

<sup>1</sup> Институт химической кинетики и горения СО РАН  
ул. Институтская, 3, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: lavrik@ns.kinetics.nsc.ru

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ТЕРАГЕРЦОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЛАЗЕРА НА СВОБОДНЫХ ЭЛЕКТРОНАХ НА ЛИОФИЛИЗОВАННЫЕ ОБРАЗЦЫ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДАМИ ИК И УФ СПЕКТРОСКОПИИ

Изучено влияние облучения светом, генерируемого лазером на свободных электронах ( $\lambda = 120\text{--}140$  мкм, мощность 130–280 мВт), на лиофилизированные образцы бычьего сывороточного альбумина (БСА). В ИК спектрах обнаружено уменьшение величины оптической плотности полос характеристических частот ( $2\,700\text{--}3\,500$  см<sup>-1</sup>) на  $(40 \pm 20)$  %. В УФ спектрах поглощения на  $\lambda = 275$  нм установлено уменьшение величины оптической плотности на  $(40 \pm 10)$  %. Облучение водных растворов БСА не приводило к изменению спектров УФ поглощения. Термический нагрев образцов до 55 °С не приводил к изменениям ИК и УФ спектров поглощения. Объяснение наблюдаемых эффектов при облучении проводится в рамках гипотезы о наличии фотохимической деструкции, лазерного свеллинга и абляции образцов БСА.

*Ключевые слова:* терагерцовое излучение, бычий сывороточный альбумин, ИК и УФ спектры поглощения, фотохимическая деструкция, лазерный свеллинг, абляция.

### Введение

Актуальность исследований влияния взаимодействия электромагнитного излучения терагерцовой частоты (0,5–10 ТГц) с биомолекулами связана с влиянием этого излучения на биологические объекты [1–3]. Свет этого спектрального диапазона поглощается многочисленными биомолекулами и водой [4]. Поглощение в этой спектральной области обусловлено наличием коллективных мод [5]. Число работ, посвященных изучению влияния взаимодействия электромагнитного излучения терагерцовой частоты собственно с биомолекулами, относительно не велико [6–8]. В частности, в работе [6] было изучено влияние 900 мкм радиации на взаимодействие гем–глобин в водном растворе. Наблюдаемые изменения величины взаимодействия после облучения авторы объясняли передачей энергии от квазикристаллической структуры воды, которая поглощает это излучение, на молекулу субстрата. В работе [7]

с помощью техники диффузионной спектроскопии, позволяющей получать информацию о размерах аэрозольных частиц, было показано, что облучение светом лазера на свободных электронах ( $\lambda_{\text{изл}} = 100\text{--}200$  мкм, время импульса 50 пс, частота 5,6 МГц, средняя мощность 200 Вт) молекул ДНК фага  $\lambda$ , лизоцима и пероксидазы из хрена приводит к мягкой абляции. Наличие «мягкости», т. е. неполного разрушения исходной молекулы, при абляции с поверхности, на которой находились молекулы, авторы связывали с тем, что биомолекулы, подвергшиеся абляции, сохраняли функциональную активность. В работе [8] сообщается о влиянии излучения импульсного ИК лазера с длиной волны  $\lambda = 90$  мкм на вторичную структуру лиофилизованного препарата бычьего сывороточного альбумина (БСА) и активность ряда ферментов. В этой работе использовался лазер с энергией в импульсе 5 мДж, а величина дозы варьировалась от 0,2 до 3 Дж. Было показано, что интенсивность флуоресценции зон-

да, которая пропорциональна степени связывания с молекулой БСА, уменьшалась после облучения немонотонным образом. Изменения интенсивности флуоресценции зонда авторы связывали с деформацией вторичной структуры белка, а из результатов определения активности сделали вывод о сохранении полипептидных цепей и отсутствии олигомеризации протеинов. Таким образом, вся имеющаяся информация о влиянии излучения субмиллиметрового диапазона на биомолекулы была основана на данных, полученных не прямыми методами, а с помощью косвенных измерений, которые не дают непосредственной информации об изменении состояния исходного вещества после воздействия излучением терагерцовой частоты. Способами, которые позволяют получать такую информацию, являются методы ИК и УФ спектроскопии. Сообщения о применении этих методов для наблюдения за состоянием биомолекул, подвергшихся облучению излучением терагерцовой частоты, отсутствуют. Таким образом, представляет интерес, используя эти методы, попытаться получить сведения о структуре образцов биомолекул, перенесших такое воздействие.

Целью настоящей работы было применение методов ИК и УФ спектроскопии для наблюдения эффектов облучения лиофилизированных образцов БСА излучением с длиной волны генерации 120–140 мкм, генерируемого лазером на свободных электронах (ЛСЭ). В качестве количественного спектрального параметра, непосредственно связанного с возможными изменениями структуры облучаемого образца, была выбрана величина интенсивности спектров поглощения характеристических полос ИК и УФ спектров.

### Материалы и методы

Источником терагерцового излучения служил лазер на свободных электронах [9]. Параметры излучения были следующие:  $\lambda = 120\text{--}140$  мкм, время импульса 50 пс, частота 5,6 МГц, мощность 130–300 мВт. Время облучения составляло от 3 до 9 мин. Диаметр лазерного пучка составлял  $\sim 2$  см. Контроль мощности осуществлялся с помощью измерителя мощности ИМО-2.

Эксперименты по термическому нагреву образцов проводились помещением кюветы в термостат или обдуванием горячего воздуха из тепловой пушки. Образцы нагревались

до 55 °С и выдерживались при этой температуре в течение 15 мин. Температура нагрева образца измерялась дифференциальной термпарой и ртутным термометром.

Лиофилизированный препарат БСА фирмы «Реанал» использовался без дополнительной очистки. Исходный препарат представлял собой отдельные плоские пластинки с размерами до 3 мм в диаметре и толщиной приблизительно 0,01 мм. Облучение образцов БСА при анализе с помощью ИК спектроскопии проводилось в герметичных кюветах с фторопластовыми окнами. Толщина окон составляла 3 мм. При этом величина оптической плотности составляла  $\sim 0,3$ . Использование таких окон позволяет регистрировать спектры в диапазоне  $\nu = 2\ 600\text{--}4\ 000$  см<sup>-1</sup>. Растертый в агатовой ступке облучаемый образец БСА помещался на дно 50 мкм цилиндрического углубления одного из окон. Диаметр углубления был 30 мм. Окна зажимались стальными пластинами. Стабильность положения образцов в такой кювете была достаточно высока, поскольку приготовленный для облучения образец с точностью до 1 % не менял своего спектра поглощения при вибрационном воздействии. Анализ ИК спектров облученных и контрольных образцов проводился в той же кювете, в которой проводилось облучение. При анализе ИК спектров поглощения использовался Фурье-спектрометр фирмы «Брукер».

Облучение образцов БСА при анализе с помощью УФ спектроскопии проводилось в герметичных цилиндрических кюветах из твердого полистирола. Величина оптической плотности материала кюветы на длине волны облучения была  $\sim 0,35$ . Диаметр кюветы 8 мм. Измерение интенсивности УФ спектров облученных и контрольных образцов БСА проводилось на длине волны 275 нм. Анализировались водные растворы БСА, концентрация которых составляла 1 мг/мл. Растворы готовились растворением навески облученного или контрольного сухого порошка БСА в деионизованной воде. УФ спектры поглощения водных растворов были получены на спектрометре фирмы «Хьюлетт-Паккард».

### Результаты

Температура кювет в ИК и в УФ экспериментах за время 9-минутного облучения светом лазера не превышала 35 °С. Таким образом, внешняя температура кюветы в лазерном

эксперименте всегда была меньше температуры в экспериментах по термическому нагреву.

На рис. 1 представлен типичный исходный ИК спектр поглощения порошка аль-

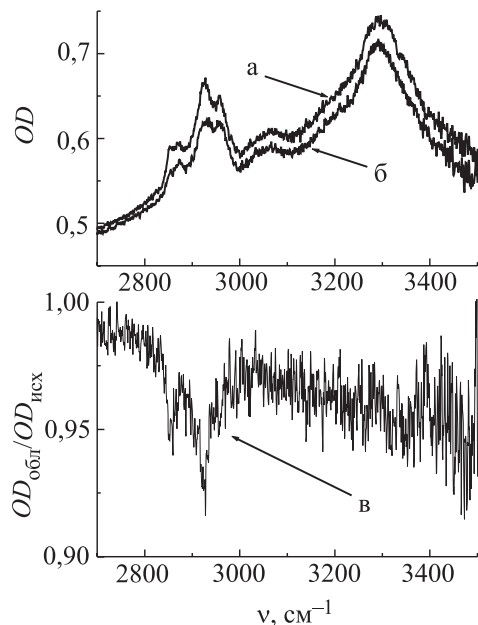


Рис. 1. ИК спектры поглощения БСА до (а) и после (б) облучения; отношение спектров облученного и контрольного образцов БСА (в).  $OD_{obl}$  и  $OD_{исх}$  – оптические плотности облученного и исходного образцов соответственно

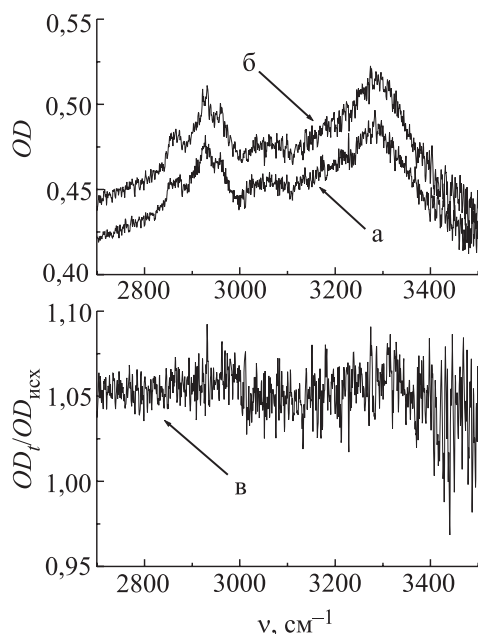


Рис. 2. ИК спектры поглощения БСА до (а) и после (б) нагрева; отношение спектров нагретого и исходного образцов БСА (в).  $OD_1$  и  $OD_{исх}$  – оптические плотности нагретого до 55 °С и исходного образцов соответственно

бумина (а). Спектр характеристических частот в области  $\nu = 2\,700\text{--}3\,500\text{ см}^{-1}$  в основном обусловлен валентными колебаниями  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{NH}$ ,  $\text{NH}_2$  и  $\text{OH}$  групп молекулы БСА [10]. Этот спектр находится на фоне, обусловленном наличием интенсивного рассеяния веществом образца и поглощением тefлоновых окон. Также показан ИК спектр поглощения порошка альбумина после 3-минутного облучения излучением ЛСЭ (б) с длиной волны  $\lambda = 127\text{ мкм}$  при мощности 250 мВт. Аналогичные эффекты в ИК спектрах поглощения наблюдались при использовании длин волн в диапазоне перестройки 120–140 мкм и мощностей в диапазоне перестройки 130–300 мВт. Как видно из сравнения этих спектров, наблюдается уменьшение интенсивности линии характеристических частот. Этот эффект отчетливо виден на рис. 1 (в), на котором представлено отношение спектров облученного и исходного образцов. На  $\nu = 2\,930\text{ см}^{-1}$  (характеристическая линия) с вычетом фона эффект уменьшения интенсивности облучения составляет  $(40 \pm 20)\%$ .

Нагрев образцов с помощью воздушной конвекции в термостате или с помощью направленного потока горячего воздуха от тепловой пушки с температурой до 55 °С не приводит к изменению интенсивности характеристических ИК спектров поглощения (рис. 2). Таким образом, излучение ЛСЭ и термический нагрев действуют на образцы БСА различно.

Сравнение рис. 1 (в) и 2 (в) показывает, что в результате облучения интенсивность фона на  $\nu = 2\,800\text{ см}^{-1}$  уменьшается, а в результате нагревания растет. Однако уменьшение интенсивности фона при облучении лазером образцов БСА наблюдалось не всегда. Оно имело место для 14 экспериментов из 22. В 8 экспериментах результат был аналогичен наблюдаемому при термическом нагреве – наблюдался рост интенсивности фона. Однако при этом всегда наблюдалось уменьшение структурированной части спектра. Напротив, при термическом нагреве рост поглощения на  $\nu = 2\,800\text{ см}^{-1}$  наблюдался во всех 11 проведенных экспериментах при неизменной величине поглощения структурированной части спектра. Различие в фоне, по-видимому, связано с неконтролируемыми и необратимыми морфологическими изменениями образца в кювете при тер-

мическом расширении, которое имело место в обоих типах экспериментов. Физическими причинами, которые могли приводить к различию морфологических изменений образцов при лазерном и термическом нагревах, являются следующие: 1) температура при лазерном нагреве всегда была меньше, чем при термическом; 2) в лазерном эксперименте градиент температуры был больше, чем в термическом, поскольку в термическом эксперименте нагрев кюветы имел место со всех сторон, в то время как при лазерном только с одной стороны. Однако, по-видимому, иногда в экспериментах с лазерным облучением, материал образца случайно претерпевал изменения, при которых конечная деформация структуры образца была подобна конечной деформации образца в экспериментах с термическим нагревом, что и давало одинаковую направленность изменения интенсивности фона в ИК спектрах в экспериментах с термическим нагревом и лазерным воздействием. Нужно заметить, что изменения интенсивности поглощения фона не велики и составляют несколько процентов, однако принципиальным в этом наблюдении является то, что в термическом эксперименте всегда наблюдался рост поглощения, а в лазерном – как рост, так и уменьшение.

На рис. 3 представлены УФ спектры поглощения облученного и исходного образцов БСА. Как видно из этого рисунка, после облучения образца интенсивность поглощения на  $\lambda = 275$  нм уменьшается приблизительно на 40 %. Это означает, что количество структурных групп, обуславливающих характерное поглощение белков на  $\lambda = 270$ – $290$  нм, уменьшается. Эксперименты, проведенные с термически нагреваемыми образцами БСА, показали отсутствие каких-либо изменений в УФ спектрах поглощения. В пределах экспериментальной погрешности  $\pm 1$  % также не наблюдалось изменений в УФ спектрах поглощения БСА при облучении его водных растворов.

Резюмируя наблюдаемые факты, заключаем, что в результате лазерного облучения с длиной волны 120–140 мкм концентрация исходного БСА, по данным ИК и УФ спектроскопии, уменьшается на 40 %.

### Обсуждение результатов

Интенсивность структурированной части ИК спектров после учета фона определяется величиной поглощения образца.

Следовательно, отсутствие изменения интенсивности структурированной части спектра в области поглощения СН, NH и OH колебаний при термическом нагреве связано с тем, что концентрация характеристических групп при нагреве не меняется. Это означает отсутствие разрыва химических связей. Напротив, при лазерном облучении имеет место разрыв химических связей. Об этом свидетельствует уменьшение интенсивности структурированной части ИК спектра поглощения. Дополнительным аргументом в пользу этого заключения является уменьшение интенсивности УФ спектра «белкового» поглощения образцов БСА на  $\lambda = 275$  нм. Физическими процессами, которые могут приводить к разрыву химических связей, при взаимодействии терагерцового излучения с сыпучим сухим веществом, которым является БСА, являются термическая деструкция, лазерная абляция и лазерный свеллинг.

*Термическая деструкция.* При облучении светом ЛСЭ в результате поглощения и соответственно нагрева неизбежно имеет место деструкция образца БСА. Процессами, приводящими к разрушению, могут быть спекание, агломерация и т. д. В результате, по данным ИК спектроскопии, количество молекул, содержащих СН<sub>2</sub>, СН<sub>3</sub>, NH, NH<sub>2</sub> и OH группы, должно уменьшаться, если происходит разрушение исходных молекул и образование продуктов, в которых доля молекул, имеющих указанные группы, меньше. Также будет уменьшаться интенсивность спектров УФ поглощения на  $\lambda = 275$  нм из-за деструкции исходной молекулы БСА. Такой химический процесс, сопровождающийся уменьшением концентрации характеристических групп, например, хорошо известен для процесса гумификации, когда в результате химических

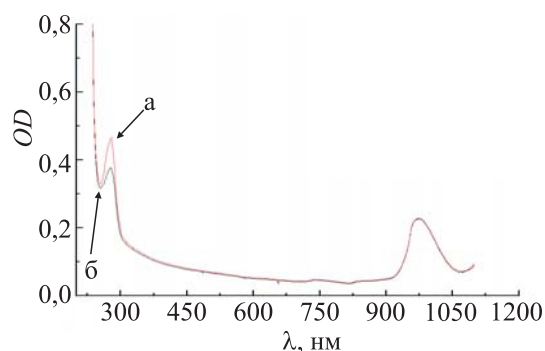


Рис. 3. Спектры УФ поглощения образцов БСА до (а) и после (б) облучения



превращений в почве со временем происходит рост отношения  $C / H$ ,  $C / N$ ,  $C / O$  и т. д. Увеличение величин этих отношений свидетельствует о росте ароматичности исследованных систем и соответственно об уменьшении количества  $CH_2$ ,  $CH_3$ ,  $NH$ ,  $NH_2$  и  $OH$  групп [11]. Следует заметить, что если в процессе «терагерцовой» деструкции (спекание, агломерация) превалирующую роль играет процесс сгорания (окисление), то в этом случае на степень деструкции будет влиять наличие кислорода. В связи с этим весьма интересным представляется проведение экспериментов по облучению терагерцовым излучением образцов БСА в обескислороженной среде.

*Лазерная абляция.* Эффект лазерной абляции – отрыв (испарение) некоторой массы облучаемого вещества от основной, в условиях нашего эксперимента также мог давать вклад в наблюдаемые спектральные изменения. Действительно, испарение может сопровождаться разрывом химических связей, что будет приводить к уменьшению интенсивности поглощения как ИК, так и УФ спектров, и поскольку эксперименты проводились в закрытом объеме (продукты абляции не исчезали), то это уменьшение регистрировалось как уменьшение концентрации характеристических групп.

*Лазерный свеллинг.* В условиях нашего эксперимента проявление эффектов лазерного свеллинга для биообъектов и полимеров [12; 13] (необратимое образование бугорков микронного размера на облучаемой поверхности) тоже реально. Его наличие может давать вклад в изменение интенсивности рассеяния и поглощения. Образование бугорков может приводить к изменению формы поверхности облучаемого образца и, следовательно, к изменению его отражающей и поглощающей способности. Эти изменения спектральных свойств образцов БСА должны проявляться в изменении величины фона (подложки) ИК спектров. При этом величина поглощения структурированной части спектра, определяемой количеством характеристических групп, может не меняться, если не происходит разрыва химических связей, поскольку их концентрация не претерпевает изменений и, напротив, может меняться, если происходит разрыв химических связей. Таким образом, наблюдаемые изменения интенсивности рассеяния и поглощения ИК

спектров образцов БСА не противоречат наличию лазерного свеллинга.

Подобные эффекты изменения интенсивности в спектрах ИК и УФ поглощения после воздействия терагерцового излучения наблюдались для сухих (порошкообразных) образцов молекул трипсина, триптофана, гуминовых кислот, паратерфенила. Интерпретация изменений спектров в рамках представлений о наличии термической деструкции, лазерной абляции и лазерного свеллинга не вызывает затруднений.

Полученные данные позволяют сделать следующее осторожное общее предположение. Воздействие терагерцового излучения на порошкообразные вещества всегда приводит к образованию агломератов, под которыми мы подразумеваем частицы, у которых на поверхности (или ее части) находятся претерпевшие деструкцию молекулы, а под этой поверхностью находятся неповрежденные исходные молекулы. В случае наличия исходной сплошной поверхности будет иметь место процесс ее спекания с образованием «корочки», и соответственно под «корочкой» будут находиться молекулы, не подверженные действию лазерного излучения. Дополнительным аргументом в пользу экранирующего действия образовавшейся «корочки» служат результаты по наблюдению зависимости эффекта разрыва химических связей от дозы. Эти зависимости имеют монотонно уменьшающийся вид с выходом на плато, которое соответствует доле разорванных связей не более 0,15. Это означает, что глубина превращения заведомо меньше 100 %, что и должно быть в случае неполного разрушения исходного вещества.

Предположение о возникновении агломератов позволяет провести альтернативное объяснение результатов работ [8; 7], в которых изучалось действие лазерного излучения на сухие биообъекты. Действительно можно принять, что в работе [8] также имели место процессы деструкции, абляции и свеллинга исходных образцов БСА. Однако для части оставшихся «неповрежденных» молекул активность белков была не нарушена, что и было зарегистрировано в эксперименте. Наблюдаемые эффекты уменьшения эффективности связывания молекулы БСА с молекулой-зондом являются количественным проявлением полного разрушения молекул БСА.

В рамках предположения о сохранении структуры и активности «внутренней» части образцов биомолекул при лазерном воздействии возможна и интерпретация результатов по мягкой абляции работы [7]. В ней анализ данных о размерах частиц, полученных в результате абляции, показал, что количество молекул в такой частице составляет порядка  $10^3$ . Таким образом, легко представить, что в частице, подвергшейся абляции, «внутренние» биомолекулы сохранили свои структурные и функциональные свойства и не подверглись разрушению в результате лазерного воздействия, что привело к сохранению биологической активности, которая наблюдалась экспериментально.

### Заключение

Облучение лиофилизированных препаратов БСА ИК излучением в диапазоне длин волн 220–240 мкм мощностью 130–300 мВт приводит к уменьшению интенсивности характерных полос поглощения в ИК и УФ спектрах. Термический нагрев не приводит к таким спектральным изменениям. Изменения в спектрах поглощения при облучении образцов БСА могут быть объяснены в рамках представлений о наличии эффектов деструкции, абляции и свеллинга. Отдать предпочтение в пользу превалирующего действия одного из них пока не представляется возможным. Наиболее вероятной причиной изменения спектров ИК и УФ поглощения представляется совместное действие всех перечисленных эффектов.

### Список литературы

1. *Grosse E.* THz radiation from free electron lasers and its potential for cell and tissue studies // *Phys. Med. Biol.* 2002. Vol. 47. P. 3755–3760.
2. *Zhengyu M.* Biological research by optically pumped far infrared lasers // *Infrared Phys.* 1989. Vol. 29. P. 631–636.
3. *Fedorov V. I., Popova S. S., Pisarchik A. N.* Dynamic effects of submillimeter wave radiation on biological objects of various levels of organization // *Intern. J. Infrared and Millimeter Waves.* 2003. Vol. 24. No. 8. P. 1235–1252.

4. *Dlott D. D., Fayer M. D.* Applications of infrared free-electron lasers: basic research on the dynamics of molecular systems // *IEEEJ. Quantum Electron.* 1991. Vol. 27. P. 2697–2713.

5. *Xie A., Meer A. F. G., Hoff W., Austin R. H.* Excited-state life times of far infrared collective modes in proteins // *Phys. Rev. Lett.* 2002. Vol. 88. P. 018102/1-4.

6. *Ильина С. А., Бакаушина Г. Ф., Гайдук В. И. и др.* О возможной роли воды в переносе действия миллиметрового излучения на биообъекты // *Биофизика.* 1979. Т. 24, вып. 3. С. 513–518.

7. *Петров А. К., Козлов А. С., Тарабан М. Б. и др.* Мягкая абляция биологических объектов под воздействием субмиллиметрового излучения лазера на свободных электронах // *ДАН.* 2005. Т. 404, вып. 5. С. 698–700.

8. *Govorun V. M., Tretiakov V. E., Tulyukov N. N. et al.* Far infrared radiation effect on the structure and properties of proteins // *Infrared and Millimeter Waves.* 1991. Vol. 12. P. 1469–1474.

9. *Bolotin V. P., Kairan D. A., Knyazev B. A. et al.* Status of Novosibirsk free electron laser and first experiments with high power teragertz radiation: Preprint of Institute of Nuclear Physik. Novosibirsk, 2004.

10. *Nakamoto K.* Infrared spectra of inorganic and coordination compounds. N. Y.; L.: John Wiley & Sons, Inc., 1965.

11. *Лаврик Н. Л., Дергачева М. И., Ковалева Е. И.* Применение методов ИК и люминесцентной спектроскопии для изучения структурных свойств гуминовых кислот // *Химия в интересах устойчивого развития.* 2000. Т. 8. С. 815–821.

12. *Мальшев А. Ю., Битюрин Т. М.* Модель лазерного свеллинга полимеров при воздействии наносекундных импульсов // *Квантовая электроника.* 2005. Т. 35, вып. 9. С. 825–830.

13. *Malyshev A. Yu., Bityurin T. M.* Laser swelling of soft biological tissue by IR pulses // *Appl. Phys.* 2004. Vol. A 79. P. 1175–1179.