

## АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ ЗОЛОТЫХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ ПЛЕНОК ПОСЛЕ ИХ ОБЛУЧЕНИЯ МОЩНЫМ ИМПУЛЬСНЫМ СВЧ-ИЗЛУЧЕНИЕМ

*С. И. Тютюнников<sup>а</sup>, А. В. Шулина<sup>б,в</sup>, И. А. Крячко<sup>а</sup>*

<sup>а</sup> Объединенный институт ядерных исследований, Дубна

<sup>б</sup> Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

<sup>в</sup> НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Изучаются возможности использования СВЧ-излучения в совокупности с металлическими нано-объектами для терапии раковых заболеваний. Приводятся результаты оптических и атомно-силовых исследований наноструктурированных металлизированных пленок, используемых для отработки методик такой терапии. Производится оценка размеров кластеров металла, оторванных от пленки СВЧ-импульсами. Рассматриваются возможные механизмы разрушения раковых клеток наноструктурами под воздействием СВЧ.

The possibility of using microwave radiation in combination with metallic nano-objects for cancer therapy was studied. The results of optical and atomic-force investigations of nanostructured metallic films used for testing of the methods of such therapy are presented. The size of metal clusters, separated from the film by microwave pulses is assessed. The possible mechanisms of destruction of the cancer cells by nanostructures under the influence of the microwave radiation are considered.

PACS: 68.37.Ps; 87.85.Qr

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время успешно развивается новое научное направление мишенной терапии рака, связанное с введением проводящих микро- или наночастиц в опухолевые ткани с последующим их локальным нагревом электромагнитным излучением. К разрушению раковых клеток приводит разогрев частиц. Достаточно далеко продвинулись эксперименты по гипертермии, использующие длинноволновое электромагнитное излучение небольшой мощности практически в непрерывном режиме. В экспериментах с использованием лазерного излучения в световом и инфракрасном диапазоне длин волн кластеры золота нагреваются при выполнении условия поверхностного плазмонного резонанса [1]. Опыты с использованием углеродных нанотрубок показали также возможность механического повреждения клеток при взрыве нанотрубок под действием импульса электромагнитного излучения [2]. Во всех этих опытах особо обсуждается вопрос об избирательном поражении онкологических клеток и вопрос о токсичности выбираемых наночастиц.

В молекулярной биологии проведены первые успешные эксперименты по нагреву металлических наночастиц, присоединенных к молекулам ДНК, токами Фуко, индуцированными магнитным полем электромагнитных волн в дециметровом диапазоне длин волн [3].

В отличие от отмеченных экспериментов, проведенных при сравнительно невысокой интенсивности импульса электромагнитного излучения и большой его длительности, применение интенсивных пучков излучения в сантиметровом диапазоне при наносекундной длительности открывает новые возможности для постановки экспериментов по разрушению онкологических клеток и дальнейших опытов в медицинской физике [4].

Использование проводящих микро- или наночастиц в сочетании с излучением в миллиметровом или сантиметровом диапазоне длин волн позволяет локально и избирательно усилить разрушение онкологических клеток. При большой интенсивности пучков излучения частицы специально выбранной формы становятся центрами автоэмиссии электронов. Автоэмиссия должна сопровождаться нагревом частиц до больших температур и их механическим движением, приводящим к поражению клеток. При большой концентрации введенных в биологическое вещество частиц возможны, по-видимому, и повреждения на молекулярном уровне, обусловленные ионизационными потерями электронов.

В настоящей статье представлены результаты исследования золотых наноструктурированных пленок, используемых в экспериментах по поражению онкологических клеток при прохождении мощного короткого импульса электромагнитного излучения через тонкий слой золота, напыленного на специально приготовленный лавсан. Основной задачей было выяснить механизм взаимодействия СВЧ большой мощности с золотой пленкой с использованием оптической и атомно-силовой микроскопии.

## 1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ПО ОБЛУЧЕНИЮ ПЛЕНОК

Источником СВЧ-излучения на частоте 30 ГГц являлся работающий в ОИЯИ мазер на свободных электронах (МСЭ-генератор). В нем используется электронный пучок от ускорителя ЛИУ-3000 со следующими параметрами: ток пучка 250 А, энергия электронов 0,8 МэВ, длительность импульса пучка 250 нс и цикличность работы 0,5 Гц [5]. Общий вид установки приведен на рис. 1. СВЧ-излучение мощностью 10–20 МВт на частоте 30 ГГц (длина волны равна 1 см) выводилось из выходного волновода МСЭ в атмосферу и использовалось для проведения экспериментов по облучению наноструктурированных пленок золота.

СВЧ-пучок на выходе МСЭ имеет гауссово распределение с максимальной плотностью мощности на оси. В некоторых режимах работы генератора за выходным волноводом можно наблюдать пробой воздуха (рис. 2, а), сопровождающийся свечением газа. Таким образом, максимальное значение напряженности электрического поля волны в воздухе близко к пробойному значению  $\sim 50$  кВ/см. Аналогичный воздушный пробой можно было наблюдать вблизи точки фокуса фторопластовой линзы (рис. 2, б).

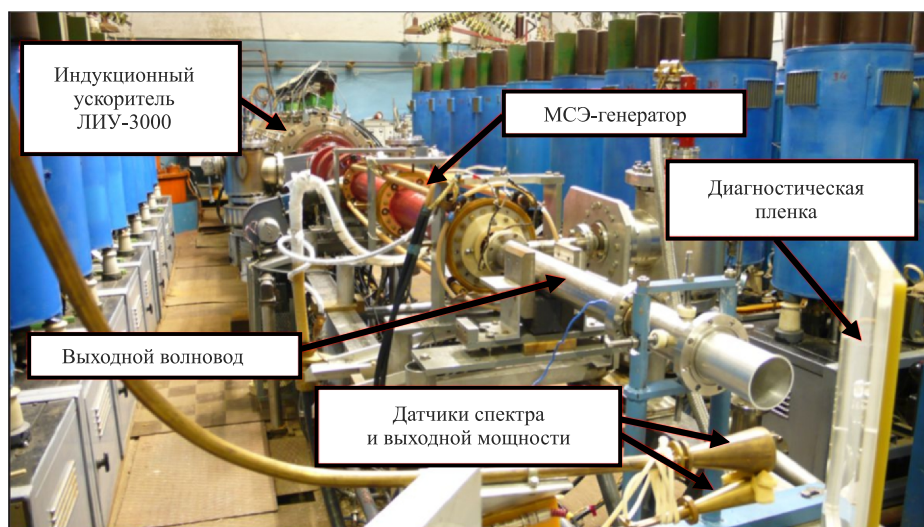


Рис. 1. Мазер на свободных электронах на основе индукционного ускорителя ЛИУ-3000

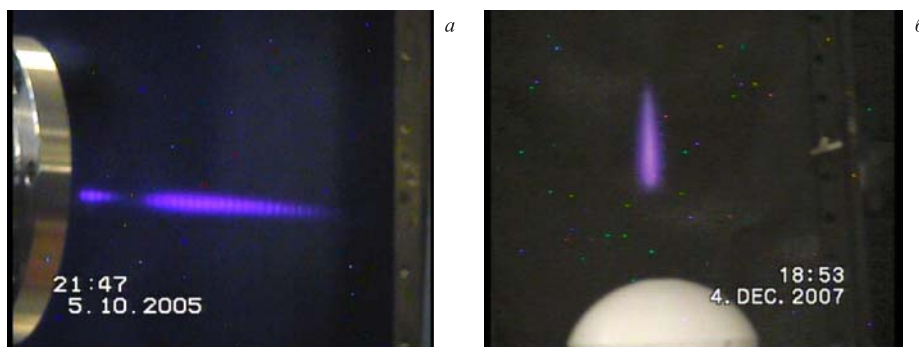


Рис. 2. Пробой воздуха на выходе МСЭ-генератора (а) и после фокусировки волнового пучка фторопластовой линзой (б)

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТЫ ПО ОБЛУЧЕНИЮ МЕТАЛЛИЗИРОВАННЫХ ЛАВСАНОВЫХ ПЛЕНОК

Настоящая работа является продолжением работы [6], в которой представлены первые результаты проведенного в ОИЯИ успешного эксперимента по поражению онкологических клеток при прохождении мощного короткого импульса электромагнитного излучения через тонкий слой золота, напыленного на лавсан.

Пленку с позолоченным лавсаном помещали в воду. При попадании на пленку мощной СВЧ-волны происходило разрушение покрытия, хотя характер повреждений заметно отличался от повреждений на воздухе. На рис. 3 представлены изображения повреждений после 600 импульсов.

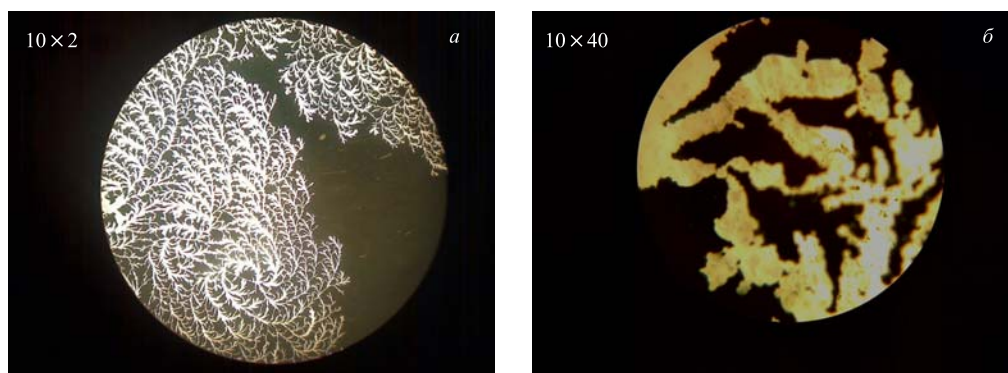


Рис. 3. Характер повреждения золоченого лавсана при облучении в тонком слое воды. *а)* 600 импульсов, увеличение  $\times 20$ , поле зрения микроскопа 10 мм; *б)* 300 импульсов, увеличение  $\times 400$ , поле зрения микроскопа 450 мкм

Для изучения оторванных импульсами частиц покрытия над позолоченной пленкой была помещена чистая пленка-сборник (также из лавсана).

Изучение сборника после облучения золоченого лавсана в воздухе проводилось при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа (ЛКСМ). Изображение поверхности сборника после воздействия 300 импульсов СВЧ-облучения представлено на рис. 4. Видно, что часть металлического покрытия оказалась на этой пленке в виде капель (до нескольких микрометров), форма которых в плоскости похожа на сферическую. Как будет показано ниже, из АСМ-исследований следует, что частицы золота на сборнике по форме больше напоминают конус. Минимально различимые поперечные размеры микрочастиц золота составляют  $2a_{\min} = 0,2-0,3$  мкм, средний размер частиц  $2a_0 = 0,8-1$  мкм. При экспозиционной дозе в 150 импульсов соответствующие размеры составляют  $2a_{\min} = 0,5-1$  мкм;  $2a_0 = 2,5-3$  мкм.

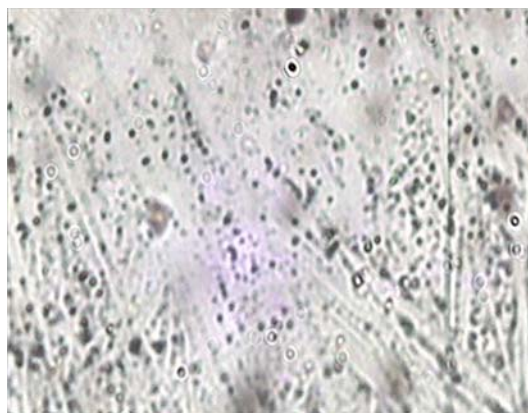


Рис. 4. Поверхность лавсанового сборника после экспозиции 300 импульсами СВЧ-излучения. Поле изображения составляет  $44 \times 33$  мкм

Для экспозиционной дозы  $N = 150$  были выполнены трехмерные профили распределения кластеров золота по глубине лавсанового сборника с помощью ЛКСМ. Измерения выполнены в режиме отражения лазерного излучения  $\lambda = 441,8$  нм. Исходя из результатов этих измерений можно утверждать, что кластеры расположены на поверхности сборника.

Из проведенных экспериментов можно сделать вывод, что при использовании в биологических опытах золоченого лавсана толщиной 50 нм как в экспериментах на воздухе, так и в экспериментах с водой под действием импульсов СВЧ-излучения с небольшой энергетикой (единицы джоулей за импульс), но с большой импульсной мощностью (до 20 МВт) происходит интенсивный разогрев металлического покрытия и его разрушение. Детальное выяснение физических механизмов этих процессов и их регулирование требуют значительного расширения программы исследований, однако полученные здесь качественные результаты позволили перейти к проведению экспериментов с облучением биологических объектов и получить обнадеживающие первые результаты, которые могут определить направление дальнейших физических и биологических исследований.

Для детального изучения структуры поверхности с золотыми кластерами как на подложке, так и на сборнике были проведены измерения на атомно-силовом микроскопе.

### 3. АСМ-ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование всех пленок с золотым покрытием проводилось на атомно-силовом микроскопе «Интегра-Аура» компании «НТ-МДТ» с использованием сканеров размерами  $5 \times 5$  и  $100 \times 100$  мкм. Сканирование поверхности с помощью кремниевого зонда NSG10 осуществлялось преимущественно полуконтактным методом, в некоторых случаях использовался контактный метод (кремниевый зонд CSG10). Нужно отметить, что исследуемые образцы — облученные золотые пленки — сами по себе представляют ин-

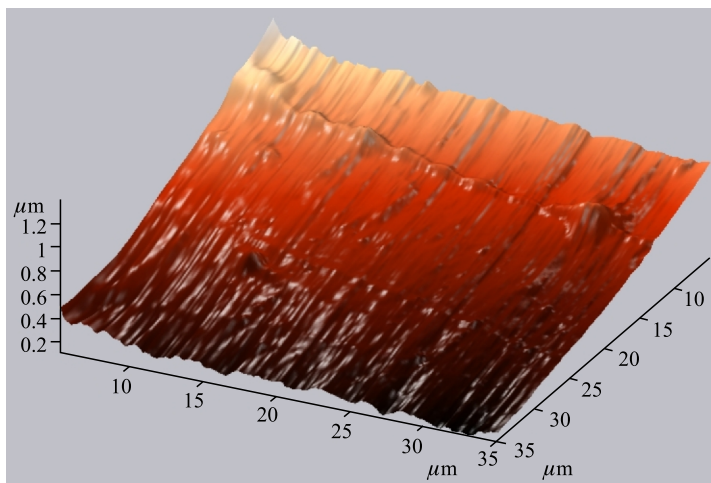


Рис. 5. Профиль поверхности чистого лавсана. Размер скана  $40,16 \times 40,16$  мкм, шаг сканирования 156,86 нм (количество точек скана  $256 \times 256$ )

терес для АСМ-исследований, поскольку сочетают как участки твердого металла, так и мягкого полимера.

Сначала при помощи АСМ был изучен профиль поверхности чистой пленки-сборника (рис. 5).

Затем были изучены поверхности сборников после облучения золоченых пленок 150 и 300 СВЧ-импульсами (эксперименты без раковых клеток). При просмотре образцов на просвет в оптическом микроскопе большая часть поверхности обоих образцов выглядит матово-серой с различной степенью пропускания. Кроме того, видны темные пятна различной плотности размером от одного до нескольких микрометров. Образец, облученный дозой 300 импульсов, в среднем выглядит менее прозрачным с большим количеством темных пятен. На рис. 6 и 7 представлены АСМ-профили этих пленок. На рис. 6 видны

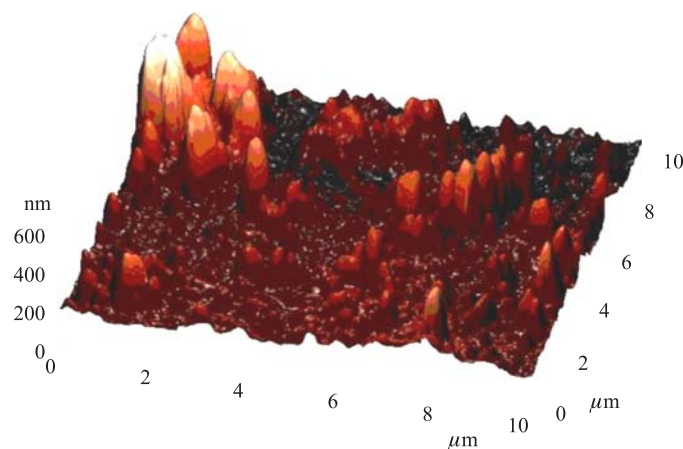


Рис. 6. Профиль поверхности темного пятна на сборнике после 150 импульсов. Размер скана  $10,04 \times 10,04$  мкм, шаг сканирования 39,22 нм (количество точек скана  $256 \times 256$ )

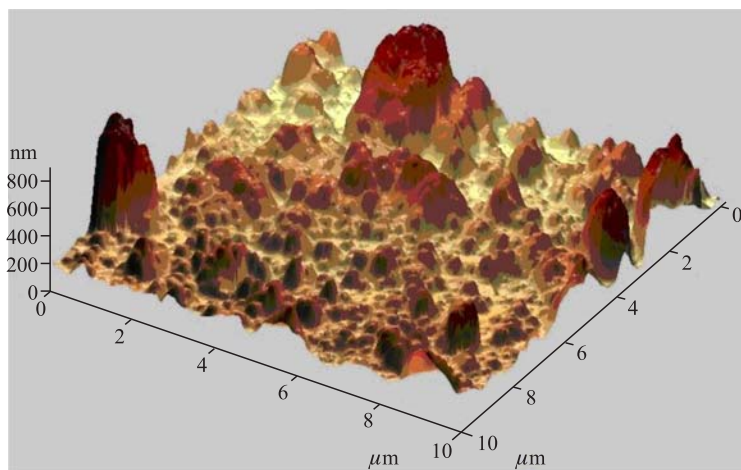


Рис. 7. Профиль поверхности темного пятна на сборнике после 300 импульсов. Размер скана  $10,04 \times 10,04$  мкм, шаг сканирования 39,22 нм (количество точек скана  $256 \times 256$ )

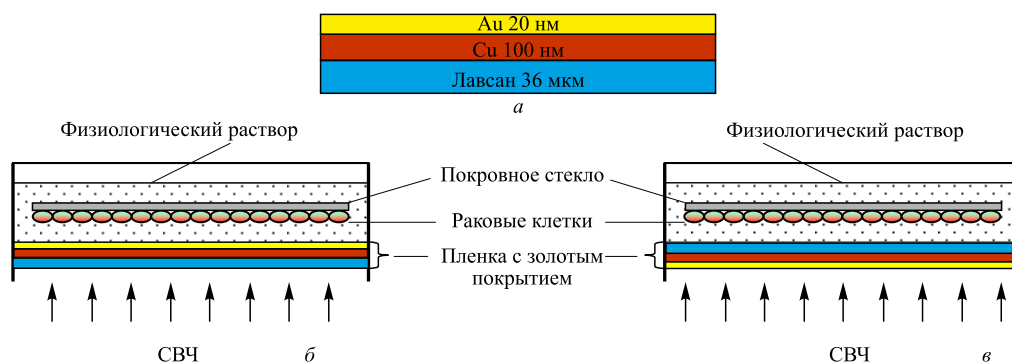


Рис. 8. Эксперимент по облучению СВЧ-излучением системы золоченая пленка – раковые клетки: а) структура исходной пленки; б) схематическое изображение прямой ориентации пленки золота к раковым клеткам; в) схематическое изображение обратной ориентации пленки золота к раковым клеткам

кластеры размером по высоте от  $\sim 200$  до  $\sim 600$  нм, причем число 200-нм кластеров значительно больше числа более крупных кластеров. В структуре поверхности крупных кластеров также можно различить неровности порядка 200 нм. Таким образом, из профиля поверхности следует вывод о том, что в процессе облучения происходит перенос 200-нм частиц золота, которые статистически распределяются на сборнике вторичных частиц.

После полученных результатов облучения пленок на воздухе было интересно выяснить, что же произойдет с пленками непосредственно в присутствии раковых клеток. Для этого были проведены эксперименты по следующей схеме (рис. 8).

На дно чашки Петри помещается пленка золота, как и в работе [6]. Сверху на нее кладется покровное стекло с нанесенным монослоем асинхронной популяции клеток карциномы молочной железы человека линии ca151, находящихся в логарифмической фазе роста. Раковые клетки находятся в питательной среде (физиологическом растворе). Покровные стекла ориентируются клетками вниз, так чтобы находиться в непосредственном контакте с пленкой золота. Также были проведены эксперименты, в которых золотая пленка ориентировалась обратной стороной (лавсановой подложкой) к раковым клеткам (рис. 8, в). Проведение эксперимента с обратной ориентацией пленки было мотивировано необходимостью подтверждения того, что именно проводящий слой специально приготовленного золота играет главную роль в гибели клеток.

В настоящей работе исследовалась следующая серия образцов: исходная пленка № 1 (рис. 8, а), не подверженная СВЧ-излучению, и три пленки, подверженные СВЧ-излучению: № 2 — контакт золотого покрытия с раковыми клетками (рис. 8, б), № 3 — золотое покрытие пленки расположено обратной стороной к раковым клеткам (рис. 8, в), № 4 — золотое покрытие пленки расположено лицом к раковым клеткам, аналогично рис. 8, б, расстояние между поверхностью пленки и раковыми клетками  $\sim 3$  мм (случай «бесконечного» удаления от поверхности клеток).

Прежде чем проводить АСМ-исследование поверхности, интересно сравнить оптические изображения исследуемых пленок (рис. 9).

Видно, что необлученная золотая пленка № 1 (рис. 9, а, б) представляет собой однородную гладкую поверхность, в то время как облученные пленки имеют абсолютно не-

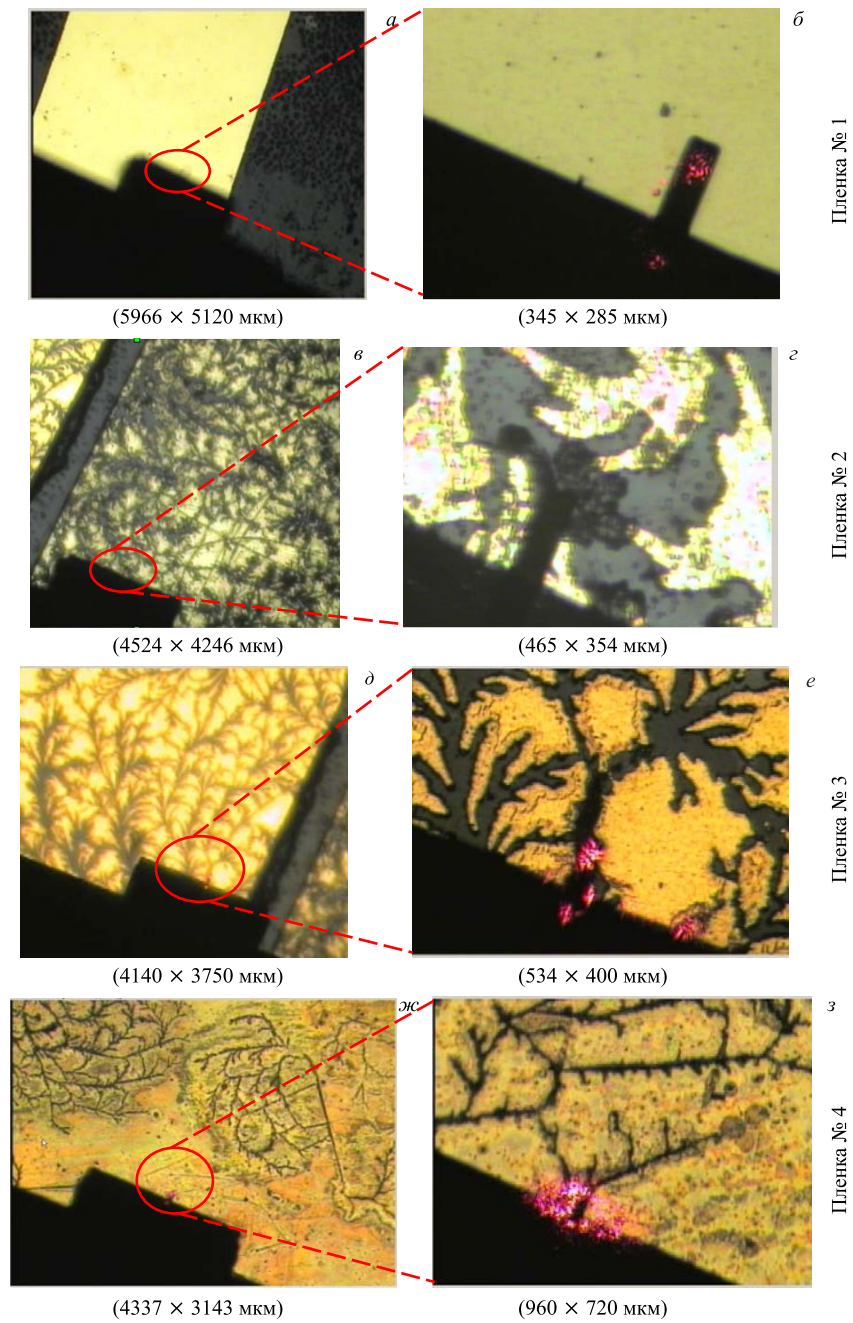


Рис. 9. Оптическое изображение исследуемых золотых пленок: а, в, д, ж) отведенное состояние пленок; б, г, е, з) подведенное состояние зонда в одну из точек сканирования



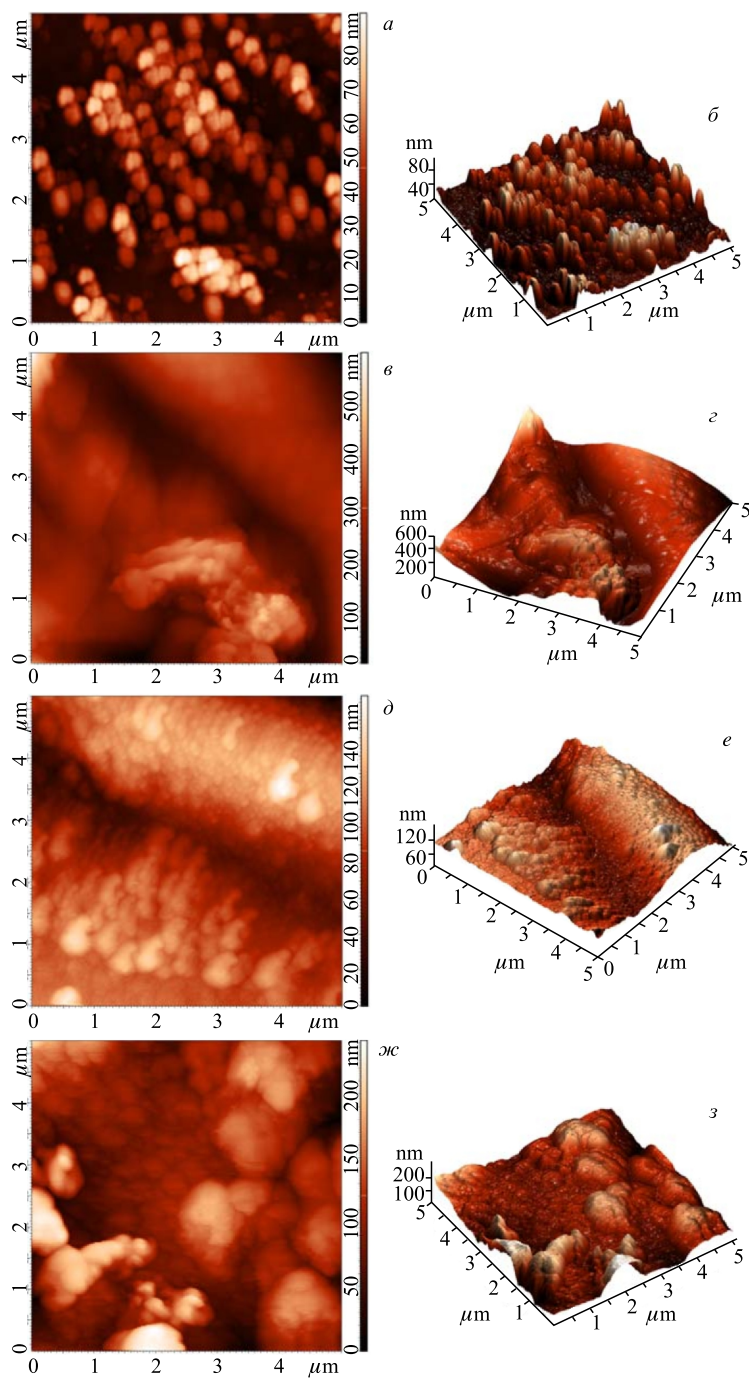


Рис. 10. АСМ-изображение (справа — двумерное, слева — трехмерное) пленок золота. Размер области сканирования  $5 \times 5$  мкм. а, б) Пленка № 1; в, г) пленка № 2; д, е) пленка № 3; ж, з) пленка № 4

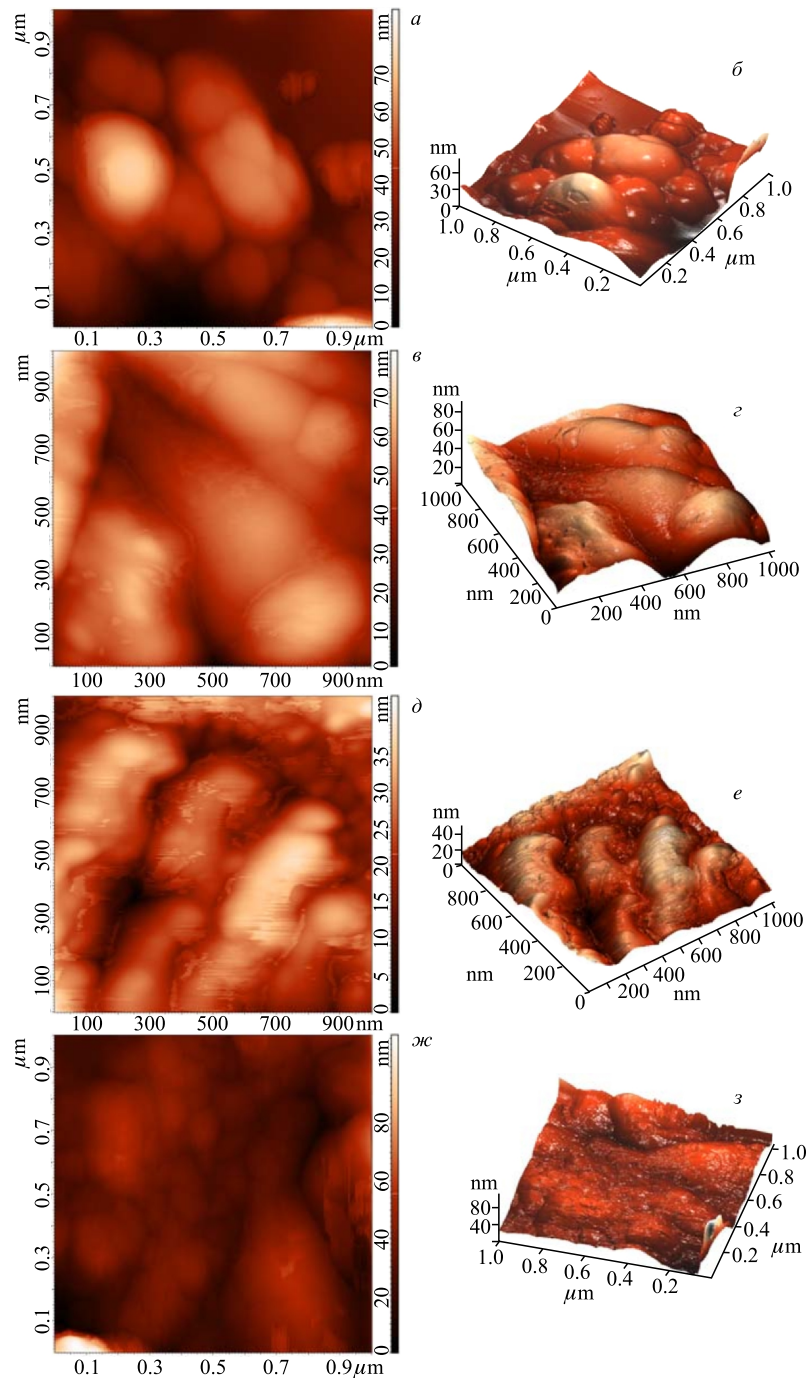


Рис. 11. АСМ-изображение (справа — двумерное, слева — трехмерное) пленок золота. Размер области сканирования  $1 \times 1$  мкм. а, б) пленка № 1; в, г) пленка № 2; д, е) пленка № 3; ж, з) пленка № 4

однородную поверхность с областями, в которых отсутствует золотое покрытие (черные «узоры») в результате воздействия СВЧ-излучения. Сравнивая поверхности облученных пленок, можно сказать, что имеются следующие отличия: между пленкой №2 (рис. 9, в, г) и №3 (рис. 9, д, е) разница на границе золотого покрытия, а именно, на пленке №2 хорошо видны четкие границы областей золота, а на пленках №3 и №4 (рис. 9, ж, з) эти же границы не так четко выражены и, кроме того, имеют дополнительный контур в виде плавного углубления. На поверхности пленки №4 вне основных узоров наблюдаются отдельные области — углубления в результате вылета золота.

После анализа полученных АСМ-изображений поверхности (рис. 10 и 11) можно заключить следующее:

- 1) исходная пленка золота представляет собой неоднородную поверхность, отличающуюся от изображения в оптическом диапазоне;
- 2) после воздействия СВЧ-излучением «гранулированность» поверхности исчезает;
- 3) при сканировании облученных образцов выявлено, что глубина «бороздок» превышает суммарный слой меди и золота в 1,5 раза.

#### 4. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерения структуры напыленной золотой пленки на буферном медном слое показывают, что она состоит из островков размерами в диапазоне от 200 до 400 нм. При воздействии СВЧ-излучения высота структур уменьшается, т. е. происходит их разрушение. Проведенные оценки напряженности поля электромагнитной волны дают значение  $E \sim 100$  кВ/см. Пиковая мощность излучения  $I_e = 2 \cdot 10^7$  Вт/см<sup>2</sup>. При такой напряженности электрического поля островки золота играют роль катода, с которого в результате взрывной эмиссии начинает инжектироваться в окружающее пространство электронный пучок. Этот пучок ускоряется в поле электромагнитной волны. Как показывают оценки [7], величина средней энергии  $W_e \cong 6,7 \cdot 10^{17} I_e / \omega^2$ , где  $[I_e] = [\text{Вт/см}^2]$ ,  $[\omega] = [\text{Гц}]$ ,  $[W_e] = [\text{эВ}]$ . Для нашего случая  $\omega = 3 \cdot 10^{10}$  Гц,  $I_e = 2 \cdot 10^7$  Вт/см<sup>2</sup>,  $W_e \cong 2 \cdot 10^4$  эВ.

Таким образом, островковая структура золотой пленки в поле СВЧ-излучения превращается в многоострый катод, с которого происходит автоэмиссия электронов. Эти электроны в поле электромагнитной волны могут быть ускорены до величины 20 кэВ, и их пробег в воде составит  $\sim 30$  мкм.

Очевидно, что эти электроны приводят к разрушению раковых клеток при их непосредственном контакте через физиологический раствор с золотой островковой пленкой.

Как показали измерения, с золотой островковой структуры вылетают также кластеры золота, которые собираются на сборнике из лавсана. Однако они, как нам представляется, теряют энергию в физиологическом растворе и уже холодными диффундируют в биологический субстрат.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведены оптические и АСМ-исследования металлизированных пленок, находившихся в воде или физиологическом растворе с клетками и подвергшихся облучению короткими, но мощными СВЧ-импульсами.

Выяснено, что образующиеся в результате облучения узоры — это не просто участки, свободные от металлизации, но и с частично разрушенным лавсаном.

По полученным АСМ-изображениям с пленки-сборника произведена оценка среднего размера отрываемых от металлизации СВЧ-импульсами кластеров. Он составил  $\sim 200$  нм.

Выдвинуто предположение об электронной эмиссии с островков золотого покрытия как об еще одном возможном (помимо разогрева токами в металлизации) механизме гибели раковых клеток.

Авторы выражают благодарность А. К. Каминскому и С. Н. Седых за проведение экспериментов на МСЭ, а также С. П. Беседину за помощь при проведении АСМ-исследований и полезные дискуссии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Govorov A. O., Richardson H. H.* Generating Heat with Metal Nanoparticles // *Nanotoday*. 2007. V. 2, No. 1. P. 30.
2. *Panchapakesan B. et al.* Single-Wall Carbon Nanotube Nanobomb Agents for Killing Breast Cancer Cells // *NanoBiotechnology*. 2005. V. 1. P. 133.
3. *Hamad-Schifferli K. et al.* Remote Electronic Control DNA Hybridization through Inductive Coupling to an Attached Metal Nanocrystal Antenna // *Nature*. 2002. V. 415, No. 10. P. 152.
4. *Большаков М. А. и др.* Воздействие мощного микроволнового излучения наносекундной длительности на некоторые биологические объекты // *Докл. РАН*. 2000. Т. 371. С. 691–695.
5. *Elzhov A. V. et al.* Status of 30 GHz Facility for Experimental Investigation of the Copper Cavity Lifetime (CLIC Collider Project) // *Proc. of the 26th Free-Electron Laser Conf. (FEL'2004)*, Trieste, Italy, Aug. 29–Sept. 3, 2004. P. 318–321.
6. *Besedin S. P. et al.* Experiments on Application of High Power Microwave Radiation to Biomedicine using Micro- and Nanoparticles // *Strong Microwaves: Sources and Applications: Proc. of the VII Intern. Workshop*. 2009. V. 2. P. 524–528.
7. *Batanov G. M. et al.* Interaction of High Power Microwave Beams with Metal-Dielectric Media // *Eur. Phys. J. Appl. Phys. G*. 2004. V. 2, No. 1. P. 11–16.

Получено 26 марта 2011 г.