

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.  
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра оптики и биофотоники

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ДЕНАТУРАЦИИ  
ОВАЛЬБУМИНА В ПРОЦЕССЕ ФОТОТЕРМИЧЕСКОГО  
ВОЗДЕЙСТВИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 4086 группы  
направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»  
Институт Физики  
Рябчикова Александра Александровича

Научный руководитель

доцент, к. ф.-м. наук



Скапцов А.А.

подпись, дата

Зав. кафедрой

профессор, д. ф.-м. наук



Тучин В.В.

подпись, дата

Саратов 2021

## **Введение**

Уникальные оптические свойства плазмонно-резонансных наночастиц совместно с высокой степенью биомолекулярного распознавания позволяют достичь новых возможностей при применении в биомедицинской диагностике, направленной доставке медикаментозных препаратов, оптической визуализации и фототермотерапии.

Применение наночастиц с плазмонно-резонансными свойствами в биомедицинских приложениях имеет две особенности: биоспецифическое распознавание определенных участков и оптический плазмонный резонанс.

Оптический плазмонный резонанс вызван когерентными колебаниями свободных электронов металла под действием электрической компоненты световой волны. Эти колебания приводят к увеличению рассеяния и поглощения света на резонансных частотах волн, обусловленных мультипольностью тензора поляризуемости. При воздействии лазерным излучением с длиной волны, соответствующей пику поглощения наночастиц, можно достичь локализованного выделения инкапсулированного лекарственного вещества или локального нагрева наночастиц и окружающих их биоструктур. Первый способ связан с адресной доставкой медикаментов в целевое место, тогда как второй лежит в основе фототермотерапии, которой и посвящена бакалаврская работа.

**Целью** настоящей бакалаврской работы является развитие метода фототермотерапии с применением плазмонно-резонансных наночастиц несферической формы.

Основными **задачами** выполняемой работы являются:

- 1) Разработка экспериментальной установки для проведения модельной фототермотерапии, а также метода приготовления экспериментального образца овальбумина, содержащего золотые наночастицы;

2) установление зависимости динамики нагрева овальбумина, содержащего золотые наночастицы, в процессе фототермотерапии от режимов лазерного облучения;

3) определение влияния денатурации овальбумина на динамику его нагрева в процессе фототермотерапии.

### **Материалы исследования**

Материалами исследования являются образцы нативного овальбумина — чистого и смешанного с золотыми наночастицами, а также образцы предварительно денатурированного овальбумина — содержащего золотые наночастицы и без них.

### **Структура и объём работы**

Бакалаврская работа состоит из введения, 2 разделов, заключения и списка используемых источников, включающего 60 наименований. Работа изложена на 46 листе машинописного текста, содержит 21 рисунок и 1 таблицу.

### **Основное содержание работы**

Во **введении** обозначена тема исследования, а также сформулированы цель и основные задачи работы.

Первый раздел состоит из четырех подразделов. В первом подразделе проводится описание структуры яичного альбумина. В [1,2] приводятся основные свойства овальбумина, его масса и строение. В [3] были исследованы функции яичного альбумина, которые еще не до конца изучены. Предполагают, что овальбумин играет роль запасного белка. Овальбумин состоит из 385 аминокислотных остатков. Молекулярная масса его полипептидной цепи составляет 42699 Да. Пептидная цепь овальбумина подвергается посттрансляционной модификации: его N-конец ацетируется, аспарат в 292 позиции гликозилируется, 68 и 344 сериновые остатки фосфорилируются. Как показано в [4], основным отличием овальбумина от большинства других секретирующихся белков является то, что сигнальная

последовательность овальбумина расположена не с N-конца, а внутри полипептидной цепи и не отщепляется.

Второй подраздел посвящен физическим свойствам яичного альбумина и описывает процесс его денатурации. В своей нативной форме яичные белки представляют собой жидкую, вязкую субстанцию, прозрачную для излучения видимого спектра. В результате термической обработки белки теряют эти свойства и становятся непрозрачными, образуя взаимосвязанный агрегат из твердой массы. [5] Причиной данных изменений являются изменения, происходящие на молекулярном уровне в процессе разрушения межмолекулярных связей. Денатурированные белки теряют трехмерную структуру (рисунок 1) и, следовательно, не способны выполнять свои предопределенные функции.

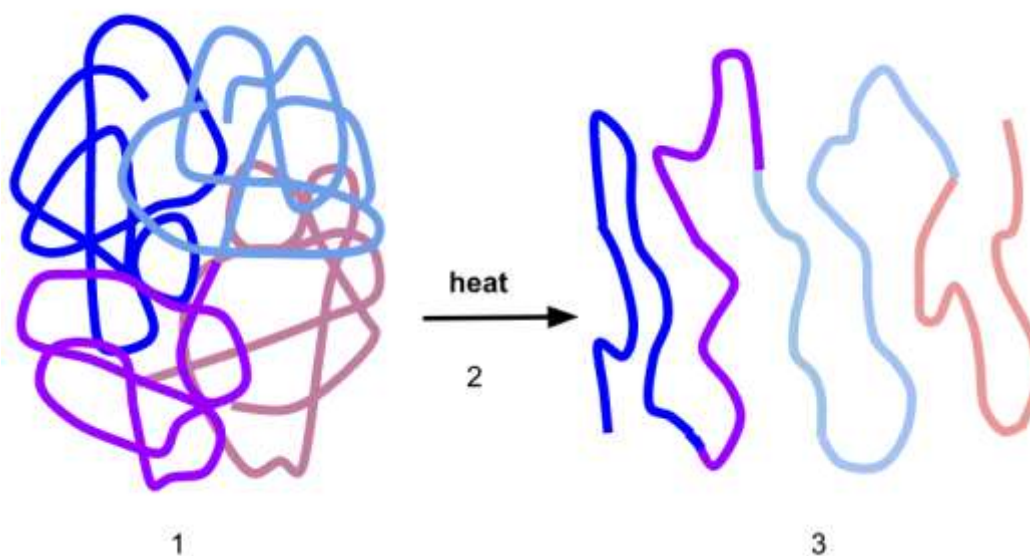


Рисунок 1. Процесс денатурации: 1) Функциональный белок с четвертичной структурой, 2) При нагревании нарушаются внутримолекулярные связи белка, 3) Разворачивание полипептидов (аминокислот).

Третий подраздел посвящен описанию элементов, без которых невозможно проведение плазмонно-резонансной фототермотерапии — золотым наночастицам. Наночастицы не обязательно должны быть

золотыми, однако, как показывают многочисленные исследования, именно золотые частицы из-за своей стабильности и надежности зарекомендовали себя в биомедицинских приложениях, и в частности в методе фототермотерапии. В [6] приводится основная информация о золотых наночастицах, показаны их оптические и химические свойства, делающие их пригодными для проведения исследований и экспериментов. В [7] показано, что физические свойства золотых частиц зависят от их размеров и формы (Рисунок 2). Как правило, длина волны поглощаемого света увеличивается с увеличением размера наночастиц.

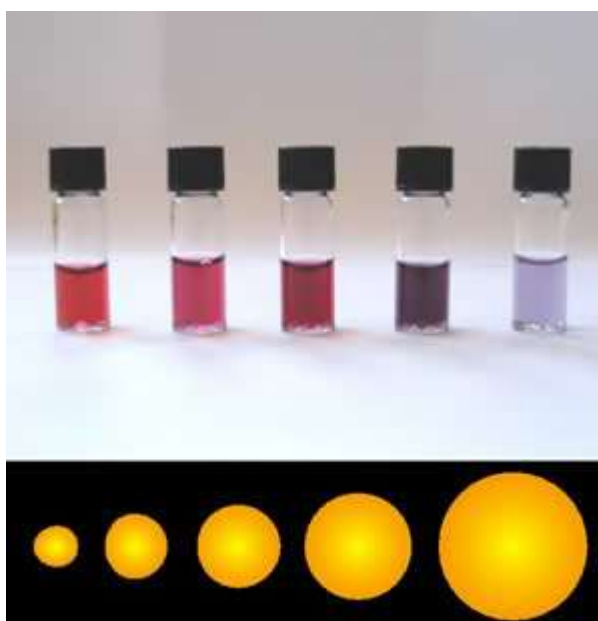


Рисунок 2. Суспензии наночастиц золота различного размера. Разница в размерах вызывает разницу в оптических свойствах, и, следовательно, в цветах, которые наночастицы поглощают и рассеивают.

В четвертом подразделе приведено описание эффекта поверхностно-плазмонного резонанса в золотых наночастицах. Дано определение поверхностно-плазмонному резонансу, описан спектр его возможных применений в биомедицине. Так, в [8] говорится об эффективности плазмонного резонанса в идентификации и диагностике биологических объектов. Плазмон — квазичастица, отвечающая квантованию плазменных колебаний, которые представляют собой коллективные колебания свободного электронного газа. В [9] показано, что в результате плазмонного

резонанса поглощённая энергия электромагнитного излучения может существенно нагревать наночастицы.

Второй раздел состоит из трех подразделов. Которые посвящены описанию материалов и методов проведения экспериментов.

В первом подразделе приведено описание установки для проведения модельных экспериментов, основных элементов установки и принципа ее работы. Для определения температурной зависимости овальбумина в процессе плазмонной фототермотерапии была собрана установка, состоящая из следующих элементов:

- 1) измерителя оптической мощности PM100D(Thorlabs Inc., США)
- 2) лазерного модуля с возможностью регулировки выходной стабильной мощности VA-I-DC-808(Beijing Viasho Technology, Китай)
- 3) ИК-тепловизора IRISYS 4010(InfraRed Integrated Systems Ltd, Великобритания) и цифровой камеры

Принцип работы установки. Излучение от лазера падает на образец, испытывает частичное поглощение и попадает на пироэлектрическую измерительную головку ваттметра. Зная мощность лазера и интенсивность прошедшего через образец излучения можно вычислить коэффициент пропускания исследуемого образца как отношение интенсивности падающего и прошедшего излучений. Для контроля температуры использовался ИК тепловизор, удаленный на расстояние 37см от объекта наблюдения. Процесс денатурации фиксируется на цифровую камеру, защищенную фильтром СЗС27 толщиной 5 мм. Роль подсветки для камеры выполнял светодиод с длиной волны максимума полосы излучения 476 нм. Схема установки приведена на рисунке 3. Крепежные элементы установки были смоделированы и распечатаны на 3D принтере. Фотография собранной установки представлена на рисунке 4.

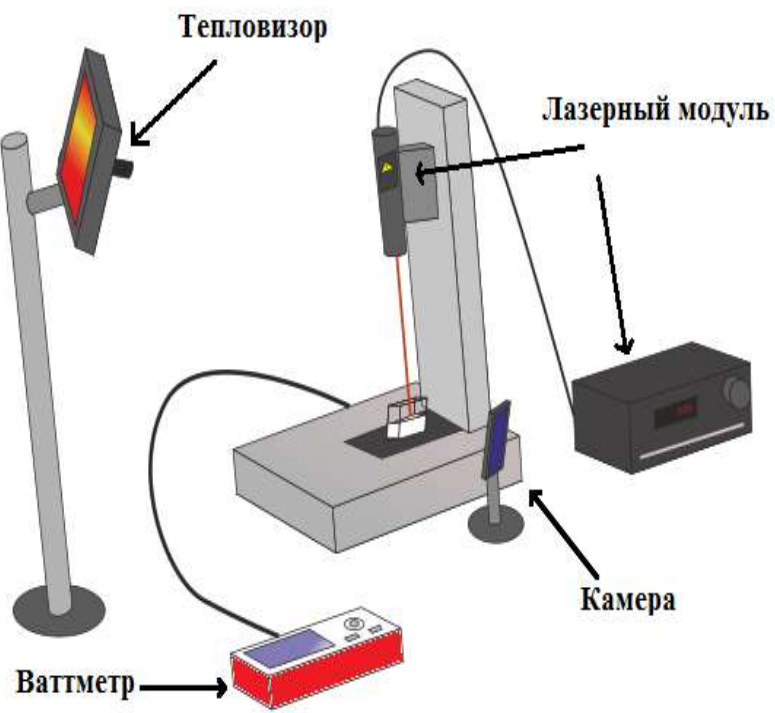


Рисунок 3. Схема экспериментальной установки.

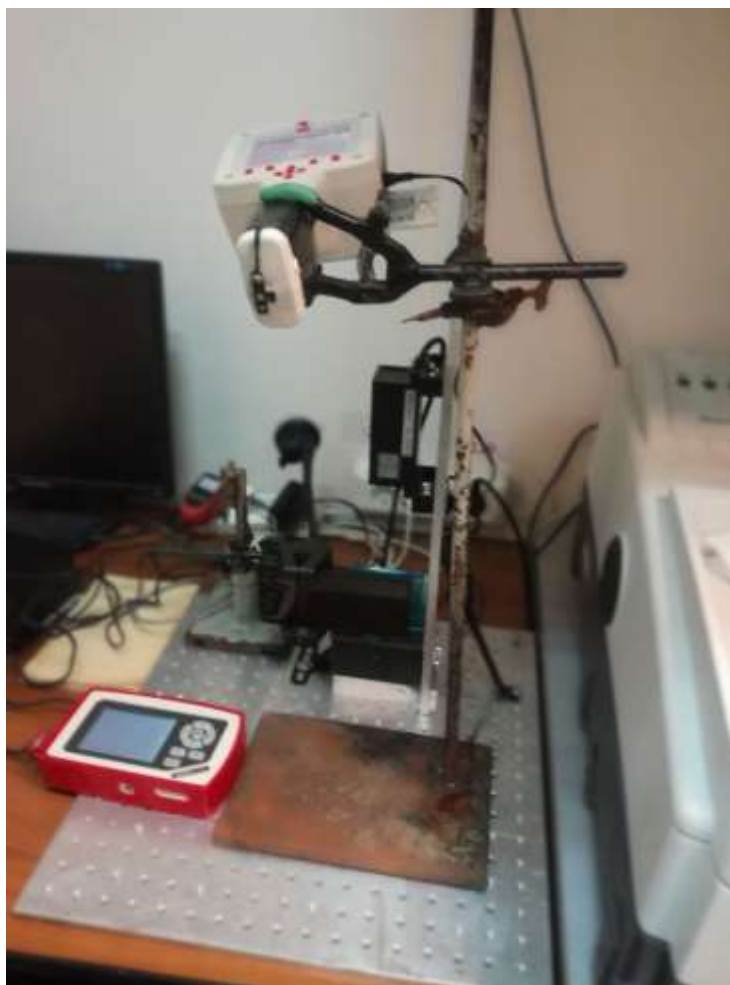


Рисунок 4. Вид собранной установки для проведения модельных экспериментов.

После того, как установка была собрана, проводилась калибровка зависимости мощности лазерного излучения от выходного тока блока питания, так как точная настройка лазера играет важную роль в стабильной работе установки.

Второй подраздел описывает метод приготовления экспериментальных образцов для проведения модельных экспериментов. В качестве материала для подготовки экспериментальных образцов был использован белок яйца сельскохозяйственной птицы *Gallus domesticus* (Рисунок 5).





Рисунок 5. Материал для подготовки исследуемого образца — белок яйца сельскохозяйственной птицы *Gallus domesticus*.

Выполнялось отделение белковых фракций от яичного желтка и фильтрация белка при помощи металлической сетки. Полученный образец разделялся на несколько порций, часть которых смешивалась с золотыми наночастицами. Для первого этапа экспериментов был подготовлено два не денатурированных образца овальбумина – чистый и смешанный с наночастицами. Для второго этапа чистый и смешанный с наночастицами овальбумин был предварительно денатурирован на нагревательном элементе.

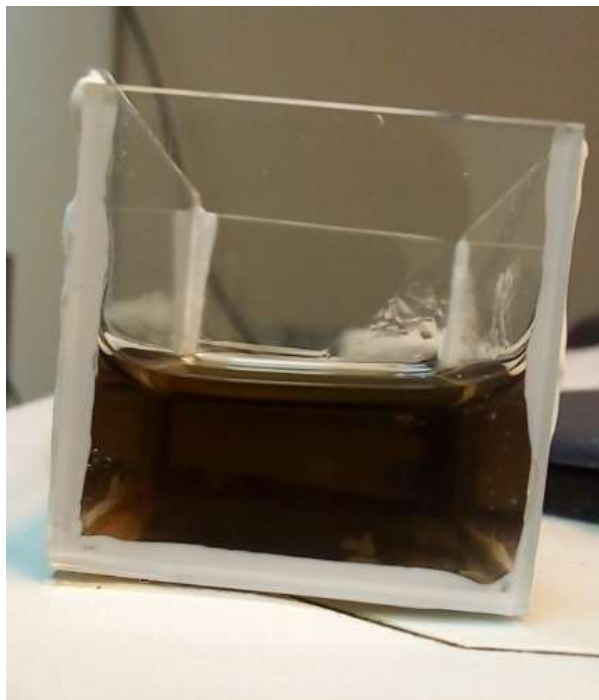


Рисунок 6. Один из образцов исследования – не денатурированный яичный альбумин, смешанный с золотыми наночастицами.

Третий подраздел посвящен исследованию влияния денатурации овалбумина на динамику его нагрева в процессе фототермотерапии. Приведено описание материалов и методов. Разработана и описана Математическая модель расчета температуры денатурированного яичного альбумина. Для проведения ПФТТ в данном эксперименте были использованы образцы чистого не денатурированного овалбумина и овалбумина, предварительно смешанного с наночастицами. кювету помещался яичный альбумин, предварительно смешанный с золотыми наностержнями с длиной волны максимума плазмонного резонанса, равной 840 нм. Толщина слоя образцов составляла 10 мм. Во всех экспериментах образцы имели начальную температуру в интервале 21–25 °С. Каждый образец подвергался облучению диодным лазером с длиной волны 808 nm, с диаметром плоскопараллельного пучка 5.1 мм и мощностью излучения в интервале от 0.5 до 2 Вт. В процессе облучения измерялась мощность прошедшего пучка через образец посредством измерителя оптической мощности. Поверхностная температура образца измерялась с интервалом в 5–10 секунд бесконтактным методом — ИК тепловизором, расположенным на расстоянии 37 см от поверхности образца. Процесс денатурации фиксировался при помощи цифровой камеры, защищенной ИК фильтром толщиной 5 мм.

На рисунке 7 продемонстрирована временная зависимость относительного изменения температуры образца от времени для различных режимов облучения. По представленным результатам зависимости температуры образца от времени видно, что первоначально зависимость относительной температуры поверхности образцов подчиняется экспоненциальному закону[59], который хорошо описывает динамику нагрева золотых наностержней в воде, но, начиная с какого-то момента, температура образца резко возрастает. Это связано с тем, что образец

достигает температуры около 52 °С, при которой запускается процесс денатурации, приводящий к уменьшению коэффициента пропускания, и, как следствие, возрастанию доли поглощенной энергии, что вызывает дополнительный разогрев образца.

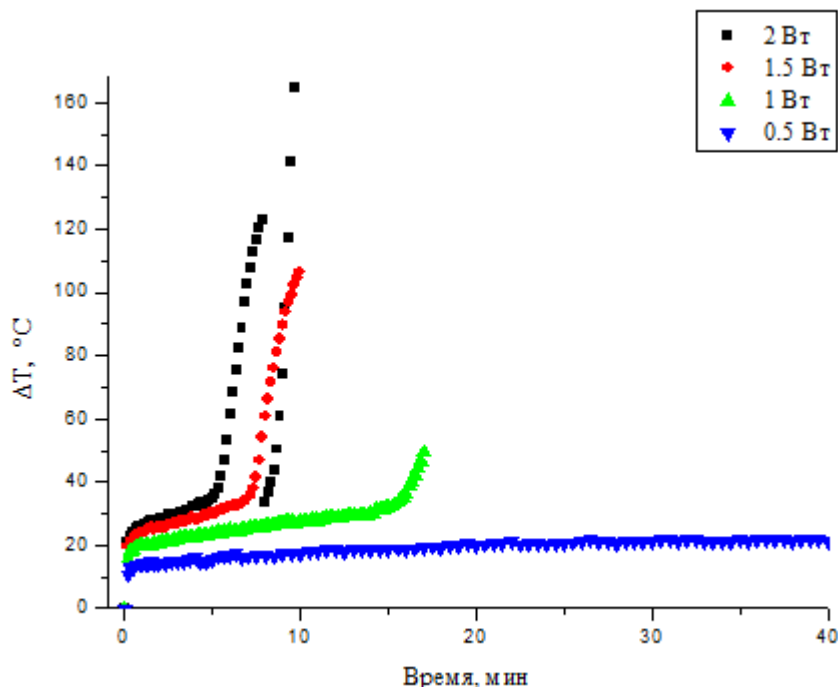


Рисунок 7. Зависимость относительного изменения температуры образца от времени для различных режимов облучения.

На рисунке 8 представлены результаты временных зависимостей относительного изменения температуры поверхности денатурированной ткани при различных режимах работы лазера. Показано, что температура зависит от плотности теплового потока, проходящего через заданную область. В свою очередь, плотность теплового потока зависит от скорости подачи тепла, т. е. от плотности мощности лазерного излучения.

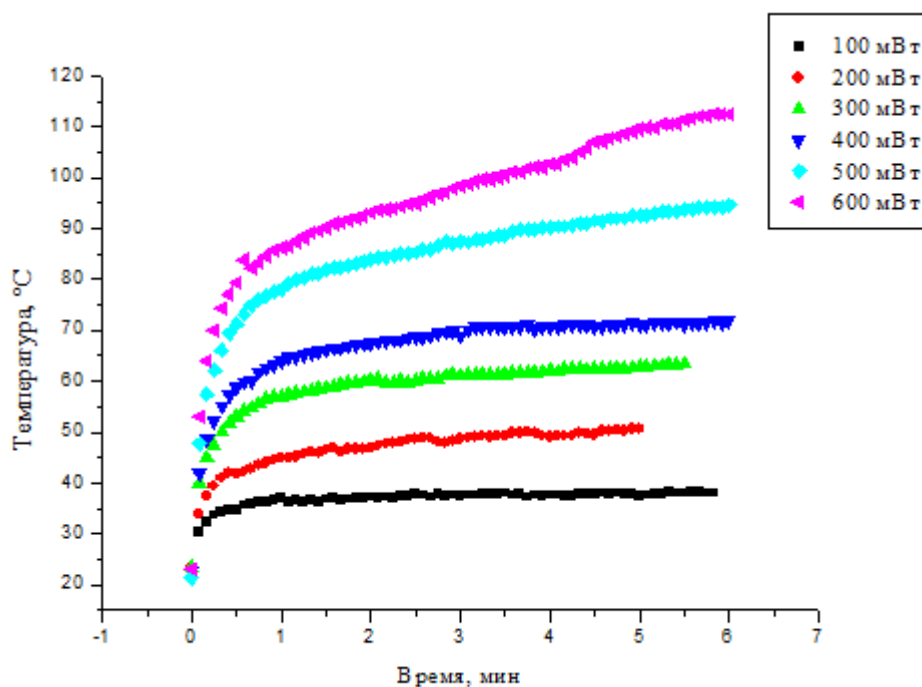


Рисунок 8. Зависимость температуры смешенного с наночастицами денатурированного овальбумина от времени при различных мощностях излучения.

Таким образом, в настоящей дипломной работе были проведены исследования, направленные на развитие методов плазмонно-резонансной фототермотерапии.

В ходе работы было исследовано влияние денатурации овальбумина на динамику его нагрева в процессе фототермотерапии, спроектирована рабочая установка для проведения модельных экспериментов и разработана Математическая модель расчета температуры денатурированного яичного альбумина.

### Список использованных источников

- 1) Huntington JA, Stein PE. Structure and properties of ovalbumin. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001 May 25;756(1-2):189-98.
- 2) Nisbet AD, Saundry RH, Moir AJ, Fothergill LA, Fothergill JE. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. Eur J Biochem. 1981 Apr;115(2):335-45.

- 3) Sugimoto Y, Sanuki S, Ohsako S, Higashimoto Y, Michio K, Junichi I, Hisham A, Takayoshi K, Takahiro K, Katsumi. Ovalbumin in Developing Chicken Eggs Migrates from Egg White to Embryonic Organs while Changing Its Conformation and Thermal Stability. *Journal of Biological Chemistry*. 1999. 274. 11030-11037.
- 4) Robinson A, Meredith C, Austen BM. Isolation and properties of the signal region from ovalbumin. *FEBS Lett*. 1986 Jul 28;203(2):243-6.
- 5) Mine, Yoshinori; Noutomi, Tatsushi; Haga, Noriyuki. Thermally induced changes in egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1990. 38 (12): 2122–2125.
- 6) Пантелеев, А.В. Исследование химического синтеза наночастиц золота и сопровождающих его цветовых превращений / А.В. Пантелеев, Д.Н. Вавулин, А.В. Альфимов, О.В. Андреева, Е.М. Арысланова, С.А. Чивилихин // *Наносистемы: физика, химия, математика*. - 2012. - Т. 3. - № 6. - С. 123-133.
- 7) Zeng S, Yong KT, Roy I, Dinh XQ, Yu X, Luan F A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications. *Plasmonics*. 2011. 6 (3): 491–506
- 8) Егоров А.М. Использование золотых наночастиц в биомедицинских приложениях с использованием оптических методов. *Иноватика и экспертиза*. 2014. Выпуск 2(13). 60-68.
- 9) Govorov A and Richardson H. Generating heat with metal nanoparticles, *Nano Today* 2. 2007. 30–38.
- 10) Максимова И.Л., Акчурин Г.Г., Терентюк Г.С., Хлебцова Б.Н., Акчурин Г.Г. (мл.), Ермолаев И.А., Скапцов А.А., Ревзина Е.М., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г. // *Квант. электрон.* 2008. Т. 38. № 6. С. 536–542.

292 18.06.2021