

На правах рукописи



Костюков Артем Станиславович

**Оптические и механические методы терапии
злокачественных новообразований с использованием
плазмонных и магнетитовых наночастиц,
функционализированных аптамерами**

Специальность
1.3.6. Оптика

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Красноярск — 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский федеральный университет».

Научный руководитель:

Карпов Сергей Васильевич,

д. ф.-м. н., проф., Институт физики им. Л. В. Киренского Сибирского отделения Российской академии наук (ИФ СО РАН) – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН), ведущий научный сотрудник лаборатории когерентной оптики.

Официальные оппоненты:

Хлебцов Николай Григорьевич,

д. ф.-м. н., проф., заслуженный деятель науки РФ, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», заведующий лабораторией нанобиотехнологии;

Солдатов Александр Владимирович,

д. ф.-м. н., проф., Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Южный федеральный университет», научный руководитель направления «Науки о материалах и синхротронно-нейтронные исследования».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М.Ф. Решетнева».

Защита состоится 16 февраля 2024 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 24.1.228.02 при ФИЦ КНЦ СО РАН по адресу: г. Красноярск, Академгородок, 50, строение № 38.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИФ СО РАН и на сайте по адресу http://kirensky.ru/zdoc/2023/diss_kostyukov.pdf

Автореферат разослан 21 декабря 2023 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
24.1.228.02,
д-р физ.-мат. наук

Втюрин Александр Николаевич

Общая характеристика работы

Актуальность темы.

Конъюгаты плазмонных наночастиц (НЧ) с биомакромолекулами являются одним из важнейших объектов междисциплинарных исследований с большим прикладным потенциалом в биомедицине и биотехнологии [1]. Повышенный интерес к изучению этих объектов объясняется тем, что они представляют собой технологическую платформу для создания наноразмерных биосенсоров нового поколения, способных обнаруживать биомолекулярные взаимодействия на уровне отдельных молекул. Биологические комплексы на основе плазмонных наночастиц являются многофункциональными и могут одновременно использоваться как для диагностики, так и для терапии, а также для медицинской визуализации и мониторинга процесса лечения злокачественных опухолей. Кроме того, эти биоконъюгаты обладают низкой токсичностью, что особенно важно при использовании их в составе комплексной терапии онкологических заболеваний и при их ранней диагностике.

В нанотераностике, включающей в себя диагностику и лечение злокачественных новообразований, наряду с плазмонными наночастицами, могут использоваться и магнитные наночастицы (МНЧ), на которых базируется магнито-механическая терапия [2]. Этот метод обладает рядом преимуществ по сравнению с лазерной фотодинамической терапией. В частности, большой глубиной проникновения в организм магнитного поля, воздействующего на МНЧ, которые доставляются к пораженному органу по кровеносной системе и сосредотачиваются в нем. Низкочастотные магнитные поля (МП) не вызывают неизбежную гипертермию клеток, а терапевтический эффект, обусловленный механическими воздействиями на мембрану злокачественных клеток, сопряжен с меньшим повреждающим воздействием на здоровые клетки. При этом высокая проникающая способность переменного МП обеспечивает эффективность лечения и универсальность использования по отношению к различным видам злокачественных новообразований. Помимо этого, важным фактором является также возможность контроля дозы и времени экспозиции при терапевтическом воздействии.

Цели диссертационной работы:

1. Повышение эффективности лазерной гипертермии злокачественных клеток с использованием золотых наночастиц с помощью следующих мероприятий:
 - а) применения оптимизированной структуры и материала плазмонных наночастиц «ядро – золотая оболочка», позволяющей достигать максимального поглощения лазерного излучения за счет выбора размера частиц и материала их ядра, включая как

традиционные диэлектрики, например, SiO_2 , так и новые альтернативные плазмонные материалы – оксид цинка допированный алюминием (AZO) и галием (GZO), а также оксид индия-олова (ITO);

- б) выбора оптимальной длительности импульса лазерного излучения с исследованием влияния этого фактора на степень локализации теплового воздействия на клеточную мембрану;
2. Разработка модели образования паровой полости вокруг плазмонной наночастицы, нагреваемой импульсным лазерным излучением. Выявление основных физических факторов, ответственных за повреждение клеточной мембраны при образовании и росте лазерно-индуцируемых паровых полостей (ПП) вокруг плазмонных сферических золотых НЧ и высокопоглощающих НЧ «AZO ядро – Au оболочка» со спектральным положением плазмонного резонанса в диапазоне прозрачности гемоглобина. Определение диапазона значений плотности энергии лазерных импульсов, в котором может наблюдаться эффективная противораковая терапия за счет разрыва (перфорации) клеточных мембран злокачественных клеток с помощью паровых полостей высокого давления;
 3. Разработка модели взаимодействия суперпарамагнитных магнитных наночастиц с мембраной злокачественных клеток в низкочастотном однородном магнитном поле. Исследование условий, при которых механическое движение магнитной НЧ, избирательно связанной со злокачественной клеткой с помощью ДНК-аптамеров, может создать в переменном магнитном поле усилие, приложенное к трансмембранному механорецептору клетки, превышающее критическое значение, необходимое для запуска клеточного апоптоза.

Для достижения поставленных целей необходимо было решить задачи, связанные с разработкой физических и математических моделей, способных описывать процессы, которые происходят в системе «НЧ – водная окружающая среда – клеточная мембрана» под действием оптических и магнитных полей, а также с применением этих моделей к конкретным системам в условиях, соответствующих реальным экспериментам, а именно:

1. Разработка модели, представленной в главе 2, и включающей в себя основные параметры системы, такие как геометрические размеры и материал наночастиц, физические свойства среды и параметры лазерного излучения. Модель позволяет определять эффективность поглощения однородных и многослойных НЧ «ядро – оболочка» с учетом квантово-размерных эффектов, рассчитывать кинетику нагрева НЧ, помещенной в окружающую

- теплопроводящую среду, а также рассчитывать распространение тепла в расчетной области сложной геометрии;
2. Разработка модели, которая включает в себя параметры системы, аналогичные предыдущей модели, на основе которых выполняется расчет оптического поглощения и нагрева НЧ. Для решения задачи теплопроводности в окружающей двухфазной среде, фазового перехода «жидкость-пар» и расчета механических напряжений в системе используется универсальная программная система анализа методом конечных элементов ANSYS Fluent. Для корректного расчета наноразмерного испарения жидкости собственный код ANSYS необходимо дополнить рядом оригинальных пользовательских функций, учитывающих граничное температурное сопротивление и фазовый переход;
 3. Получение сведений об основных закономерностях образования паровых полостей и их воздействия на мембрану клетки;
 4. Разработка модели, в основе которой лежит совместное использование пакетов ANSYS Fluent и ANSYS Mechanical, и которая предназначена для решения задачи движения в водной среде магнитной наночастицы, связанной с клеточной мембраной, в переменном магнитном поле; разработка модели броуновской динамики для исследования агрегации как однородных, так и многослойных суперпарамагнитных наночастиц с флуктуирующим магнитным моментом при их связывании с клеточную мембраной. Модель учитывает ван дер Ваальсово, магнитодипольное взаимодействие наночастиц, силы вязкого трения и электростатического отталкивания, а также стохастические силы.

Научная новизна:

1. Исследованы возможности применения нового плазмонного материала (AZO) в лазерной гипертермии злокачественных клеток в качестве материала ядра НЧ с высоким оптическим поглощением. Показано, что AZO является перспективным материалом с низкими внутренними потерями для использования в спектральном диапазоне прозрачности гемоглобина. Показано, что при одинаковых условиях эффективность повреждения клеточной мембраны с использованием НЧ с ядром из AZO может возрастать на несколько порядков по сравнению с ядром из традиционного материала – кварца, благодаря низкой теплоемкости AZO;
2. Исследован фактор длительности лазерных импульсов, воздействующих на биоконъюгаты плазмонных НЧ. Продемонстрировано преимущество использования пикосекундных лазерных импульсов в задачах гипертермии. Пикосекундные импульсы позволяют сконцентрировать тепловую энергию в малом

объеме вокруг НЧ. Локализация области нагрева увеличивает тепловое воздействие на мембрану злокачественной клетки и уменьшает повреждающее воздействие на близкорасположенные к наночастице здоровые клетки;

3. Установлено, что максимум давления на мембране, превышающий порог ее деформационного напряжения на растяжение (разрыв), может предшествовать моменту, когда ее достигает паровая полость. При этом паровая полость может вообще не достигать мембраны. Эта особенность процесса нагрева может быть связана с формированием быстро распространяющейся волны высокого давления со ступенчатым фронтом, зарождающейся паровой полостью вблизи НЧ в начальный момент ее нагрева. Использование реализованного подхода позволило выявить ранее не наблюдавшиеся особенности в этих гидродинамических эффектах;
4. Исследованы условия воздействия функционализированных аптамерами магнетитовых НЧ на мембраны злокачественных клеток, позволяющие запустить их программируемую гибель (апоптоз). Показано, что суперпарамагнитные НЧ магнетита с флуктуирующим магнитным дипольным моментом; могут образовывать многочастичные магнитоупорядоченные анизотропные агрегаты. Такая агрегация сопровождается постепенным прекращением тепловых флуктуаций магнитных дипольных моментов в наночастицах, вошедших в состав агрегатов, увеличением суммарного магнитного момента агрегата и, соответственно, возрастанием силы воздействия агрегата на трансмембранный белок в приложенном переменном магнитном поле.

Практическая значимость. Полученные результаты открывают пути к совершенствованию и внедрению новых технологий в терапии рака; позволяют повысить понимание физики процессов, лежащих в основе большого массива имеющихся экспериментальных данных; позволяют получить ответ на вопрос о том, какие условия – размер, форма и состав наночастиц, свойства внешних физических полей необходимо создать для успешного лечения злокачественных новообразований; позволяют дать правильную интерпретацию результатам и расширить предсказательные возможности разработанных моделей. Результаты, полученные в диссертации, свидетельствуют в пользу возможности успешного применения физических методов для лечения злокачественных новообразований с помощью наночастиц, что открывает перспективы их внедрения в лечебную практику.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Использование в лазерной гипертермии высокопоглощающих НЧ «ядро – золотая оболочка» с ядром из плазмонного материала с низкой удельной теплоемкостью может значительно повысить

- эффективность избирательного повреждения мембраны злокачественных клеток по сравнению с традиционно используемыми материалами (например, кварцем) и достигать высокой эффективности при более низкой интенсивности лазерных импульсов;
2. Применение плазмонных НЧ для повреждения клеточных мембран за счет волны высокого давления вблизи паровых полостей, образующихся вокруг НЧ в поле пикосекундных лазерных импульсов, может позволить при меньших интенсивностях излучения значительно превысить пороговую величину давления, необходимого для необратимого повреждения злокачественных клеток за счет перфорации мембраны;
 3. Использование пикосекундных лазерных импульсов для нагрева плазмонных НЧ как в задачах лазерной гипертермии злокачественных клеток (их программируемой гибели), так и их повреждения под действием паровых полостей, обеспечивает локализацию воздействия и предотвращает повреждение здоровых клеток;
 4. Эффективность применения суперпарамагнитных НЧ для запуска апоптоза злокачественных клеток в переменном магнитном поле может значительно возрастать в условиях образования многочастичных агрегатов, что сопровождается увеличением силы воздействия на механорецепторы клетки, превосходящей значение, необходимое для запуска апоптоза.

Достоверность полученных результатов обосновывается совпадением результатов расчетов с имеющимися экспериментальными данными. Разработанные алгоритмы протестированы на моделях с известными аналитическими решениями.

Апробация работы.

Результаты работы докладывались на научных конференциях: Открытая конференция молодых учёных ИВМ СО РАН по математическому моделированию и информационным технологиям (Красноярск, 2017; 2019), Международная научно-практическая конференция «Решетневские чтения» (Красноярск, 2018; 2019; 2020), IV Международная конференция по метаматериалам и нанофотонике «METANANO 2019» (Санкт-Петербург, 2019), XV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Перспективы Свободный» (Красноярск, 2019), Всероссийская научная конференция с международным участием «Енисейская фотоника» (Красноярск, 2022).

Личный вклад автора.

Разработка модели поглощающей частицы в главах 2–3 выполнена совместно с В. С. Герасимовым и А. Е. Ершовым. Разработка модели теплопроводности в главе 2 выполнена совместно с С. А. Филимоновым.

Моделирование процесса наноразмерного кипения в главе 3 выполнено совместно с И. Л. Исаевым. Модель деформации клеточной мембраны в главе 4 разработана совместно с А. Б. Ключанцевым. Расчет межчастичного взаимодействия выполнен И. Л. Исаевым и П. Н. Семиной. Постановка задач и интерпретация полученных в диссертации результатов выполнены совместно с научным руководителем д.ф.-м.н., профессором С. В. Карповым.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации изложены в 11 печатных изданиях, 4 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, 4 — в периодических научных журналах первого квартиля, индексируемых Web of Science и Scopus, 7 — в тезисах докладов.

Содержание работы

Во **Введении** обосновывается актуальность темы диссертационной работы, формулируется цель и ставятся соответствующие задачи исследования, аргументируется научная новизна и практическая значимость полученных результатов работы и их достоверность на основе сравнения с другими исследованиями, формулируются защищаемые положения.

Первая глава посвящена обзору публикаций по теме диссертационной работы. Выполнен анализ экспериментальных и теоретических работ, посвященных запуску процесса гибели злокачественных клеток за счет тепловых и механических воздействий с участием наночастиц. Рассмотрены преимущества избирательного использования функционализированных НЧ, изучены публикации об особенностях нагрева окружающей среды и наноразмерного кипения жидкости вокруг нагреваемых лазерным излучением металлических наночастиц. Выполнен детальный обзор подходов к реализации магнито-механической терапии с использованием магнитных НЧ, а также сопутствующих процессов.

Вторая глава посвящена плазмонной фототермической терапии (ПФТТ) – методу гипертермии связанному с локальным перегревом злокачественных клеток, конъюгированных с плазмонными НЧ. Основным преимуществом ПФТТ является селективное лазерное воздействие на злокачественные опухоли, с клетками которых избирательно связываются НЧ. Лазерное излучение в данном методе вызывает сильный нагрев высокопоглощающих плазмонных НЧ за счет локализации электромагнитного поля, который вызывает сильный локальный перегрев окружающей жидкости и последующее необратимое повреждение клеточной мембраны за счет перегрева.

Обычно в ПФТТ учитываются только поглощающие свойства НЧ. В ряде исследований изучалась проблема оптимизации эффективности поглощения излучения сферическими НЧ «ядро – оболочка» [3; 4]. Однако специфику в это процесс вносит использование коротких, пикосекундных

лазерных импульсов, при которых в реальной среде возникают высоко-градиентные, быстро релаксирующие тепловые поля. В таких условиях температура клеточной мембраны вблизи нагретой НЧ будет зависеть от ряда факторов.

В этой главе исследуется влияние теплового воздействия на клеточную мембрану таких факторов, как размеры НЧ, относительные размеры ядра и оболочки для этого типа НЧ, оптические, теплофизические свойства материалов, а также длительность лазерного импульса.

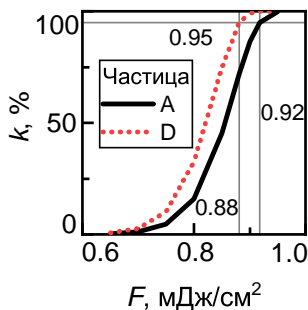


Рис. 1 — Доля погибших клеток k в зависимости от плотности энергии импульса F в течение времени термализации системы и ее возвращения в исходное состояние. Частица A имеет структуру «ядро-оболочка» AZO/Au с наибольшим поглощением, а частица D обладает наибольшим повреждающим фактором. $\lambda_A = 700$ нм, $\lambda_D = 701$ нм. Длительность лазерного импульса $\tau = 70$ пс.

Расчет выполнялся для высоко-поглощающих НЧ в диапазоне длин волн 700 – 800 нм, что соответствует спектральному диапазону александритового лазера. Его излучение попадает в диапазон прозрачности гемоглобина и распространяется в межчастичной среде с минимальными потерями. При этом за эффективное поглощение излучения в выбранном диапазоне ответственны лишь плазмонные наночастицы типа «ядро – оболочка» с золотой оболочкой и SiO₂, AZO, GZO, ITO в качестве материалов ядра.

Установлено, что при оптимизации структуры НЧ при некотором уменьшении их размеров относительно условия максимального оптического поглощения можно достичь усиления теплового воздействия на близкорасположенную клеточную мембрану. Причиной этого является снижение теплоемкости НЧ при уменьшении её размера, что приводит как к ускоренному нагреву, так и быстрому охлаждению НЧ, и, как следствие, сопровождается появлением больших температурных градиентов вблизи НЧ и клеточной мембраны.

Усиление теплового воздействия за счет изменения только геометрических размеров системы позволяет добиться той же эффективности терапии при меньшей интенсивности лазерного излучения (см. рис. 1), что повышает избирательность терапии и снижает повреждающее воздействие на соседние здоровые клетки.

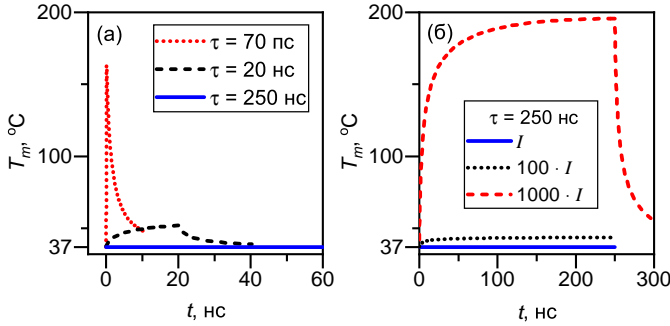


Рис. 2 — (а) Временные зависимости температуры мембраны за время облучения наночастицы импульсами различной длительности (τ), интенсивностью $I = 1.0 \text{ [мДж/см}^2] \cdot \tau^{-1}[\text{с}^{-1}]$, SiO_2/Au НЧ с размерами $d_c = 48 \text{ нм}$, $d_{sh} = 65 \text{ нм}$. (б) Те же зависимости для субмикросекундных импульсов с увеличенной интенсивностью импульса, где $I = 1.0 \text{ [мДж/см}^2] \cdot \tau^{-1}[\text{с}^{-1}]$.

Уменьшение длительности лазерного импульса от субмикросекундной до пикосекундной показало, что при той же плотности энергии импульса вблизи мембраны наблюдаются значительно более высокие градиенты температуры, что следует из рис. 2 (а). При этом, для достижения требуемой температуры нагрева мембраны, создаваемой пикосекундным импульсом, субмикросекундному импульсу необходимы в десятки раз более высокая плотность энергии импульса, что продемонстрировано на рис. 2 (б). Таким образом, пикосекундное лазерное излучение обеспечивает высокую локализацию и селективность теплового воздействия на злокачественные клетки со связанными наночастицами в условиях их нагрева излучением. Результаты исследований опубликованы в работах [A1—A4].

Связывание плазмонных наночастиц со злокачественными клетками позволяет реализовать различные сценарии физического воздействия на них. В третьей главе исследовался нагрев наночастиц золота импульсным лазерным излучением до высокой температуры в водной среде. При повышении плотности энергии излучения выше порогового значения такой нагрев наночастиц сопровождается испарением слоя воды вокруг них и образованием паровой оболочки высокого давления. Этот процесс может порождать мини-ударную волну, которая приводит к перфорации мембраны. Модель нагрева учитывает фазовый переход «жидкость – пар» и обратно с учетом особенностей наноразмерного кипения. Кроме того, при расчетах учитывалась динамика жидкости в условиях высоких градиентов температуры и давления в процессе нагрева. В работе исследуются переходные и нестационарные тепловые поля на границах «пар – жидкость», а также области с высоким давлением вблизи возникающих ПП,

способным повреждать мембраны злокачественных клеток. Особенностью нагрева наночастицы и окружающей ее среды в разрабатываемой модели является близкое расположение клеточной мембраны.

В этой главе была предложена исследовательская платформа, лежащая в основе одного из методов воздействия на злокачественные новообразования и открывающая перспективы детального изучения гидродинамических эффектов в водной среде при облучении плазмонных НЧ импульсным лазерным излучением. Показано, что адаптация универсального пакета моделирования ANSYS Fluent с помощью ряда оригинальных пользовательских функций позволяет верифицировать модель и выполнять расчет процесса образования паровых полостей вокруг плазмонных НЧ, связанных с мембраной злокачественных клеток, в высокоинтенсивных импульсных лазерных полях при произвольном сочетании параметров. Использование нашего подхода позволило выявить ранее не наблюдавшиеся особенности в этих гидродинамических эффектах. Модификация кода пакета ANSYS Fluent была реализована с помощью пользовательских функций (UDF) для учета следующих факторов: а) Граничная проводимость (обратная величина сопротивления Капицы) существенно различается для границ золото/вода и золото/пар. Таким образом, сопротивление Капицы было реализовано с помощью UDF; б) При использовании встроенной модели Ли без ее модификации испарение начинается слишком рано и протекает непосредственно на поверхности частицы, хотя этот процесс начинается на некотором расстоянии от поверхности за пределами поверхностного слоя (1–2 нм). Соответственно, в этом случае между паром и частицей отсутствует слой жидкости, что существенно меняет кинетику процесса; в) Учтены особенности формирования ПП — начало парообразования при плотности воды ниже критического значения $\rho_c = 322 \text{ кг/м}^3$. Разработанная модель была представлена в работах [A5; A6].

В четвертой главе устанавливаются основные особенности эффекта зарождения паровой полости вокруг плазмонных НЧ, связанных с клеточной мембраной, под действием импульсного лазерного излучения. Получены представления о физических закономерностях этого процесса. Получены сведения о пространственном распределении давления, температуры и объемной доли пара в системе «НЧ - мембрана - среда», а также об изменении этих параметров во времени.

Индикатором начала гибели клеток (терапевтического эффекта) является условие превышения значения давления на клеточной мембране выше порогового значения [5; 6], вызывающего критические повреждения клеток. В литературе эти значения различаются в зависимости от условий и механизма повреждения. Так, максимальное деформационное напряжение на мембране, необходимое для лизиса (растворения) взвешенных клеток, находится в диапазоне от 60 до 220 КПа [6] и зависит от концентрации клеток. В работе [7] значения давления для повреждения

клеток, создаваемого лазерным излучением (после воздействия пяти импульсов), определены в диапазоне от 30 до 100 МПа в зависимости от типа клеток. А значение стационарного давления повреждения клеток, согласно [8], составляет, в среднем, 100 МПа. Установлено, что ПП вблизи мембраны создает волну давления со ступенчатым фронтом (близким по свойствам к ударной волне). Величина давления превышает прочность мембраны при плотности энергии импульса $F = 12 \text{ Дж/м}^2$, при котором температура НЧ в любой момент времени остаётся ниже точки плавления Au. Обращено внимание на необходимость ограничения плотности энергии импульса для предотвращения плавления частиц и подавлении в них плазмонного резонанса за время действия импульса.

На рис. 3 приведен пример расчета распределения основных параметров в системе «НЧ – мембрана – среда»: давления и температуры на мембране, а также объемной доли пара вокруг НЧ в момент времени после достижения максимального давления с учетом влияния мембраны.

Рис. 4 демонстрирует кинетику образования ПП вокруг однородной золотой НЧ с радиусом $R_p = 20 \text{ нм}$, расположенной на расстоянии $H = 3 \text{ нм}$ от клеточной мембраны. НЧ облучались лазерными импульсами с длительностью $\tau = 25 \text{ пс}$ и плотностью энергии $F = 25 - 37 \text{ Дж/м}^2$. В этих условиях температура НЧ оказывалась выше порогового значения для образования ПП при всех значениях плотности энергии излучения. Однако, хотя при $F = 25 \text{ Дж/м}^2$ ПП образуется (Рис. 4 (в)), для его роста вплоть до касания с мембраной не хватает энергии. Рис. 4 (б) показывает, что давление на мембрану при $F = 25 \text{ Дж/м}^2$ значительно ниже, чем при более высоких значениях плотности энергии лазерного излучения.

Анализ рассчитанных кинетических зависимостей показывает, что рост давления на мембране и достижение его максимума предшествует моменту, когда ПП достигает мембраны. В некоторых случаях ПП может вообще не достигать мембраны, но давление на мембрану остается значительным. Это объясняется тем, что в момент своего образования ПП создает высокоамплитудную волну давления перед своим фронтом, распространяющуюся намного быстрее, чем скорость расширения границы ПП.

Рост ПП, возникающих при облучении НЧ импульсами с плотностями энергий в диапазоне $F=30 - 37 \text{ Дж/м}^2$, препятствует передаче тепла от НЧ к клеточной мембране. Мембрана при более низких значениях плотности энергии $F = 25 \text{ Дж/м}^2$ охлаждается меньше из-за продолжающегося потока тепловой энергии от НЧ через тонкий слой ПП. В связи с этим температура мембраны при плотности энергии импульса $F = 25 \text{ Дж/м}^2$ в какой-то момент сравнима с ее значениями при больших значениях плотности энергии импульса (Рис. 4 (а)).

Наличие близкорасположенной мембраны вблизи НЧ вносит существенную особенность в процесс формирования ПП вокруг НЧ, связанный

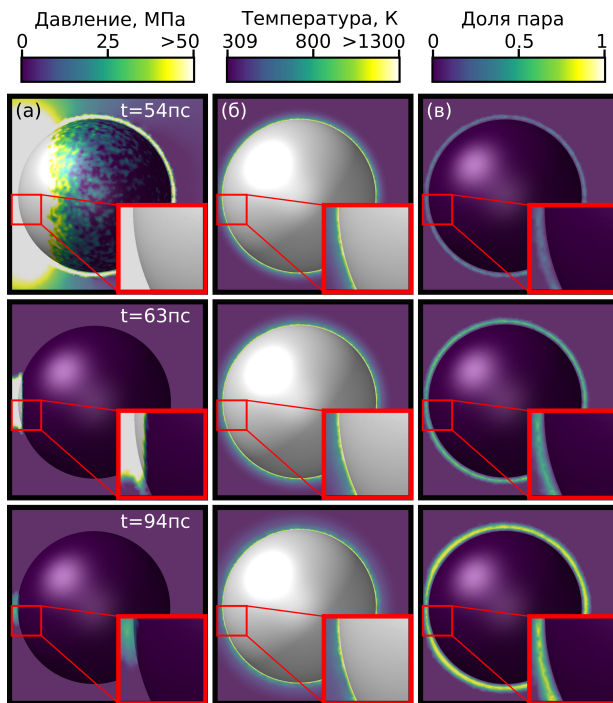


Рис. 3 — Распределение температуры, давления и объемной доли пара вокруг 58/74 нм НЧ «ядро – оболочка» при наличии клеточной мембраны: (а) давление, (б) температура, (в) объемная доля пара вокруг НЧ. Расчет выполнен для $\lambda=700$ нм, значения плотности энергии $F = 20$ Дж/м², длительности импульса $\tau=25$ пс. Клеточная мембрана совпадает с левой границей рисунков.

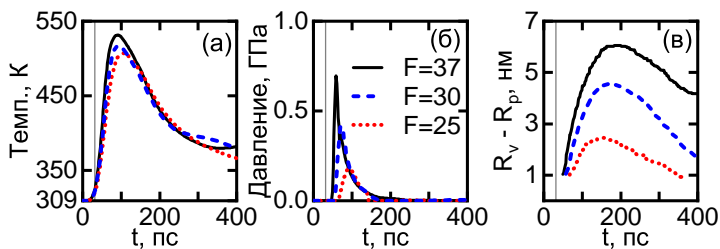


Рис. 4 — Кинетика развития ПП при облучении 20 нм Au НЧ лазерным импульсом ($\lambda=532$ нм, $\tau = 25$ пс) и значениями плотности энергии в диапазоне $F = 25 - 37$ Дж/м²: (а) температура поверхности мембраны, (б) давление на поверхности мембраны, (в) толщина ПП. Вертикальные линии соответствуют максимуму 25 пс импульса.

с асимметрией окружения. Установленной особенностью является сильно анизотропный характер распределения давления из-за близкого расположения мембраны. Максимальное давление наблюдается в пространстве между мембраной и частицей, которое значительно превышает это значение на противоположной стороне НЧ, что продемонстрировано на рис. 3 (а). Кроме того, было установлено, что пикосекундное лазерное излучение создает импульсное давление на мембрану (до 2 ГПа), значительно превышающее прочность мембраны на разрыв.

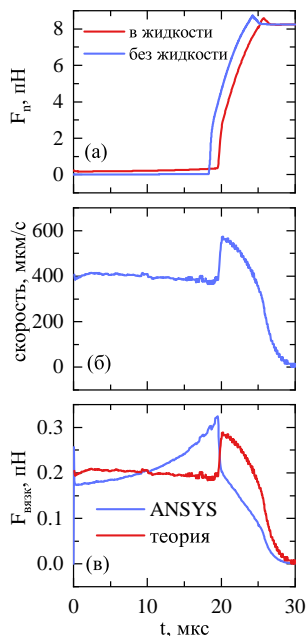


Рис. 5 — (а) Сила воздействия НЧ на мембрану $|F_n|$, (б) скорость НЧ, (в) сила вязкого трения в зависимости от времени.

AS-14, конъюгированных с золотой поверхностью НЧ, а также наночастиц гетерогенных гидрозолей, состоящих из отдельных золотых и магнетитовых НЧ.

В основе терапевтического эффекта лежит механическое воздействие магнитных наночастиц, движущихся в низкочастотном магнитном поле,

При использовании наносекундных лазерных импульсов необходимо учитывать фактор плавления НЧ и утраты резонансных свойств НЧ во время импульса из-за увеличения константы электронной релаксации [9], поскольку время плавления НЧ составляет порядка десятков пикосекунд. Кроме того, в этом случае значительно ухудшается локализация энергии излучения за счет более высоких значений плотности энергии импульса и его длительности. Все это сопровождается снижением температурных градиентов вокруг НЧ, что ухудшает селективность воздействия и приводит к повреждению соседних здоровых клеток, расположенных на больших расстояниях. Результаты исследований опубликованы в работах [А6; А7].

В пятой главе разработана модель магнитомеханического воздействия на злокачественные клетки с использованием: однодоменных магнетитовых НЧ с размерами 11 – 15 нм, наночастиц «ядро – оболочка» в диапазоне внешних размеров оболочки 30 – 50 нм с магнетитовым ядром диаметром 11 – 15 нм; ДНК-аптамеров

на механорецепторы клетки (выше порогового значения силы равного 4 пН [10]).

С помощью пакета ANSYS Fluent (метода конечных объемов) выполнен расчет вертикальной составляющей вытягивающей силы воздействия F_n на мембрану со стороны МНЧ (в точке связывания МНЧ с мембраной и расположении трансмембранного белка), а также скорости движения МНЧ (Рис. 5). В условиях расчета диаметр МНЧ принимался равным 30 нм, а магнетитового ядра — 14 нм. Расчет проводился для упрощенного случая движения частицы, связанной аптамером с определенным участком мембраны (трансмембранным белком — механорецептором).

В начальный момент времени МНЧ расположена перпендикулярно мембране (угол между центром МНЧ и трансмембранным белком, а также плоскостью мембраны равен 90°). Угол между направлением МП и собственным магнитным моментом НЧ в начальный момент времени составляет 90° . Движение частиц в этих условиях, включающее в себя помимо вращения также и движение по дуге, реализовывалось как в вязкой среде (в воде), так и в условной среде в отсутствие вязкого трения.

Изменение во времени вертикальной проекции силы в этой геометрии, действующей на мембрану со стороны НЧ диаметром 30 нм в низкочастотном магнитном поле 0.1 Тл, показано на рис. 5 (а). В крайних положениях происходит плавное касание частицей мембраны, с незначительным увеличением силы F_n в момент касания ($t = 25$ мкс), после чего значение силы стремится к статическому пределу. Однако при напряженности магнитного поля, использованного в экспериментах, величина силы F_n , действующей на мембрану, оказывается гораздо ниже порогового значения (4 пН) [10] при любом варианте геометрии магнетитовых НЧ с размерами, близкими к экспериментальным значениям.

Если сила воздействия одиночной НЧ на трансмембранный белок оказывалась недостаточной и не превышала порогового значения при экспериментальных значениях напряженности переменного МП, то жесткий агрегат из таких магнетитовых НЧ (либо из НЧ с магнетитовым ядром и золотой оболочкой), будет гораздо эффективней взаимодействовать с мембраной под действием внешнего МП благодаря суммированию моментов импульса отдельных частиц.

Анализ парных межчастичных потенциалов показывает возможность коагуляции частиц и образования агрегатов в главном потенциальном минимуме. На рис. 6 показаны различные типы парных межчастичных взаимодействий, подтверждающие возможность коагуляции МНЧ (размером 11 нм) и образования многочастичных агрегатов.

Проблема заключается в том, что при размере магнетитовых наночастиц меньше определенного значения (порядка 20–25 нм) они переходят

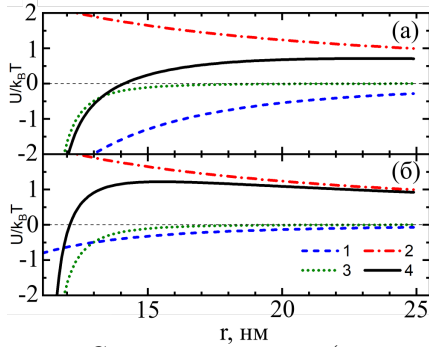


Рис. 6 — Сравнение энергии (в единицах $k_B T$) парного взаимодействия МНЧ от межцентрового расстояния: (1) магнитодипольное, (2) электростатическое, (3) ван дер Ваальсово и (4) суммарное взаимодействие. (а) случай коллинеарного расположения магнитных диполей взаимодействующих частиц, (б) случай расположения магнитных диполей взаимодействующих частиц под углом 60° к направлению внешнего поля.

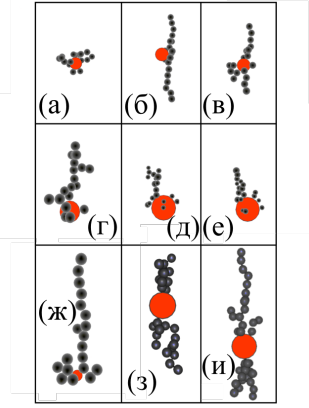


Рис. 7 — Структура агрегатов магнетитовых НЧ с участием золотой НЧ в присутствии магнитного поля. На всех рисунках направление поля - вдоль оси анизотропии агрегатов.

в суперпарамагнитное состояние и утрачивают свой собственный постоянный магнитный момент, который может хаотично изменять свое направление и амплитуду в результате тепловых флуктуаций. Если характерное время между такими термически индуцированными переключениями значительно меньше, чем время, в течение которого НЧ должна совершить движение, необходимое для механического воздействия на мембрану, эффективный механический момент значительно снижается.

Следует отметить, что образование большого агрегата из магнитных НЧ приводит, во-первых, к значительному увеличению суммарного магнитного момента и, следовательно, к увеличению момента силы, что повышает воздействие на мембрану. Во-вторых, это повышает потенциальный барьер перемагничивания в отдельных суперпарамагнитных НЧ, то есть приводит к резкому ослаблению эффекта тепловых флуктуаций (см., например, [11; 12]). В этом случае влияние тепловых флуктуаций намагниченности на динамику многочастичного агрегата с магнитоупорядоченным расположением магнитных диполей, входящих в агрегат, можно считать пренебрежимо малым уже начиная с агрегатов, которые состоят из 3–4 магнетитовых наночастиц.

Методом броуновской динамики с использованием реалистичных парных потенциалов было установлено, что суперпарамагнитные магнетитовые НЧ с флуктуирующим магнитным дипольным моментом объединяются в цепочечные агрегаты, рост которых может начинаться на центрах агрегации (поверхности золотых наночастиц или золотых наночастиц с магнетитовым ядром), избирательно связанных с мембранными механорецепторами злокачественных клеток.

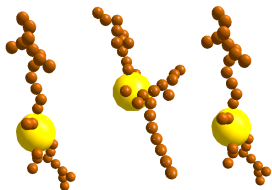


Рис. 8 — Вытянутая структура спонтанно формирующихся агрегатов из магнетитовых наночастиц (в отсутствие внешнего магнитного поля) при их ван дер Ваальсовом взаимодействии и с учетом усиливающегося парного магнито-дипольного взаимодействия частиц в условиях роста агрегатов. Размер магнетитовых частиц 11 нм, размер золотой частицы 40 нм).

Образование вытянутых агрегатов из суперпарамагнитных магнетитовых наночастиц происходит как в присутствии (рис. 7), так и в отсутствие внешнего магнитного поля (рис. 8) в условиях постепенного формирования агрегатов и блокировки в них тепловых флуктуаций. Для исследования этого эффекта модель броуновской динамики была дополнена условием сохранения магнитных моментов наночастиц, входящих в состав агрегатов из трех и более частиц.

В процессе роста магнетитовых агрегатов в отсутствие магнитного поля флуктуации магнитных моментов в их отдельных частицах постепенно прекращаются, что сопровождается формированием суммарного постоянного магнитного дипольного момента.

На рис. 7 (а) показано спонтанное образование агрегатов магнетитовых НЧ. При включении МП наночастицы выстраиваются в вытянутые цепочки с упорядоченными магнитными моментами (рис. 7 (б,в)). Аналогичная форма агрегатов наблюдается для НЧ «магнетитовое ядро – золотая оболочка» (радиус ядра 7 нм, толщина оболочки 2 нм) на золотой НЧ (рис. 7 (г)), малых полидисперсных [13] МНЧ (рис. 7 (д,е)), НЧ «магнетитовое ядро – золотая оболочка» $R=25$ нм на золотой НЧ (рис. 7 (ж)), магнетитовых НЧ на НЧ «магнетитовое ядро – золотая оболочка» (рис. 7 (з,и)).

Таким образом, учет агрегации МНЧ вблизи мембраны позволяет достичь и превысить пороговое значение силы воздействия на механорецепторы клетки со стороны золотой НЧ, окруженной многочастичной

структурой из МНЧ. Такого совокупного воздействия становится достаточно для запуска апоптоза. Результаты исследований опубликованы в работах [A8—A11].

В **заключении** приведены основные результаты исследований.

Основные результаты диссертационной работы:

1. Показано, что применение в лазерной гипертермии злокачественных клеток высокопоглощающих наночастиц с использованием нового плазмонного материала (AZO) в качестве материала ядра в структурах «AZO ядро – Au оболочка» может повысить эффективность повреждения клеточной мембраны на несколько порядков по сравнению с ядром из традиционно применяемого кварца благодаря низкой теплоемкости AZO.
2. Установлено, что облучение связанных с клеточной мембраной плазмонных наночастиц импульсным лазерным излучением в водной среде сопровождается их нагревом и образованием вокруг них паровой полости, а также ростом давления в окружающей среде. Показано, что адаптация универсального программного пакета ANSYS Fluent с помощью ряда оригинальных пользовательских функций позволяет моделировать процесс образования паровых полостей вокруг плазмонных НЧ в высокоинтенсивных импульсных лазерных полях в системе «наночастица–окружающая жидкость–мембрана». Использование реализованного подхода позволило выявить ранее не наблюдавшиеся особенности в этих гидродинамических эффектах.
3. Повреждение мембраны злокачественной клетки может происходить за счет волны высокого давления, возникающей в момент зарождения паровой полости вокруг НЧ. Быстрое образование этой полости – ее образование и рост, может создавать волну с близким к ступенчатому фронту давления, превышающего порог необратимого повреждения злокачественной клетки. При этом максимум давления сосредотачивается между НЧ и мембраной. Установлено, что достижение максимального давления на мембране может предшествовать моменту, когда паровая полость достигает мембраны.
4. В рамках предложенной в работе магнитомеханической модели установлены основные закономерности взаимодействия суперпарамагнитных магнетитовых наночастиц (размером менее 14 нм) с мембраной злокачественных клеток в низкочастотном однородном магнитном поле. Показано, что запуск апоптоза может происходить в условиях образования агрегатов из суперпарамагнитных магнетитовых наночастиц. Увеличение силы воздействия наночастиц на трансмембранный механорецептор интегрин достигается за счет формирования магнитоупорядоченных многочастичных

агрегатов, совокупный магнитный момент которых значительно превышает магнитный момент одиночной НЧ в приложенном магнитном поле при характерных значениях параметров, в которых реализуется клеточный апоптоз.

Представленные в диссертации результаты подтверждают возможность успешного применения физических методов для высокоэффективного лечения злокачественных новообразований, что открывает перспективы их внедрения в медицинскую практику.

Публикации автора по теме диссертации

- A1. *Kostyukov, A. S.* Super-efficient laser hyperthermia of malignant cells with core-shell nanoparticles based on alternative plasmonic materials [Text] / A. S. Kostyukov, A. E. Ershov, V. S. Gerasimov, S. A. Filimonov, I. L. Rasskazov, S. V. Karpov // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. — 2019. — Vol. 236. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2019.106599>.
- A2. *Костюков, А. С.* Оптимизация фототермических методов лазерной гипертермии с применением биоконъюгатов многослойных наночастиц с днк-аптамерами [Текст] / А. С. Костюков, А. Е. Ершов // Открытая конференция молодых учёных ИВМ СО РАН по математическому моделированию и информационным технологиям. — Красноярск, 2017. — С. 14–15.
- A3. *Костюков, А. С.* Оптимизация фототермических методов лазерной гипертермии злокачественных клеток с применением биоконъюгатов многослойных наночастиц с днк-аптамерами [Текст] / А. С. Костюков, С. А. Филимонов, А. Е. Ершов, В. С. Герасимов, С. В. Карпов // Решетневские чтения. — Красноярск, 2018. — С. 529–531.
- A4. *Костюков, А. С.* Высокоэффективная импульсная лазерная гипертермия злокачественных клеток с применением двухслойных наночастиц [Текст] / А. С. Костюков, А. Е. Ершов, В. С. Герасимов // Открытая конференция молодых учёных ИВМ СО РАН по математическому моделированию и информационным технологиям. — Красноярск, 2019. — С. 24–26.
- A5. *Kostyukov, A. S.* Part I. Nanobubbles in pulsed laser fields for anti-cancer therapy: in search of adequate models and simulation approaches [Text] / A. S. Kostyukov, I. L. Isaev, A. E. Ershov, V. S. Gerasimov, S. P. Polyutov, S. V. Karpov // Journal of Physics D: Applied Physics. — 2022. — Feb. — Vol. 55, no. 17. — P. 175401. — URL: <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ac4c20>.

- A6. *Костюков, А. С.* Нанопузырьки вокруг плазмонных наночастиц в импульсных лазерных полях для противоопухолевой терапии [Текст] / А. С. Костюков, И. Л. Исаев, А. Е. Ершов, В. С. Герасимов, П. Сёмина, С. П. Полютов, С. В. Карпов // Енисейская фотоника. — Красноярск, 2022. — С. 118–119.
- A7. *Kostyukov, A. S.* Part II. Nanobubbles around plasmonic nanoparticles in terms of modern simulation modeling: what makes them kill the malignant cells? [Text] / A. S. Kostyukov, I. L. Isaev, A. E. Ershov, V. S. Gerasimov, S. P. Polyutov, S. V. Karpov // Journal of Physics D: Applied Physics. — 2022. — Feb. — Vol. 55, no. 17. — P. 175402. — URL: <https://doi.org/10.1088/1361-6463/ac4c1f>.
- A8. *Semina, P. N.* Towards understanding the triggering of the malignant cell death in high-efficiency magneto-mechanical anticancer therapy [Text] / P. N. Semina, I. L. Isaev, S. V. Komogortsev, A. B. Klyuchantsev, A. S. Kostyukov, A. V. Blagodatova, D. E. Khrennikov, A. S. Kichkailo, T. N. Zamay, I. N. Lapin, A. E. Sokolov, S. P. Polyutov, S. V. Karpov // Journal of Physics D: Applied Physics. — 2023. — Jan. — Vol. 56, no. 6. — P. 065401. — URL: <https://dx.doi.org/10.1088/1361-6463/acb0dd>.
- A9. *Костюков, А. С.* Терапия злокачественных новообразований с помощью магнитных наночастиц, активируемых низкочастотным магнитным полем [Текст] / А. С. Костюков, А. Е. Ершов, В. С. Герасимов, С. В. Карпов // Решетневские чтения. — Красноярск, 2019. — С. 558–560.
- A10. *Костюков, А. С.* Механизмы необратимого повреждения злокачественных клеток ферромагнитными наночастицами в переменном магнитном поле [Текст] / А. С. Костюков, А. Б. Ключанцев, А. Е. Ершов, В. С. Герасимов, С. В. Карпов // Решетневские чтения. — Красноярск, 2020. — С. 444–445.
- A11. *Сёмина, П. Н.* О возможности запуска апоптоза злокачественных клеток в переменном магнитном поле с использованием магнетитовых наночастиц, конъюгированных аптамерами [Текст] / П. Н. Сёмина, И. Л. Исаев, А. Б. Ключанцев, А. С. Костюков, Д. Е. Хренников, А. С. Замай, С. П. Полютов, С. В. Карпов // Енисейская фотоника. — Красноярск, 2022. — С. 128–129.

Список литературы

1. *Khlebtsov, N. G.* Optics and biophotonics of nanoparticles with a plasmon resonance [Текст] / N. G. Khlebtsov // Quantum Electronics. — 2008. — Май. — Т. 38, № 6. — С. 504–529. — URL:

<http://stacks.iop.org/1063-7818/38/i=6/a=R02?key=crossref.e51256316f57fb228714a2e4e91d5205>.

2. *Golovin, Y. I.* New Approaches to Nanotheranostics: Polyfunctional Magnetic Nanoparticles Activated by Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field Control Biochemical System with Molecular Locality and Selectivity [Текст] / Y. I. Golovin, N. L. Klyachko, A. G. Majouga, S. L. Gribovskii, D. Y. Golovin, A. O. Zhigachev, A. V. Shuklinov, M. V. Efremova, M. M. Veselov, K. Y. Vlasova, A. D. Usvaliev, I. M. Le-Deygen, A. V. Kabanov // Nanotechnologies in Russia. — 2018. — Май. — Т. 13, № 5. — С. 215–239. — URL: <https://doi.org/10.1134/S1995078018030060>.
3. *Tuersun, P.* Optical absorption analysis and optimization of gold nanoshells [Текст] / P. Tuersun, X. Han // Applied Optics. — 2013. — Февр. — Т. 52, № 6. — С. 1325.
4. *Zakomirnyi, V. I.* New ideally absorbing Au plasmonic nanostructures for biomedical applications [Текст] / V. I. Zakomirnyi, I. L. Rasskazov, S. V. Karpov, S. P. Polyutov // Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. — 2017. — Янв. — Т. 187. — С. 54–61.
5. *Rau, K. R.* Investigation of laser-induced cell lysis using time-resolved imaging [Текст] / K. R. Rau, A. Guerra, A. Vogel, V. Venugopalan // Applied Physics Letters. — 2004. — Т. 84, № 15. — С. 2940–2942.
6. *Rau, K. R.* Pulsed Laser Microbeam-Induced Cell Lysis: Time-Resolved Imaging and Analysis of Hydrodynamic Effects [Текст] / K. R. Rau, P. A. Quinto-Su, A. N. Hellman, V. Venugopalan // Biophysical Journal. — 2006. — Т. 91, № 1. — С. 317–329.
7. *Lee, S.* Laser-generated stress waves and their effects on the cell membrane [Текст] / S. Lee, A. G. Doukas // IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. — 1999. — Т. 5, № 4. — С. 997–1003.
8. *Pagán, R.* Relationship between Membrane Damage and Cell Death in Pressure-Treated *Escherichia coli* Cells: Differences between Exponential- and Stationary-Phase Cells and Variation among Strains [Текст] / R. Pagán, B. Mackey // Applied and Environmental Microbiology. — 2000. — Т. 66, № 7. — С. 2829–2834. — eprint: <https://aem.asm.org/content/66/7/2829.full.pdf>. — URL: <https://aem.asm.org/content/66/7/2829>.
9. *Ershov, A. E.* Surface plasmon resonances in liquid metal nanoparticles [Текст] / A. E. Ershov, V. S. Gerasimov, A. P. Gavriluk, S. V. Karpov // Applied Physics B. — 2017. — Май. — Т. 123, № 6. — URL: <https://doi.org/10.1007/s00340-017-6755-2>.

10. *Kilinc, D.* Mechanochemical Stimulation of MCF7 Cells with Rod-Shaped Fe-Au Janus Particles Induces Cell Death Through Paradoxical Hyperactivation of ERK [Текст] / D. Kilinc, A. Lesniak, S. A. Rashdan, D. Gandhi, A. Blasiak, P. C. Fannin, A. von Kriegsheim, W. Kolch, G. U. Lee // Advanced Healthcare Materials. — 2014. — Октябрь. — Т. 4, № 3. — С. 395–404. — URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.201400391>.
11. *Balaev, D.* Superparamagnetic blocking of an ensemble of magnetite nanoparticles upon interparticle interactions [Текст] / D. Balaev, S. Semenov, A. Dubrovskiy, S. Yakushkin, V. Kirillov, O. Martyanov // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. — 2017. — Октябрь. — Т. 440. — С. 199–202. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.12.046>.
12. *Komogortsev, S.* The magnetic dipole-dipole interaction effect on the magnetic hysteresis at zero temperature in nanoparticles randomly dispersed within a plane [Текст] / S. Komogortsev, V. Fel'k, O. Li // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. — 2019. — Март. — Т. 473. — С. 410–415. — URL: <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.10.091>.
13. *Belyanina, I. V.* In Vivo Cancer Cells Elimination Guided by Aptamer-Functionalized Gold-Coated Magnetic Nanoparticles and Controlled with Low Frequency Alternating Magnetic Field [Текст] / I. V. Belyanina, T. N. Zamay, G. S. Zamay, S. S. Zamay, O. S. Kolovskaya, T. I. Ivanchenko, V. V. Denisenko, A. K. Kirichenko, Y. E. Glazyrin, I. V. Garanzha, V. V. Grigorieva, A. V. Shabanov, D. V. Veprintsev, A. E. Sokolov, V. M. Sadovskii, A. Gargaun, M. V. Berezovski, A. S. Kichkailo // Theranostics. — 2017. — Т. 7, № 13. — С. 3326–3337. — URL: <https://doi.org/10.7150/thno.17089>.

Костюков Артем Станиславович

Оптические и механические методы терапии злокачественных новообразований
с использованием плазмонных и магнетитовых наночастиц,
функционализированных аптамерами

Автореф. дис. на соискание ученой степени канд. физ.-мат. наук

Подписано в печать 11.12.2023. Заказ № 15.

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1,4. Тираж 80 экз.

Типография Института физики им. Л. В. Киренского Сибирского отделения
Российской академии наук – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН

