

УДК 544.77+541.18+535.8+616-006.04

## ОПТИМИЗАЦИЯ ФОТОТЕРМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ЛАЗЕРНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОКОНЬЮГАТОВ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2016 г. В. С. Герасимов\*, А. Е. Ершов\*\*, \*\*\*, \*\*\*,  
С. В. Карпов\*, \*\*\*, \*\*\*\*\*, С. П. Полютов\*, П. Н. Семина\*\*\*\*

\*Сибирский федеральный университет

660041 Красноярск, Свободный просп., 79

\*\* Институт вычислительного моделирования СО РАН

660036 Красноярск, Академгородок, 50/44

\*\*\* Институт физики им. Л.В. Киренского СО РАН

660036 Красноярск, Академгородок, 50/38

\*\*\*\* Сибирский государственный аэрокосмический университет им. М.Ф. Решетнева

660037 Красноярск, просп. им. Газеты "Красноярский рабочий", 31

E-mail: karpov@iph.krasn.ru

E-mail: valkrsk@gmail.com

Поступила в редакцию 6.11.2015 г.

Проведено исследование различных режимов избирательного воздействия лазерного излучения на мембраны злокачественных клеток с использованием конъюгатов наночастиц золота с олигонуклеотидами на примере ДНК-аптамеров. В условиях контакта биоконъюгата с поверхностью клетки и возникновения значительных, быстро релаксирующих градиентов температуры вблизи наночастицы достигается эффективное повреждение мембраны лишь у злокачественных клеток за счет локальной гипертермии клеточной мембраны. Показано, что локализация повреждающего воздействия, не затрагивающая здоровые клетки, реализуется в условиях применения излучения импульсных, а не непрерывных лазеров.

DOI: 10.7868/S0023291216040054

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Конъюгаты плазмонных наночастиц с биомолекулами относятся к числу важнейших объектов междисциплинарных исследований, среди которых наибольшим прикладным потенциалом обладают исследования в области биомедицины и биотехнологий [1]. Повышенный интерес к изучению этих объектов объясняется тем, что они представляют собой технологическую платформу для конструирования наноразмерных биосенсоров нового поколения, способных детектировать биомолекулярные взаимодействия на уровне отдельных молекул. Биологические комплексы на основе плазмонных наночастиц мультифункциональны: имеется возможность их одновременного применения как для диагностики, так и для терапии, а также для медицинской визуализации и мониторинга процесса лечения злокачественных новообразований. Помимо этого, данные биоконъюгаты обладают низкой токсичностью, что особенно важно при применении их в составе комплексной терапии онкологических заболеваний, а также при их ранней диагностике.

К числу перспективных подходов к решению этих задач относится фотодинамический метод лечения опухолей, основанный на лазерном облучении пораженных тканей [2, 3]. Альтернативой фотодинамическому методу является разработанная в последнее десятилетие технология термического избирательного воздействия лазерным излучением на пораженные злокачественной опухолью ткани, меченные плазмонно-резонансными наночастицами, которая получила название плазмонно-резонансной фототермической терапии (ПРФТТ) [4–6].

Для применения этих методов важен выбор длины волны излучения, которая совпадает как с полосой минимального поглощения гемоглобина, что позволяет излучению проникать на наибольшую глубину, так и с полосой плазмонного поглощения наночастиц. Однако в реальной ситуации при облучении лазерным пучком биотканей необходимо также учитывать присущее им сильное рассеяние из-за оптической неоднородности таких сред. Учет этих факторов необходим для решения проблемы доставки излучения на требуемую глубину [7] и регулирования локаль-

ной температуры нагрева биотканей плазмонными наночастицами для достижения необратимого повреждения злокачественных клеток. Таким образом, важным условием фототермических методов лечения является настройка параметров лазерного излучения. Спектральное положение пика плазмонного поглощения наночастиц золота определяется их размерами и формой, а также составом наночастиц, что позволяет выбрать оптимальную для терапевтического эффекта длину волны излучения в диапазоне от 530 до 1100 нм [8, 9].

При гипертермии опухолей, связанной с локальным перегревом онкологических клеток, конъюгированных с наночастицами, особенно важно обеспечить избирательное воздействие лазерного излучения на пораженный участок, не затрагивающее здоровую ткань. Отметим, что существующие на сегодняшний день методы фотодинамического лечения опухолей сопряжены с осложнениями и деструктивными для здоровой ткани последствиями. Поэтому разработка наиболее щадящего и эффективного метода лечения злокачественных опухолей является одной из приоритетных задач онкологии.

Среди соединений, проявляющих селективное связывание и применяемых в биомедицинской практике для функционализации наночастиц, значительное распространение получили антитела. Их применение в ПРФТТ показало свою эффективность [10, 11]. Однако сравнительно большой размер молекул антител (порядка 25–30 нм) снижает эффективность фототермического воздействия и его локализацию при импульсном режиме облучения, что связано с увеличенным зазором между наночастицей и поверхностью клеточной мембраны.

Отдельный интерес в этой связи представляют ДНК-аптамеры, которые обладают рядом преимуществ [12–14]. К числу наиболее важных относится их относительно малый размер (2–3 нм), что позволяет достигать оптимального режима нагрева онкологических клеток при низкой интенсивности лазерных импульсов. Кроме того, современные методы синтеза аптамеров позволяют гибко изменять свойства получаемых конъюгатов, обеспечивая их селективное связывание с поверхностью мембраны злокачественных клеток определенного типа.

Возможность адресного воздействия излучения только на опухолевые клетки без повреждения здоровой ткани реализуется в условиях введения в организм биоконъюгатов аптамер–наночастица [12, 13]. Такие биоконъюгаты в виде плазмонных наночастиц с адсорбированными на их поверхности синтетическими олигонуклеотидами – ДНК-аптамерами обеспечивают функционализацию этих комплексов и, как следствие, высокоточную адресную доставку конъюгатов к

биологической мишени. В этой связи в настоящей работе рассматривается процесс ПРФТТ при использовании конъюгатов наночастиц золота с ДНК-аптамерами.

К числу наиболее распространенных типов плазмонно-резонансных наночастиц, используемых для ПРФТТ, относятся золотые наностержни [15, 16], наносферы [9, 17, 18] и наноболочки [19–21]. Селективное присоединение наночастиц к клеткам опухоли может достигаться путем функционализации наночастиц ДНК-аптамерами как при пассивной [22], так и активной доставке [12–14].

В основе избирательности воздействия лежит способность аптамеров высокоспецифично связываться с комплементарными им эпитопами – участками белков-онкомаркеров, расположенных на мембране исключительно злокачественных клеток; при этом здоровые клетки с Au-наночастицами не взаимодействуют. Связанные с ДНК-аптамерами наночастицы золота, поглощая резонансное лазерное излучение, нагреваются, и за счет теплопередачи повышается температура участков опухоли. При повышении температуры до 42–43°C и более идет апоптоз (регулируемый процесс клеточной гибели) злокачественных клеток [2].

В обзоре [5] приведены результаты сравнения фототермического воздействия на злокачественные клетки с использованием как непрерывного, так и импульсного лазерного излучения (в условиях специфического связывания наночастиц с клетками с помощью антител). Одной из проблем подхода, основанного на применении непрерывного лазерного излучения, является низкая избирательность воздействия на злокачественные клетки, при котором нагреваемые наночастицы при длительном облучении создают в окружающей среде изотропный температурный фон с низкими радиальными градиентами. При этом нагреву и последующему некрозу подвергаются как опухолевые клетки, непосредственно примыкающие к наночастицам, так и здоровые, расположенные на значительном расстоянии от источника нагрева. Таким образом, длительное воздействие непрерывного излучения приводит к нагреву среды за счет теплопроводности с возникновением однородного температурного фона, в который попадает весь макроскопический участок облучаемой ткани. В условиях импульсного лазерного облучения при отсутствии специфического связывания основным механизмом повреждения клетки является механическое воздействие, вызванное быстрым возникновением и исчезновением паровой полости вблизи наночастиц. Однако такой механизм требует импульсного лазерного излучения достаточно высокой интенсивности [6, 23]. Выполненные нами расче-

ты (см. раздел 3) показывают, что в случае использования аптамеров (с учетом их малого размера) для связывания наночастицы с клеточной мембраной термическое воздействие, достаточное для ее повреждения, достигается при температуре на поверхности частицы значительно ниже порога парообразования воды. Это, в свою очередь, позволяет применять импульсное лазерное излучение с существенно меньшей интенсивностью.

В наших работах [24, 25] исследовались процессы взаимодействия импульсного лазерного излучения со сферическими наночастицами серебра, а также с их агрегатами. Эти процессы включали в себя, в том числе, и учет нагрева окружающей среды на примере воды. Было обнаружено, что в импульсном режиме облучения таких частиц в области, непосредственно примыкающей к поверхности частицы, происходит формирование быстро релаксирующих тепловых полей с высокими радиальными градиентами температуры.

Таким образом, есть основание считать, что решение проблемы нелокальности при гипертермии пораженных тканей может лежать в применении не непрерывного, а импульсного лазерного излучения. В этом случае действующий на наночастицу лазерный импульс с длительностью порядка  $10^{-5}$ – $10^{-8}$  с нагревает также и окружающую среду, создавая за короткое время значительные радиальные градиенты температуры, которые релаксируют за время порядка  $10^{-6}$ – $10^{-7}$  с. При этом в область, прогреваемую выше температуры необратимых повреждений клетки, попадают лишь ближайшие к наночастице клетки. Однако традиционные лазеры, которые можно применять в биомедицине, генерируют нано-, пико- и фемтосекундные оптические импульсы с высокими значениями пиковой интенсивности, что может вызывать необратимые термические эффекты при неизбирательном термоллизе клеток. По этой причине требуется проведение отдельных исследований для получения ответов на вопросы, касающиеся зависимости скорости гибели злокачественных клеток от длины волны лазерного излучения и его интенсивности, от длительности импульсов в широком диапазоне значений и скважности в условиях многоимпульсного воздействия. В работе [26] было экспериментально показано, что селективная лазерная гипертермия клеток может достигаться при воздействии на опухоль наносекундных лазерных импульсов. Однако в этом случае, по нашим оценкам, температура наночастицы достигает сотен градусов Цельсия.

Целью настоящей работы является развитие и оптимизация фототермических методов лечения онкологических заболеваний, которые основаны на избирательном необратимом разрушении мембраны злокачественных клеток путем воздей-

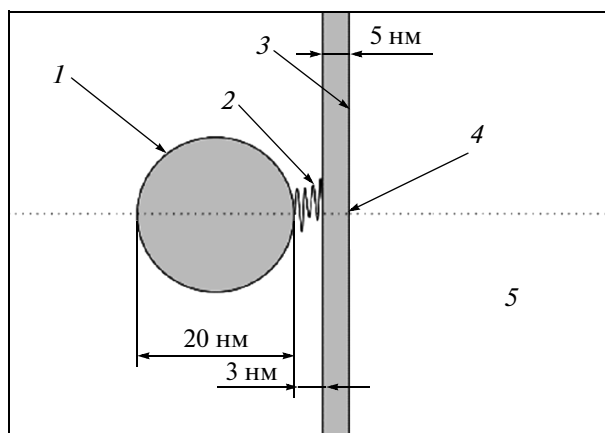


Рис. 1. Схематическое изображение наночастицы и клеточной мембраны: 1 – наночастица Au, 2 – аптамер, 3 – клеточная мембрана, 4 – точка измерения температуры, 5 – внутриклеточное пространство.

ствия на них импульсным лазерным излучением с длиной волны 532 нм в условиях контакта клеток с биоконъюгатом на примере аптамер–Au-наночастица с учетом их характерных размеров.

## 2. МОДЕЛЬ

В работе рассматривается взаимодействие наночастицы золота, прикрепленной к клеточной мембране при помощи аптамера, с резонансным импульсным лазерным излучением (в виде однократного импульса) на длине волны 532 нм. Характерные размеры этой системы, включая толщину мембраны (порядка 5 нм [27]) указаны на рис. 1.

В качестве среды, заполняющей межклеточное и внутриклеточное пространство, рассматривается вода. Частица облучается плоской электромагнитной волной

$$\mathbf{E}(\mathbf{r}) = \mathbf{E}_0 \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}), \quad (1)$$

где  $\mathbf{k}$  – волновой вектор,  $\mathbf{E}_0$  – амплитуда электрической компоненты электромагнитного поля. Размеры частиц предполагаются много меньшими длины волны излучения. Возбуждаемый на частице дипольный момент описывается выражением

$$\mathbf{d} = \varepsilon_0 \alpha \mathbf{E}_0, \quad (2)$$

где  $\mathbf{d}$  – вектор дипольного момента частицы,  $\alpha$  – дипольная поляризуемость частицы,  $\varepsilon_0$  – электрическая постоянная.

В общем случае поляризуемость частицы с учетом самовоздействия [28] определяется следующим выражением:

$$\alpha = \left( (\alpha_0)^{-1} - \frac{2}{3} i (R|\mathbf{k}|)^3 \right)^{-1}, \quad (3)$$

где  $\alpha_0$  – поляризуемость частицы без учета эффекта самовоздействия [28]:

$$\alpha_0 = 4\pi R^3 \frac{\varepsilon - \varepsilon_m}{\varepsilon + 2\varepsilon_m}. \quad (4)$$

Здесь  $R$  – радиус частицы,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость материала частицы,  $\varepsilon_m$  – диэлектрическая проницаемость межчастичной среды. Зависимость диэлектрической проницаемости  $\varepsilon$  от радиуса частицы описывается выражением

$$\varepsilon = \varepsilon_{\text{tab}} + \frac{\omega_{\text{pl}}^2}{\omega(\omega - i\Gamma_0)} - \frac{\omega_{\text{pl}}^2}{\omega(\omega - i\Gamma)}, \quad (5)$$

где  $\varepsilon_{\text{tab}}$  – табулированные экспериментальные значения для макрообразца [29],  $\Gamma_0$  – константа электронной релаксации для макрообразца,  $\omega_{\text{pl}}$  – плазменная частота материала частиц,  $\Gamma$  – константа электронной релаксации частицы с учетом ее размерной зависимости,

$$\Gamma = \Gamma_0 + A \frac{v_F}{R}, \quad (6)$$

где  $v_F$  – скорость электронов на уровне Ферми. В большинстве модельных оптических расчетов значение множителя  $A$  принимается равным 1. Однако в общем случае релаксационные процессы на границе частицы зависят от состояния ее поверхности и ряда других факторов.

Сечение поглощения  $\sigma_a$  описывается выражениями [30]

$$\sigma_a = \frac{4\pi}{k} y_a \frac{|d|^2}{|E_0|^2},$$

$$y_a = \text{Im}\left(\frac{1}{\alpha}\right) - \frac{2k^3}{3}.$$

При описании термодинамических процессов, связанных с нагревом материала частиц и окружающей их среды при временах воздействия больше  $10^{-9}$  с, можно пренебречь различием температур электронной и ионной компонент материала частицы. Это связано с тем, что они находятся в термодинамическом равновесии и под температурой частицы понимается средневзвешенная температура ионной (кристаллической решетки) и электронной компонент частицы. Для мощности излучения, поглощаемой частицей, имеем

$$W = \sigma_a I, \quad (7)$$

где  $I$  – интенсивность лазерного излучения.

Нагрев частицей окружающей среды может быть описан уравнением теплопроводности

$$\frac{\partial T(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - a(\mathbf{r}) \nabla^2 T(\mathbf{r}, t) = f(\mathbf{r}), \quad (8)$$

где  $a(\mathbf{r})$  – зависящий от координат коэффициент теплопроводности среды:

$$a(\mathbf{r}) = \begin{cases} a_p, & \text{при } |\mathbf{r}| \leq R, \\ a_m, & \text{при } D \leq x \leq D + h, \\ a_{\text{int}}, & \text{при } x > D + h, \\ a_{\text{ex}}, & \text{иначе.} \end{cases} \quad (9)$$

Здесь  $\mathbf{r} = (x, y, z)$  – радиус-вектор точки системы в нагреваемом пространстве,  $a_p$  – теплопроводность материала частицы,  $a_m$  – теплопроводность клеточной мембраны (использовано значение для жировой ткани  $9.8 \times 10^{-8} \text{ м}^2 \text{ с}^{-1}$  [31]),  $a_{\text{int}}$  – теплопроводность жидкости вне клетки,  $a_{\text{ex}}$  – теплопроводность внутриклеточного вещества (в настоящей работе не учитывалось различие теплопроводности сред снаружи и внутри клетки в силу высокого содержания воды в них),  $D$  – расстояние от центра частицы до внешней поверхности мембраны,  $h$  – толщина мембраны. Процесс теплообмена между частицей и окружающей средой описывается за счет функции источников тепла

$$f(\mathbf{r}) = \begin{cases} \frac{W}{V}, & \text{при } |\mathbf{r}| \leq R, \\ 0, & \text{иначе,} \end{cases} \quad (10)$$

где  $V$  – объем частицы.

В задаче определен ряд начальных и граничных условий: в начальный момент времени  $t = 0$  температура по все системе считается одинаковой:  $T(\mathbf{r}, t = 0) = T_0$ ; в тангенциальных к поверхности мембраны направлениях на расстоянии порядка половины среднего межчастичного расстояния (около 1 мкм) выполняется условие симметрии  $\partial T / \partial r|_{r=1 \text{ мкм}} = 0$ .

Так как размер аптамера значительно меньше размера наночастицы, термодинамическая модель не учитывает отличие теплопроводности аптамера относительно межклеточной среды.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе в качестве модельного объекта использовались биоконъюгаты со сферическими наночастицами золота с максимумом полосы плазмонного поглощения 520 нм, которые наиболее часто применяются на практике. Для выбора оптимального режима облучения важна длительность лазерного импульса, поскольку при слишком высокой интенсивности излучения, присущей наносекундным импульсам, макроскопические процессы локального нагрева тканей могут сопровождаться фотохимическим распадом молекул и их ионизацией с образованием продуктов распада.

### 3.1. Воздействие микросекундными импульсами

Выбор микросекундных лазерных импульсов, несмотря на высокую плотность энергии, обусловлен относительно низкими значениями интенсивности, что позволяет избежать проявления фотохимических процессов.

При выполнении расчетов варьировали длительность импульса (от десятых долей микросекунды до ста микросекунд) и интенсивность излучения при условии сохранения плотности энергии импульса равной  $2.5 \text{ Дж/см}^2$ .

На рис. 2 показано пространственное распределение температуры в окружающей наночастицу среде на момент окончания лазерного импульса (с прямоугольной огибающей) продолжительностью  $10^{-6}$  с и в процессе охлаждения частицы за счет теплообмена с окружающей средой. Представленные распределения показывают, что в рассматриваемой системе происходит крайне быстрая релаксация теплового возбуждения. При этом за время порядка  $10^{-8}$  с максимальное приращение температуры в системе уменьшается в 3 раза, а через  $10^{-7}$  с система уже приходит в термодинамическое равновесие. Таким образом, локальное термическое воздействие на клеточную мембрану происходит лишь в условиях воздействия лазерным импульсом.

На рис. 3 представлены температурные профили для разных значений длительности лазерного импульса  $\tau$  (рис. 3а и 3б различаются лишь масштабом). Видно, что при малых длительностях импульса (менее  $10^{-6}$  с) изменение температуры на границе наночастицы достигает 100 К. В то же время, в периферийных областях рассматриваемого объема температура практически не изменяется. Иными словами, происходит лишь локальный нагрев небольшой области, непосредственно примыкающей к частице. Однако при длительностях  $10^{-5}$  с и более тепловая энергия распределяется по всему рассматриваемому объему (рис. 3б). Следовательно, для достижения условия локальности нагрева следует применять излучение с длительностью импульса менее  $10^{-5}$  с.

На рис. 4 представлена зависимость прироста температуры  $\Delta T_m$  на внутренней поверхности клеточной мембраны (см. рис. 1) от времени для различных значений длительности лазерного импульса. Рисунок показывает, что максимальная температура на поверхности мембраны, достигаемая на момент окончания импульса, возрастает с уменьшением длительности импульса. Кроме того, наблюдается следующая тенденция: с ростом длительности импульса область прогрева значительно расширяется. Из этого рисунка следует, что при использовании непрерывного лазерного излучения локализации нагрева достичь невозможно.

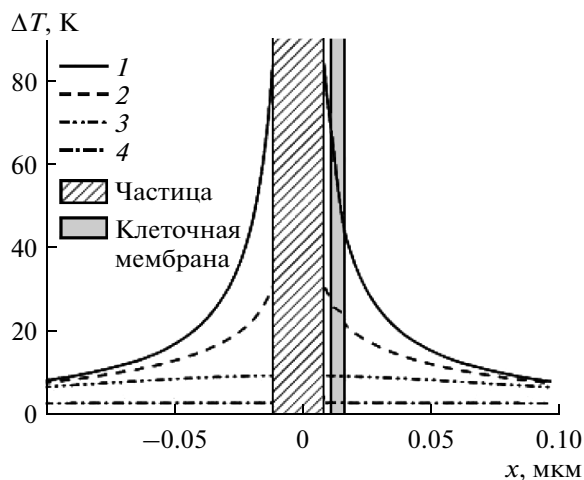
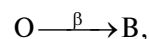


Рис. 2. Профили прироста температуры  $\Delta T$  вблизи нагреваемой наночастицы в различные моменты времени, прошедшего после начала импульса: 1 –  $10^{-6}$ , 2 –  $1.008 \times 10^{-6}$ , 3 –  $1.02 \times 10^{-6}$ , 4 –  $1.2 \times 10^{-6}$  с. Длительность импульса  $\tau = 10^{-6}$  с, длина волны  $\lambda = 532$  нм.

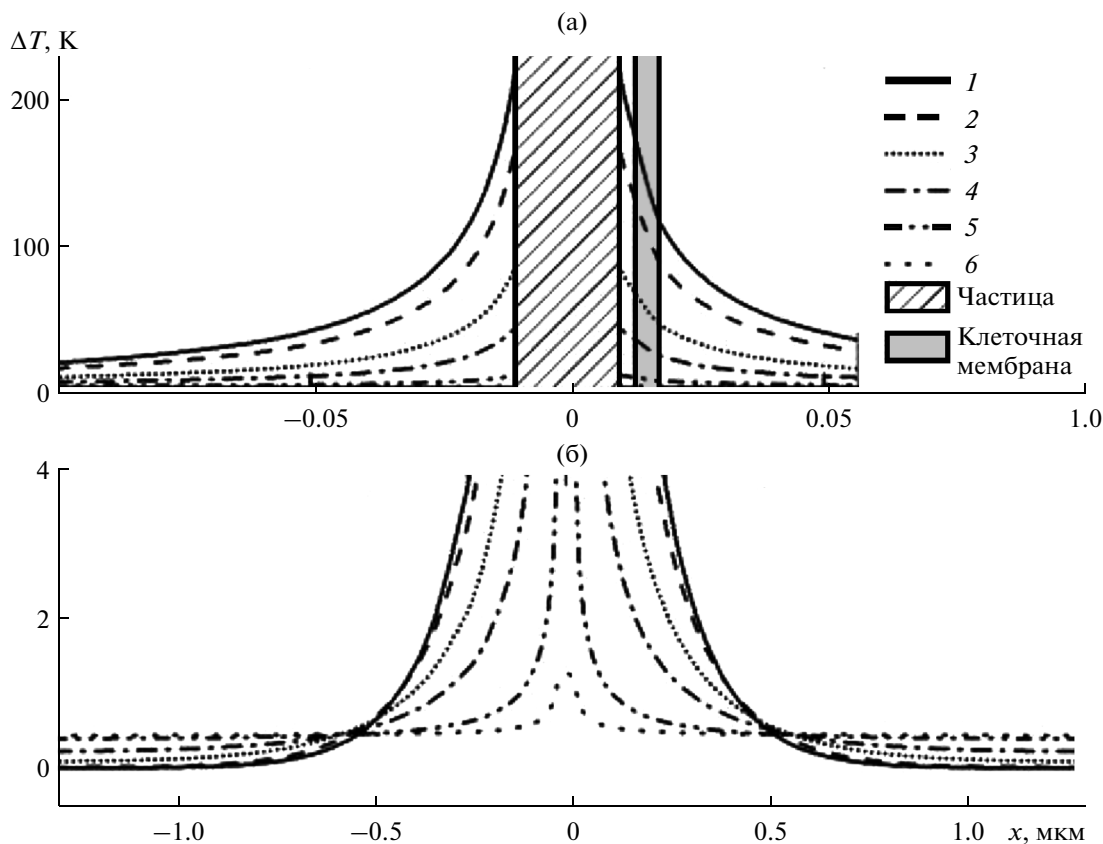
Процесс термического разрушения клеточной мембраны связан с растворением входящих в нее липидов в окружающей водной электролитической среде и конформационными перестройками белков мембраны [32]. Этот процесс можно описать простым уравнением кинетики химической реакции первого порядка. Для описания воздействия, приводящего к разрушению клеточной мембраны, можно воспользоваться следующим выражением, которое является аналогом уравнения Аррениуса [32]

$$\beta = \frac{d\Omega}{dt} = A_r e^{-E/RT(t)}, \quad (11)$$

где параметр  $A_r$  характеризует частоту столкновений реагирующих молекул (при  $T \rightarrow \infty$ ),  $R$  – универсальная газовая постоянная  $T(t)$  – зависимость температуры клеточной мембраны от времени,  $E$  – энергия активации [32],  $\Omega$  – параметр, характеризующий степень повреждения мембраны. Степень повреждения мембраны может быть определена путем интегрирования уравнения (11) по времени теплового воздействия. Применительно к группе клеток или ткани доля поврежденных клеток может быть определена с помощью простой кинетической модели. Допустим, клетки, находящиеся в исходном состоянии  $O$ , подвергнуты повреждающему температурному воздействию, в результате которого переходят в поврежденное состояние  $B$  со скоростью  $\beta$  [32]:



$$\frac{dN_o}{dt} = -\beta(T(t)) N_o,$$



**Рис. 3.** Профили прироста температуры  $\Delta T$  вблизи частицы на момент окончания импульса на крупном (а) и мелком (б) масштабе для различных значений длительности импульса: 1 –  $\tau = 0.375$ , 2 – 0.5, 3 – 1, 4 – 2, 5 – 10, 6 – 100 мкс;  $\lambda = 532$  нм.

где  $N_O$  – число клеток в состоянии O. Доля поврежденных клеток при этом равна

$$k = 1 - \frac{N_O(t)}{N_O(0)} = 1 - e^{-\Omega(t)}. \quad (12)$$

В данном выражении параметр  $\Omega$  будет являться решением уравнения (11):

$$\Omega(t) = \int_0^t A_r e^{-E/RT(t)} dt.$$

Доля поврежденных клеток в зависимости от длительности лазерного импульса с длиной волны 532 нм

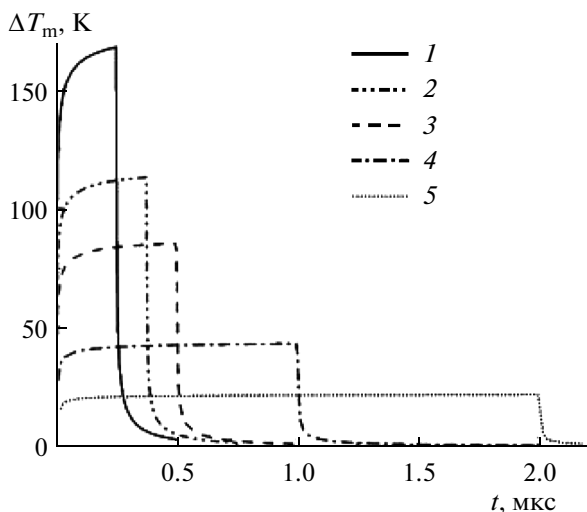
$\tau, \text{с}$	$\Omega$	$k$
$0.25 \times 10^{-6}$	2645	1
$0.375 \times 10^{-6}$	1.6	0.798
$0.5 \times 10^{-6}$	0.01795	0.018
$1 \times 10^{-6}$	$6.047 \times 10^{-6}$	$6.047 \times 10^{-6}$
$2 \times 10^{-6}$	$6.34 \times 10^{-8}$	$6.34 \times 10^{-8}$

Для конкретного расчета эффективности температурного воздействия мы использовали значения  $A_r = 2.9 \times 10^{37} \text{ с}^{-1}$  и  $E = 244 \text{ кДж/моль}$ , которые в [33] приведены в качестве характерных для клеток мышечной ткани, при этом критерием гибели клетки в данном случае служит повреждение клеточной мембраны. Следует отметить, что клетки злокачественных образований более чувствительны к температурному воздействию [34], поэтому приведенные выше значения параметров  $A_r$  и  $E$  позволят выбрать условия, обеспечивающие надежное повреждение таких клеток. В таблице приведены значения доли поврежденных клеток ткани в результате представленного на рис. 4 температурного воздействия.

Из таблицы видно, что наибольшей эффективностью обладает лазерное излучение с импульсами длительностью от 0.4 до 0.25 мкс.

### 3.2. Особенности воздействия наносекундными импульсами

Наибольшее распространение имеют лазеры с наносекундной длительностью импульсов, кото-



**Рис. 4.** Зависимости максимального прироста температуры  $\Delta T_m$  на внутренней поверхности клеточной мембраны от времени для разных значений длительности лазерного импульса: 1 –  $\tau = 0.25$ , 2 –  $0.375$ , 3 –  $0.5$ , 4 –  $1$ , 5 –  $2$  мкс;  $\lambda = 532$  нм.

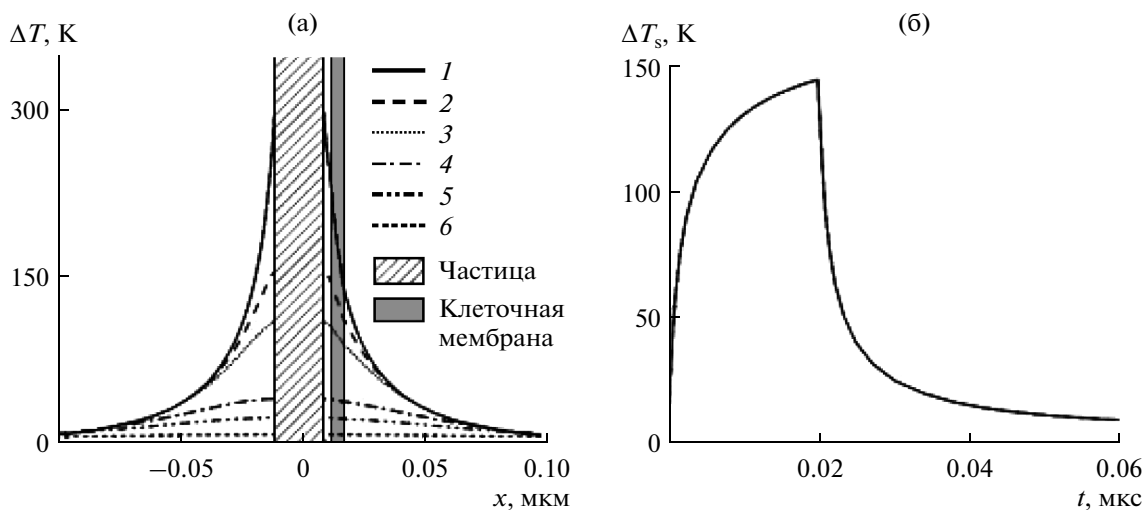
рые зачастую и используются в медицинской практике. По этой причине исследование термического воздействия излучения в виде таких коротких импульсов представляет отдельный интерес. Нами были выполнены расчеты температурных полей и кинетики нагрева мембраны клетки для лазерного импульса продолжительностью 20 нс. На рис. 5 представлена эволюция профиля температуры после окончания импульса, а также зави-

симость приращения температуры поверхности клетки  $\Delta T_s$  от времени. Плотность энергии в импульсе подбиралась таким образом, чтобы доля поврежденных клеток в ткани была близка к 1 (при  $\Omega = 2.76$ ), и оказалась равной  $88 \text{ мДж/см}^2$ , что на порядок ниже характерной для излучения микросекундной длительности. Рисунок 5 показывает, что температура вблизи частицы выше, чем в импульсах с большей длительностью, из-за более высокой интенсивности излучения. Другая отличительная особенность обнаруживается в кинетике изменения температуры: значительно более быстрый спад температуры вблизи мембраны после окончания импульса и ее непрерывный рост за время действия импульса без перехода в стационарный режим.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют в пользу следующих утверждений. Избирательность лазерной гипертермии злокачественных клеток, при которой не повреждается здоровая ткань, обеспечивается применением биоконъюгатов нового типа – наночастица золота–ДНК-аптамер, в которых размер аптамера подбирается специальным образом. При этом значительный вклад в локализацию воздействия обеспечивается применением импульсного лазерного излучения в условиях контакта наночастиц через аптамер лишь с мембраной злокачественных клеток.

Оптимальными с точки зрения режима термического воздействия на клеточную мембрану являются импульсы как микросекундной, так и на-



**Рис. 5.** (а) – Профили прироста температуры  $\Delta T$  в различные моменты времени  $t$  после окончания импульса: 1 –  $t = 2 \times 10^{-8}$ , 2 –  $2.05 \times 10^{-8}$ , 3 –  $2.1 \times 10^{-8}$ , 4 –  $2.5 \times 10^{-8}$ , 5 –  $3.5 \times 10^{-8}$ , 6 –  $5 \times 10^{-8}$  с; (б) – зависимость от времени изменения температуры на поверхности клеточной мембраны  $\Delta T_s$ ;  $\tau = 20$  нс,  $\lambda = 532$  нм.

носекундной длительности при совпадении длины волны излучения с положением полосы плазмонного поглощения наночастиц.

Применение микросекундных лазерных импульсов предпочтительнее в системах с увеличенным зазором (в несколько десятков нанометров) между наночастицей и мембраной.

При использовании непрерывного лазерного излучения локализация воздействия на клеточную мембрану утрачивается из-за быстрой температурной релаксации области прогрева и формирования вокруг нагреваемой излучением наночастицы однородного температурного фона большой протяженности, в который попадают как злокачественные, так и здоровые клетки.

Установлено, что вредное воздействие непрерывного лазерного излучения усугубляется при условии относительно большого зазора (десятки нанометров и более) между наночастицей и поверхностью клеточной мембраны, что дополнительно ухудшает селективность воздействия на клеточную мембрану и приводит к нагреву всей области, на которую действует лазерное излучение.

Для увеличения глубины проникновения лазерного излучения в ткани предпочтение следует отдать использованию биологически инертных наночастиц с плазмонным резонансом в области 600–800 нм, совпадающей с полосой относительной прозрачности гемоглобина. К ним, в частности, относятся золотые вытянутые эллипсоиды и наностержни, частицы типа ядро/оболочка, в которых ядром служит материал с высоким показателем преломления, а оболочкой — золото. Результаты исследования систем на основе таких частиц будут представлены в отдельном сообщении.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ: Соглашение № 14.607.21.0104 RFMEFI60714X0104 (раздел 3) и Госзадание Министерства образования и науки РФ для Сибирского федерального университета, Соглашение № 1792 (раздел 2). Численные расчеты были выполнены с использованием кластера МВС-1000 М в Институте вычислительного моделирования СО РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Хлебцов Н.Г.* // Квантовая электроника. 2008. Т. 38. С. 504.
2. *Чумаков Д.С., Баско М.В., Дихт Н.И., Бучарская А.Б., Родионова Т.И., Терентюк Г.С.* // Саратовский научно-медицинский журнал. 2013. Т. 9. С. 700.
3. *Habash R.W.Y., Bansal R., Krewski D., Alhafid H.T.* // Crit. Rev. Biomed. Eng. 2007. V. 35. P. 37.
4. *Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A.* // Laser Med. Sci. 2008. V. 23. P. 217.
5. *Lapotko D.* // Nanomedicine. 2009. V. 4. P. 253.
6. *Lukianova-Hleb E., Hu Y., Latterini L., Tarpani L., Lee S., Drezek R.A., Hafner J.H., Lapotko D.O.* // ACS Nano. 2010. V. 4. P. 2109.
7. *Тучин В.* Оптическая биомедицинская диагностика. М: Физматлит, 2007.
8. *Huang X., El-Sayed M.A.* // J. Adv. Res. 2010. V. 1. P. 13.
9. *Elbialy N., Abdelhamid M., Youssef T.* // J. Biomed. Nanotechnol. 2010. V. 6. P. 687.
10. *Dreaden E.C., Mackey M.A., Huang X., Kang B., El-Sayed M.A.* // Chem. Soc. Rev. 2011. V. 40. P. 3391.
11. *Dykman L., Khlebtsov N.* // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. P. 2256.
12. *Zhang J., Liu B., Liu H., Zhang X., Tan W.* // Nano-medicine. 2013. V. 8. P. 983.
13. *Reinemann C., Strehlitz B.* // Swiss Medical Weekly. 2014. V. 144. P. 13908.
14. *Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Glazyrin Y.E., Krat A.V., Zubkova O., Spivak E., Wehbe M., Gargaun A., Muharemagic D., Komarova M., Grigorieva V., Savchenko A., Modestov A.A., Berezovski M.V., Zamay A.S.* // Mol. Therapy. 2015. V. 23. P. 1486.
15. *Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A.* // J. Amer. Chem. Soc. 2006. V. 128. P. 2115.
16. *von Maltzahn G., Park J.-H., Agrawal A., Bandaru N.K., Das S.K., Sailor M.J., Bhatia S.N.* // Cancer Res. 2009. V. 69. P. 3892.
17. *Afifi M.M., El Sheikh S.M., Abdelsalam M.M., Ramadan H., Omar T.A., El Tantawi M., Abdel-Razek K.M., Mohamed M.* // Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. 2013. V. 115. P. 743.
18. *Lukianova-Hleb E.Y., Hanna E.Y., Hafner J.H., Lapotko D.O.* // Nanotechnology. 2010. V. 21. P. 085102.
19. *Hirsch L.R., Stafford R.J., Bankson J.A., Sershen S.R., Rivera B., Price R.E., Hazle J.D., Halas N.J., West J.L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 13549.
20. *Loo C., Lin A., Hirsch L., Lee M.H., Barton J., Halas N., West J., Drezek R.* // Technol. Cancer Res. Treat. 2004. V. 3. P. 33.
21. *Maksimova I.L., Akchurin G.G., Khlebtsov B.N., Terentyuk G.S., Akchurin G.G. Jr., Ermolaev I.A., Skaptsov A.A., Soboleva E.P., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V.* // Med. Laser Appl. 2007. V. 22. P. 199.
22. *Greisch K.* // J. Drug. Target. 2007. V. 15. P. 457.
23. *Hleb E.Y., Hafner J.H., Myers J.N., Hanna E.Y., Rostro B.C., Zhdanok S.A., Lapotko D.O.* // Nanomedicine. 2008. V. 3. P. 647.
24. *Gavrilyuk A.P., Karpov S.V.* // Appl. Phys. B. 2009. V. 97. P. 163.
25. *Ershov A.E., Gavrilyuk A.P., Karpov S.V., Semina P.N.* // Appl. Phys. B. 2014. V. 115. P. 547.
26. *Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X., Anderson R.R., Lin C.P.* // Biophys. J. 2003. V. 84. P. 4023.
27. *Kozlov M.M., Chernomordik L.V.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2015. V. 33. P. 61.



28. *Markel V.A., Muratov L.S., Stockman M.I., George T.F.* // Phys. Rev. B. 1991. V. 43. P. 8183.
29. *Johnson P. B., Christy R. W.* // Phys. Rev. B. 1972. V. 6. P. 4370.
30. *Markel V.A., Shalaev V.M., Stechel E.B., Kim W., Armstrong R.L.* // Phys. Rev. B. 1996. V. 53. P. 2425.
31. *Hasgall P.A., Gennaro D.F., Baumgartner C., Neufeld E., Gosselin M.C., Payne D., Klingeböck A., Kuster N.* ITIS Database for thermal and electromagnetic parameters of biological tissues. 2015. Version 3.0. DOI: 10.13099/VIP21000-03-0
32. *Lee R.C., Aarsvold J. N., Chen W., Astumian R.D., Kelley K.M., Pliskin N.H.* // Semin. Neurol. 1995. V. 15. P. 367.
33. *Cravalho E.G., Toner M., Taylor D.C., Lee R.C.* // Electrical Trauma: The Pathophysiology, Manifestations and Clinical Management / Ed. by Lee R.C., Cravalho E.G., Burke J.F. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1992. P. 281.
34. *Генфольд М.Л., Барчук А.С.* Лазерная селективная гипертермия в лечении злокачественных новообразований. Методические рекомендации. СПб.: ГУН НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова, 2002.