

Взаимодействие лазерного излучения и комплексов золотых плазмонных наночастиц с белками

С.В.Зарьков, Ю.А.Аветисян, А.Н.Якунин,
И.Г.Меерович, Д.Фикслер, А.П.Савицкий, В.В.Тучин

Приведены результаты численного моделирования распределения ближнего поля внутри и в окрестности золотых наночастиц двух типов (наносферы и наностержни), предназначенных для изготовления комплексов золотая плазмонная наночастица–белок и возбуждения фотосенсибилизаторов в диапазоне длин волн 532–770 нм. Получены количественные оценки локализации (усиления) поля в зависимости от типа наночастиц и размерных факторов. Описана тенденция «красного» смещения длины волны, на которой достигается максимум усиления локального поля, относительно положений максимумов сечений поглощения и рассеяния наночастиц и комплексов.

Ключевые слова: лазерное излучение, золотые плазмонные наночастицы, локализация поля, комплекс наночастица–белок, биосенсор, флуоресценция белков.

1. Введение

Несмотря на высокие темпы развития медицинской науки, диагностических и лечебных технологий, включая персонализированную медицину, диагностика и лечение опасных для жизни заболеваний все еще сопряжена со множеством трудностей. Например, из-за схожих симптомов, малой чувствительности и воспроизводимости результатов биохимических анализов и неинвазивных методов инструментальной диагностики, таких как УЗИ, бывает сложно дифференцировать доброкачественные и злокачественные опухолевые заболевания. Альтернативные методы могут оказаться либо излишне инвазивными (биопсия), либо труднодоступными (позитронно-эмиссионная томография и т. п.). В связи с этим представляется актуальной разработка мультимодальных оптических сенсоров, позволяющих оценивать биохимические показатели целевого органа или ткани для более надежной идентификации патологий на молекулярном уровне. При этом одна из модальностей таких сенсоров может быть использована как триггер для запуска терапевтического воздействия, например фототермического, фотодинамического и т. п. (задачи тераностики).

Предполагается, что золотые наночастицы и флуоресцирующие в красной и дальней красной областях флуоресцентные белки помогут расширить спектр применения флуоресцентных белков и сенсоров на основе двух флуоресцентных белков, разделенных сайтом распознавания протеолитических ферментов, для биомедицинских целей. Такие наногриды, снабженные дополнительными модальностями (например, сенсором pH на базе известных флуоресцирующих красителей), могут работать *in vivo* как биологические вычислительные устройства и самостоятельно обнаруживать аномалии, а с учетом возможности использования золотых наночастиц (ЗНЧ) в противоопухолевой терапии [1] впоследствии запускать процесс терапии.

Золотые наночастицы с различными покрытиями и лигандами в настоящее время широко применяются в биологических и биомедицинских целях *in vitro* и *in vivo* благодаря их фотофизическим свойствам. Наночастицы золота могут использоваться в качестве контрастных средств для ряда оптических методов визуализации, а также для фототермического разрушения опухолевых клеток и микроорганизмов [2–7].

На протяжении долгого времени ЗНЧ считались в значительной степени биологически инертным материалом по отношению к живой клетке и живому организму в целом. Однако исследования последних десятилетий по применению наночастиц золота в качестве агентов для нанодиагностики и наномедицины [8, 9] предоставляют множество сведений о биораспределении, фармакокинетике и потенциальной токсичности нанопрепаратов золота [10–12]. В частности, как показано в работе [13], *in vitro* цитотоксичность золотых наночастиц с концентрацией, не превышающей 10^{12} наночастиц/мл, не наблюдается для наночастиц размером 3–100 нм. Данные же по *in vivo* токсичности ЗНЧ весьма неоднозначны. При этом исследования показывают, что основными мишенями для накопления ЗНЧ размером 10–100 нм в живом организме являются органы ретикулоэндотелиальной системы. Особенности накопления ЗНЧ в печени и лимфатической ткани должны учитываться при их использовании

С.В.Зарьков, Ю.А.Аветисян, А.Н.Якунин. Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: anyakunin@mail.ru

И.Г.Меерович, А.П.Савицкий. Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2; e-mail: apsavitsky@inbi.ras.ru

D.Fixler. Institute for Nanotechnology and Advanced Materials Bar-Ilan University, Ramat-Gan, 5290002 Israel

В.В.Тучин. Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Национальный исследовательский Томский государственный университет, Россия, 634050 Томск, просп. Ленина, 36; Институт проблем точной механики и управления РАН, Россия, 410028 Саратов, ул. Рабочая, 24; e-mail: tuchinvv@mail.ru

in vivo во избежание провоцирования воспалительных процессов.

Авторы работы [13] также обращают внимание на то, что эффект проникновения ЗНЧ через гематоэнцефалический барьер критически зависит от размера наночастиц, верхняя граница которого составляет около 20 нм. Золотые наночастицы диаметром 1–2 нм потенциально могут быть более токсичны из-за возможности необратимого связывания с ключевыми биомолекулами клеток (например, ДНК) и последующего влияния на функционирование клеточных молекулярных процессов.

С точки зрения токсичности важны также свойства модифицированной поверхности ЗНЧ. Например, при конъюгации ЗНЧ с полиэтиленгликолем (ПЭГ) их стабильность *in vitro* существенно улучшается, предотвращая солевую агрегацию. Увеличиваются биодоступность и стабильность наночастиц *in vivo*, что приводит к возрастанию времени их циркуляции в кровотоке. *In vivo* пэгилированные наночастицы преимущественно накапливаются в опухолевой ткани благодаря увеличенной проницаемости сосудов опухоли и удерживаются в ней за счет уменьшенного лимфооттока. Кроме того, пэгилированные наночастицы менее доступны для иммунной системы [2].

Размер наночастиц для использования *in vivo* также должен определяться задачей тераностики. При этом необходимо учитывать как возможность фильтрации наночастиц почками для выведения из организма, так и возможность прохождения данными наночастицами сосудистой сети (в частности, для доставки в опухоль) [14].

Финальное покрытие наночастиц определяется требованиями к биосовместимости, биодоступности и биораспределению ЗНЧ в клетках *in vitro* и в живом организме, а также их агрегацией и химической устойчивостью в различном биологическом микроокружении. Кроме того, имеется возможность снабдить наночастицы рецептор-специфическими молекулами. Выбор наночастиц обуславливается требованиями к химическим и физическим свойствам модифицированных наночастиц: размеру, химическому составу, функциональности поверхности, квантовому выходу флуоресценции, ширине пика флуоресценции, длине волны максимума флуоресценции, химической стабильности и фотостабильности.

Наночастицы золота могут служить транспортными средствами для своеобразных логических элементов, позволяя использовать несколько способов обнаружения и выступая в то же время в качестве платформ для потенциально сложных структур [15–17]. Золотые наночастицы хорошо известны своей биосовместимостью [18, 19], способностью к модификации поверхности и взаимодействию с близлежащими флуоресцентными материалами [20].

С развитием нанотехнологий стало возможным адаптировать наночастицы к конъюгированию с реагирующими на окружающую среду и активируемыми зондами, которые могут реагировать только на определенные биологические стимулы, ферменты или параметры микроокружения [21]. Впоследствии сочетание ряда биологических триггеров можно также рассматривать как одну из форм биологических компьютеров [22].

Суспензии ЗНЧ могут быть получены известным методом цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты (метод Туркевича) [23], золотые наносферы различного диаметра с узким распределением по размеру – методом нуклеации в среде, содержащей ми-

целлы цетилтриметиламмоний хлорида и аскорбиновую кислоту в качестве восстанавливающего агента [24], золотые наностержни – индуцированным «зародышами» (seed-mediated) способом на основе «мягких» матриц, в котором также используются ПАВ (цетилтриметиламмоний бромид) для формирования мягких матриц и аскорбиновая кислота как восстановитель [25].

Существует множество методов модификации ЗНЧ белками [26]. Присоединение стрептавидина к ЗНЧ может происходить путем его прямой адсорбции на непокрытых наночастицах [27]. Ковалентные конъюгаты ЗНЧ (наносфер, наностержней) могут быть получены следующими способами:

- присоединением стрептавидина к активированным группам (например, карбоксильным) на поверхности ЗНЧ [28];

- присоединением стрептавидина, предварительно модифицированного с помощью активных групп, к ЗНЧ [29];

- наконец, ковалентные конъюгаты белков (в частности, стрептавидина) с ЗНЧ (наносферами, наностержнями) могут быть получены путем ковалентного присоединения белка к наночастицам, предварительно покрытым активированным ПЭГ, например метокси-ПЭГ (85%) и карбоксилированным ПЭГ (15%) [30].

Относительно высокая прозрачность тканей в дальней красной и ближней ИК областях спектра обуславливает возможность широкого применения в биомедицинских исследованиях целого ряда флуоресцентных белков [31–33] с нерадиационным (ферстеровским) резонансным переносом энергии. Максимум спектра поглощения некоторых из них располагается не только в видимой части диапазона длин волн, но и в ближнем ИК диапазоне [34]. Синтез комплексов наночастица–белок [31, 32] обещает в значительной степени повысить эффективность биомедицинских применений флуоресцентных белков вследствие эффектов усиления поля лазерного излучения на плазмонных наночастицах.

В связи с этим основной задачей настоящей работы являлось построение модели и теоретическое исследование особенностей формирования зон локализации ближнего поля в окрестности ЗНЧ, поскольку интенсивность данного поля определяет эффективность возбуждения молекул фотосенсибилизатора [35] при лазерном облучении. Были проведены количественные оценки влияния оптических свойств и геометрических параметров многослойной структуры фотосенсибилизатора типа «сэндвич» на спектральные и флуоресцентные свойства комплексов наночастица–белок.

2. Постановка задачи

Ориентируясь на потенциальную возможность выбора флуоресцентных белков со спектром поглощения в широком диапазоне длин волн, рассмотрим ЗНЧ двух типов – золотые наносферы и золотые наностержни. Это обеспечит проведение исследования плазмонно-резонансного усиления локального поля как в зеленой области ($\lambda = 532$ нм) в окрестности наносфер, так и на красном крае диапазона длин волн ($\lambda = 630$ и 730 нм), вплоть до ближнего ИК диапазона ($\lambda = 770$ нм), в окрестности наностержней. Для наночастиц из материала с заданными оптическими характеристиками настройка плазмонного резонанса на указанные длины волн осуществима вари-

цией размерных параметров этих наночастиц. Для наносфер таким параметром является радиус R , для наностержней (которые моделируются прямыми круговыми цилиндрами высотой L и диаметром d с двумя полусферами того же диаметра d на их торцах) – объем V и аспектное отношение AR длины наностержня h (с учетом цилиндрической части и закругленных концов) к диаметру d поперечного сечения: $AR = h/d$. Общие закономерности изменения зависимостей спектральных характеристик золотых наностержней от их размеров достаточно тщательно исследовались как теоретически, так и экспериментально, например в работах [36, 37]. Поэтому с учетом известного опыта настройки наностержней на резонансные длины волн $\lambda = 630, 730$ и 770 нм будем проводить, для определенности, при $AR = 2, 2.5$ и 3 соответственно.

Требования для синтеза размерных параметров наночастиц с заранее заданными длинами волн плазмонного резонанса будут сформулированы на основе анализа результатов моделирования методом конечных элементов спектральных свойств ЗНЧ с помощью коммерческого программного комплекса Comsol Multiphysics (модуль Wave Optics). При моделировании предполагалось, что наночастица погружена в водную среду и облучается плоской линейно поляризованной электромагнитной волной. Для описания объемных диэлектрических функций золота и воды использовалась интерполяция данных работ [38, 39].

Известно, что для плазмонных наночастиц произвольной формы, размер a которых сопоставим с длиной свободного пробега электрона l_e в объемном металле, диэлектрическая функция не может быть корректно описана диэлектрической функцией объемного металла [34]. Таким образом, диэлектрическую функцию частицы можно представить в виде

$$\varepsilon_{Au}(\omega, a) = \begin{cases} \varepsilon_{Au\text{ bulk}}(\omega), & a \gg l_e, \\ \varepsilon_{Au\text{ bulk}}(\omega) + \Delta\varepsilon(\omega, a), & a \approx l_e, \end{cases} \quad (1)$$

где $\varepsilon_{Au}(\omega, a)$ – диэлектрическая функция ЗНЧ размером a ; $\varepsilon_{Au\text{ bulk}}(\omega)$ – диэлектрическая функция объемного золота; $\Delta\varepsilon(\omega, a)$ – поправка, учитывающая вклад размерно-зависимого рассеяния электронов в друдевскую часть диэлектрической функции в соответствии с формулой

$$\Delta\varepsilon(\omega, L_{\text{eff}}) = \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega\gamma_b} - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\omega(\gamma_b + A\hbar v_F/L_{\text{eff}})}, \quad (2)$$

где $\omega_p = 9$ эВ – плазменная частота; $\gamma_b = 0.09$ эВ – постоянная затухания для объемного золота; A – константа рассеяния электронов (принимаемая нами равной 0.7 для сферы [40] и 0.46 для наностержней) [41]; $v_F = 1.4 \times 10^{15}$ нм/с – скорость Ферми; L_{eff} – эффективная средняя длина пробега электрона (для сферы рассеяние полагалось диффузным, т.е. $L_{\text{eff}} = 4R/3$, для наностержней по формуле Шатца–Коронадо [42] было получено $L_{\text{eff}} = AR^{-1}(h - d/3)$).

На втором этапе исследования будет проведен сравнительный анализ особенностей распределения коэффициента усиления электрического поля по напряженности в окрестности ЗНЧ, по результатам которого можно будет судить о приемлемости использования исследуемых наночастиц для синтеза эффективных комплексов наночастица–белок.

Заключительный этап исследования посвящен построению феноменологической модели сэндвич-комплекса с

распределенными параметрами и оценке влияния белкового слоя на спектральные свойства и параметры локализации электрического поля, определяющие флуоресценцию белка.

3. Численное моделирование и обсуждение результатов

3.1. Настройка плазмонного резонанса ЗНЧ

Процедура настройки плазмонного резонанса наночастиц заключается в определении их размерных параметров для обеспечения плазмонного резонанса на заданных длинах волн. Выбор параметров проводится на основе анализа результатов параметрического расчета спектров поглощения и рассеяния наночастиц. Варьируемыми параметрами при этом являются радиус R (для наносфер) и размеры h и d при заданном аспектном отношении AR (для наностержней). В общем случае наносфере можно формально присвоить обозначение $AR = 1$. Это позволяет сделать единообразными подходы к моделированию наночастиц обоих типов, хотя некоторые различия сохраняются. Так, если процесс взаимодействия плоской линейно поляризованной волны с наносферой является поляризационно-независимым, то эффекты поглощения и рассеяния такой волны наностержнем существенно зависят от его ориентации по отношению к вектору поляризации поля.

Результаты параметрического моделирования спектральных зависимостей сечения поглощения C_{abs} и сечения рассеяния C_{sca} для наносфер ($AR = 1$) приведены на рис.1, *a* и *b*. Видно, что построенные для C_{abs} и C_{sca} кривые монотонно возрастают с увеличением радиуса наносфер. При этом наблюдается незначительный «красный» сдвиг их максимума. Положение максимумов сечения рассеяния также характеризуется некоторым красным сдвигом по сравнению с положением максимумов сечения поглощения для наносфер одинаковых размеров, максимальный сдвиг максимума при изменении радиуса наносфер в исследуемом диапазоне размеров достигает 15 нм.

Приведенные на рис.1, *b* и *c* результаты параметрического моделирования спектральных зависимостей сечения поглощения C_{abs} и сечения рассеяния C_{sca} для наностержней (на примере наностержней с $AR = 3$) свидетельствуют о существовании иных тенденций. Во-первых, количественно красный сдвиг экстремумов и поглощения, и рассеяния с ростом размеров наностержней является более значимым. Изменение резонансной длины волны составляет 3% для наносфер, а в случае наностержней достигает почти 20%. Во-вторых, резонансное сечение поглощения с увеличением размеров наностержней не растет монотонно, а имеет локальный экстремум в окрестности $\lambda = 770$ нм, как следует из анализа данных на рис.1, *b*.

Для удобства восприятия описанных выше особенностей спектральных зависимостей сечения поглощения C_{abs} и сечения рассеяния C_{sca} информация об экстремумах полученных спектров представлена на рис.2 (наносферы с $AR = 1$) и рис.3 (наностержни с $AR = 3$) в виде зависимостей этих сечений от объема V наночастиц. В данном случае введение обобщенной переменной V позволяет проводить сравнение различных типов наночастиц в единой системе координат. Расчетные точки на построенных кривых при движении слева направо соответствуют раз-

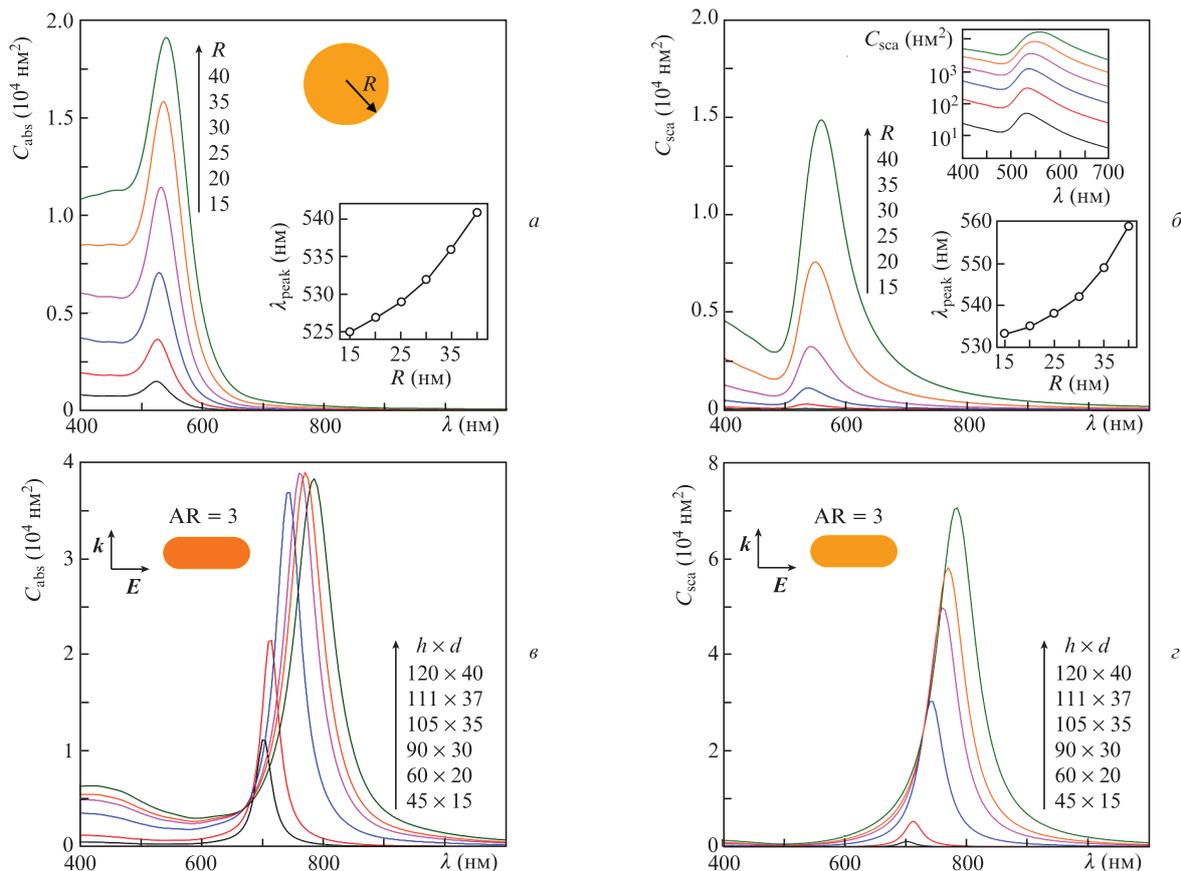


Рис.1. Спектры сечений поглощения (а, в) и рассеяния (б, г) для наносфер различных радиусов (приведены в нм на рис.1,а и б) и наностержней различных размеров $h \times d$ (указаны в нм на рис.1,в и г) с $AR = 3$. На нижних вставках на рис.1,а и б показаны зависимости длины волны максимума плазмонного резонанса λ_{peak} от радиуса наносферы. На верхней вставке на рис.1,б приведен спектр сечения рассеяния C_{sca} в логарифмическом масштабе в диапазоне длин волн 400–700 нм. Ориентация волнового вектора k и напряженности E поля относительно наностержня показана на соответствующих рисунках. Цветные варианты рис.1, 4 и 7 помещены на сайте нашего журнала <http://www.quantum-electron.ru>.

мерам наносфер и наностержней, указанным на рис.1, в порядке возрастания размеров. Из рис.2,а можно определить, что искомую резонансную длину волны $\lambda = 532$ нм имеет наносфера с радиусом $R = 30$ нм, а из рис.3,б – что

резонансную длину волны $\lambda = 770$ нм имеет наностержень с параметрами $h = 111$ нм и $d = 37$ нм. Аналогичные результаты моделирования для наностержней с $AR = 2$ и 2.5 позволили установить, что длина волны плазмонного ре-

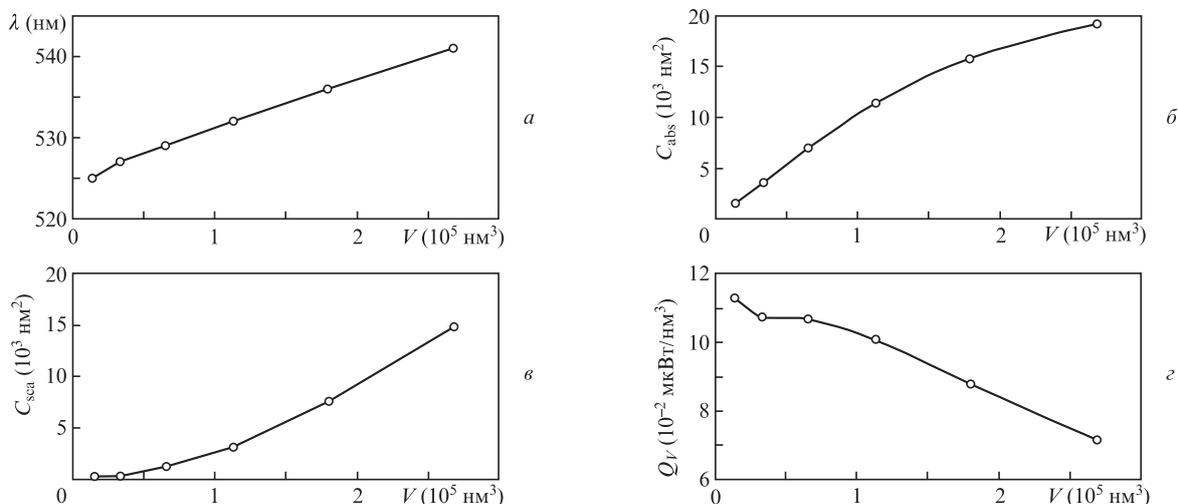


Рис.2. Зависимости от объема V наносфер ($AR = 1$) длины волны плазмонного резонанса (а), сечений поглощения (б) и рассеяния (в) на длине волны плазмонного резонанса, а также удельной объемной мощности поглощения наночастицы при облучении пучком с интенсивностью 1 мкВт/нм² на длине волны плазмонного резонанса (г).

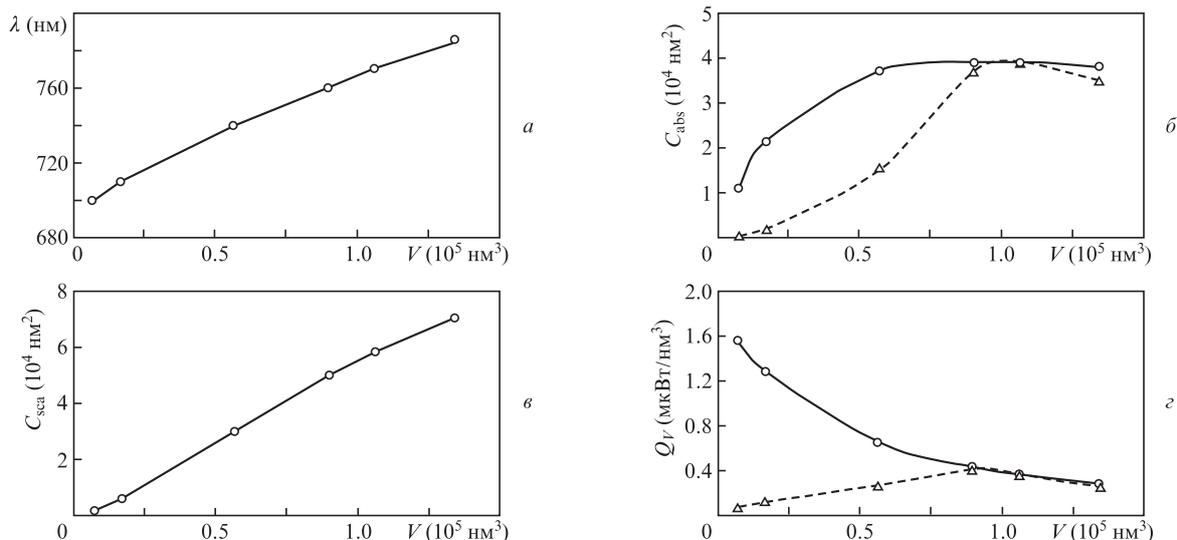


Рис.3. Зависимости от объема V наностержней с $AR = 3$ длины волны плазмонного резонанса (a), сечения поглощения на длине волны плазмонного резонанса и на рабочей длине волны $\lambda = 770$ нм ($б$), сечения рассеяния на длине волны плазмонного резонанса ($в$) и удельной объемной мощности поглощения наночастицы при облучении пучком с интенсивностью 1 мкВт/нм² на длине волны плазмонного резонанса и на $\lambda = 770$ нм ($г$); кружки соответствуют расчетным данным, полученным на длине волны плазмонного резонанса, а треугольники – на $\lambda = 770$ нм.

зонанса $\lambda = 630$ нм обеспечивается в наностержнях с размерами $h = 80$ нм и $d = 40$ нм, а $\lambda = 730$ нм – в наностержнях с размерами $h = 115$ нм и $d = 46$ нм.

Дополнительная информация об удельной мощности поглощения Q_V наночастицами, представленная на рис.2,г и 3,г, позволяет оценить возможное тепловое воздействие лазерного излучения на наночастицу и окружающую ее биоткань. Необходимо отметить, что при облучении наностержней и наносфер лазерным пучком одинаковой интенсивности величины Q_V для наностержней не менее чем в пять раз превышают Q_V для наносфер. Поскольку при принятом диапазоне варьирования размеров (объема) наносфер длина волны плазмонного резонанса изменяется не более чем на 3%, то влияние таких отклонений от рабочей длины волны $\lambda = 532$ нм на C_{abs} и C_{sca} , а также на Q_V оказывается пренебрежимо малым. Иная ситуация наблюдается в случае наностержней: как следует из рис.3,б и г, при отклонении длины волны плазмонного резонанса наностержня от рабочей ($\lambda = 770$ нм) значения C_{abs} и Q_V могут существенно изменяться (до 20 раз).

3.2. Расчет распределения коэффициента усиления локального поля лазерного пучка на ЗНЧ

Задача исследования закономерностей формирования зон локализации ближнего поля в окрестности ЗНЧ приобретает особую значимость в контексте рассматриваемых в настоящей работе вопросов, поскольку именно напряженность электрического поля определяет эффективность возбуждения молекул фотосенсибилизатора при его лазерном облучении. Поэтому целесообразно ввести функцию пространственных координат $\xi_{E^2} = |E|^2/|E_0|^2$, где E – локальное значение комплексной амплитуды полного (результатирующего) поля, а E_0 – комплексная амплитуда облучающего поля, моделируемого нами в виде плоской электромагнитной волны.

Топограммы распределения ξ_{E^2} в плоскости $E\mathbf{k}$, где \mathbf{k} – волновой вектор облучающего поля внутри и снаружи четырех, определенных выше плазмонных наночастиц,

представлены на рис.4. Выбор данной плоскости, называемой далее плоскостью падения, обусловлен наибольшей неоднородностью распределения ξ_{E^2} , объясняющейся максимальными значениями фазовых набегов поля в этой плоскости и существованием глобального максимума ξ_{E^2} . Первые справа от каждой топограммы цветовые шкалы указывают диапазон изменения ξ_{E^2} внутри наночастицы, определяя распределение удельной мощности поглощения излучения Q_V , а вторые справа – диапазон изменения этого коэффициента в окрестности наночастицы. Видно, что окрестность полусферического наконечника наностержней является выраженной зоной локализации электрического поля с повышенной напряженностью, в которой вероятность инициирования флуоресценции молекул белка при облучении их оптическим пучком низкой интенсивности (рис.4,б–г) наиболее велика. Характерно, что в окрестности средней части наностержней коэффициент усиления ближнего поля примерно в шесть-семь раз ниже. Неоднородность углового распределения ξ_{E^2} у поверхности наносферы практически такая же. Однако из сравнения данных рис.4,б–г с данными рис.4,а следует, что в любом из рассмотренных вариантов ξ_{E^2} для наностержней не меньше, чем для наносферы. Вместе с тем необходимо учитывать отсутствие поляризационной зависимости локальных полей при облучения наносферы.

Для удобства сравнительной оценки оптических характеристик разнотипных исследуемых наночастиц с искомыми резонансными параметрами на рис.5 приведены результаты моделирования спектральных зависимостей сечений поглощения, рассеяния и экстинкции, а также максимальных значений коэффициента усиления поля ξ_{E^2} .

Количественно оценить неоднородность углового распределения ξ_{E^2} у поверхности и на расстоянии от поверхности наночастиц, т.е. в некоторой распределенной зоне локализации ближнего поля, позволяет рис.6. Обобщенные данные о параметрах локализации поля сведены в табл.1.

Из анализа данных следует, что золотые наностержни имеют значительный потенциал и перспективу для созда-

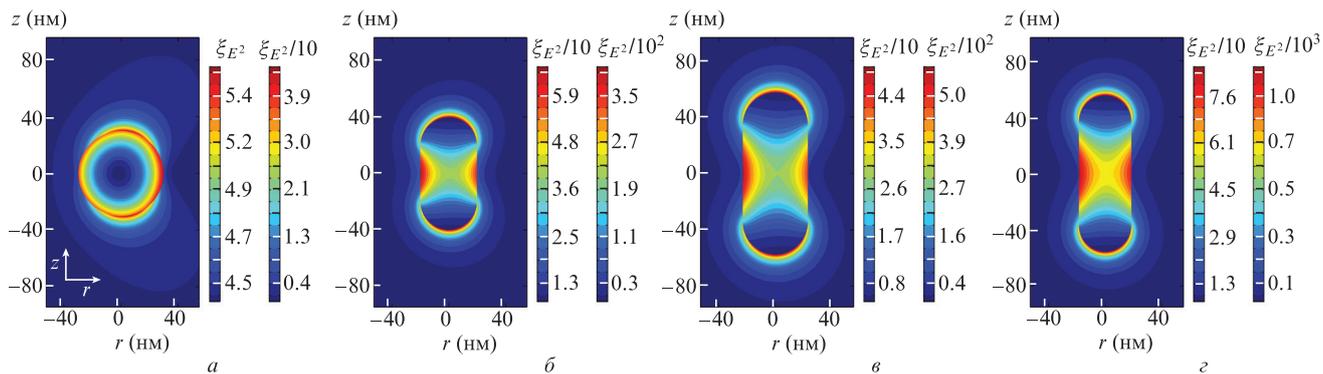


Рис.4. Топограммы распределений коэффициента усиления поля ξ_{E^2} в центральных сечениях наночастиц плоскостью E_k . Наночастицы с размерами $(h \times d)$ и аспектными отношениями (AR) 60 нм (AR = 1) (а), 80×40 нм (AR = 2) (б), 115×46 нм (AR = 2.5) (е), 111×37 нм (AR = 3) (з) облучались на длинах волн $\lambda = 532, 630, 730$ и 770 нм соответственно. Вектор поляризации направлен вдоль оси z .

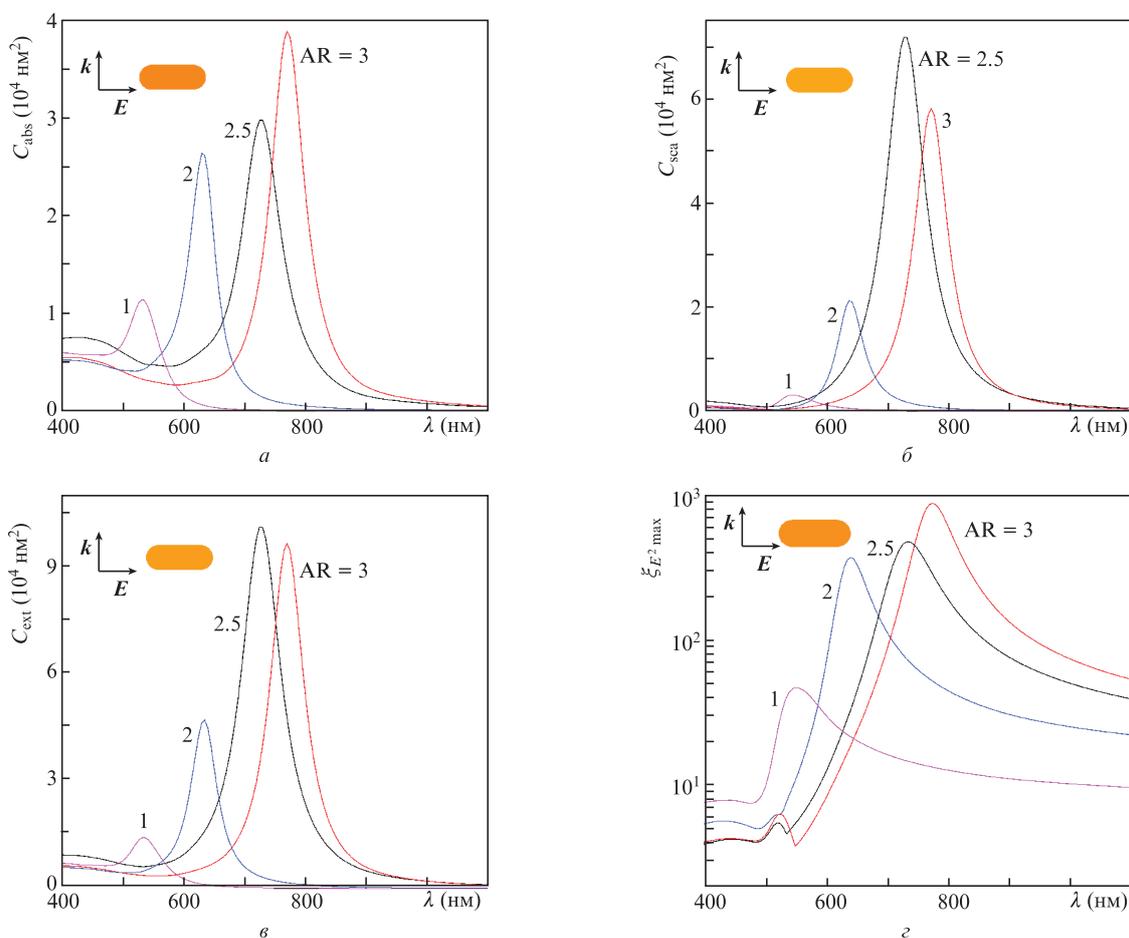


Рис.5. Спектральные зависимости сечений поглощения (а), рассеяния (б) и экстинкции (в), а также максимального значения коэффициента усиления электрического поля (з) для наносферы радиусом $R = 30$ нм (AR = 1) и наностержней с размерами $(h \times d)$ 80 × 40 нм (AR = 2), 115 × 46 нм (AR = 2.5), 111 × 37 нм (AR = 3).

Табл.1. Параметры локализации поля в окрестности наностержней.

Характеристики наностержней	Диапазон изменения ξ_{E^2} в зоне локализации, ограниченной толщиной радиального слоя Δ			Интенсивность лазерного пучка I/I_0 для обеспечения одинаковой минимальной напряженности в зоне локализации электрического поля на расстоянии от поверхности Δ		
	$\Delta = 5$ нм	$\Delta = 10$ нм	$\Delta = 15$ нм	$\Delta = 5$ нм	$\Delta = 10$ нм	$\Delta = 15$ нм
AR = 1 ($R = 30$ нм)	1.5–37.8	0.4–37.8	0.2–37.8	168	290	300
AR = 2 (80 × 40 нм)	76–320	32–320	16–320	3.3	3.7	3.7
AR = 2.5 (115 × 46 нм)	130–475	67–475	37–475	1.9	1.7	1.6
AR = 3 (111 × 37 нм)	250–870	117–870	60–870	1.0	1.0	1.0

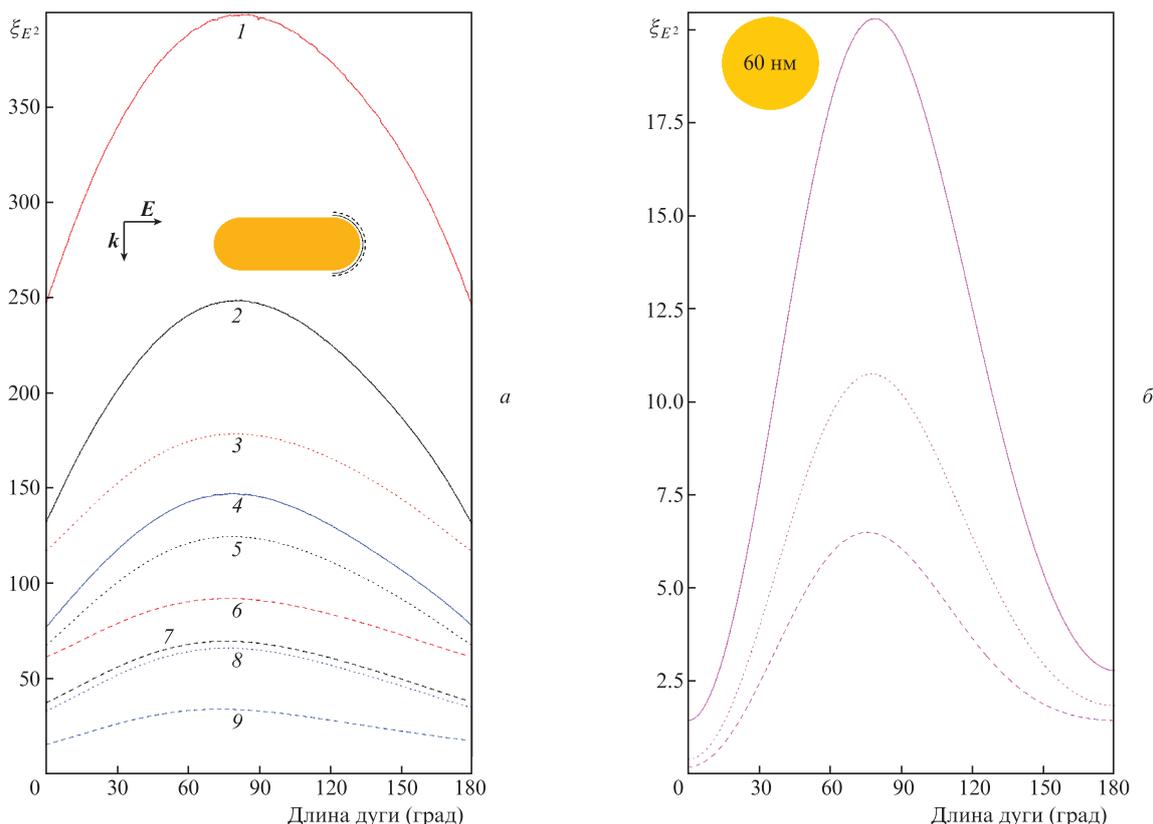


Рис.6. Угловые распределения коэффициента усиления ξ_{E^2} в окрестности полусферического наконечника наностержней трех размеров (а) и в окрестности наносферы диаметром 60 нм (б). Сплошные кривые – распределения, полученные на расстоянии 5 нм от поверхности наночастиц, пунктирные – на расстоянии 10 нм, штриховые – на расстоянии 15 нм. Размеры ($h \times d$) и аспектные отношения (AR) наностержней: 111×37 нм (AR = 3) для кривых 1, 3, 6, 115×46 нм (AR = 2.5) для кривых 2, 5, 7 и 80×40 нм (AR = 2) для кривых 4, 8, 9. Для наностержней расчеты выполнены на длинах волн $\lambda = 770, 730$ и 630 нм соответственно, для наносфера – на $\lambda = 532$ нм.

ния комплексов с возбуждением флуоресцентных белков в ближнем ИК диапазоне. Основанием для этого являются примерно в 20 раз большие значения максимального ξ_{E^2} в заданной зоне локализации по сравнению с коэффициентом усиления для наносфер, как следует из рис.5,з, и примерно в 300 раз большие значения минимального ξ_{E^2} в той же зоне локализации (см. в табл.1 колонку для интенсивности лазерного пучка I/I_0 , необходимой для обеспечения одинаковой минимальной напряженности в зоне локализации электрического поля на расстоянии от поверхности наночастицы Δ).

3.3. Феноменологическая модель сэндвич-структуры с распределенными параметрами

Технологически процедура синтеза композитной структуры, в которой обеспечивается сопряжение ЗНЧ с белковой оболочкой, является нетривиальной и предусматривает последовательное многостадийное формирование многослойной системы [32,43]. Условное изображение синтезированной структуры приведено на рис.7 слева. Основными ее компонентами являются собственно ЗНЧ, спейсер на основе ПЭГ, комплекс стрептавидин–биотин и молекулы флуоресцентного белка TagRFP. Как установлено в работах [44,45], а также как следует из результатов исследований [46], толщина слоя ПЭГ в зависимости от массы используемых для модификации ЗНЧ молекул ПЭГ (варьируемой в диапазоне 2–5 кДа) может составлять 10 нм и более. Толщина слоя стрептавидина рав-

на 5.6 нм, слоя TagRFP – 4 нм. Существованием тонкого связующего слоя тетраметиленовой группы (биотин) толщиной менее 0.25 нм с точки зрения возможного влияния на оптические свойства структуры можно пренебречь. С учетом свойств ПЭГ и стрептавидина (показатель преломления $n_1 \approx 1.5$), а также TagRFP ($n_2 = 1.67 + ik_2(\lambda)$) расчетную феноменологическую модель можно представить в виде ЗНЧ с трехслойной структурой типа сэндвич, как показано на рис.7 справа.

При расчете использовались оптические параметры флуоресцентного белка TagRFP, взятые из работы [43], в том числе спектр показателя поглощения k_2 , приведенный на рис.8 из работы [47]. Коэффициент экстинкции α флуоресцентного белка TagRFP (в $см^{-1}$) находится по формуле

$$\alpha = \alpha_m \frac{\rho C}{M}, \tag{3}$$

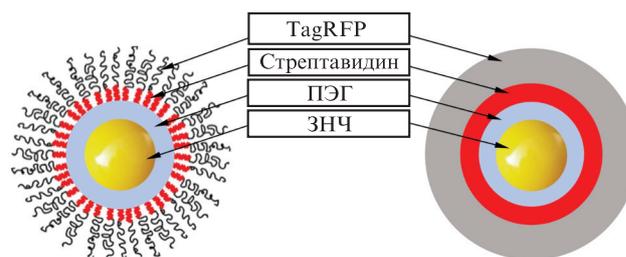


Рис.7. К определению феноменологической сэндвич-структуры с распределенными параметрами.

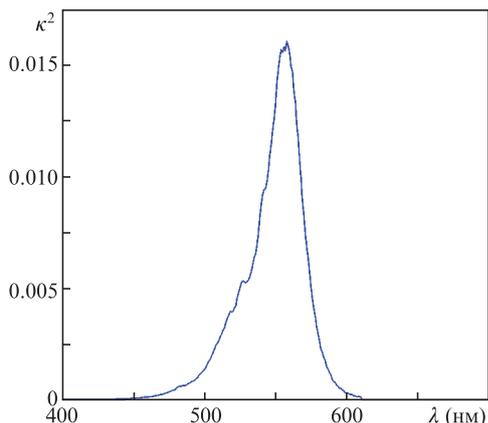


Рис.8. Спектр показателя поглощения κ_2 флуоресцентного белка TagRFP, рассчитанный на основе спектра молярного коэффициента экстинкции (в $M^{-1} \cdot cm^{-1}$) [47].

где α_m – молярный коэффициент экстинкции (в $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ или $mol^{-1} \cdot dm^3 \cdot cm^{-1}$); ρ – плотность вещества (в g/cm^3); C – объемная концентрация вещества; M – молярная масса (в кДа). Мнимая часть показателя преломления (показатель поглощения) определяется выражением

$$\kappa_2 = \frac{\lambda}{4\pi} \alpha. \tag{4}$$

3.4. Расчет распределения коэффициента усиления локального поля лазерного пучка на комплексах белок–ЗНЧ

Оценка влияния белкового покрытия на оптические свойства комплекса белок–ЗНЧ проведена с использованием построенной и описанной выше математической модели. Поскольку максимум поглощения флуоресцентного белка TagRFP, как следует из приведенных на рис.8 данных, наблюдается на $\lambda = 555$ нм, то здесь основное внимание будет уделено моделированию комплексов на основе золотых наносфер. Длина волны их плазмонного резонанса, в отличие от длины волны резонанса наностержней, наиболее близка к указанной. Рассчитанные спектральные зависимости оптических свойств такой наносферы диаметром 60 нм – золотой без покрытия и золотой с многослойным покрытием – даны на рис.9,а и б. Для сферы с многослойным покрытием были выбраны следующие толщины слоев покрытия: 15 нм для первого (внутреннего) слоя, моделирующего комплекс ПЭГ и стрептавидина ($n_1 \approx 1.5$) и 4 нм для второго (внешнего) слоя, для которого были заданы оптические свойства TagRFP ($n_2 = 1.67 + i\kappa_2(\lambda)$). Наблюдается 30%-ный рост максимума сечения поглощения для многослойной структуры, который можно объяснить наличием целого ряда причин, включая дополнительное поглощение в белковом слое, процессы преломления и переотражения света в

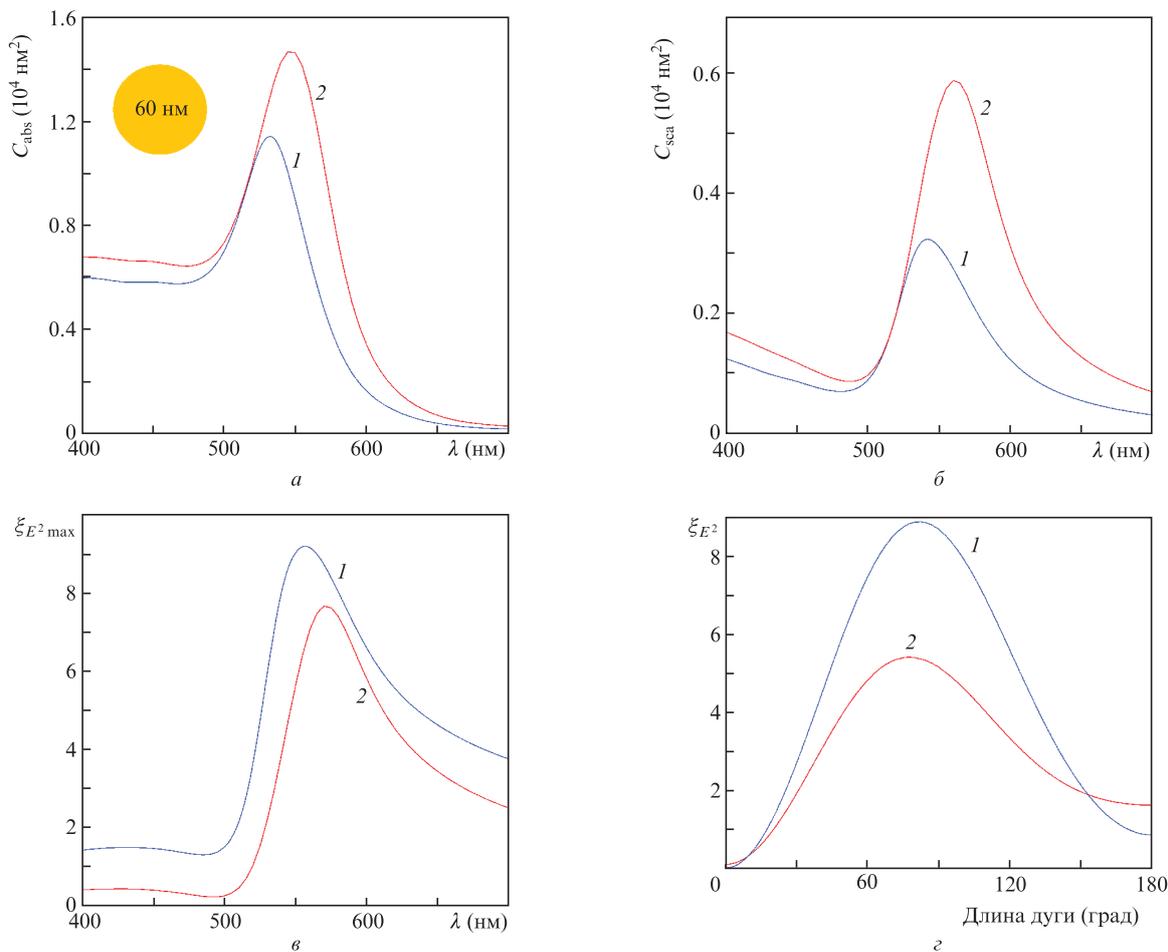


Рис.9. Спектральные зависимости сечения поглощения (а), сечения рассеяния (б) и максимального значения коэффициента усиления поля $\xi_{E^2_{max}}$ (в), а также азимутальное распределение ξ_{E^2} на расстоянии 15 нм от поверхности золотой наносферы (слой флуоресцентного белка TagRFP) на $\lambda = 532$ нм (г) для золотой наносферы без покрытия (1) и с белковым покрытием (2).

многослойной структуре, а также увеличение ее общего объема (диаметра) по сравнению с размером золотой наносферы. Еще более существенным является рост максимума сечения рассеяния – он увеличивается на 100% по сравнению с наносферой без покрытия. Повышение экстинкции конъюгатов было описано ранее, например авторами [48]. Прямо противоположную тенденцию проявляет спектральная зависимость максимального коэффициента усиления $\xi_{E^2_{max}}$, приведенная на рис.9,в. При формировании белкового покрытия максимальный коэффициент усиления снижается на 15%. А в области белкового слоя снижение ξ_{E^2} больше, что следует из анализа азимутального распределения на рис.9,г и объясняется повышенным значением реальной части показателя преломления TagRFP.

Определенный интерес, на наш взгляд, представляет наблюдающаяся тенденция красного смещения длины волны, на которой достигается максимум коэффициента усиления ξ_{E^2} локального поля, относительно положений максимумов сечений поглощения и рассеяния для непокрытых золотых наносфер и многослойных структур. Влияние этого эффекта проиллюстрируем результатами расчетов радиальных распределений ξ_{E^2} , выполненных на двух длинах волн облучающего лазерного пучка. Первая из них (532 нм) соответствует плазмонному резонансу поглощения для золотой наносферы диаметром 60 нм без

покрытия (рис.10), вторая длина волны (555 нм) отвечает резонансу, рассчитанному на основе проведенного численного эксперимента по настройке длины волны облучающего пучка по критерию достижения максимума ξ_{E^2} в структуре с многослойным покрытием.

Сравнение данных моделирования, приведенных на рис.10,а и 11,а, позволяет сделать вывод о том, что указанная настройка длины волны облучающего пучка существенно уменьшает отрицательное влияние белкового покрытия на величину максимума коэффициента усиления ξ_{E^2} для структуры (под отрицательным влиянием понимаем снижение ξ_{E^2} после формирования на золотой наносфере многослойной структуры). Если в первом случае (при облучении на $\lambda = 532$ нм) кривая для непокрытой наносферы располагается заметно выше соответствующей кривой для наносферы с покрытием, то во втором случае ($\lambda = 555$ нм) различие в положении обеих кривых минимально. Скачок с понижением значений ξ_{E^2} при изменении радиального расстояния от 15 до 19 нм отвечает области расположения белкового слоя и объясняется более высоким значением действительной части показателя преломления n_2 . Именно эта область представляет основной интерес для оптимизации локального поля. Оценка по результатам проведенного моделирования свидетельствует о том, что настройка зондирующего сигнала обеспечивает в рассматриваемом случае увеличение коэффи-

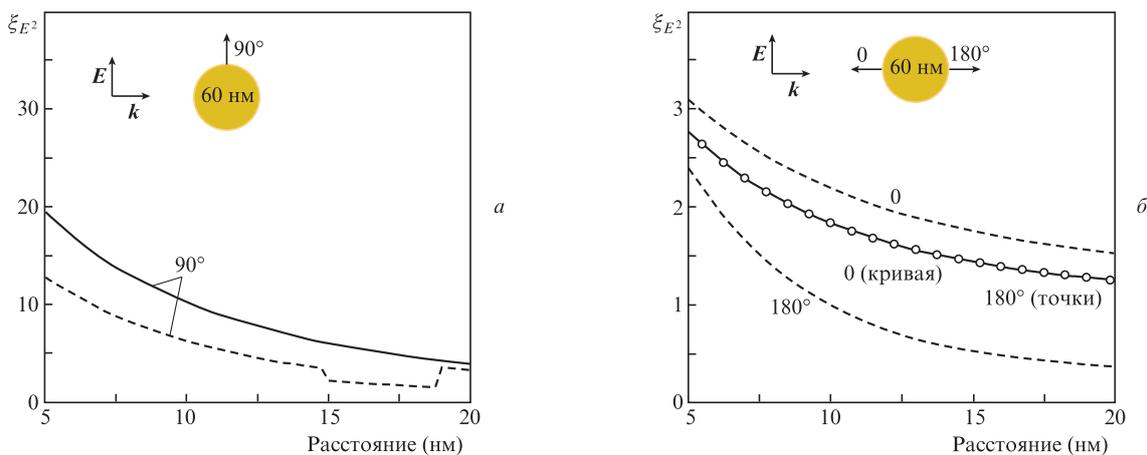


Рис.10. Радиальные распределения коэффициента усиления ξ_{E^2} на $\lambda = 532$ нм в окрестности золотой наносферы без покрытия (сплошные кривые) и с покрытием (штриховые кривые) при различных направлениях радиуса-вектора (указаны на вставках), вдоль которых построены распределения.

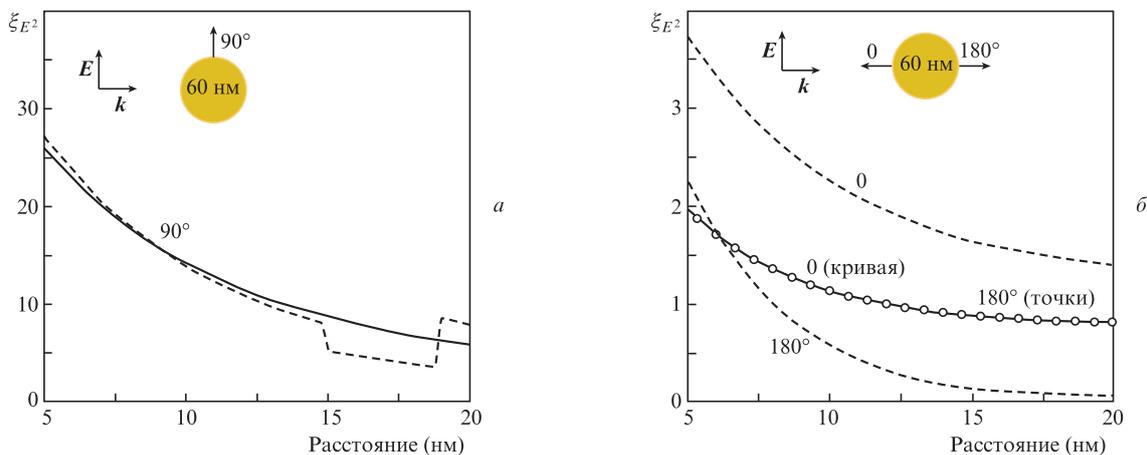


Рис.11. То же, что и на рис.10, но для $\lambda = 555$ нм.

циента усиления ξ_{E^2} и, следовательно, эффективности флуоресцентного отклика в 2,3 раза. Анализ результатов, приведенных в табл.1, а также на рис.10 и 11, позволяет в качестве дополнительного возможного способа повышения эффективности белкового покрытия предложить уменьшение толщины внутренних переходных слоев многослойной структуры. С приближением к поверхности золотой наносферы (плазмонного концентратора поля) величина ξ_{E^2} нелинейно растет, что убедительно показано там же.

Распределения ξ_{E^2} в двух противоположных направлениях (под углами 0 (кривая) и 180° (точки) параллельно волновому вектору \mathbf{k}), представленные на рис.10,б и 11,б, демонстрируют появление существенной асимметрии при формировании многослойного покрытия. В случае золотых непокрытых наносфер оба распределения практически совпадают.

О степени влияния радиуса золотой наносферы на изменение параметра усиления ξ_{E^2} в области расположения белкового слоя (предполагается, что при изменении размера наносферы толщины многослойного покрытия остаются прежними) можно судить из номограммы, приведенной на рис.12. На рис.12,а показано семейство спектральных зависимостей ξ_{E^2} для наносфер, радиус которых изменяется в диапазоне 30–60 нм. Видно, что экстремумы кривых для ξ_{E^2} изменяются немонотонно. Также изменяются их положения в исследуемом диапазоне длин волн. О трансформации данного семейства кривых можно судить, исходя из сравнения с результатами моделирования спектральных зависимостей ξ_{E^2} , представленных на рис.12,б. Общая тенденция проявляется в уменьшении величины локального максимума каждой кривой и его смещении в сторону длинных волн. Примеры количественных и качественных изменений зависимостей $\xi_{E^2}(R)$ при облучении наносфер с покрытием и без покрытия на двух различных длинах волн приведены на рис.12,в. Видно, что $R = 40$ нм является оптимальным размером наносферы для изготовления флуоресцентной структуры, в которой предполагается возбуждать белковый фотосенсибилизатор излучением на $\lambda = 555$ нм. Отклонение от этого размера в указанных на рис.12,в пределах может привести к уменьшению ξ_{E^2} почти в 1,4 раза. При облучении лазерным пучком на длине волны $\lambda = 532$ нм коэффициент ξ_{E^2} снижается в два раза и слабо зависит от размеров наночастиц.

Для сравнения с известными экспериментальными данными [49] было выполнено дополнительное численное исследование плазмонных свойств покрытых и непокрытых наносфер с диаметрами 13 и 20 нм. Результаты моделирования показаны на рис.13.

Расчеты проведены в предположении, что толщина оболочки прямо пропорциональна радиусу наносферы, поэтому расстояние в радиальном направлении от поверхности сферы до слоя TagRFP оказывается для малых наносфер меньше, чем для больших. Таким образом, если для сфер с $R \geq 30$ нм толщина сэндвич-оболочки была принята нами равной 15 нм, то для сфер с диаметрами 13 и 20 нм она составила 3 и 5 нм соответственно. Это хорошо согласуется с размерами исследованных экспериментально в [49] наносфер и многослойных структур. Следует отметить, что и рассчитанные нормированные спектры экстинкции (рис.13,б) также находятся в хорошем соответствии с экспериментальными результатами исследования экстинкции аналогичных наносфер с покрытием и

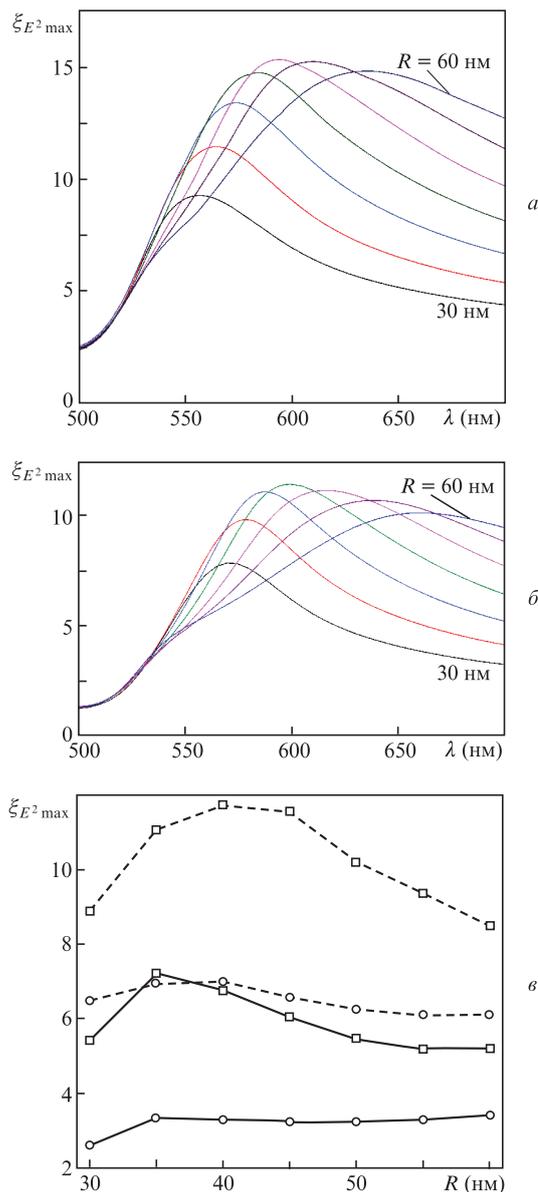


Рис.12. Спектральные зависимости максимального значения $\xi_{E^2\max}$ на расстоянии 15 нм от поверхности наносфер с различными радиусами (шаг по радиусу наносфер, соответствующему соседним кривым, составляет 5 нм) без покрытия (а) и с белковым покрытием (б), а также зависимости коэффициента усиления $\xi_{E^2\max}$ от радиуса покрытых (сплошные кривые) и непокрытых (штриховые кривые) наносфер на $\lambda = 532$ (кружки) и 555 нм (квадраты) (в).

без покрытия [49]. Из сравнения данных, полученных для сфер диаметром 60 нм (см. рис.9,в) и сфер с диаметрами 13 и 20 нм (рис.13), видно, что с учетом толщины покрытия они демонстрируют довольно близкие максимальные значения ξ_{E^2} в области прикрепления флуоресцентного белка, различающиеся не более чем на 40%. В то же время для применения в биомедицинских приложениях комплексы наночастица–белок на основе малых частиц представляются более перспективными.

4. Заключение

Построены математические модели и проведено численное моделирование распределения ближнего поля внутри и в окрестности ЗНЧ двух типов (наносферы и наностержни), предназначенных для изготовления ком-

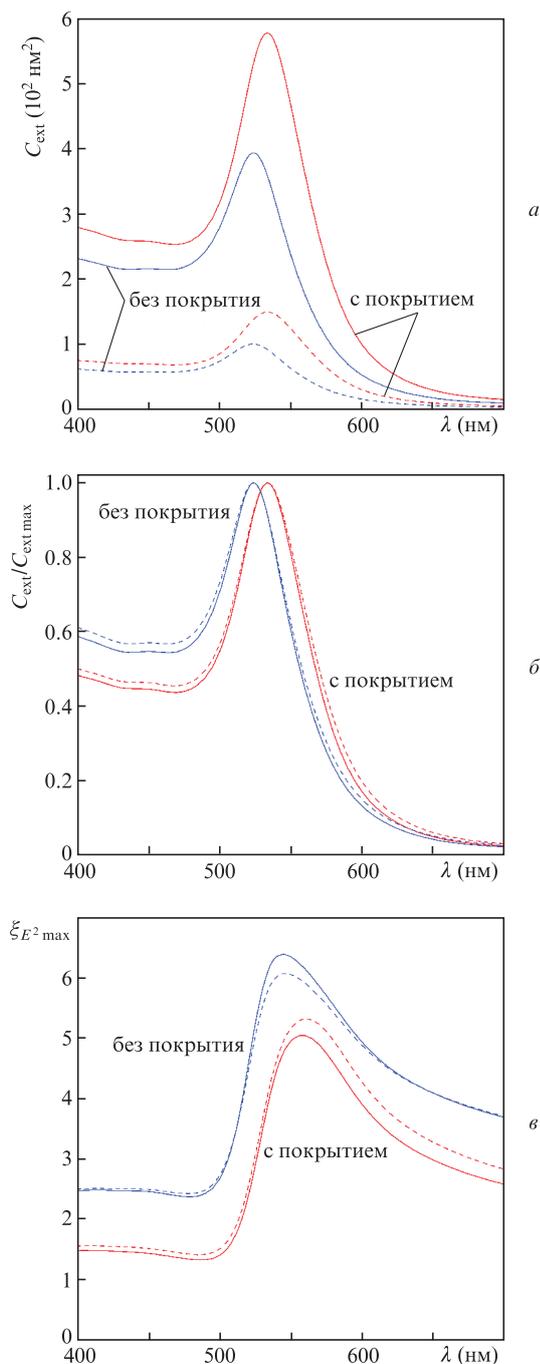


Рис.13. Спектральные зависимости сечения экстинкции (а), нормированного сечения экстинкции (б) и максимального значения $\xi_{E^2 \max}$ (в) в области слоя флуоресцентного белка TagRFP для наносфер диаметром 20 нм (сплошные кривые) и 13 нм (штриховые кривые).

плексов белок–ЗНЧ и возбуждения фотосенсибилизаторов в диапазоне длин волн 532–770 нм.

Исследованы особенности формирования зон локализации оптического поля и характер снижения соответствующего коэффициента усиления ξ_{E^2} электрического поля лазерного пучка по напряженности при удалении от наночастиц. Оценена перспектива создания комплексов на основе золотых наностержней с возбуждением флуоресцентных белков в ближнем ИК диапазоне, в которых ожидается увеличение ξ_{E^2} примерно в 300 раз по сравнению с комплексами на основе золотых наносфер.

Описана тенденция красного смещения длины волны, на которой достигается максимум коэффициента усиления ξ_{E^2} локального поля, относительно положений максимумов сечений поглощения и рассеяния для золотых наносфер без покрытия и многослойных структур. Рассмотрено влияние размерных эффектов на локализацию полей в указанных белковых структурах. Предложен критерий достижения максимума ξ_{E^2} в структуре с многослойным покрытием для оптимизации комплексов белок–ЗНЧ и повышения эффективности воздействия лазерного излучения на флуоресцирующие белковые структуры.

Показано, что наносферы диаметром 13, 20 и 60 нм с учетом толщины покрытия имеют близкие максимальные коэффициенты ξ_{E^2} усиления локального поля. При этом сферы малого диаметра (13 и 20 нм) являются предпочтительными с точки зрения проницаемости для них мембраны клетки. Достижение сравнимых значений ξ_{E^2} для больших и малых сферических частиц является важным результатом для практического использования комплексов белок–ЗНЧ в биомедицинских задачах.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-54-06008 МНТИ_а и грантом MOST Израиля №3-16536. Результаты, приведенные в разд.2, получены в рамках государственного задания ИПТМУ РАН, а результаты, представленные на рис.4, – при поддержке гранта РФФИ №19-07-00378.

- Vines J.B., Yoon J.-H., Ryu N.-E., Lim D.-J., Park H. *Front. Chem.*, **7**, 167 (2019).
- Dykman L., Khlebtsov N. *Gold Nanoparticles in Biomedical Applications* (Boca Raton–London–New York: CRC Press, 2017).
- Максимова И.Л., Акчурин Г.Г., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Акчурин Г.Г. мл., Ермолаев И.А., Скапцов А.А., Ревзина Е.М., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **38** (6), 536 (2008) [*Quantum Electron.*, **38** (6), 536 (2008)].
- Тучина Е.С., Тучин В.В., Хлебцов Б.Н., Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **41** (4), 354 (2011) [*Quantum Electron.*, **41** (4), 354 (2011)].
- Генина Э.А., Долотов Л.Е., Башкатов А.Н., Терентюк Г.С., Маслякова Г.Н., Зубкина Е.А., Тучин В.В., Ярославский И.В., Альтшулер Г.Б. *Квантовая электроника*, **41** (5), 396 (2011) [*Quantum Electron.*, **41** (5), 396 (2011)].
- Генина Э.А., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Башкатов А.Н., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **42** (6), 478 (2012) [*Quantum Electron.*, **42** (6), 478 (2012)].
- Тучина Е.С., Петров П.О., Козина К.В., Ратто Ф., Центи С., Пини Р., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **44** (7), 683 (2014) [*Quantum Electron.*, **44** (7), 683 (2014)].
- Mieszawska A.J., Mulder W.J.M., Fayad Z.A., Cormode D.P. *Mol. Pharmaceutics*, **10** (3), 831 (2013).
- Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. *Nat. Nanobiotechnol.*, **2**, 469 (2007).
- Duncan B., Kim C., Rotello V.M. *J. Controlled Release*, **148** (1), 122 (2010).
- Bhattacharya R., Mukherjee P. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **60**, 1289 (2008).
- Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D. *Small*, **1** (3), 325 (2005).
- Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А. *Российские нанотехнологии*, **6** (1-2), 39 (2011).
- Марченков Н.С., Марченко Н.В. *Медицинская физика*, **4** (64), 64 (2014).
- Motiei M., Dreifuss T., Betzer O., Panet H., Popovtzer A., Santana J., Abourbeh G., Mishani E., Popovtzer R. *ACS Nano*, **10**, 3469 (2016).
- Dreifuss T., Betzer O., Shilo M., Popovtzer A., Motiei M., Popovtzer R. *Nanoscale*, **7**, 15175 (2015).
- Betzer O., Ankri R., Motiei M., Popovtzer R. *J. Nanomater.*, **2015**, 646713 (2015).

18. Eghtedari M., Liopo A.V., Copland J.A., Oraevsky A.A., Motamedi M. *Nano Lett.*, **9**, 287 (2009).
19. Von Maltzahn G., Park J.H., Agrawal A., Bandaru N.K., Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N. *Cancer Res.*, **69** (9), 3892 (2009).
20. Jain P.K., Lee K.S., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *J. Phys. Chem. B*, **110**, 7238 (2006).
21. Barnoy E.A., Popovtzer R., Fixler D. *J. Biophotonics*, **13** (9), e202000158 (2020).
22. Tregubov A.A., Nikitin P.I., Nikitin M.P. *Chem. Rev.*, **118** (20), 10294 (2018).
23. Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. *Discussion of the Faraday Society*, **11**, 55 (1951).
24. Zheng Y., Ma Y., Zeng J., Zhong X., Jin M., Li Z.-Y., Xia X. *Chem. Asian J.*, **8** (4), 792 (2013).
25. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Chem. Mater.*, **15**, 1957 (2003).
26. Hermanson G.T., in *Bioconjugate Techniques* (Amsterdam–London–New York: Academic Press, 2013, pp 549–587).
27. Самохвалов А.В., Сафенкова И.В., Еремин С.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. *Российские нанотехнологии*, **14** (7-8), 91 (2019).
28. Li S., Liu H., Hia Y., Deng Y., Zhang L., Lu Z., He N. *Theranostics*, **2** (10), 967 (2012).
29. Hao K., He Y., Lu H., Pu S., Zhang Y., Dong H., Zhang X. *Anal. Chim. Acta*, **954**, 114 (2017).
30. Olshinka A., Deam A.-E., Didkovski E., Weiss S., Ankri R., Goldenberg-Cohen N., Fixler D. *Materials*, **13** (2), 447 (2020).
31. Richtering W., Alberg I., Zentel R. *Small*, **16** (39), 2002162 (2020).
32. Liu J., Peng Q. *Acta Biomater.*, **55**, 13 (2017).
33. Deliolanis N.C., Kasmieh R., Wurdinger T., Tannous B.A., Shah K., Ntziachristos V. *J. Biomed. Opt.*, **13**, 044008 (2008).
34. Злобовская О.А., Саркисян К.С., Лукьянов К.А. *Биоорганическая химия*, **41**, 299 (2015) [*Russ. J. Bioorg. Chem.*, **41**, 266 (2015)].
35. Celli J.P., Spring B.Q., Rizvi I., Evans C.L., Samkoe K.S., Verma S., Pogue B.W., Hasan T. *Chem. Rev.*, **110**, 2795 (2010).
36. Prescott S.W., Mulvaney P. *J. Appl. Phys.*, **99**, 123504 (2006).
37. Khlebtsov B.N., Khanadeev V.A., Burov A.M., Le Ru E.C., Khlebtsov N.G. *J. Phys. Chem. C*, **124** (19), 10647 (2020).
38. Johnson P.B., Christy R.W. *Phys. Rev. B*, **6**, 4370 (1972).
39. Khlebtsov N.G., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Melnikov A.G. *J. Colloid Interface Sci.*, **180**, 436 (1996).
40. Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **38**, 504 (2008) [*Quantum Electron.*, **38**, 504 (2008)].
41. Foerster B., Joplin A., Kaefer K., Celiksoy S., Link S., Sönnichsen C. *ACS Nano*, **11**, 2886 (2017).
42. Coronado E.A., Schatz G.C. *J. Chem. Phys.*, **119**, 3926 (2003).
43. Li Y., Zhang H. *J. Wuhan University Technology-Mater. Sci. Ed.*, **30**, 1304 (2015).
44. Dreaden E.C., Austin L.A., Mackey M.A., El-Sayed M.A. *Ther. Delivery*, **3** (4), 457 (2012).
45. Spaas C., Dok R., Deschaume O., Roo B.D., Vervaele M., Seo J.W., Bartic C., Hoet P., van den Heuvel V., Nuyts S., Locquet J.-P. *Radiat. Res.*, **185** (4), 384 (2016).
46. Nayhoz T., Barnoy E.A., Fixler D. *Materials*, **9** (11), 926 (2016).
47. <https://www.fpbase.org/protein/tagrpf/>
48. Хлебцов Н.Г., Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Хлебцов Б.Н. *Коллоидный журн.*, **65** (4), 552 (2003).
49. Barnoy E.A., Motiei M., Tzror C., Rahimipour S., Popovtzer R., Fixler D. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2** (10), 6527 (2019).