

# Фототермические эффекты при лазерном нагреве золотых наностержней в суспензиях и в привитых опухолях в экспериментах *in vivo*

Г.С.Терентюк, А.В.Иванов, Н.И.Полянская, И.Л.Максимова,  
А.А.Скапцов, Д.С.Чумаков, Б.Н.Хлебцов, Н.Г.Хлебцов

*Исследованы фототермические эффекты при лазерном облучении водных суспензий золотых наностержней в экспериментах *in vitro* и привитой мышам карциномы Эрлиха после внутривенного введения золотых наностержней размером  $40 \times 10$  нм с плазмонным резонансом на длине волны 810 нм в экспериментах *in vivo*. Покрытые полиэтиленгликолем наночастицы через сутки после введения накапливались в опухоли в концентрации, примерно в три-четыре раза большей, чем в здоровой мышечной ткани. При достигнутых в результате пассивного накопления концентрациях наночастиц в опухоли (4 мкг на 1 г опухоли) эффективность её нагрева была выше, чем в водных растворах с той же концентрацией наночастиц. Обсуждаются возможные причины данного эффекта, включая различие в теплофизических параметрах воды и биоткани, агрегацию наночастиц в тканях, влияние многократного рассеяния в биоткани и неоднородность накопления частиц в опухоли. С использованием метода Монте-Карло для моделирования многократного рассеяния света показано, что существуют соотношения коэффициентов рассеяния биоткани и коэффициентов поглощения наночастиц, при которых доля поглощенных фотонов в ткани выше, чем в прозрачной среде. Сделан вывод о том, что режим гипертермии менее эффективен для противоопухолевой терапии, чем термическое повреждение за счет быстрого кратковременного нагрева тканей до температуры деструкции.*

**Ключевые слова:** наночастицы золота, фототермический эффект, фототермальная терапия опухоли.

## 1. Введение

Метод термотерапии [1] в зависимости от механизма повреждения патологических биомишеней (органов, тканей, клеток) применяется в двух вариантах: гипертермия и термодеструкция или термоллиз. В гипертермии используют нагрев биомишеней до температуры 43–45 °С, который может приводить к апоптозу клеток за счёт нарушения их нормальных функций, денатурации ферментов, индукции белков теплового шока, нарушению кровообращения, уменьшению скорости репарации повреждений в раковых клетках по сравнению с нормальными тканями и т. д. [1]. В случае термоллиза (термодеструкции) осуществляется нагрев до температуры свыше 50 °С определенного участка ткани или органа, поражённого патологическим процессом. Подобное воздействие, как правило, имеет

небольшую длительность и локальный характер. Наиболее актуально применение термоллиза в онкологии, где он приводит к некрозу злокачественных клеток и деструкции опухоли [2].

Разнообразие способов, с помощью которых осуществляется термотерапия, обусловлено большим количеством источников излучения и термосенсибилизаторов, которые поглощают излучение и генерируют тепло, используемое для гипертермии или термоллиза [1]. Одним из перспективных и относительно новых способов проведения термоллиза тканей является плазмонно-резонансная фототермотерапия (ПФТТ) [3, 4], в которой применяется лазерный нагрев металлических, чаще всего золотых и композитных (диэлектрик–золото, серебро–золото), наночастиц. Как было показано в пионерской работе [5], локальный нагрев частиц коллоидного золота размером  $\sim 20$  нм, адсорбированных на поверхности раковых клеток, вызывает их гибель после облучения импульсным зелёным лазерным излучением со сравнительно невысокой средней мощностью, но при достаточно большой пиковой мощности коротких (20 нс) импульсов. Аналогичный результат был получен в работе [6] при облучении раковых клеток, меченных золотыми нанооболочками, красным лазерным излучением в непрерывном режиме. Высокая эффективность нагрева определяется большим сечением поглощения металлических наночастиц на длине волны плазмонного резонанса [7], которое на много порядков превышает таковое для эндогенных хромофоров-термосенсибилизаторов типа меланина.

К настоящему времени разработаны методы химического синтеза частиц с настройкой их плазмонных резонансов в нужный спектральный диапазон, включая окно прозрачности биотканей (650–900 нм) [8, 9], за счёт изменения структуры и состава частиц. Из всего разнообразия

Г.С.Терентюк. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83; Ульяновский государственный университет, Россия, 432970 Ульяновск, ул. Л.Толстого, 42

А.В.Иванов, Н.И.Полянская. Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

И.Л.Максимова, А.А.Скапцов, Д.С.Чумаков. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83

Б.Н.Хлебцов. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

Н.Г.Хлебцов. Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского, Россия, 410012 Саратов, ул. Астраханская, 83;

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13; e-mail: khlebtsov@ibppm.sgu.ru

наночастиц, используемых сейчас для ПФТТ, можно выделить три класса наиболее перспективных частиц: золотые нанооболочки на ядрах из двуокиси кремния [10], золотосеребряные наноклетки [11] и золотые наностержни [12, 13]. Наиболее исследованными с точки зрения их использования в ПФТТ являются золотые нанооболочки, информацию о которых можно найти в недавних обзорах [14, 15], включающих в себя опубликованные данные по экспериментам *in vitro* и *in vivo* [16–18]. Не случайно, что именно с этими частицами фирма Nanospectra Biosciences (США) начала первые клинические испытания ПФТТ применительно к злокачественным опухолям головы и шеи человека [19].

В 2007 г. группа Y.Xia [20] впервые продемонстрировала применение золотосеребряных наноклеток для ПФТТ раковых клеток *in vitro* (данные по оптоакустическому имиджингу меланомы в эксперименте *in vivo* были опубликованы в работе [21], а детальный обзор имеющихся данных по наноклеткам можно найти в [22]). Более перспективными для ПФТТ, с нашей точки зрения, являются золотые наностержни (в том числе и из-за относительной простоты их синтеза) [12], функционализированные соответствующим образом для уменьшения токсичности исходного стабилизатора частиц – цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) [23]. Эффективность золотых наностержней как термосенсибилизаторов была продемонстрирована в модельных экспериментах и расчетах [24, 25] и в экспериментах *in vivo* с привитыми опухолями у мышей [26].

К настоящему времени разработаны методы конъюгирования наночастиц (в том числе и покрытых СТАВ золотых наностержней) с различными биомолекулами. Основными задачами являются ослабление взаимодействия наночастиц с клетками иммунной системы, продление времени их циркуляции в крови [27] с целью повышения эффективности механизма пассивного накопления (enhanced permeability and retention – EPR [28]), а также адресная (или векторная) [29] доставка конъюгатов к биомишеням. В частности, имеется много работ по ПФТТ раковых клеток в экспериментах *in vitro* с золотыми наностержнями, функционализированными антителами к рецептору эпидермального фактора роста [30], фосфатидилхолином [31], фолиевой кислотой [32] и т. д. Однако в области применения золотых наностержней для ПФТТ в экспериментах *in vivo* и тем более в клинической онкологии существует еще ряд нерешенных проблем.

Во-первых, как отмечалось в ряде работ [33, 34], эффективность ПФТТ в онкологии определяется комплексом факторов: 1) селективным накоплением частиц в опухоли за счёт пассивного механизма EPR и оптимальной поверхностной функционализации; 2) селективным нагревом за счёт локализации в микрообъемах и спектральной селективности источников преобразования света в тепло в результате настройки плазмонного резонанса; 3) оптимизацией протоколов ПФТТ в отношении дозы и способа введения частиц, средств контроля за их накоплением и локализацией, параметров и режимов облучения, а также мониторинга характеристик термолитиза. Всё еще остаются актуальными и проблемы, связанные с доставкой оптического излучения к биомишени.

В отличие от множества публикаций, посвящённых экспериментам *in vitro*, число публикаций по ПФТТ опухолей *in vivo* с использованием золотых наностержней невелико. В большинстве работ применялось внутривенное

введение, а увеличение накопления частиц в опухоли достигалось функционализацией частиц молекулами тирозинированного полиэтиленгликоля (ПЭГ-тиол) [26, 34–38]. Активная адресная доставка пока ещё является редким исключением [39]. Для повышения накопления использовалось также микрокапсулирование наночастиц [40] или их прямое введение в опухоль [41], однако этот приём реализуем только для опухолей с доступной локализацией.

Актуальной также является оптимизация фототермотерапии с использованием фантомов и животных моделей [16, 42–44]. Известно, что существенная деструкция опухолевой ткани имеет место только при увеличении её температуры свыше 50 °С [2]. Поэтому, с нашей точки зрения, важны оптимальные дозы вводимых частиц и лазерного облучения, обеспечивающие такой нагрев опухолевых тканей, который приводит именно к фототермолитизу злокачественных клеток, а не к общей умеренной гипертермии.

Цель настоящей работы – исследование фототермических эффектов и пространственно-временного распределения температуры в тканях мышей с привитой опухолью и в модельных суспензиях в зависимости от дозы вводимых наночастиц, их биораспределения и параметров лазерного излучения.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Синтез и характеристики покрытых ПЭГ золотых наностержней

В работе использовали следующие реактивы: нитрат серебра  $\text{AgNO}_3$  (свыше 99.9%, Aldrich, США, 20.913-9), СТАВ (96%, Fluka, США, № 52370), золотохлористоводородная кислота  $\text{HAuCl}_4$  (свыше 99%, Aldrich, США), аскорбиновая кислота (свыше 99%, Fluka, США), боргидрид натрия (Sigma-Aldrich, США), соляная кислота (ОСЧ, Вектон, Россия), поташ (ОСЧ, Реахим, Россия), ПЭГ-тиол ( $M_w = 5000$ , Nektar, США), вода (Milli Q).

На первом этапе синтеза последовательно смешивали 1 мл СТАВ (0.1 М), 25 мкл  $\text{HAuCl}_4$  (10 мМ) и 100 мкл раствора боргидрида натрия (10 мМ). После добавления  $\text{HAuCl}_4$  смесь меняет цвет с бесцветного на жёлтый, после добавления боргидрида натрия цвет немедленно изменяется на бледно-коричневый, что свидетельствует об образовании наночастиц золота диаметром 1–3 нм. Зародышевый раствор оставляли без перемешивания, не закрывая крышку, на 30–120 мин. Далее к 100 мл раствора СТАВ (0.1 М) добавляли последовательно 2 мл раствора  $\text{AgNO}_3$  (4 мМ), 5 мл раствора  $\text{HAuCl}_4$  (10 мМ), 1 мл раствора аскорбиновой кислоты (100 мМ), 1 мл соляной кислоты (1 М) и 1 мл зародышей золота. Образовавшуюся суспензию выдерживали при температуре 28 °С в течение 24 ч. В результате получали суспензию покрытых СТАВ золотых наностержней с концентрацией золота ~80 мкг/мл и оптической плотностью 3.5–4 на длине волны плазмонного резонанса в кювете длиной 1 см.

Полученную суспензию золотых наностержней центрифугировали 1 ч при ускорении 14000g. Осадок, содержащий наночастицы, растворяли в том же объёме воды. К 100 мл суспензии наночастиц добавляли 1 мл раствора поташа (0.2 М) и 1 мл раствора ПЭГ-тиола (1 мМ). Суспензию выдерживали 12 ч при температуре 28 °С и центрифугировали 1 ч при ускорении 14000g. Осадок растворяли в 100 мл воды. Процедуру центрифугирования-пе-

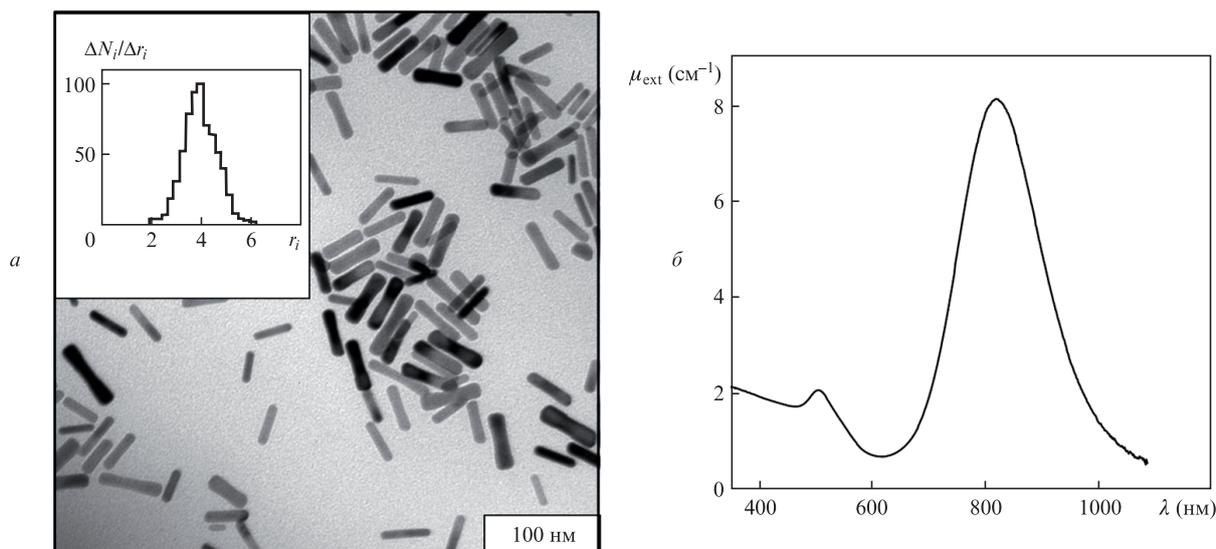


Рис.1. Трансмиссионное электронно-микроскопическое изображение (а) и спектр экстинкции (б) золотых наностержней с показателем экстинкции  $8.16 \text{ см}^{-1}$  на длине волны плазмонного резонанса 820 нм. На вставке – гистограмма распределения числа частиц  $\Delta N_i/\Delta r_i$  по осевым отношениям  $r_i$  со средним значением  $r = 4.03 \pm 0.7$ .

растворения повторяли пять раз, после чего раствор концентрировали до требуемой оптической плотности на длине волны плазмонного резонанса.

Геометрические параметры наностержней определяли по трансмиссионным электронно-микроскопическим изображениям, полученным с помощью электронного микроскопа Libra-120 (Carl Zeiss, Германия) (рис.1,а). Из рис.1,а видно, что в среднем частицы имели форму цилиндра с полусферическими основаниями, а её вариации за счёт более плоской формы оснований и уменьшения диаметра в центре частицы («end-cap» и «dog-bone» морфологии [45]) для данного образца очень малы. Для ансамбля из примерно 500 частиц определялись длина  $L_i$ , диаметр  $d_i$  и осевое отношение  $r_i = L_i/d_i$  для каждой частицы. Средние значения длины ( $L$ ) и диаметра ( $d$ ) стержней равны  $41 \pm 8 \text{ нм}$  и  $10.2 \pm 2 \text{ нм}$  соответственно. На вставке к рис.1,а приведена гистограмма распределения числа частиц  $\Delta N_i/\Delta r_i$  по осевым отношениям  $r_i$  со средним значением  $r = 4.03 \pm 0.7$ . Оптические свойства наностержней контролировались по спектрам экстинкции, измеренным на спектрофотометре UV-vis Specord 250 (Analytik, Йена, Германия) (рис.1,б). По измеренным значениям экстинкции  $A_{\text{ext}}$  образца в слое толщиной  $l$  определяли показатель экстинкции (в  $\text{см}^{-1}$ )  $\mu_{\text{ext}} = \ln 10(A_{\text{ext}}/l)$ . По данным рис.1,б длина волны продольного плазмонного резонанса составляет 820 нм, а показатель экстинкции в резонансе –  $8.16 \text{ см}^{-1}$ .

Показатели экстинкции концентрированных растворов наностержней, использованных в экспериментах *in vivo*, на длине волны плазмонного резонанса составляли примерно 46 и  $11.5 \text{ см}^{-1}$  (оптические плотности в кювете длиной 1 см равны 20 и 5 соответственно). Содержание золота в образцах биоткани определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС) на спектрофотометре Dual Atomizer Zeeman AA iCE 3500 (Thermo Scientific Inc., США). Для калибровки спектрометра использовали раствор  $\text{HAuCl}_4$  в  $\text{HCl}$  (0.1 М) или раствор коллоидного золота с известной его концентрацией. Во втором случае коллоидные частицы растворялись в царской водке ( $\text{HCl}:\text{HNO}_3 = 3:1$ ). Обе калибровочные процедуры давали сходные результаты. Концентрации золота в концен-

трированных суспензиях покрытых ПЭГ золотых наностержней с показателями экстинкции 46 и  $11.5 \text{ см}^{-1}$  были равны примерно 400 и 100 мкг/мл соответственно.

## 2.2. Схема экспериментов *in vivo*

В работе использовались женские особи линейных мышей Balb/c, полученные из питомника «Столбовая» РАН (Москва). К началу экспериментов их возраст составлял три месяца, а масса тела равнялась 20–22 г. До и в период экспериментов животные содержались в виварии в соответствии с «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей». Для исследования были сформированы две экспериментальные группы по 14 животных и две контрольные группы по 6 животных.

В качестве модели опухоли использовали асцитную карциному Эрлиха, которая прививалась всем мышам внутримышечно в левое бедро. Объем вводимой опухолевой суспензии был равен 0.2 мл с общим количеством клеток  $2 \times 10^6$ . На 14-й день после прививки средний объём опухоли составлял  $1.7 \pm 0.3 \text{ см}^3$ .

В экспериментах *in vivo* животным первой экспериментальной группы со сформированной опухолью в хвостовую вену вводили 0.4 мл суспензии наностержней с концентрацией золота 100 мкг/мл, а животным второй экспериментальной группы – аналогичный объём суспензии наностержней с концентрацией золота 400 мкг/мл. Животным первой и второй контрольных групп через хвостовую вену вводили 0.4 мл физиологического раствора. С учётом объёма введённых суспензий и среднего веса животных введённые дозы наночастиц по содержанию золота были равны 40 и 160 мкг, а средние удельные дозы введённого золота в расчёте на вес животного – 2 и 8 мг/кг соответственно.

Через сутки после внутривенного введения наночастиц проводились эксперименты по лазерному нагреву опухоли, а также симметрично расположенного участка здоровых тканей. Предварительно поверхность опухоли и участки, предназначенные для облучения, были эпили-

рованы. В качестве источника излучения использовали полупроводниковый лазер LIMO (Дортмунд, Германия) с длиной волны 810 нм и выходной мощностью до 30 Вт. Облучению подвергались животные обеих экспериментальных групп и одной контрольной. Вторая контрольная группа мышей не подвергалась никакому воздействию. Облучение проводилось в течение 5 мин при выходной мощности излучения с торца световода 1.2 Вт, расстояние от торца световода до объекта составляло 27 мм, площадь лазерного пятна была равна 0.3 см<sup>2</sup>.

Через час после нагрева опухолей половина животных из каждой экспериментальной группы была подвергнута эвтаназии с последующим забором образцов опухоли, мышечной ткани, селезёнки и печени, а вторая половина животных экспериментальных групп оставлена для наблюдения динамики развития опухоли и оценки выживаемости. Из каждой контрольной группы на контроль дожития оставляли по четыре мыши, а две мыши подвергались эвтаназии с забором образцов мышечной ткани, селезёнки и печени. В отобранных органах определяли накопление наностержней по содержанию золота методом ААС.

### 2.3. Измерение пространственного распределения температуры в экспериментах с суспензиями наностержней и *in vivo*

Исходные суспензии наностержней помещались в пробирки Эппендорфа и облучались полупроводниковым лазером на длине волны 810 нм. Эксперименты проводились при различных концентрациях наностержней, объём образца составлял 1.5 мл, плотность мощности непрерывного лазерного излучения была равна 1.2 Вт/см<sup>2</sup>. Пробирка закреплялась вертикально, а лазерное излучение подводилось по световоду сверху (рис.2,а). Расстояние между торцом волокна и поверхностью жидкости в пробирке составляло 3 см. Облучение проводили в течение 5 мин с регистрацией распределения температуры каждые 10 с.

По мере облучения пробирок с суспензиями наностержней осуществлялся неинвазивный мониторинг температуры с помощью тепловизора IRISYS 4010 (InfraRed Integrated System Ltd, Великобритания), находящегося на расстоянии 37 см от пробирки. Пространственное распределение температуры регистрировалось тепловизором, расположенным сбоку пробирки, в направлении, перпендикулярном пучку лазера (рис.2,б).

Облучение экспериментальных и контрольных групп животных проводили в соответствии с методикой, изло-

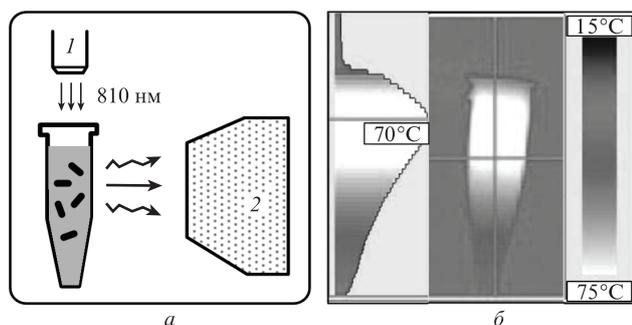


Рис.2. Схема экспериментов с суспензиями наностержней, помещёнными в пробирку Эппендорфа (а), и термограмма пространственного распределения температуры в этой пробирке (б): 1 – полупроводниковый лазер; 2 – тепловизор IRISYS 4010.

женной в п.2.2. Неинвазивный мониторинг температуры поверхности экспериментальных и контрольных участков опухолей и нормальных тканей выполняли с помощью тепловизора, как описано в [16, 25].

## 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Фототермические эффекты в суспензиях золотых наностержней

На рис.3 представлены распределения температуры вдоль осей пробирок с суспензиями золотых наностержней с концентрациями 8 и 100 мкг/мл. Пять измерений с интервалом 1 мин сделаны после включения лазера (до 5-й минуты) и три (до 8-й минуты) – после его выключения.

Из рис.3 видно что максимальная температура при концентрации 8 мкг/мл достигает 58°C, а при концентрации 100 мкг/мл – 76°C. Однако при большой concentra-

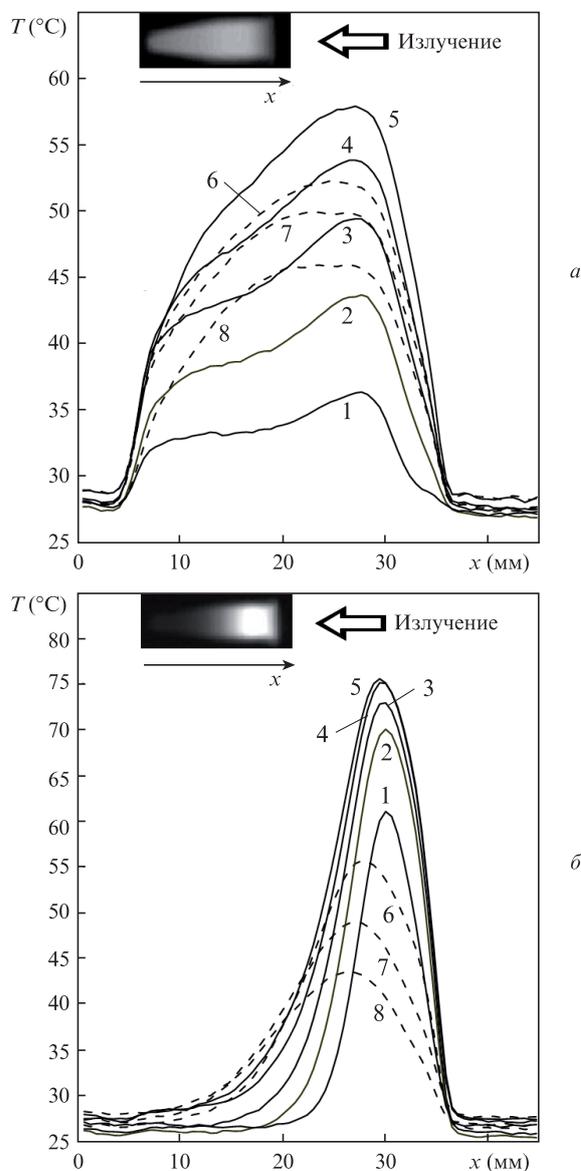


Рис.3. Распределения температуры  $T$  вдоль оси пробирок  $x$  при лазерном нагреве суспензий золотых наностержней с концентрациями 8 (а) и 100 мкг/мл (б). Цифры у кривых – время (в минутах) начала регистрации распределения температуры после включения и выключения лазера (лазер работал 5 мин).

ции наночастиц не удаётся равномерно нагреть весь облучаемый объём, т.к. лазерное излучение поглощается в области его входа в образец и не доходит до более глубоких слоёв суспензии. Фактически, верхний слой концентрированной суспензии представляет собой экран, в котором выделяется практически всё тепло, поглощённое наночастицами. Перенос тепла от верхних слоёв к нижним происходит довольно медленно, поэтому нагрев концентрированных суспензий в течение первых пяти минут происходит очень неоднородно. С другой стороны, для очень разбавленных суспензий выделение тепла было более равномерным по объёму, но незначительным из-за малого количества наночастиц. Таким образом, существует оптимальный диапазон концентраций, при которых весь облучаемый объём прогревается достаточно равномерно и эффективно. В данном эксперименте при различии концентраций наночастиц более чем в 10 раз, относительные приращения температуры различаются только на 20%. Полученные результаты важны для понимания возможных механизмов выделения тепла в условиях эксперимента *in vivo*. Ясно, например, что как малые, так и большие концентрации частиц в биоматериале не являются оптимальными для фототермолиза.

### 3.2. Биораспределение золотых наностержней

На рис.4 приведены диаграммы биораспределения золотых наностержней для двух доз введенного золота в расчёте на вес животного (2 и 8 мг/кг), которые соответствуют наиболее вероятному диапазону доз, используемых в экспериментах по биотоксичности наночастиц золота [23]. Следует, однако, иметь в виду, что по литературным данным [23] отсутствия токсичности можно ожидать при кратковременном (около недели) курсе введения частиц в ежедневной дозе  $\sim 0.5$  мг/кг. Таким образом, применяемые нами дозы несколько выше этой границы токсичности. С другой стороны, в успешном ПФТТ-эксперименте на мышках с привитыми опухолями [26] дозы наностержней были существенно выше (20 мг/кг).

Из представленных данных видно, что соотношение содержания золота во всех исследованных тканях при введении суспензий наностержней примерно соответствует соотношению введенных доз золота 1:4. В согласии с имеющимися литературными данными [23], концентрация частиц золота в печени и селезёнке почти на порядок больше, чем в опухоли, и составляет  $\sim 10\%$  от концентрации золота во вводимых суспензиях. Как и для сходной модели *in vivo* [37], наши данные показывают, что накопление золотых наностержней в селезёнке намного больше, чем в печени. Подчеркнем, что в результате селективного накопления наностержней содержание золота в печени ( $\sim 35$  мкг/г) и селезёнке ( $\sim 55$  мкг/г) существенно выше средней введённой дозы (8 мкг/г). Примерно такое же соотношение наблюдается и для меньшей введённой дозы (2 мкг/г). С учетом типичного среднего веса печени ( $\sim 1.1$  г) и селезёнки ( $\sim 100$  мг) мышей линии Balb/c [46] общее количество золота в этих органах составляет  $\sim 40$  мкг или 25% от общей введённой дозы 160 мкг. Этот результат находится в разумном согласии с данными группы T.Niidome [37] для золотых наностержней и другими литературными данными по биораспределению наночастиц золота [23]. Повышенное накопление золотых наностержней в печени и селезёнке обусловлено строением этих органов и физиологическими особенностями сосу-

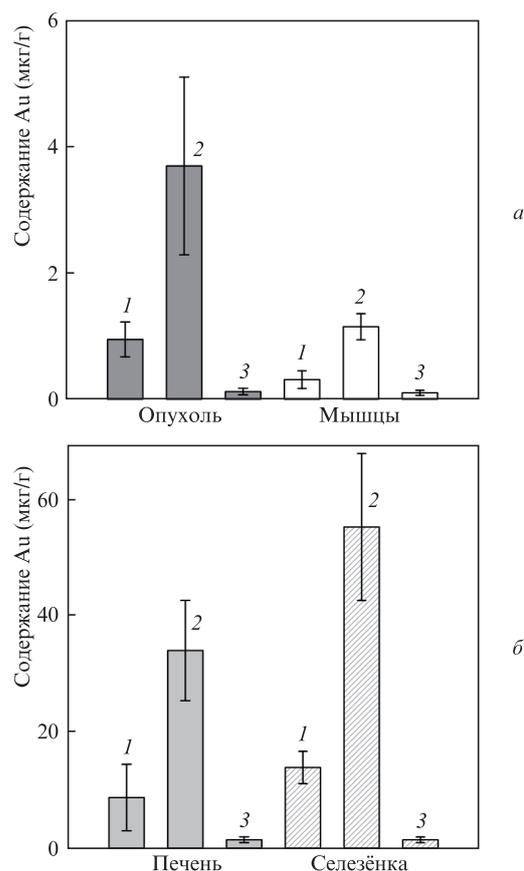


Рис.4. Биораспределения золотых наностержней в опухоли и мышцах (а), а также в печени и селезёнке (б) через сутки после внутривенного введения наночастиц в дозах 2 (1) и 8 мг/кг (2). Цифрой 3 обозначено соответствующее распределение при введении физиологического раствора вместо наночастиц.

дистой системы. В печени преобладают сосудистые капилляры фенестрированного типа, а в селезёнке имеются лакуны. Хотя накопление золота в селезёнке (в мкг/г) несколько выше, чем в печени, в целом абсолютное количество золота в печени больше из-за большей массы органа. Отметим также, что в работе [37] золотые наностержни в заметных количествах (примерно 50% от накопленных в печени) были обнаружены также в легких мышей.

Содержание золота в опухолевой ткани составляет  $\sim 1\%$  от его концентрации во вводимых суспензиях и превышает средние значения для здоровой мышечной ткани в три-четыре раза. Другими словами, содержание золота в расчёте на единицу массы опухоли равно примерно 1 и 4 мкг/г для введённых доз 2 и 8 мг/кг соответственно. Таким образом, даже при пассивном накоплении наночастиц без специальной их функционализации адресными биомолекулами создается вполне заметное накопление – около 50% от средней дозы введённых наночастиц. Полученные нами данные в целом согласуются с результатами работ по биораспределению наностержней при пассивном накоплении частиц [35, 37, 38, 47].

### 3.3. Фототермические эффекты при лазерном нагреве золотых наностержней *in vivo*

На рис.5 показаны двумерные распределения температуры на поверхности кожи мыши при лазерном нагреве через сутки после системного введения золотых нано-

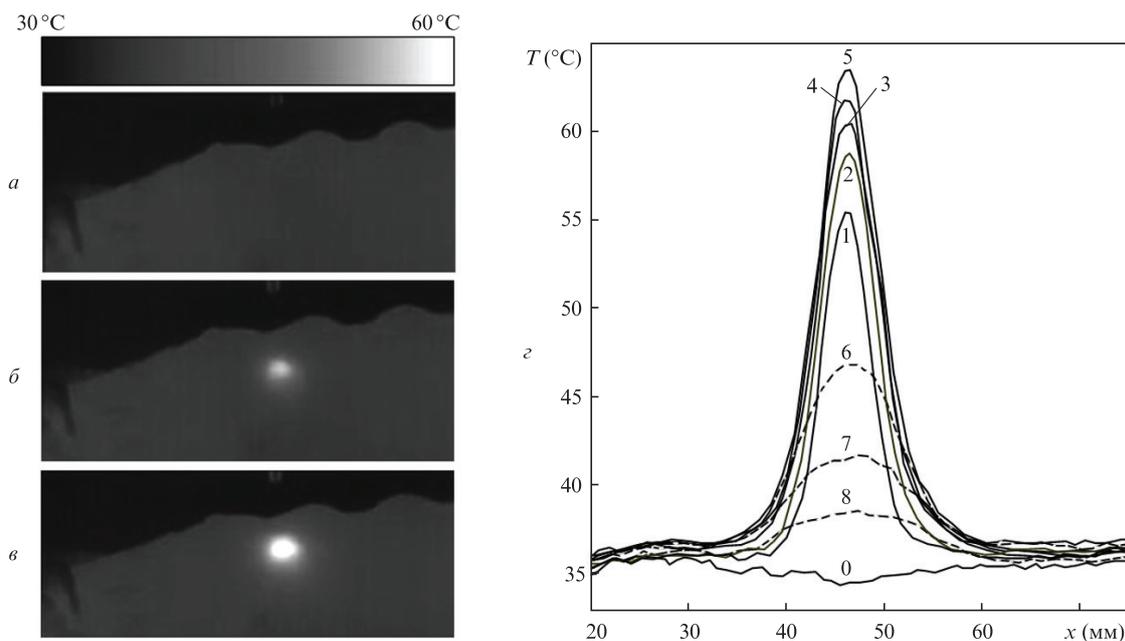


Рис.5. Двумерные распределения температуры на поверхности кожи мыши до облучения лазером (а), а также через 1 (б) и 5 мин (в) после начала облучения, полученные через сутки после системного введения наночастиц золота в дозе 8 мкг/г. На рис.5,б представлены распределения температуры  $T$  вдоль горизонтальной оси (проходящей через центр нагретой области). Цифры у кривых – время (в минутах) начала регистрации распределения температуры до облучения, после начала облучения и после выключения лазера на 5-й минуте.

стержней. Тепловизор при этих измерениях находился в одном и том же фиксированном положении.

Из рис.5 видно, что распределение температуры по лазерному пятну неоднородно, что связано с неоднородностью распределения плотности мощности падающего лазерного излучения и с процессами перераспределения тепла от нагретых областей к холодным. Эффективность лазерного нагрева определяется не только максимальной температурой в центре лазерного пятна, но и диаметром нагретой области, в которой температура превышает заданное граничное значение для гипертермии или термолеза. В данном эксперименте диаметр области, в которой температура превышала  $45^{\circ}\text{C}$ , составлял 7 мм через 1 мин после начала облучения и 11 мм через 5 мин. На рис.5,б представлены распределения температуры вдоль горизонтальной оси (проходящей через центр нагретой области), полученные с интервалом в 1 мин после начала облучения и после выключения лазера. Увеличение ширины температурного распределения обусловлено процессами термодиффузии. После выключения лазера происходит медленное, по сравнению с характерными временами нагрева, остывание участка кожи и уширение (выравнивание) температурного профиля.

На рис.6 приведены временные зависимости температуры поверхности экспериментальных и контрольных участков кожи, каждая кривая получена путем усреднения результатов для семи животных.

Даже в случае малой дозы введённых наностержней (2 мг/кг, рис.6,а) наблюдалось заметное различие в температуре опухолевой ткани и соседнего здорового участка.

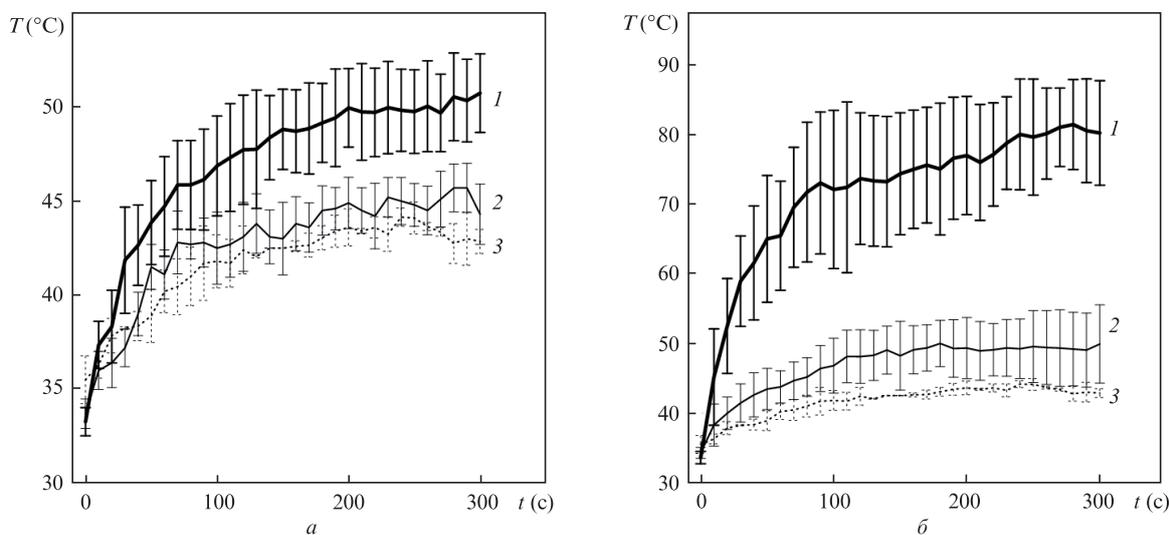


Рис.6. Кинетика лазерного нагрева опухолевой (1) и здоровой (2) тканей в области его максимума через сутки после внутривенного введения золотых наностержней в дозе 2 (а) и 8 мг/кг (б). Кривые 3 – кинетика максимального нагрева здоровой мышечной ткани без введения её наночастиц (контроль). Данные усреднены по экспериментальным и контрольным группам животных.

После установления стационарной температуры это различие составляло  $\sim 10^\circ\text{C}$ . Для контроля измерялась температура поверхности кожи в зоне опухоли и в зоне здоровых тканей без введения в них наночастиц. Значимых различий в температуре здоровых и опухолевых тканей без введения в них наночастиц выявлено не было. При внутривенном введении наностержней в малой дозе (2 мг/кг) температура нагретых мышечных тканей превышала контрольные значения примерно на  $5^\circ\text{C}$  за счёт установленного в экспериментах по биораспределению незначительного накопления частиц в здоровых мышечных тканях. Основное повышение температуры биоткани с введёнными в неё наночастицами происходит в первые 100 с лазерного нагрева, а затем скорость роста температуры значительно уменьшается.

Из рис.6,б видно, что в результате пассивного селективного накопления наностержней при внутривенном введении их в дозе 8 мг/кг имеет место сильное увеличение температуры опухоли (на  $\sim 30^\circ\text{C}$ ) по сравнению с температурой соседнего участка здоровых тканей у того же животного. Для этой дозы уже после одной-двух минут лазерного облучения температура опухоли достигала  $\sim 70^\circ\text{C}$ , в то время как для дозы 2 мг/кг максимальная стационарная температура была равна  $\sim 50^\circ\text{C}$ .

На рис.7 представлены зависимости увеличения (инкремента) температуры суспензий и опухолевой ткани (эксперимент *in vivo*) от концентрации наночастиц золота. Инкремент температуры был измерен после 5-й минуты облучения, как описано выше. В диапазоне концентраций 0–10 мг/мл температурный инкремент линейно зависит от концентрации наночастиц золота в суспензии (рис.7, вставка), а затем зависимость становится нелинейной и выходит на плато. Если учесть, что наностержни практически только поглощают, но не рассеивают свет, то качественно поведение кривой 1 на рис.7 согласуется с законом Бугера:  $I_{\text{abs}}/I_0 = 1 - \exp(-\mu_{\text{abs}}l)$ , где показатель поглощения суспензии  $\mu_{\text{abs}}$  пропорционален концентрации частиц.

Зависимость 2 на вставке к рис.7 соответствует системному введению суспензии наночастиц, полученной разбавлением препарата с концентрацией 400 мг/мл. Максимальная концентрация золота в опухолевой ткани сос-

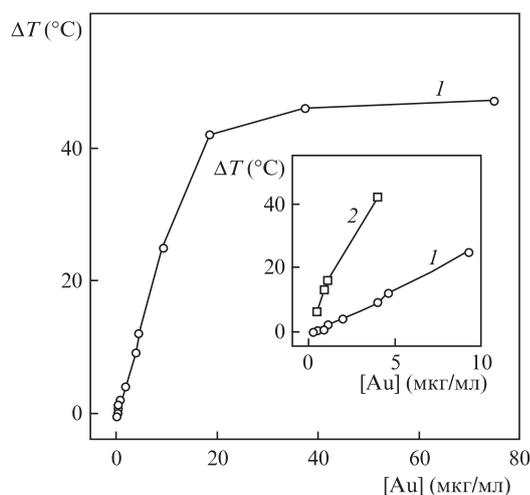


Рис.7. Зависимости температурного инкремента  $\Delta T$  от концентрации золотых наностержней в суспензии (1) и в опухолевой ткани (2) после облучения лазерным излучением (810 нм, 1 Вт/см<sup>2</sup>) в течение 5 мин.

тавляла  $\sim 4$  мкг/мл, т.е. находилась в диапазоне, соответствующем линейному росту инкремента температуры в экспериментах *in vitro*. Однако наблюдавшиеся температурные инкременты в ткани с введёнными в неё наночастицами на  $5-25^\circ\text{C}$  больше, чем в суспензии с той же концентрацией наночастиц. Возможные физические механизмы, приводящие к этому различию, обсуждаются в следующем разделе.

### 3.4. Моделирование лазерного нагрева биоткани с введёнными в неё наночастицами

По данным ААС концентрация наностержней в опухоли составляет не более 1% (4 мкг/мл) от исходной концентрации вводимых частиц 400 мкг/мл. Показатель экстинкции суспензии наностержней с концентрацией 4 мкг/мл равен  $\sim 0.2 \text{ см}^{-1}$  на длине волны плазмонного резонанса. Эксперименты по нагреву водных суспензий при таких концентрациях показали, что суспензии в пробирках нагреваются на  $5-10^\circ\text{C}$ , т.к. при столь малой объёмной доле частиц выделяемое ими тепло не может существенно нагреть весь объём в пробирке. С другой стороны, из рис.4, 6 и 7 следует, что опухолевая ткань со средним содержанием наночастиц  $\sim 4$  мкг/г нагревается очень эффективно: в среднем до  $80^\circ\text{C}$  за пять минут. Таким образом, имеется, на первый взгляд, очевидное противоречие между данными нагрева в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Возможные объяснения этого противоречия состоят в следующем. Во-первых, тепловизор регистрирует ИК излучение от поверхности объекта и соответственно определяет распределение температуры на поверхности, а не по всему объёму образца. Для биоткани поверхностный нагрев будет больше, чем для водной суспензии наночастиц, в особенности, если их распределение неоднородное, с большим накоплением частиц у поверхностных слоёв биоткани. Во-вторых, теплофизические свойства биоткани отличаются, конечно, от таковых для воды. В частности, комплекс сложных фототермических явлений, сопровождающих формирование пузырьков пара в водной среде при лазерном нагреве плазмонных наночастиц [48], сильно зависит от параметров внешней среды. В-третьих, в тканях наночастицы могут формировать агрегаты, в которых реализуется усиление фототермических эффектов за счёт электродинамического взаимодействия наночастиц на малых расстояниях [49].

Наконец, может иметь место оптический механизм усиления поглощения, связанный с многократным рассеянием. В отличие от воды, биоткань является сильно (многократно) рассеивающей средой. Для расчёта оптических свойств таких сред можно использовать как аналитические подходы на основе уравнения переноса, так и статистическое моделирование на основе дискретного представления о фотонах и описания процессов многократного рассеяния и поглощения методом Монте-Карло [50]. В рамках этого подхода принципиальное различие между прозрачной и сильно рассеивающей средой с одинаковой объёмной долей поглощающих частиц состоит в том, что во втором случае средняя длина пробега фотонов существенно меньше, чем в первом. Поэтому при прочих равных условиях в рассеивающей среде доля поглощённых фотонов за счёт переоблучения многократно рассеянными фотонами может быть больше, чем в прозрачной среде с тем же самым количеством поглощающих наночастиц. При этом важную роль играет также и

поглощение наночастицами диффузно рассеянного света за пределами падающего пучка. В прозрачной же среде тепло выделяется практически только в результате однократного поглощения излучения наночастицами в области пучка. В соответствии с дискретной моделью Монте-Карло в прозрачной среде поглощается только часть баллистических фотонов падающего пучка, в то время как в рассеивающей среде дополнительный вклад в выделение тепла даёт также поглощение многократно рассеянных фотонов во всём образце. Насколько нам известно, описанный выше механизм усиления поглощения за счёт многократного рассеяния никем не обсуждался применительно к проблемам ПФТТ, хотя эффекты многократного рассеяния в системах ткань–золотые наностержни рассматривались в связи с проблемой увеличения контраста в оптической когерентной томографии [51, 52].

Приведённое выше качественное объяснение иллюстрирует рис.8, на котором представлены данные расчёта методом Монте-Карло доли поглощённых фотонов для рассеивающего плоскопараллельного слоя толщиной 1 см с хаотически ориентированными золотыми наностержнями. Доля поглощённых фотонов  $R_{\text{abs}}$  рассчитывалась по формуле  $R_{\text{abs}} = 1 - T - R$ , где  $T$  – коэффициент пропускания слоя (учитывающий и коллимированное, и диффузное пропускание), а  $R$  – коэффициент диффузного отражения. Число прослеженных фотонов равнялось  $10^5$ . Рассеивающие свойства мышечной биоткани [53] с учетом её возможного просветления [54] моделировались рассеянием света ансамблем диэлектрических сфер в воде. Диаметр сфер составлял 600 нм, показатель преломления – 1.44, а их концентрация выбиралась соответствующей диапазону показателей экстинкции  $\mu_{\text{ext}} = 0-25 \text{ см}^{-1}$ . На длине волны 810 нм показатель экстинкции такой системы практически совпадает с показателем рассеяния  $\mu_{\text{sc}}$ .

Ансамбль золотых наностержней моделировался хаотически ориентированными цилиндрами с полусферическими основаниями и гауссовым распределением по осевым отношениям. Как показано в [45], эта модель хорошо описывает оптические свойства реальных образцов наностержней. Диаметр всех цилиндров одинаков и составляет 10 нм, их средняя длина – 40 нм, среднее осевое отно-

шение – 4, а ширина гауссова распределения по осевым отношениям равна 0.15. Эти параметры соответствуют исследованным в настоящей работе наночастицам с плазмонным резонансом на длине волны 810–820 нм. Если концентрация золота в единице объёма равна 1 мкг/мл (что соответствует концентрации наностержней  $N = 1.8 \times 10^{10} \text{ см}^{-3}$ ), то ансамбль модельных наночастиц имеет следующие оптические характеристики: средний показатель экстинкции  $\mu_{\text{ext}} = \mu_{\text{abs}} + \mu_{\text{sc}} = N C_{\text{ext}} = 0.0998 \text{ см}^{-1}$  ( $C_{\text{ext}}$  – интегральное сечение экстинкции); средний показатель поглощения  $\mu_{\text{abs}} = N C_{\text{abs}} = 0.09805 \text{ см}^{-1}$  ( $C_{\text{abs}}$  – интегральное сечение поглощения); среднее альbedo  $\bar{\omega} = \mu_{\text{sc}}/\mu_{\text{ext}} = 0.0175$ ; средняя индикатриса рассеяния практически совпадает с рэлеевской индикатрисой  $p(\theta) = (1 + \cos^2\theta)/2$ . Для другой концентрации золота показатели экстинкции и поглощения просто умножаются на эту концентрацию (в мкг/мл).

Из рис.8,а видно, что для слоя наностержней в воде с концентрацией, соответствующей показателю экстинкции  $0.4 \text{ см}^{-1}$  (практически равному показателю поглощения), доля поглощённых фотонов составляет 28.5%. Если то же самое количество наночастиц помещено в рассеивающую биоткань, то доля поглощённых фотонов возрастает до  $\sim 39\%$  при показателе рассеяния  $5-15 \text{ см}^{-1}$ . При малых показателях рассеяния результаты расчётов совпадают с результатами, полученными для наночастиц в воде, а при больших показателях рассеяния излучение в основном диффузно отражается (рассеивается) назад и практически не проникает в глубь слоя. Этим объясняется наличие широкого оптимального диапазона показателей экстинкции (рассеяния) биоткани ( $5-15 \text{ см}^{-1}$ ), при которых доля поглощённых фотонов приближается к 40%, а также снижение доли поглощённых фотонов при больших показателях рассеяния биоткани ( $\mu_{\text{sc}} > 60 \text{ см}^{-1}$ ).

На рис.8,б представлены результаты компьютерного расчёта доли поглощённых фотонов  $R_{\text{abs}}$  в зависимости от концентрации наночастиц золота в воде и в модельной биоткани. В соответствии со сказанным выше, при малой концентрации наночастиц величина  $R_{\text{abs}}$  пропорциональна их концентрации (вставка на рис.8,б), причем  $R_{\text{abs}}$  в модельной биоткани выше, чем в воде, если концентрация частиц менее 20 мкг/мл. При больших концентрациях

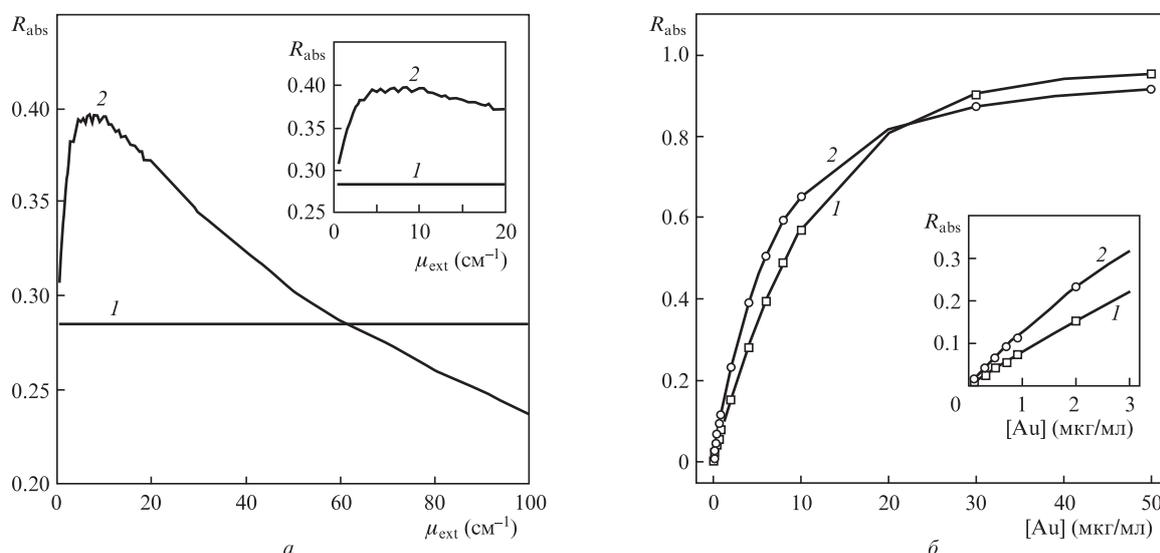


Рис.8. Рассчитанные методом Монте-Карло зависимости доли поглощённых фотонов от показателя экстинкции рассеивающей биоткани при концентрации золотых наностержней 4 мкг/мл (показатель поглощения  $0.4 \text{ см}^{-1}$ ) (а) и от концентрации золотых наностержней при показателе рассеяния биоткани  $10 \text{ см}^{-1}$  (б) для суспензии наностержней в воде (1) и для биоткани с введёнными в неё наночастицами (2).

наблюдается обратный эффект: поглощение суспензии частиц превышает поглощение наночастиц в модельной ткани. Это обусловлено тем, что при высокой концентрации наночастиц излучение не проникает в глубоко лежащие слои, а поглощается и обратно рассеивается в поверхностных слоях.

Таким образом, компьютерное моделирование качественно подтверждает вклад эффекта многократного рассеяния в увеличение поглощения наночастиц. Однако этот вклад ограничен диапазоном показателей рассеяния биоткани, меньших  $60 \text{ см}^{-1}$ . Кроме того, проведённые расчёты и данные предварительных экспериментов показывают, что увеличением поглощения в рассеивающей среде нельзя объяснить сильное различие в нагреве тканей и суспензий. Другое возможное объяснение состоит в том, что концентрация наночастиц золота на периферии опухоли выше, чем в объёме. Подобный эффект наблюдался в работе [55] при гистологических исследованиях накопления золотосеребряных наноклеток в опухоли. Поэтому увеличение поверхностной температуры, регистрируемое термографом, может быть обусловлено увеличением выделяемого тепла за счёт большей периферийной концентрации частиц. Более детальный анализ данных рис.7 требует дополнительных исследований, включающих моделирование тепловых эффектов и измерения объёмного распределения температуры, что выходит за рамки данной статьи.

### 3.5. Изменение размеров опухоли при ПФТТ

На рис.9 представлены зависимости объёма опухоли у мышей от времени, прошедшего после проведения фототермотерапии. Лазерное облучение опухолей при системном введении золотых наностержней в максимальной дозе  $8 \text{ мкг/г}$  привело к существенному уменьшению размеров опухоли спустя 9–12 дней после ПФТТ. Сильное повышение температуры в этом режиме ПФТТ привело к термодеструкции (термолизу) опухолей. Однако на периферии опухолей остались неповреждённые участки, ставшие источником последующей рецидивии. В случае меньшей дозы ( $2 \text{ мкг/г}$ ) был реализован режим гипертермии, и замедление роста опухолей было минимальным по сравнению с контрольными группами. У животных контрольной группы при лазерном воздействии имела место даже

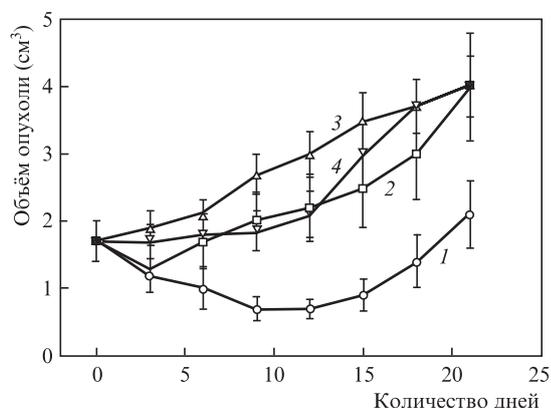


Рис.9. Зависимости среднего объёма опухоли от количества дней, прошедших после проведения ПФТТ, для экспериментальных групп при дозе вводимых золотых наностержней  $8$  (1) и  $2 \text{ мкг/г}$  (2), а также для контрольных групп при лазерном облучении без введения наночастиц (3) и без лазерного облучения (4).

стимуляция роста опухолей при температуре  $\sim 40^\circ\text{C}$ , что согласуется с известными литературными данными [1, 2].

## 4. Заключение

Основные результаты данной работы состоят в следующем:

1. Покрытые ПЭГ наностержни размером  $40 \times 10 \text{ нм}$  через сутки после системного введения их мышам с привитой карциномой Эрлиха накапливаются в опухоли в количестве  $\sim 4 \text{ мкг/г}$  (1% от концентрации вводимого препарата). Через сутки после введения концентрация наночастиц максимальна в селезёнке, несколько меньше в печени и превышает концентрацию наночастиц в опухоли в 10–15 раз. Содержание золота в здоровой мышечной ткани примерно в 3–4 раза меньше, чем в опухоли. В согласии с опубликованными данными [23, 26, 35, 47], наши результаты подтверждают хороший контраст накопления покрытых ПЭГ наностержней только за счёт пассивного механизма накопления (EPR-эффект [28]).

2. Слишком высокие концентрации наночастиц в опухоли могут приводить к нежелательному эффекту поглощения света в поверхностных слоях и крайне неравномерному выделению тепла. С клинической точки зрения это ограничивает возможности применения интерстициального способа введения наночастиц золота в опухоль при ПФТТ.

3. При одинаковой средней концентрации наночастиц в суспензиях и в опухолевых тканях лазерный нагрев тканей (по данным ИК термографии) происходит более эффективно. Это увеличение оптического нагрева в тканях с введёнными в них наночастицами может быть связано с комплексом причин, включая различие в теплофизических параметрах воды и биоткани, агрегацию наночастиц в тканях и влияние многократного рассеяния в биоткани.

4. Накопление золотых наностержней в количестве  $5\text{--}10 \text{ мкг/г}$  в ткани опухоли позволяет снизить плотность мощности лазерного облучения до  $1\text{--}2 \text{ Вт/см}^2$ , что примерно в два раза меньше, чем в случае накопления наночастиц (4  $\text{Вт/см}^2$  [14]). С учётом этих данных можно предположить, что золотосеребряные наноклетки также могут быть эффективными термосенсибилизаторами для ПФТТ [55].

5. По нашему мнению, слабая гипертермия с использованием плазмонных наночастиц неэффективна для лечения опухолей. Более оптимальным является подход, направленный на достижение термодеструкции (термолиза) опухолей за счёт кратковременного быстрого нагрева их до температуры деструкции тканей. В наших экспериментах даже в случае значительного фототермического воздействия на опухолевую ткань её полная резорбция не достигалась, а начиная с 12-го дня после ПФТТ рост опухоли возобновлялся. Эти результаты лишней раз подчеркивают необходимость использования фототермотерапии в комбинации с химиотерапией и лучевой терапией с целью повышения эффективности комплексного лечения.

Авторы признательны А.Н.Башкатову (Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского) за обсуждение оптических свойств биотканей и моделирования их методом Монте-Карло.

Работа была частично поддержана РФФИ, Программами Президиума РАН «Фундаментальные основы тех-

нологий наноструктур и наноматериалов» и «Фундаментальные науки – медицине», ФЦП «Научные и педагогические кадры инновационной России» (контракты 14.740.11.260), а также грантами Президента РФ для поддержки молодых кандидатов наук МК-1057.2011.2 и Правительства РФ для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования.

- Habash R.W., Bansal R., Krewski D., Alhafid H.T. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **35**, 37 (2007).
- Goldberg S.N., Gazelle G.S., Mueller P.R. *AJR Am. J. Roentgenol.*, **174**, 323 (2000).
- Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *Lasers Med. Sci.*, **23**, 217 (2008).
- Dreaden E.C., Mackey M.A., Huang X., Kang B., El-Sayed M.A. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 3391 (2011).
- Pitsillides C.M., Joe E.K., Wei X., Anderson R.R., Lin C.P. *Biophys. J.*, **84**, 4023 (2003).
- 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. U.S.A.*, **100**, 13549 (2003).
- Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **38**, 504 (2008).
- Boisselier E., Astruc D. *Chem. Soc. Rev.*, **38**, 1759 (2009).
- Khlebtsov N.G., Dykman L.A. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer.*, **111**, 1 (2010).
- Hirsch L.R., Gobin A.M., Lowery A.R., Tam F., Drezek R.A., Halas N.J., West J.L. *Ann. Biomed. Eng.*, **34**, 15 (2006).
- Skrabalak S.E., Au L., Li X., Xia Y. *Nat. Protoc.*, **2**, 2182 (2007).
- Huang X., Neretina S., El-Sayed M.A. *Adv. Mater.*, **21**, 4880 (2009).
- Ratto F., Matteini P., Centi S., Rossi F., Pini R. *J. Biophotonics*, **4**, 64 (2011).
- Lal S., Clare S.E., Halas N.J. *Acc. Chem. Res.*, **41**, 1842 (2008).
- Bardhan R., Lal S., Joshi A., Halas N. *Acc. Chem. Res.*, **44**, 936 (2011).
- Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G., Maksimova I.L., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.*, **14**, 021016 (2009).
- Schwartz J.A., Shetty A.M., Price R.E., Stafford R.J., Wang J.C., Uthamanthil R.K., Pham K., McNichols R.J., Coleman C.L., Payne J.D. *Cancer Res.*, **69**, 1659 (2009).
- Day E.S., Thompson P.A., Zhang L., Lewinski N.A., Ahmed N., Drezek R.A., Blaney S.M., West J.L. *J. Neurooncol.*, **104**, 55 (2010). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00848042>.
- Chen J., Wang D., Xi J., Au L., Siekkinen A., Warsen A., Li Z.Y., Zhang H., Xia Y., Li X. *Nano Lett.*, **7**, 1318 (2007).
- Kim C., Cho E.C., Chen J., Song K.H., Au L., Favazza C., Zhang Q., Cogley C.M., Gao F., Xia Y., Wang L.V. *ACS Nano*, **4**, 4559 (2010).
- Xia Y., Li W., Cogley C.M., Chen J., Xia X., Zhang Q., Yang M., Cho E.C., Brown P.K. *Acc. Chem. Res.*, **44**, 914 (2011).
- Khlebtsov N.G., Dykman L.A. *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 1647 (2011).
- Cole J.R., Mirin N.A., Knight M.W., Goofrich G.P., Halas N.J. *J. Phys. Chem. C*, **113**, 12090 (2009).
- Хлебцов Б.Н., Ханадеев В.А., Максимова И.Л., Терентюк Г.С., Хлебцов Н.Г. *Российские нанотехнологии*, **5**, 54 (2010).
- Von Maltzahn G., Park J.H., Agrawal A., Bandaru N.K., Das S.K., Bhatia S.N. *Cancer Res.*, **69**, 3892 (2009).
- Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov B.N., Kogan B.Ya., Akchurin G.G., Shantrocha A.V., Maksimova I.L., Khlebtsov N.G., Tuchin V.V. *J. Biophotonics*, **2**, 292 (2009).
- Iyer A.K., Khaled G., Fang J., Maeda H. *Drug Discovery Today*, **11**, 812 (2006).
- Llevot A., Astruc D. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 242 (2012).
- Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115 (2006).
- Takahashi H., Niidome T., Nariai A., Niidome Y., Yamada S. *Chem. Lett.*, **35**, 500 (2006).
- Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Hansen M.N., Cheng J.-X., Wei A. *Nanomedicine*, **2**, 125 (2007).
- Kennedy L.C., Bickford L.R., Lewinski N.A., Coughlin A.J., Hu Y., Day E.S., West J.L., Drezek R.A. *Small*, **7**, 169 (2011).
- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2256 (2012).
- Kogan B.Y., Andronova N.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Rudoy V., Dement'eva O., Sedykh E., Bannykh L. *NSTI-Nanotech. Nanotechnology*, **2**, 65 (2008).
- Sirotkina M.A., Elagin V.V., Shirmanova M.V., Bugrova M.L., Snopova L.B., Kamensky V.A., Nadochenko V.A., Denisov N.N., Zagaynova E.V. *J. Biophotonics*, **3**, 718 (2010).
- Akiyama Y., Mori T., Katayama Y., Niidome T. *J. Controlled Release*, **139**, 81 (2009).
- Wang L., Li Y.F., Zhou L., Liu Y., Meng L., Zhang K., Wu X., Zhang L., Li B., Chen C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**, 1105 (2010).
- Li Z., Huang P., Zhang X., Lin J., Yang S., Liu B., Gao F., Xi P., Ren Q., Cui D. *Mol. Pharmaceutics*, **7**, 94 (2010).
- Kawano T., Niidome Y., Mori T., Katayama Y., Niidome T. *Bioconjugate Chem.*, **20**, 209 (2009).
- Dickerson E.B., Dreaden E.C., Huang X., El-Sayed I.H., Chu H., Pushpanketh S., McDonald J.F., El-Sayed M.A. *Cancer Lett.*, **269**, 57 (2008).
- Максимова И.Л., Акчурин Г.Г., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Акчурин Г.Г. мл., Ермолаев И.А., Скапцов А.А., Ревзина Е.М., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г. *Квантовая электроника*, **38**, 536 (2008).
- Richardson H.H., Carlson M.T., Tandler P.J., Hernandez P., Govorov A.O. *Nano Lett.*, **9**, 1139 (2009).
- Ratto F., Matteini P., Cini A., Centi S., Rossi F., Fusi F., Pini R. *J. Nanopart. Res.*, **13**, 4337 (2011).
- Khlebtsov B., Khanadeev V., Pylaev T., Khlebtsov N. *J. Phys. Chem. C*, **115**, 6317 (2011).
- Freund Y.R., Riccio E.S., Phillips S.J., Dousman L., MacGregor J.T. *Toxicol. Sci.*, **42**, 91 (1998).
- Niidome T., Yamagata M., Okamoto Y., Akiyama Y., Takahishi H., Kawano T., Katayama Y., Niidome Y. *J. Controlled Release*, **114**, 343 (2006).
- Lukianova-Hleb E., Hu Y., Latterini L., Tarpani L., Lee S., Drezek R.A., Hafner J.H., Lapotko D.O. *ACS Nano*, **4**, 2109 (2010).
- Khlebtsov B.N., Zharov V.P., Melnikov A.G., Tuchin V.V., Khlebtsov N.G. *Nanotechnol.*, **17**, 5167 (2006).
- Wang L.-H., Jacques S.L., Zheng L.-Q. *Comput. Meth. Prog. Bio.*, **47**, 131 (1995).
- Oldenburg A.L., Hansen M.N., Zweifel D.A., Wei A., Boppert S.A. *Opt. Express*, **14**, 6724 (2006).
- Troutman T.S., Barton J.K., Romanowski M. *Opt. Lett.*, **32**, 1438 (2007).
- Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **4**, 9 (2011).
- Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2007, PM 166).
- Chen J., Glaus C., Laforest R., Zhang Q., Yang M., Gidding M., Welch M.J., Xia Y. *Small*, **6**, 811 (2010).