

КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЗОЛОТЫХ НАНОСТЕРЖНЕЙ ПРИ ОБЛУЧЕНИИ НА ЧАСТОТЕ ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

Долинский Г.А.

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
имени Р.Е.Кавецкого НАН Украины, лаборатория квантовой нанобиологии,
03022 Украина, г. Киев, ул. Васильковская, 45,
тел.: +38(044) 258-16-58

Методами флуоресцентной спектроскопии и люминол-зависимой хемилюминесценции изучены процессы перекисного окисления в суспензии фосфолипидов, инициируемые внесением золотых наностержней и облучением полупроводниковым лазером на частоте плазмонного резонанса ($\lambda=658$ нм). Показана дозозависимость продукции синглетного кислорода при облучении раствора с наностержнями. Сделан вывод о возможности создания на основе таких наноструктур высокоэффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии опухолей.

Ключевые слова: золотые наностержни, перекисное окисление фосфолипидов, плазмонный резонанс, синглетный кислород, фотодинамическая терапия опухолей.

Введение и постановка задачи

Золотые благородных металлов, особенно золота и серебра, обладают уникальными оптическими характеристиками, важнейшая из которых – поверхностный плазмонный резонанс в широком диапазоне частот возбуждающего излучения [9, 14]. Кроме того, они отличаются хорошей биосовместимостью и селективностью по отношению к биосубстратам в сочетании с высокой электропроводностью и адсорбционной способностью, что позволяет осуществлять целенаправленную функционализацию поверхности биосубстрата [6, 11].

Нелинейно-оптические свойства золотых наночастиц, связанные с явлениями плазмонного резонанса и комбинационного рассеивания, обусловили их широкое применение в биосенсорных системах [15], а достижения последних лет открывают перспективы разработки на этой основе средств внутриклеточной молекулярной диагностики и терапии [17, 23]. Локальное выделение энергии резонансных процессов позволяет визуализировать субклеточные структуры с разрешающей способностью вплоть до отдельных макромолекул и воздействовать на них с одновременным контролем избирательности и эффективности [5]. Обладая развитой активной поверхностью (значительно большим отношением площади поверхности к объему, чем массивные материалы), все наноразмерные структуры в той или

иной мере проявляют высокую адсорбционную и каталитическую активность [18]. Наноструктурированное золото адсорбирует свободные радикалы и катализирует образование активных форм кислорода [8]. Показана высокая каталитическая активность наночастиц золота в окислительно-восстановительных процессах с участием растворенного кислорода и пероксидов, обусловленная активацией молекул кислорода на поверхности раздела твердой и жидкой фаз [16].

Особый интерес вызывают опосредованные нанокластерами процессы конверсии поглощенной энергии излучения, которые могут быть использованы для визуализации и разрушения опухолевых клеток [22]. Учитывая возможность передачи энергии плазмонов на адсорбированные на поверхности наночастиц молекулы с переходом их в возбужденное состояние, предполагается разработка наноструктурных фотосенсибилизаторов, значительно более продуктивных и специфичных, чем существующие [4].

Среди наноматериалов с выраженными плазмонно-резонансными характеристиками наиболее перспективными представляются золотые наностержни (НС), которым присущ эффект усиленного селективного проникновения и накопления в опухолевой ткани, а также «подстройка» резонансной частоты в пределах дальнего красного – ближнего инфракрасного диапазона [10]. Кроме того, с увеличением отношения продоль-

ных размеров к диаметру (aspect ratio) усиливается молекулярная анизотропия наноструктур и возрастает каталитическая активность на их торцевых поверхностях [3].

Целью настоящей работы было изучение окислительных процессов с участием активных форм кислорода, образующихся при внесении золотых НС в суспензию фосфолипидов (ФЛ) и ее лазерном облучении на частоте плазмонного резонанса.

Материалы и методы

В экспериментах использованы золотые НС диаметром $25,0 \pm 2,5$ нм и длиной $62,0 \pm 6,0$ нм (водная дисперсия с исходной концентрацией 150 ppm, Sigma-Aldrich, USA), с пиком поверхностного (продольного) плазмонного резонанса в области длины волны 656 (625–675) нм и локального (поперечного) плазмонного резонанса - в области 519 (505–555) нм, которые вносили в суспензию, приготовленную из лецитина (Биолек, Украина) на буфере трис-НСl, pH=7,4. Образование активных форм кислорода выявляли по вспышке хемилюминесценции после инъекции НС (конечная концентрация 0,6 мкг/мл) в инкубационную среду, содержащую 0,4 мг/мл ФЛ, с добавлением 0,04% тритона X-100 и 0,5 мкМ кумарина С-334 (Sigma-Aldrich, USA) – физического усилителя квантового выхода реакции рекомбинации липопероксильных радикалов [21].

Для оценки фотосенсибилизирующего действия НС по 2 мкл их исходной дисперсии вносили в лунки 96-луночного планшета с 200 мкл суспензии с содержанием ФЛ 2,0 мг/мл и облучали красным светом полупроводникового лазера (Фотоника Плюс, Украина) с длиной волны $\lambda=658$ нм в дозе 10 Дж/см² при плотности мощности 10 мВт/см², регистрируемой на уровне поверхности жидкости при помощи измерителя мощности/энергии лазерного излучения Ophir NOVA II (Ophir Optronics, Israel). Накопление метастабильных продуктов перекисного окисления ФЛ определяли методом люминол-зависимой хемилюминесценции [2].

Уровень продукции синглетного кислорода оценивали по интенсивности флуоресценции специфического индикатора Singlet Oxygen

Sensor Green (SOSG, Molecular Probes, USA) на флуороспектрометре ND-3300 (NanoDrop, USA), $\lambda_{ex} = 470 \pm 10$ нм, $\lambda_{em} = 531 \pm 20$ нм. Параллельно облучали пробы, содержавшие 1,5 мкг/мл НС с 2 мкМ раствором SOSG на 50 мМ буфере трис-НСl, pH=7,4, и контрольные пробы без НС, варьируя экспозиционную дозу от 1 до 20 Дж/см².

Хемилюминесценцию регистрировали на универсальном ридере Synergy HT (BioTek, USA) в кинетическом режиме.

Обработку данных проводили методами параметрической статистики при помощи пакета анализа Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение

В суспензии ФЛ после инъекции золотых НС наблюдалась вспышка хемилюминесценции, развивавшаяся почти немедленно и продолжавшаяся около 100 секунд (рис. 1).

По-видимому, при внесении наночастиц инициировалась цепная реакция разложения липопероксидов с образованием липопероксильных радикалов, рекомбинация которых сопровождается интенсивным свечением, подобно тому, как это происходит при каталитическом действии ионов металлов переходной валентности [1]. Образование пероксидов при инкубации золотых НС в суспензии с высоким содержанием ФЛ подтверждено также методом люминол-зависимой хемилюминесценции, причем лазерное облучение на частоте плазмонного резонанса достовер-

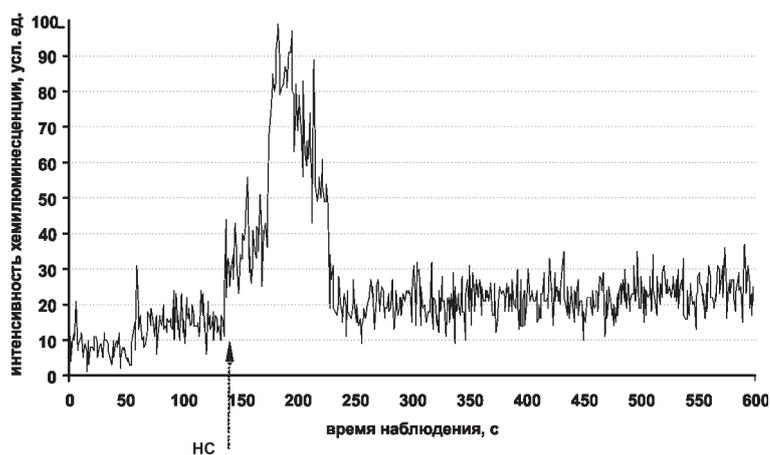


Рис. 1. Хемилюминесценция в суспензии ФЛ после внесения золотых НС (момент внесения отмечен стрелкой)

но повышало выход метастабильных продуктов перекисного окисления (рис. 2).

Обнаруженный фотодинамический эффект вполне согласуется с современными представлениями о конверсии энергии фотонов, взаимодействующих с НС, в тепловую энергию молекул,

адсорбированных на поверхности наночастиц [13]. При этом возможно как непосредственное усиление термоллабильных реакций свободно-

частоте плазмонного резонанса (рис. 3).

Снижение флуоресценции SOSG в «темной» пробе и при дозе облучения 1 Дж/см², наблюдавшееся после добавления НС, очевидно, было связано с поглощением на частоте их локального плазмонного резонанса (длина волны 505–555 нм) и не изменяло общей картины динамики прироста пика в полосе $\lambda_{em} = 531 \pm 20$ нм, характерного для реакции на синглетный кислород при накоплении дозы.

В ряде работ, где исследовалась возможность применения золотых НС для разрушения опухолевых клеток, были описаны два основных механизма лечебного действия: повышение концентрации мембранно-связанного фотосенсибилизатора, доставляемого в виде комплекса с наночастицами, и фототермолиз после облучения на частоте плазмонного резонанса в ближнем инфракрасном диапазоне [12, 19]. Поскольку перекисное окисление ФЛ клеточных мембран приводит к инициации сигнальных каскадов апоптоза [7], по-видимому, следует также рассматривать цитотоксическое действие золотых НС, связанное с их непосредственной фотодинамической активностью.

Выводы

Золотые НС обладают способностью инициировать процессы перекисного окисления липидов, усиливающиеся за счет образования активных форм кислорода при лазерном облучении на частоте продольного плазмонного резонанса НС, что

открывает перспективу создания на основе этих наноструктур высокоэффективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии опухолей.

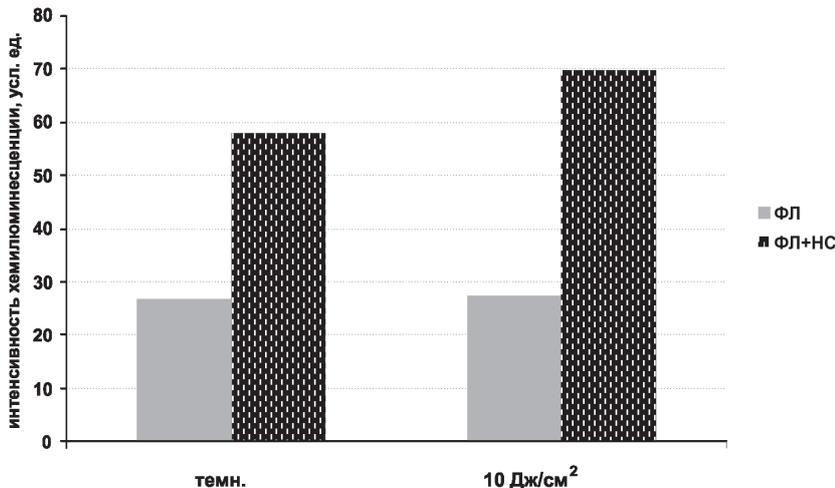


Рис. 2. Люминол-зависимая гемилюминесценция в суспензии ФЛ после инкубации с золотыми наностержнями (ФЛ + НС) без освещения (темн.) и при облучении с плотностью дозы 10 Дж/см² на частоте плазмонного резонанса

радикального окисления, так и опосредованное синглетным кислородом, образующимся при плазмонной активации триплетного состояния [20]. В пользу последнего механизма свидетельствует дозозависимое увеличение интенсивно-

сенсибилизатора, доставляемого в виде комплекса с наночастицами, и фототермолиз после облучения на частоте плазмонного резонанса в ближнем инфракрасном диапазоне [12, 19]. Поскольку перекисное окисление ФЛ клеточных мембран приводит к инициации сигнальных каскадов апоптоза [7], по-видимому, следует также рассматривать цитотоксическое действие золотых НС, связанное с их непосредственной фотодинамической активностью.

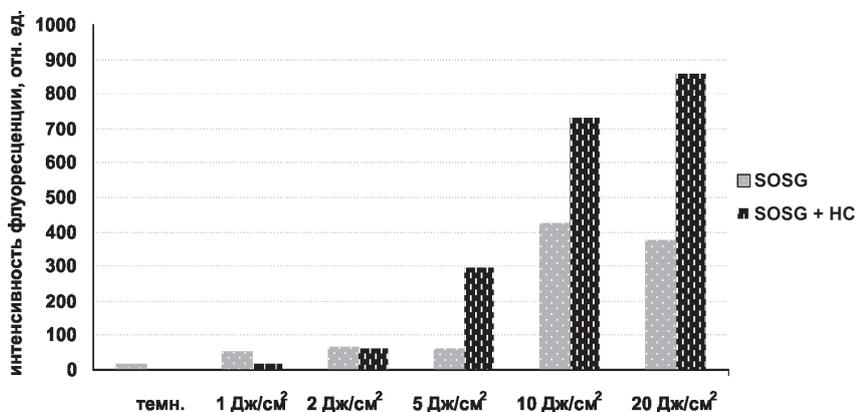


Рис. 3. Изменение интенсивности флуоресценции специфического индикатора синглетного кислорода после облучения красным светом лазера с длиной волны 658 нм: SOSG – в буферном растворе; SOSG + НС – в присутствии золотых НС

сти флуоресценции специфического индикатора синглетного кислорода SOSG в растворе, содержащем золотые НС, при лазерном облучении на

Література

1. Владимиров Ю.А. Свечение, сопровождающее биохимические реакции / Ю.А.Владимиров // Соросовский образовательный журнал.- 1999.- №6.- С.25-32.
2. Долинский Г.А. Каталитическая активность наноразмерных феррошпинелей кобальта и меди в фосфолипидной модельной системе / Г.А.Долинский, Е.Н.Лавриненко, И.Н.Тодор и др. // Наноструктурное материаловедение.- 2010.- №1.- С.59-68.
3. Andoy N.M. Single-molecule catalysis mapping quantifies site-specific activity and uncovers radial activity gradient on single 2D nanocrystals / N.M.Andoy, X.Zhou, E.Choudhary et al. // J. Amer. Chem. Soc.- 2013.- Vol.135.- P.1845-1852.
4. Cheng S-H. Inorganic nanoparticles for enhanced photodynamic cancer therapy / S-H.Cheng, L.-W.Lo. // Current Drug Discovery Technologies.- 2011.- Vol.8.- P.269-276.
5. Coto-García A.M. Nanoparticles as fluorescent labels for optical imaging and sensing in genomics and proteomics / A.M.Coto-García, E.Sotelo-González, M.T.Fernández-Argüelles et al. // Anal. Bioanal. Chem.- 2011.- Vol.399, Iss.1.- P.29-42.
6. Daniel M.-Ch. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology / M. Ch.Daniel, D.Astruc // Chem. Rev.- 2004.- Vol.104.- P.293-346.
7. Deigner H.-P. Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology / H. P.Deigner, A.Hermetter // Curr. Opin. Lipidol.-2008.- Vol.19.- P.289-294.
8. Gong J. Surface science investigations of oxidative chemistry on gold / J.Gong, C.B.Mullins // Acc. Chem. Res.- 2009.- Vol.42, Iss.8.- P.1063-1073.
9. Haes A.J. A nanoscale optical biosensor: The short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of silver and gold nanoparticles / A.J.Haes, S.Zou, G.C.Schatz, R.P.Van Duyne // J. Phys. Chem. B.- 2004.- Vol.108.- P.6961-6968.
10. Huang X. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications / X.Huang, S.Neretina, M.A.El-Sayed // Adv. Mater.- 2009.- Vol.21.- P.4880-4910.
11. Ipe B. Functionalized gold nanoparticles as phosphorescent nanomaterials and sensors / B.Ipe, K.Yoosaf, K.G.Thomas // J. Amer. Chem. Soc.- 2006.- Vol.128.- P.1907-1913.
12. Jang B. Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/ photothermal therapy in vivo / B.Jang, J.-Y.Park, C.-H.Tung et al. // ACS NANO.- 2011.- Vol.5, №2.- P.1086-1094.
13. Khlebtsov N.G. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles / N.G.Khlebtsov, L.A.Dykman // Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer.- 2010.- Vol.111.- P.1-35.
14. Khlebtsov N.G. Optical properties of colloidal-gold bioconjugates / N.G.Khlebtsov, V.A.Bogatyrev, L.A.Dykman et al. // Izv. Vuz. Applied Nonlinear Dynamics.- 2002.- Vol.10.- P.172-187.
15. Kneipp J. Novel optical nanosensors for probing and imaging live cells / J.Kneipp, H.Kneipp, B.Wittig, K.Kneipp // Nanomedicine.- 2010.- Vol.6, №2.- P.214-226.
16. Shang C. Origin and activity of gold nanoparticles as aerobic oxidation catalysts in aqueous solution / C.Shang, Z.P.Liu // J. Amer. Chem. Soc.- 2011.- Vol.133, Iss.25.- P.9938-9947.
17. Singhal S. Nanotechnology applications in surgical oncology / S.Singhal, S.Nie, M.D.Wang // Ann. Rev. Med.- 2010.- Vol.61.- P.359-373.
18. Somorjai G. A. Impact of surface chemistry / G.A.Somorjai, Y.Li // PNAS.- 2011.- Vol.108, Iss.3.- P.917-924.
19. Tong L. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity / L.Tong, Y.Zhao, T.B.Huff et al. // Adv. Mater.- 2007.- Vol.19.- P.3136-3141.
20. Vankayala R. Metal nanoparticles sensitize the formation of singlet oxygen / R.Vankayala, A.Sagadevan, P.Vijayaraghavan et al. // Angew. Chem. Int. Ed.- 2011.- Vol.50.- P.10640-10644.
21. Vladimirov Yu.A. Quinolizin-coumarins as physical enhancers of chemiluminescence during lipid peroxidation in live HL-60 cells / Yu.A.Vladimirov, A.Arroyo, J.M.Taylor et al. // Archives of Biochemistry and Biophysics.- 2000.- Vol.384, №1.- P.154-162.
22. Xia Y. Gold nanocages: From synthesis to theranostic applications / Y.Xia, W.Li, C.M.Cobley et al. // Acc. Chem. Res.- 2011.- Vol.44, №10.- P.914-924.
23. Yu L. Quantitative gold nanoparticle analysis methods: A review / L.Yu, A.Andriola // Talanta.- 2010.- Vol.82, Iss.3.- P.869-875.

ФОТОКАТАЛІТИЧНА АКТИВНІСТЬ ЗОЛОТИХ НАНОСТРИЖНІВ ПРИ ОПРОМІНЕННІ НА ЧАСТОТІ ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

Долинський Г.А.

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є.Кавецького НАН України,
лабораторія квантової нанобіології,
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022 Україна, тел.: +38(044) 258-16-58*

Методами флуоресцентної спектроскопії і люмінол-залежної хемілюмінесценції досліджені процеси перекисного окиснення в суспензії фосфоліпідів, що ініціювалися внесенням золотих нанострижнів та опроміненням напівпровідниковим лазером на частоті плазмонного резонансу ($\lambda=658$ нм). Показана дозозалежність продукції синглетного кисню при опроміненні розчину з нанострижнями. Зроблено вис-

новок про можливість розробки на основі таких наноструктур вискоелективних фотосенсибілізаторів для фотодинамічної терапії пухлин.

Ключові слова: золоті нанострижні, перекисне окиснення фосфоліпідів, плазмонний резонанс, синглетний кисень, фотодинамічна терапія пухлин.

**PHOTOCATALYTIC ACTIVITY OF GOLD NANORODS
ON PLASMON RESONANCE FREQUENCY EXPOSURE**

Dolynskiy G.A.

*R.E.Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,
Laboratory of Quantum Nanobiology,
45, Vasylykivska Str., Kyiv, 03022 Ukraine, tel.: +38(044) 258-16-58*

Peroxidation processes initiated in a phospholipids suspension by gold nanorods adding and a diode laser irradiation at the plasmon resonance frequency ($\lambda=658$ nm) were studied using fluorescence spectroscopy and lumimol-dependent chemiluminescence techniques. During the nanorods-containing solution irradiation a dose-dependent production of singlet oxygen occurred. The workability of such type nanostructures as a basis for high-efficient photosensibilizers fit to photodynamic therapy of tumors was concluded.

Key words: gold nanorods, phospholipids peroxidation, plasmon resonance, singlet oxygen, photodynamic therapy of tumors.