков, вызывающих повреждение мембраны клеток [12].

В экспериментах с клетками разделить эти два механизма не представляется возможным. В связи с этим возникает необходимость в простой экспериментальной методике, позволяющей изучать только механизм денатурации белка и исключаяющей влияние микропузырьков. Кроме того, клеточные структуры являются достаточно сложными объектами, для исследования которых требуется комплекс методов оптической и электронной микроскопии. В подобных экспериментах довольно труд-

Ю.П.Мешалкин. Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630092 Новосибирск, просп. К.Маркса, 20; Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 13/3

И.Н.Лапин, В.А.Светличный. Сибирский физико-технический институт им акад. В.Д.Кузнецова Томского государственного университета, Россия, 634050 Томск, пл. Новособорная, 1; e-mail: ivan@public.tsu.ru, v_svetlichnyi@rumbler.ru

Поступила в редакцию 24 февраля 2011 г., после доработки – 6 июня 2011 г.

но определить оптимальные характеристики лазерного излучения для получения эффективной фототермоконверсии.

Считается, что для эффективной конверсии лазерного излучения в тепло необходима плотность мощности лазерного излучения $10^5 - 10^{10}$ Вт/м² [13]. Вместе с тем в экспериментах нагрев наностержней или нанооболочек чаще всего выполняется полупроводниковым непрерывным лазером с длиной волны 808 нм и средней мощностью 450–600 мВт, что не позволяет достичь требуемой плотности мощности.

При использовании импульсных лазеров, подбирая энергетические и временные характеристики, можно получить максимально эффективную для данного вида наночастиц конверсию излучения в тепло с учетом их окружения.

В настоящей работе предложен экспериментальный подход к исследованию особенностей термического разложения некоторых биологических объектов в зависимости от характеристик лазерного излучения с использованием удобной модельной биологической среды – куриного белка. Объектом исследования служил белок свежего куриного яйца, который на 12 % состоит собственно из белка и на 86 % из воды [14] и является оптически прозрачным в видимом диапазоне в естественном состоянии. При денатурации яичного белка образец становится оптически непрозрачным в видимом диапазоне, что легко определить оптическими методами. Кроме того, лазерный нагрев образцов белка легко фиксируется дистанционно с помощью пирометра.

2. Образцы и методы исследований

Исходный яичный белок был извлечен из свежего сырого куриного яйца механически, без перемешивания с желтком и без разбавления. Наночастицы золота были получены методом лазерной абляции твердой мишени в жидкости. Данный метод широко используется для получения наночастиц различного состава, морфологии и размеров и имеет ряд преимуществ перед другими методами [15]. Он эффективен, когда требуются небольшие количества частиц, например в медико-биологических исследованиях, поскольку позволяет получать водные растворы наночастиц золота без посторонних примесей, как, например, при использовании химических методов синтеза. Установка для синтеза, на которой были получены коллоидные растворы наночастиц золота, подробно описана в работе [16]. Для абляции использовалось сфокусированное излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера LS-2134UTF (LOTIS ТП, Минск) с длиной волны 532 нм, длительностью импульса 7 нс и частотой следования импульсов 15 Гц. Мишень из объемного золота (99.99 %) облучалась в дистиллированной воде лазерным излучением при начальной пиковой плотности мощности на поверхности мишени 2 ГВт/см², что более чем на порядок превышает порог абляции в данных условиях. По мере наработки частиц в растворе плотность мощности излучения на поверхности мишени уменьшалась. Время облучения составляло 20 мин, объем жидкости был равен 10 мл, суммарная энергия излучения на образце составила 1.6 кДж. Концентрация наночастиц в пробе определялась путем измерения потери массы образца мишени, приведенной к объему жидкости, и для базового образца была равна 600 мг/л.

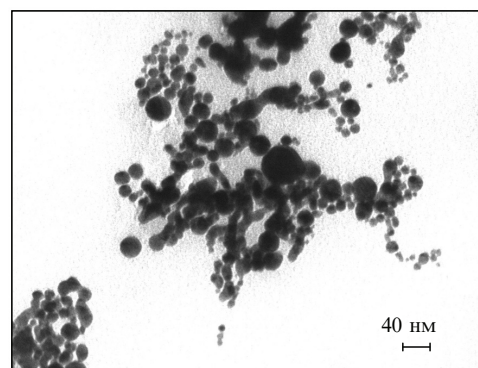


Рис.1. ПЭМ изображение наночастиц золота, полученных методом лазерной абляции объемной мишени в дистиллированной воде.

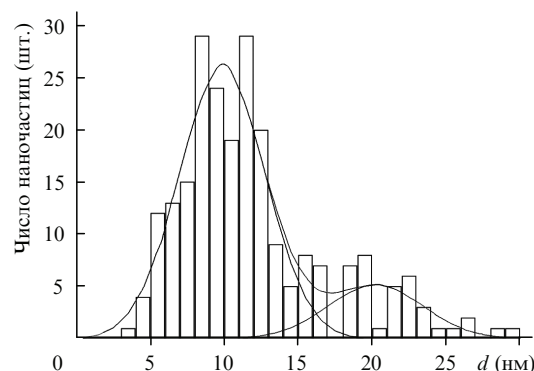


Рис.2. Диаграмма распределения сферических наночастиц золота по диаметрам.

По данным, полученным с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) CM12 (Philips), форма наночастицы золота близка к сферической (рис.1). При аппроксимации гауссовым бимодальным распределением средние диаметры частиц составили 9.9 и 20.3 нм с полуширинами распределения 5.8 и 6.5 нм соответственно (рис.2). Распределение было построено на основе 230 измерений диаметров наночастиц на трех ТЕМ изображениях.

Линейные спектры поглощения и флуоресценции образцов регистрировались спектрофлуориметром CM 2203 (СОЛАР, Минск). На рис.3 приведен спектр поглощения яичного белка с наночастицами золота при концентрации 120 мг/л (оптический путь 1 см, кривая 1) и спектр поглощения белка без добавок (оптический путь 0.12 мм, кривая 2). Полоса интенсивного белкового поглощения лежит в УФ области, тогда как полоса плазмонного ре-

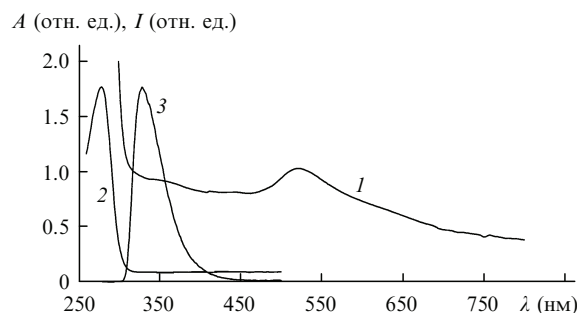


Рис.3. Спектры поглощения белка с наночастицами золота (длина оптического пути 1 см, 1) и без них (длина оптического пути 0.12 мм, 2) и спектр белковой флуоресценции 1 (3).

зонанса наночастиц золота с максимумом при 533 нм находится в видимой части спектра. Большое фоновое поглощение в спектре 1 во всем диапазоне связано с достаточно сильным рассеянием. Спектр флуоресценции образца белка (кривая 3) типичен для триптофановой флуоресценции и имеет максимум около 330 нм; для образца белка с добавлением наночастиц золота спектр флуоресценции не изменяется. Собственное свечение наночастиц золота не обнаруживается.

Оптическая схема измерения денатурации белка при лазерном нагреве наночастиц золота была достаточно проста. Излучение второй гармоники Nd:YAG-лазера, параметры которого указаны выше, в виде несфокусированного пучка диаметром 5 мм направлялось в кювету с образцом. В процессе экспериментов средняя мощность лазерного излучения на входе в кювету и на ее выходе регистрировалась измерителем энергии и средней мощности лазерного излучения NOVA II с калориметрическим детектором 12A-P (Ophir Optronics Ltd, Израиль). На входе средняя мощность изменялась от 0.49 до 1.64 Вт (импульсная плотность мощности составляла 15–50 мВт/см²).

Образцы для исследования при лазерном возбуждении представляли собой яичный белок с добавленными к нему водными растворами наночастиц золота без стабилизации в соотношении по объему 4:1. Таким образом, массовая концентрация наночастиц золота в пробе составляла 120 мг/л. Для сравнения использовался раствор белка, разбавленный дистиллированной водой в соотношении 4:1. При приготовлении образцов компоненты тщательно перемешивались в течение 10–15 мин в мерном цилиндрическом стакане вручную стеклянной палочкой до получения однородной гомогенной среды, после чего образцы выстаивались в течение 60 мин для удаления воздушных пузырьков, возникающих при перемешивании. Для стимулирования выхода пузырьков из раствора стакан периодически осторожно встряхивался.

В процессе экспериментов линейные спектры поглощения и флуоресценции исследуемых образцов контролировались с периодичностью 30 мин с целью подтверждения стабильности оптических свойств среды.

Объем пробы при облучении лазером составлял 0.5 см³, использовались кварцевые спектрометрические кюветы с длиной оптического пути 0.5 см. Температура белка определялась дистанционно с помощью пирометра AR 1300, погрешность измерений не превышала 1.5 °C при температуре около 40 °C.

3. Результаты и их обсуждение

Образец яичного белка, не содержащий наночастиц золота, подвергался лазерному облучению в течение 15 мин, при этом интенсивность прошедшего через него излучения во всем диапазоне используемых мощностей возбуждающего излучения не изменялась. На рис.4 приведены временные зависимости изменения пропускания образцов белка при различных мощностях падающего излучения. Отметим, что при введении в образец коллоидного раствора наночастиц интенсивность проходящего излучения падает примерно в 10 раз из-за поглощения и рассеяния излучения на наночастицах. При этом нормированная кривая пропускания 2 имеет два участка – области плавного уменьшения пропускания и его резкого падения в результате образования в образце оптически

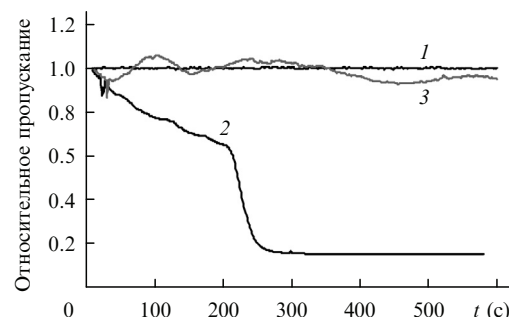


Рис.4. Временные зависимости относительного пропускания лазерного излучения, проходящего через кювету с исследуемым раствором (оптический путь 0.5 см), для белка (средняя мощность возбуждения 1.15 Вт) (1) и белка с наночастицами (средняя мощность возбуждения 1.15 и 0.49 Вт соответственно) (2, 3). Пропускание прошедшего излучения нормировано на пропускание в начальный момент облучения.

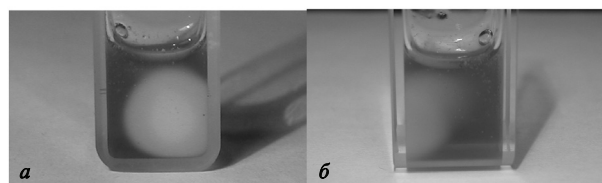


Рис.5. Фотография сгустка, образующегося в кювете с яичным белком, после его денатурации при импульсном лазерном облучении: фронтальный вид (а) и вид сбоку (б).

более плотного объемного сгустка денатурированного белка (рис.5). Измерение температуры образцов с помощью пирометра показало, что у образца без наночастиц средняя температура остается близкой к комнатной (26 ± 1.5 °C), тогда как у образца с наночастицами во время образования сгустка температура повышается до 43 ± 1.5 °C. Таким образом, природа образующегося сгустка связана с денатурацией яичного белка в возбуждаемом объеме.

При изменении средней мощности лазерного излучения изменяется время образования сгустка (время с момента начала воздействия и до момента, отвечающего середине области резкого уменьшения пропускания). Соответствующая зависимость представлена на рис.6. При средней мощности 0.77 Вт и ниже за 10 мин облучения денатурация белка в виде сгустка не наблюдалась; это может свидетельствовать о пороговом характере данного эффекта, что, однако, явно не следует из полученной зависимости.

Данный экспериментальный подход можно развивать с целью получения оценки эффективности лазерного нагрева наночастиц.

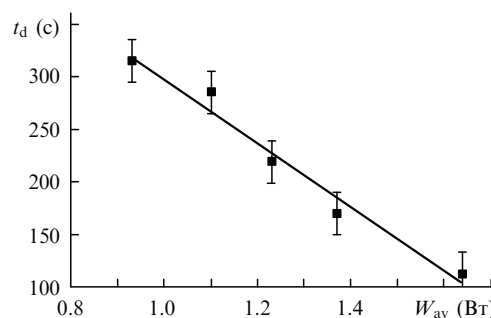


Рис.6. Зависимость времени «объемной» денатурации белка t_d от средней мощности лазерного излучения W_{av} .

При диаметре лазерного пучка 5 мм и длине оптического пути 5 мм облучаемый объем образца составляет 0.16 см^3 . Концентрация наночастиц равна 120 мг/л , масса наночастиц в облучаемом объеме образца $m = 19 \times 10^{-9} \text{ кг}$. Удельная теплоемкость объемного золота $c \approx 0.13 \text{ кДж} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ [17]. Данные по удельной теплоемкости наночастиц золота отсутствуют, поэтому в расчетах будем считать, что удельная теплоемкость используемых наночастиц диаметром 10 нм и более сравнима с удельной теплоемкостью объемного золота.

На основании анализа спектров поглощения при оптической плотности образца на длине волны облучения $D = 0.115$ можно заключить, что при лазерном возбуждении с указанными характеристиками $\sim 23\%$ падающего излучения поглощается, 67% рассеивается, а 10% проходит через образец и регистрируется калориметром.

При максимальной средней мощности излучения 1.64 Вт энергия в импульсе $Q = 0.11 \text{ Дж}$, если поглощается 23% энергии, то $Q = 0.0253 \text{ Дж}$.

Таким образом, средний нагрев наночастиц золота (без учета нагрева окружающей наночастицы среды) за один импульс

$$T - T_0 = \frac{Q}{cm} \approx 10^4 \text{ К.} \quad (1)$$

В реальных условиях в течение времени воздействия наносекундного импульса начинается перенос энергии возбуждения с наночастиц на молекулы растворителя, а также возникает дополнительное нелинейное рассеяние на локальных неоднородностях показателя преломления вокруг поглощающих излучение наночастиц [18, 19], экранирующее излучение накачки. В результате этого максимальная температура нагрева частиц составляет $\sim 10^3 \text{ }^\circ\text{C}$.

При рассмотрении лазерного нагрева всей среды ее физические параметры (теплоемкость и плотность) заменим соответствующими параметрами чистой воды, т.к. концентрации наночастиц и белка достаточно малы. В этом случае удельная теплоемкость среды $c \approx 4.2 \text{ кДж} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$ [17]. В облучаемой среде рассеивается вся поглощенная за один импульс энергия, поэтому

$$T - T_0 = \frac{Q}{cm} = 0.038 \text{ }^\circ\text{C.} \quad (2)$$

Частота следования лазерных импульсов $f = 15 \text{ Гц}$. Будем считать, что за время между импульсами тепло от нагретых наночастиц успеет распространиться по всему объему образца (0.5 см^3) и нагреть его за один импульс на температуру

$$T - T_0 = 0.012 \text{ }^\circ\text{C.} \quad (3)$$

Будем считать также, что система в первом приближении является теплоизолированной, т.е. не остывает за время между импульсами. Тогда, учитывая, что денатурация белка наблюдается через $t = 112.7 \text{ с}$, а $f = 15 \text{ Гц}$, получаем число лазерных импульсов, вызывающих денатурацию белка, равное 1.7×10^3 .

Суммарный нагрев образца всеми лазерными импульсами составляет $20.3 \text{ }^\circ\text{C}$.

При комнатной температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$ образец нагревается до $45.3 \text{ }^\circ\text{C}$, что хорошо согласуется с температурой, измеренной с помощью пирометра. Аналогичные оценки

при средних мощностях возбуждения $1.1 - 1.64 \text{ Вт}$ дают $44 - 48 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таким образом, предварительные оценки, выполненные с использованием постоянных теплофизических параметров и без учета теплопереноса в воздух и теплоемкости кюветы, показывают, что данная физическая модель вполне реальна и хорошо объясняет механизм термической денатурации белка при импульсном лазерном облучении наночастиц золота на длине волны плазмонного резонанса.

По нашему мнению, отличительной особенностью нагрева наночастиц золота в белковом окружении импульсным низкочастотным лазерным излучением является наличие двух процессов – быстрого и медленного. Быстрый процесс основан на нагреве частицы за импульс, после чего она успевает отдать тепло в среду. При этом в первую очередь денатурируют молекулы белка, находящиеся в ближайшем окружении наночастиц. Их можно визуально наблюдать в виде белых мутных микрочастиц в среде. Именно они обуславливают монотонное снижение пропускания в начальный период времени (см. рис.4, кривая 2 в диапазоне до 200 с).

Медленный механизм проявляется в виде объемного свертывания белка во всей области лазерного воздействия, прогретой вследствие многократного частотного возбуждения до температуры денатурации.

При непрерывном облучении быстрый механизм отсутствует, и при достижении пороговой мощности возбуждения происходит только объемное свертывание белка, поскольку теплоперенос не успевает компенсировать рост температуры за счет лазерного нагрева.

Импульсное возбуждение вследствие быстрого механизма требует меньших средних мощностей воздействия, и денатурация белка наблюдается еще до нагрева всего облучаемого объема до критической температуры. Таким образом, если увеличить концентрацию наночастиц в области патологии, а также повысить импульсную мощность за счет использования более коротких, например фемтосекундных, импульсов, то можно вызвать селективное термическое повреждение клеток не только на поверхности органа, но и внутри него, что актуально при лечении онкологических заболеваний.

4. Заключение

В результате проведенных исследований термической денатурации белка в присутствии наночастиц золота при возбуждении последних наносекундным лазерным излучением в полосу плазмонного поглощения (вторая гармоника Nd:YAG-лазера, 532 нм) и на основании зависимостей пропускания среды от времени облучения при различных плотностях мощности мы предположили, что существуют два механизма термической денатурации: локальный, быстрый – в течение импульса и объемный, медленный, возникающий за счет постепенного повышения температуры всей среды при облучении. Проведены количественные оценки возможного нагрева среды при облучении, которые хорошо совпадают с экспериментальными результатами.

Предлагаемый экспериментальный подход к исследованию лазерного нагрева биологических сред с использованием в качестве модельной среды куриного белка легко реализуем и может служить удобным инструментом для исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг., ГК П2511 «Нелинейные фотопроцессы, протекающие в системах, содержащих органические соединения и наноразмерные структуры» и АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы (2009–2011)», проект 2.1.1/11430 «Исследование плазмонного резонанса и лазерного разогрева металлических наночастиц в зависимости от их формы и размеров в полимерных матрицах и биологических тканях».

1. Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X., et. al. *Biophys. J.*, **84**, 4023 (2003).
2. Sadauskas E., Jacobson N.R., Danscher G., et. al. *Chem. Central. J.*, **3**:16, 1 (2009).
3. Eghtedari M.A., Copland J.A., Popov V.L., et.al. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4960**, 76 (2004).
4. El-Sayed I.H., Huang X.H., El-Sayed M.A. *Cancer Lett.*, **239**, 129 (2006).
5. Murphy C.J., Sau T.K., Gole A., et. al. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 13857 (2005).
6. Altansukh B., Yao J.X., Wang D. *J. Nanosci. Nanotech.*, **8**, 1 (2008).
7. Takahashi H., Niidome T., Nariai A., Niidome Y., Yamade S. *Nanotechnology*, **17**, 4431 (2006).
8. Pissuwan D., Cortie C.H., Valenzuela S.M., Cortie M.B. *Gold Bulletin*, **40/2**, 121 (2007).
9. Kim C.-B., Yi D.K., Kim P.S.S., Lee W., Kim M.J. *J. Nanosci. Nanotech.*, **9**, 1 (2008).
10. Park S.I., Hwang Y.H., Lim J.H., et al. *J. Magn. Mater.*, **304**, E403 (2006).
11. Takahashi H., Niidome T., Nariai A., Niidome Y., Yamade S. *Nanotechnology*, **17**, 4431 (2006).
12. Zharov V.P., Letfullin R.R., Galitovskaya E.N. *J.Phys.D: Appl. Phys.*, **38**, 2571 (2005).
13. Huang Y.-F., Sefan K., Bamrungsap S., Chang H.-T., Tan W. *Langmuir*, **24**, 11860 (2008).
14. Рейслер А.В. *Гигиена питания* (М.: Медгиз, 1952).
15. Симакин А.В., Воронов В.В., Шафеев Г.А. *Труды ИОФАН*, **60**, 83 (2004).
16. Светличный В.А., Изаак Т.И., Бабкина О.В., Шабалина А.В. *Изв. вузов. Сер. Физика*, **52**, 110 (2009).
17. Геращенко О.А., Гордов А.Н., Еремина А.К. и др. *Температурные измерения. Справочник* (Киев: Наукова Думка, 1989).
18. Francois L., Mostafavi M., Belloni J., et. al. *J. Phys. Chem. B*, **104**, 6133 (2000).
19. Sun Ya.-P., Riggs J.E., Henbest K.B., Martin R.B. *J. Nonlin. Opt. Phys. Mater.*, **9**, 481 (2000).