ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ РАДИОТЕХНИКИ И ЭЛЕКТРОНИКИ
ИМ. В.А. КОТЕЛЬНИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Денисов Роман Андреевич

НЕТЕПЛОВОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ МОЩНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИМПУЛЬСОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДЫ

Специальность 1.3.4. – Радиофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
академик РАН, профессор, д.ф.-м.н.
Черепенин В.А.

Москва
2026 г.

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ …….. 4
Глава 1. Обзор литературы по воздействию мощными электромагнитными импульсами на биологические среды …… 15
1.1. Физика взаимодействия с биологическими структурами..... 15
1.1.1. Теория электропорации в клеточных мембранах..... 15
1.1.2. Модели электропорации 23
1.1.3. Методы молекулярной динамики 25
1.1.4. Закон подобия для электрических импульсов..... 27
1.1.5. Влияние параметров импульсов при воздействии 28
1.1.6. Температурные эффекты воздействия..... 30
1.1.7. Дальнейшие направления исследований..... 32
1.1.8. Тенденции по укорочению импульсов 34
1.2. Экспериментальные методы и техника для исследования эффектов воздействия ультракоротких импульсов 35
1.2.1. Принципы и способы генерации импульсов..... 35
1.2.2. Способы подачи электромагнитных импульсов на объект.... 37
1.2.3. Регистрация мощных ультракоротких импульсов 44
1.3. Биологические эффекты при воздействии электрическими импульсами 48
1.3.1. Механизмы клеточной гибели при воздействии 48
1.3.2. Прочие эффекты воздействия..... 49
1.3.3. Медицинские применения за рубежом и в России 50
Глава 2. Технология эксперимента и теоретические исследования нетеплового воздействия мощными электромагнитными импульсами на биологические среды ……..…... 53
2.1. Описание схемы экспериментальной установки..... 53
2.2. Применение метода эквивалентных схем 59
2.2.1. Эквивалентная радиофизическая схема объекта в экспериментах *in vitro*..... 59

2.2.2. Эквивалентная радиофизическая схема объекта в экспериментах *in vivo* 62
2.3. Численная оценка переходных процессов в эквивалентных радиофизических схемах объектов 64
2.3.1. Моделирование переходных процессов и их численная оценка в экспериментах *in vitro*..... 64
2.3.2. Моделирование переходных процессов и их численная оценка в экспериментах *in vivo*..... 69
2.3.3. Влияние емкости подложки в радиофизической эквивалентной схеме эксперимента *in vivo* 71
2.4. Оценка физических величин для случая электропорации в клеточной мембране 73
2.5. Оценка нетеплового эффекта воздействия мощными импульсами на биологические объекты в экспериментах..... 77
Глава 3. Проведение экспериментов по нетепловому воздействию мощными электромагнитными импульсами на биологические среды……..... 81
3.1. Эксперименты *in vitro*..... 81
3.1.1. Материалы и методы 81
3.1.2. Экспериментальные результаты 84
3.2. Эксперименты *in vivo*..... 90
3.2.1. Материалы и методы 90
3.2.2. Экспериментальные результаты 96
3.3. Основные экспериментальные результаты и их обсуждение 112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ …….. 115
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ ……. 117
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ …….. 118
БЛАГОДАРНОСТИ ……...133

ВВЕДЕНИЕ

Диссертационная работа посвящена исследованию особенностей и эффектов нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами на биологические среды в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Актуальность темы исследования и степень её разработанности. Одним из наиболее перспективных направлений исследований в области применения электромагнитного излучения является изучение эффектов, которые такое излучение оказывает на биологические среды. Подобные исследования велись достаточно давно: так, например, в ИРЭ АН СССР велись под руководством академика Н.Д. Девяткова работы по воздействию СВЧ-излучения миллиметрового диапазона на человека [1–3]. Интересные результаты были получены научными группами О.В. Бецкого, В.Я. Кислова [4–6]. Основное внимание в этих работах уделялось воздействию маломощного непрерывного излучения различных частотных диапазонов на специально выбранные области тела человека. В последние годы активно ведутся работы по воздействию высоковольтными (напряжённость электрического поля 10 кВ/см и выше) ультракороткими (длительность 1 мс и ниже) электромагнитными импульсами на среды органического происхождения.

В зарубежной литературе указывается, что такие импульсы вызывают в биологических клетках обратимую или необратимую электропорацию (явление увеличения проницаемости клеточной мембраны при образовании в ней пор под влиянием электрического поля высокой амплитуды), благодаря чему инициируются различные механизмы клеточной гибели. Исследуется возможность применения этого метода в клинической медицине, в частности, для терапии онкологических заболеваний, которые остаются одной из самых распространённых причин заболеваемости и смертности во всём мире: так, в 2022 году зафиксировано около 20 миллионов случаев рака с 9,7 миллионов случаев смертельных исходов [7].

Тем не менее, есть основания полагать, что при обработке биологических клеток мощными ультракороткими видеоимпульсами возможна не только электропорация, но и другие эффекты, связанные прежде всего с нетепловым воздействием. Особенностью является то, что характерное время закрытия пор клеточной мембраны имеет один порядок с длительностью подаваемого наносекундного импульса (в то время как в случае обратимой электропорации характерное время закрытия пор значительно больше, от единиц миллисекунд [8] и секунд [9] до нескольких минут [10]). В связи с этим данная работа является логическим продолжением вышеуказанных исследований Н.Д. Девяткова.

Цель и задачи диссертационной работы. Общей целью настоящей работы являются экспериментальные исследования нетеплового воздействия мощных электромагнитных импульсов наносекундной длительности на различные среды биологической природы. В отличие от указанной ранее методики электропорации, где важным элементом являются обратимые или необратимые микропробои (повреждения) среды, в представляемой работе предпринимаются меры к предотвращению микроразрядов, к которым относится, в частности, применение импульсов короткой (наносекундной и менее) длительности. Отметим, что в этом случае воздействие может достигать ядра клетки.

Систематические исследования в более широком плане по применению нетеплового воздействия мощного электромагнитного излучения на различные среды были начаты в ИРЭ по инициативе и поддержке академика Ю.В. Гуляева. В диссертации представлены следующие направления работ.

1. Разработка радиофизических схем для рассмотрения воздействия на биологические объекты (микропланшет с клеточным раствором, бедро лабораторной мыши с привитой опухолью).

2. Анализ переходных процессов в полученных радиофизических схемах и численная оценка характерных физических величин.

3. Оценка воздействия наносекундных импульсов на разные биологические тест-системы в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*, в частности, противоопухолевого эффекта.

4. Экспериментальное установление связи между эффективностью воздействия наносекундными импульсами и набором физических параметров воздействия с целью определения оптимальных режимов обработки биологических объектов.

Научная новизна диссертационной работы. В настоящее время эффекты электромагнитных импульсов, которые проявляются при воздействии ими на биологические ткани, достаточно хорошо изучены для диапазонов милли- и микросекундной длительности. Как подчёркивается зарубежными исследователями в их работах (например, [11, 12]), существует тенденция на дальнейшее укорочение длительности импульсов. В связи с этим интерес для учёных представляет диапазон более коротких длительностей импульсов, в частности, наносекундных и субнаносекундных. Подчеркнём также, что исследования на эту тему последние 10 лет активно развиваются за рубежом [13], однако сосредоточены в основном на попытках обоснования и объяснения механизмов электропорации без какого-либо указания на нетепловое воздействие.

В России данная тема развита в значительно меньшей степени, чем за рубежом, и большинство работ, опубликованных по рассматриваемой теме, носят медицинский характер. Значительное число отечественных исследований сосредоточено на терапии онкологических заболеваний (как отдельно, так и в совокупности с другими средствами), где используется исключительно необратимая электропорация [14–17]. Стоит также отметить исследования, проведённые в Томском государственном университете, где в экспериментах *in vitro* изучалось сочетанное применение микроволнового радиоимпульсного воздействия с химическим препаратом [18].

Данная работа направлена на получение новых знаний о противоопухолевом эффекте нетеплового воздействия наносекундными электрическими видеоимпульсами на онкологические образования. Отличительной особенностью данной работы является использование радиофизических методов исследования как к процессу постановки экспериментов, так к их анализу. Отметим, что для воздействия применяются видеоимпульсы, у которых отсутствует частота заполнения, однако разработанная методика применима и в других случаях.

Также подчеркнём, что в работе используется тот же диапазон значений напряжённости поля, что и в работах за рубежом [19–23], однако отличается длительность импульсов (в наших экспериментах меньше на 1-2 порядка) и частота их следования (в наших экспериментах больше на 1-2 порядка), а также используются другие опухолевые модели. Наконец, представлены результаты экспериментов *in vivo* на лабораторных мышах с привитыми опухолями различного генеза, в то время как работы по подобному методу воздействия как в России, так и за рубежом проводились в основном на растворах клеток.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования в работе является радиофизическая система воздействия мощных электромагнитных видеоимпульсов наносекундной длительности, подаваемых с высоковольтного генератора на исследуемый образец биологической природы. Что касается основных экспериментальных материалов, ими в работе являлись различные биологические тест-системы, использованные в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

В экспериментах *in vitro* импульсное воздействие производилось на пластиковые микропланшеты с клеточным раствором внутри. Микропланшет представляет собой коробку высотой 16,5 мм, внутри которой с шагом 9 мм расположены 96 цилиндрических лунок (высота и диаметр каждой лунки – 10,5 мм и 6,5 мм соответственно). В центре микропланшета выбирается матрица 5×5 лунок, которая заполняется клеточным раствором – эти лунки в установке целиком накрываются верхним электродом. В качестве опухолевой модели в растворе использовались клетки мышиной карциномы легкого Льюиса (LLC),

культивированные при 37ºС в CO_2-инкубаторе в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

В экспериментах *in vivo* импульсное воздействие оказывалось на лабораторных мышей с различными привитыми опухолями в области бёдер. Для воздействия были выбраны мыши-гибриды первого поколения F1 (CBA × C57Bl/6), самки (категории MD) и мыши линии C57Bl/6, самки (категории SPF); возраст мышей составлял 8 – 10 недель. Для помещения в экспериментальную установку мыши фиксировались на специальных сертифицированных подстилах REHOFIX МК 2000 из оргстекла. В качестве опухолевых моделей использовались саркома мягких тканей мыши S37 и карцинома легкого Льюиса (LLC): взвеси опухолевых тканей были инокулированы мышам под кожу на наружную поверхность бедра в объеме 0,1 мл. Исследования проводили у мышей на 7 – 9 день роста опухолей, размер которых на начало воздействия составлял: 130 ± 20 мм^3 для саркомы S37 и 120 ± 20 мм^3 – для карциномы LLC.

Теоретическая и практическая значимость. Представленный в данной работе массив экспериментальных результатов, полученный при проведении опытов на реализованной схеме установки, подтверждает данные о нетепловом воздействии мощными наносекундными импульсами на онкологические образования. Благодаря данным результатам появляется возможность установить конкретные режимы нетеплового воздействия электромагнитных импульсов с оптимальными параметрами, имеющие биологически значимое разрушительное влияние на опухоли и не несущие вреда для здоровой ткани. Эти режимы воздействия могут стать стартовой точкой в дальнейшей отработке метода для получения более эффективных результатов, подразумевающих больший процент разрушения опухолевых клеток в области воздействия. Таким образом, практическая значимость работы заключается в разработке метода радиофизического воздействия на биологические объекты.

Методология и методы исследования. В работе производится теоретический и экспериментальный анализ влияния электромагнитного импульсного нетеплового воздействия на различные биологические объекты.

Для теоретического рассмотрения используется метод эквивалентных схем, так как характерные длины волн много больше объекта воздействия. Для каждого из объектов (микропланшет с биологическим образцом в экспериментах *in vitro*, лабораторная мышь на подложке из оргстекла в экспериментах *in vivo*) разрабатывается радиофизическая эквивалентная схема. Затем для эквивалентных схем производится численная оценка характерных физических величин и изменения формы импульса на нагрузке.

Для экспериментального рассмотрения используются в основном методы, хорошо известные в биологических и медицинских применениях. В случае клеточных растворов в экспериментах *in vitro* рассматривалась процентная мера торможения роста (ингибирования пролиферации) клеточной культуры. В случае мышей с привитыми опухолями в экспериментах *in vivo* основной характерной величиной был процент торможения роста опухоли (ТРО).

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанный метод нетеплового воздействия мощными электромагнитными импульсами (с амплитудой порядка напряжённости электрического поля на мембране клетки) на биологические среды с опухолевыми клетками оказывает положительный противоопухолевый эффект, зависящий от радиофизических параметров воздействия, таких как амплитуда, частота повторения импульсов и общее количество импульсов.
2. Разработанная экспериментальная установка обеспечивает нетепловые режимы воздействия мощными электромагнитными импульсами *in vitro* и *in vivo*, которые инициируют торможение роста опухолевых клеток.

3. Инициация торможения роста опухолевых клеток наблюдается в заданных границах параметров, которые определяются с помощью разработанного метода нетеплового воздействия мощными электромагнитными импульсами.

Личный вклад автора. Экспериментальная установка, на которой производилось воздействие мощными наносекундными импульсами *in vitro* и *in vivo*, была разработана, собрана и настроена соискателем при содействии научного руководителя, академика РАН Черепенина В.А., а также к.ф.-м.н. Вдовина В.А. и коллектива лаборатории.

Лично соискателем совместно с коллегами по лаборатории проводились все эксперименты по непосредственному воздействию на биологические объекты, предоставленные научными сотрудниками филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (филиал МНИОИ им. П.А. Герцена). Соискатель также принимал участие в анализе и структуризации результатов обработки экспериментальных данных, производившейся сотрудниками НМИЦ, а также интерпретировал полученные результаты в виде графиков. Постановка задачи, обсуждение и интерпретация результатов осуществлялись совместно с научным руководителем.

Численное моделирование радиофизических схем в программе OrCAD PSpice было произведено лично соискателем. Графическая обработка полученных результатов в программе OriginPro также производилась автором.

Поиск и анализ актуальных работ по указанной тематике также выполнялся соискателем. Соискателем также были сформулированы научная новизна, положения и выводы по диссертации.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные идеи и положения диссертационной работы изложены в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН по специальности 1.3.4. Радиофизика. Из них – 1 статья

в зарубежных научных изданиях, входящая в систему цитирования Scopus, 2 статьи – в научных журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК по соответствующей специальности, 3 статьи – в научных журналах, входящих в Белый список ВАК (уровень 1), 5 статей – в научных журналах, индексируемых базой данных RSCI:

1. В. А. Вдовин, ***Р. А. Денисов***, С. А. Сапецкий, В. А. Черепенин. Технология экспериментов нетеплового воздействия мощных электромагнитных импульсов на естественные и искусственные среды. // Радиотехника и электроника. – 2023. – Т. 68 – № 9. – С. 910–916. DOI: 10.31857/S0033849423090267. (**Уровень 1 Белого списка ВАК, RSCI**)
   Переводная версия: V. A. Vdovin, ***R. A. Denisov***, S. A. Sapetskii, V. A. Cherepenin. Technology of Experiments of Non-Thermal Effect of Powerful Electromagnetic Pulses on Natural and Artificial Environments //Journal of Communications Technology and Electronics. – 2023. – V. 68. – №. 9. – P. 995-1001. DOI: 10.1134/S1064226923090267. (**Scopus**)
2. В.А. Вдовин, ***Р.А. Денисов***, С.А. Сапецкий, В.А. Черепенин. Особенности экспериментов по воздействию интенсивных ультракоротких электрических импульсов на биоподобные среды. // Журнал радиоэлектроники. – 2024. – №. 9. DOI: 10.30898/1684-1719.2024.9.6 (**Перечень ВАК, RSCI, РИНЦ**)
3. В.А. Вдовин, Н.Б. Морозова, А.А. Панкратов, С.А. Сапецкий, ***Р.А. Денисов***, Репецкая Л.В., Черепенин В.А. Противоопухолевый эффект *in vivo* при нетепловом воздействии мощных электромагнитных импульсов. // Биофизика / Biophysics. – 2026. – Т. 71. – №1. – С. 173–190. DOI: 10.7868/S3034527826010167. (**Уровень 1 Белого списка ВАК, RSCI**)
   Переводная версия: V. A. Vdovin, N. B. Morozova, A. A. Pankratov, S. A. Sapetskii, ***R. A. Denisov***, L. V. Repetskaya, and V. A. Cherepenin. In vivo Antitumor Effect of Non-Thermal Exposure to High-Power Electromagnetic

Pulses //Biofizika. – 2026. – V. 71. – No. 1. – P. 173–190. DOI: 10.1134/S0006350926700168.

4. Вдовин В.А., Плютинская А.Д., Панкратов А.А., Воронцова М.С., Сапецкий С.А., ***Денисов Р.А.***, Черепенин В.А. Влияние мощных электромагнитных импульсов наносекундной длительности на опухолевые клетки в системе *in vitro*. // Журнал радиоэлектроники. – 2026. – №. 3. DOI: 10.30898/1684-1719.2026.3.8 (**Перечень ВАК, RSCI, РИНЦ**)
5. В.А. Черепенин, В.А. Вдовин, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, С.А. Сапецкий, ***Р.А. Денисов***. Нетепловое воздействие мощных электромагнитных импульсов на онкологические объекты *in vitro* и *in vivo*. // Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки. – 2026. – Т.528. – С. 50–57. DOI: 10.7868/S3034508126030065 (**Уровень 1 Белого списка ВАК, RSCI**).

Помимо этого, результаты научной работы обсуждались на научных семинарах ИРЭ им. В.А.Котельникова РАН, а также на международных и российских конференциях и семинарах. По итогам конференций были опубликованы сборники научных трудов (1 с индексацией в Scopus, 3 с индексацией в РИНЦ):

1. ***R. A. Denisov***, V. A. Vdovin, S. A. Sapetskiy and V. A. Cherepenin, Transient Processes Analysis in Experiments on Nanosecond Electric Pulses Exposure on Similar to Biological Media //2024 IEEE 9th All-Russian Microwave Conference (RMC). – IEEE, 2024. – С. 252-255. (**Scopus**)
2. ***Р.А. Денисов***, В.А. Вдовин, С.А. Сапецкий. Особенности воздействия интенсивными ультракороткими электрическими импульсами на различные варианты нагрузок с биоподобными средами. // Сборник научных статей по материалам VII Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития радиотехнических и инфокоммуникационных систем» («Радиоинфоком-

2023»), г. Москва, РТУ МИРЭА: сборник научных статей. – М.: МИРЭА – Российский технологический университет, 2023. – с. 193-198. (**РИНЦ**)

3. ***Р.А. Денисов***, В.А. Вдовин, С.А. Сапецкий. Применение метода эквивалентных схем для анализа воздействия наносекундными импульсами на биологические среды. // Сборник трудов XXXV Всероссийской школы-семинара «Волновые явления: физика и применения» имени профессора А.П. Сухорукова – 2024 г. – с. 163-165. (**РИНЦ**)
4. ***Р. А. Денисов***, В.А. Вдовин, А.А. Панкратов, А.Д. Плютинская. Оценка выживаемости опухолевых клеток культуры LLC при воздействии наносекундными электрическими импульсами // Сборник трудов XXXVI Всероссийской школы-семинара «Волновые явления: физика и применения» имени профессора А.П. Сухорукова. – 2025. – С. 306-308. (**РИНЦ**)

Общий список конференций и научных семинаров, где были представлены результаты работы, дан далее: XXXIV Всероссийская школа-семинар «Волновые явления: физика и применения» («Волны-2023») имени А.П. Сухорукова (Красновидово, Россия, 28 мая – 2 июня 2023 года); VII Международная научно-практическая конференция («Радиоинфоком-2023») «Актуальные проблемы и перспективы развития радиотехнических и инфокоммуникационных систем», (Москва, Россия, 20 – 24 ноября 2023 года); 20-й конкурс работ молодых ученых, специалистов, аспирантов и студентов имени Ивана В. Анисимкина ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН (Москва, Россия, 8 – 9 апреля 2024 г.); XXXV Всероссийская школа-семинар «Волновые явления: физика и применения» («Волны-2024») имени профессора А.П. Сухорукова (Красновидово, Россия, 26 – 31 мая 2024 года); 9 Всероссийская Микроволновая Конференция (9th All-Russian Microwave Conference) (Международная конференция) (Москва, Россия, 25 – 29 ноября 2024 г.); XXXVI Всероссийская школа-семинар «Волновые явления: физика и применения» («Волны-2025») имени профессора А.П. Сухорукова, (Красновидово,

Россия, 1 – 6 июня 2025 года); XXXVII Всероссийская школа-семинар «Волновые явления: физика и применения» («Волны-2026») имени профессора А.П. Сухорукова, (Красновидово, Россия, 31 мая – 5 июня 2026).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, трёх глав, заключения, а также списка использованной литературы и раздела благодарностей. Работа содержит 133 страницы, 39 рисунков и 11 таблиц. Список цитированной литературы содержит 139 наименований.

Во введении содержится обоснование актуальности темы и описывается степень её общей разработанности, формулируются цель и задачи исследования, описываются научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также представляются основные положения, выносимые на защиту, и излагается краткое содержание работы.

В главе 1 представлен подробный обзор отечественной и зарубежной литературы по теме нетеплового воздействия мощными импульсами ультракороткой (наносекундной и субнаносекундной) длительности на биологические среды. Указываются основные современные достижения радиофизических и биомедицинских исследований в области, а также тенденции дальнейшего изучения.

В главе 2 описывается экспериментальная установка на основе высоковольтного генератора наносекундных импульсов, созданная для нетеплового воздействия на различные биологические объекты. Производится моделирование переходных процессов, происходящих при воздействии на объекты на этой установке, и численно оцениваются характерные физические величины.

В главе 3 описывается проведение биомедицинских экспериментов *in vitro* и *in vivo* на данной схеме установки и представляются их результаты.

В заключении приведены основные выводы проведённой научно-исследовательской работы.

Глава 1. Обзор литературы по воздействию мощными электромагнитными импульсами на биологические среды.

1.1. Физика взаимодействия с биологическими структурами

1.1.1. Теория электропорации в клеточных мембранах

Задача воздействия электромагнитным излучением на биологические клетки и ткани была предметом изучения с конца 1950-х годов [24], и особый интерес в этой области представляет воздействие мощными импульсами малой длительности. По мере исследований в этой области возрастала интенсивность воздействия. Под интенсивностью импульса подразумевается, что он имеет достаточную величину для того, чтобы вызвать нелинейные изменения клеточных мембран – здесь также важную роль играет длительность приложенного импульса. Общепризнанно в зарубежной литературе ключевым процессом здесь является электропорация – создание пор в мембране под действием электрического поля. Электропорация бывает обратимой или необратимой, в зависимости от того, закрываются ли поры после воздействия. Типичные импульсы, необходимые для возникновения электропорации, варьируются от десятков миллисекунд с амплитудой в несколько 100 В/см до импульсов в несколько микросекунд и нескольких кВ/см [25].

Исследования по переходу к диапазону воздействия ультракоротких импульсов (определяемых как импульсы субмикросекундной длительности) начались в середине 1990-х годов. Первоначальной целью вместо фундаментального исследования их воздействия на клетки ставился поиск средства для более эффективного бактериального обеззараживания и предотвращения биологического обрастания – образования наростов на погружённых в воду предметах. Вскоре после этого были выполнены измерения воздействия

наносекундных импульсов на раковые клетки, которые сравнивались с данными, полученными с помощью микросекундных импульсов [26]. Было обнаружено, что более короткие импульсы (50 нс) вызывали повреждение ядра, но не влияли на внешнюю мембрану, в то время как импульсы длительностью 5 мс, напротив, не влияли на ядро, но вызывали повреждение внешней мембраны. Таким образом, за рубежом появилась тенденция на изучение эффектов воздействия импульсов более низкой длительности.

Для объяснения обнаруженных эффектов был использован следующий подход. На рис. 1.1 показано поперечное сечение клетки млекопитающего с единственной показанной мембраносвязанной субструктурой, являющейся ядром. Цитоплазма, которая заполняет большую часть клетки, содержит растворенные белки, электролиты и формы глюкозы и является умеренно проводящей, как и нуклеоплазма и содержимое других органелл. С другой стороны, мембраны, окружающие клетку и субклеточные структуры, обладают низкой проводимостью. Таким образом, мы можем рассматривать клетку как проводник, окруженный изолирующей оболочкой с потерями и содержащий подструктуры с аналогичными свойствами.

Рисунок 1.1. Схема поперечного сечения клетки млекопитающего. Типичный диаметр такой клетки составляет порядка 10 мкм, а толщина клеточной мембраны у неё – примерно 7-8 нм.

Рассмотрим действие электрического импульса на отдельную клетку. Основные эффекты электрического поля на живую клетку следующим образом: когда клетка помещается в проводящую среду между двумя электродами, на которые подаётся импульс напряжения, результирующий ток вызывает накопление электрических зарядов на мембране клетки и, как следствие, временное изменение напряжения на мембране, которое определяется постоянной времени зарядки этой мембраны. Для клеток млекопитающих типичные значения этой постоянной времени находятся в субмикросекундном диапазоне. При определенном уровне увеличенного вследствие накопления зарядов на мембране напряжения (порядка 1 В) произойдет обратимый пробой; при еще более высоких уровнях напряжения клетка получит непоправимый ущерб. Электрическое поле в суспендирующей среде, необходимое для создания напряжения U на клетке с диаметром D, составляет:

$$E = \frac{U}{fD} \qquad (1)$$

где f – коэффициент формы, характерный для формы клетки [26].

Постоянная времени зарядки клеточной мембраны для сферической клетки с однородной цитоплазмой определяется выражением (2):

$$\tau = (\rho_c + \frac{\rho_a}{2} \times \frac{1+2V}{1-V}) \frac{D}{2} c_m \qquad (2)$$

где ρ_a – удельное сопротивление суспендирующей среды (например, воды), ρ_c – удельное сопротивление цитоплазмы, c_m – емкость мембраны на единицу площади, V – объёмная концентрация сферических клеток (доля объёма всей системы, которая приходится на сами сферические частицы). Для клетки млекопитающего диаметром 10 мкм, ρ_c и ρ_a = 100 Ом×см, емкостью плазматической мембраны 1 мкФ/см^2 и достаточно малой объемной концентрацией, время зарядки составляет 75 нс. Для тканей оно может достигать гораздо больших значений.

Когда к сферической клетке прикладывается ступенчатое электрическое поле E, результирующее увеличение напряжения на клеточной мембране ΔU (добавленное к разности потенциалов покоя мембраны) составляет

$$|\Delta U(t)| = fE\frac{D}{2}|\cos\theta|(1-exp(-t/\tau)) \qquad (3)$$

Здесь $\Delta U(t)$ описывает изменение трансмембранного потенциала во времени t сферической клетки диаметра D при воздействии постоянного электрического поля E (τ – постоянная времени зарядки, θ определяет угловую зависимость этого изменения относительно направления приложенного электрического поля), f – коэффициент формы, для сферических клеток равный 1,5 [27].

Стоит отметить, что с помощью сфер, сфероидов и эллипсоидов можно смоделировать отдельные клетки, но не клетки в составе реальных биологических тканей, где каждая клетка обычно отличается по своей форме от остальных. Для клеток неправильной формы и/или близко расположенных друг к другу клеток невозможно вывести трансмембранный потенциал аналитически и сформулировать как элементарную математическую функцию [28]. Поэтому приходится прибегать к оцениванию, которое, однако, является довольно точным: так, в работе [29] исследовалось временное и пространственное распределение трансмембранного потенциала на основе модели клетки с двойной оболочкой без сложной математики. Алгоритм, представленный в этом исследовании, можно легко применить к биологическим клеткам неправильной формы, в том числе и к реальным биологическим клеткам.

Для возникновения электропорации в течение заданной длительности импульса амплитуда электрического поля прямоугольного импульса $E_{\text{кр}}$ должна быть такой, чтобы мембранное напряжение на полюсах клетки (θ = 0 или π) достигло критического значения $U_{\text{кр}}$ [30]:

$$E_{\text{кр}} = \frac{U_{\text{кр}}}{f\frac{D}{2}(1-exp(-t/\tau))} \qquad (4)$$

Тогда критическое значение объёмной плотности энергии, необходимое для пробития мембраны, определяется выражением (5):

$$W_{\text{кр}} = \frac{{E_{\text{кр}}}^2 \tau}{\rho_a} = \frac{K\tau}{(1 - exp(-t/\tau))^2} \qquad (5)$$

где K – постоянная, складывающаяся из известных величин.

Для того, чтобы получить количественную информацию о необходимых импульсных параметрах для внутриклеточного воздействия, используется эквивалентная радиофизическая схема клетки, предложенная в 1997 году [31]. В такой модели с эквивалентной схемой клетки, показанной на рис. 1.2, клеточная и ядерная мембраны представлены конденсаторами, а цитоплазма, нуклеоплазма и окружающая клетку среда – резисторами. В эквивалентной схеме предполагается, что проводимость плазматической мембраны равна нулю, а емкостные компоненты цитоплазмы (внутренней части клетки) не учитываются. Эти предположения ограничивают применимость модели тем временным диапазоном, который определяется временами диэлектрической релаксации мембраны и цитоплазмы. Время диэлектрической релаксации τ_r дает информацию о важности резистивного или емкостного компонента мембраны и цитоплазмы соответственно по отношению к длительности электрического поля τ. τ_r определяется выражением (6):

$$\tau_r = \frac{\varepsilon}{\sigma} \qquad (6)$$

где ε – диэлектрическая проницаемость, а σ – проводимость. Для длительности импульса τ, большей по сравнению с τ_r, преобладает резистивная составляющая, в противном случае – емкостная составляющая [32]. Так, в случае сферической клетки для мембраны τ_r имеет порядок 10^{-9}–10^{-10} секунд, а для клеточной цитоплазмы – 10^{-12} секунд [33].

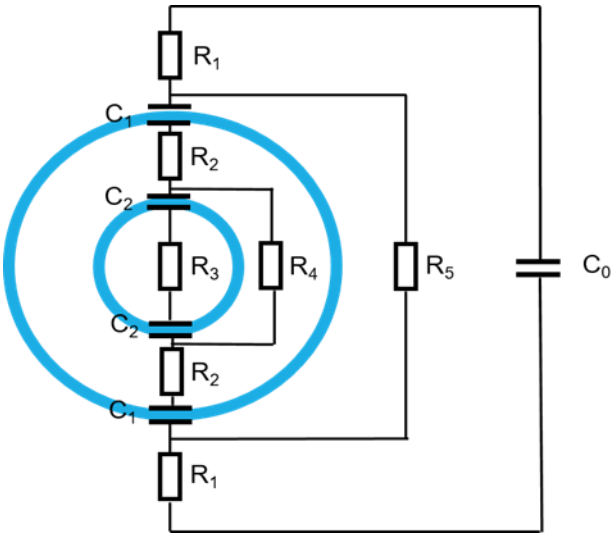


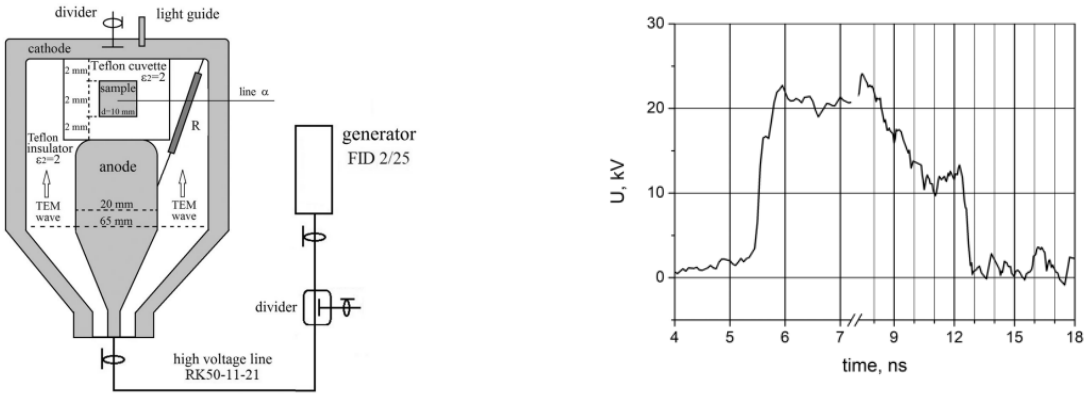
Рисунок 1.2. Радиофизическая эквивалентная схема клетки между двумя электродами. Синими кругами обозначены клеточная и ядерная мембраны. Клеточная и ядерная мембраны описываются емкостями C_1 и C_2 соответственно, а цитоплазма клетки и нуклеоплазма в ядре – сопротивлениями R_2 и R_3. R_1, R_5 и C_0 зависят от электрических свойств среды, в которой находится клетка, а также от геометрии системы.

Представленные выше заключения из исследований в основном являются результатами трудов зарубежных специалистов. Что касается отечественных исследований, как уже было упомянуто во введении, впервые задачу исследования по нетермическому воздействию мощными электромагнитными импульсами на биологические среды рассмотрела научная группа академика Н.Д. Девяткова в конце 1980-х годов в ИРЭ АН СССР. В работе использовались релятивистские сильноточные СВЧ-генераторы, позволявшие создавать микроволновые импульсы с высокими значениями напряженностей электрического поля, которые были основным средством воздействия на живые организмы, в частности, с целью лечения онкологических образований [1–3]. Тем не менее, эти перспективные исследования в силу различных причин не удалось довести до логического завершения. На данный момент в России по этой теме публикуются в основном работы прикладного характера, хотя есть и теоретические работы: к последним, например, относится работа [34], в которой для получения распределения

электрического поля в системе решалась трёхмерная электродинамическая задача для векторного потенциала магнитного поля A по следующей системе уравнений (7):

$$\nabla \times \mu_r^{-1}(\nabla \times A) + \mu_0 \sigma \frac{\partial A}{\partial t} + \mu_0 \frac{\partial}{\partial t}\left(\varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{\partial A}{\partial t}\right) = 0 \qquad E = -\nabla V - \frac{\partial A}{\partial t} \qquad (7)$$

Геометрия поставленной в работе [34] задачи представлена на рис. 1.3а, на коаксиальный вход волновода подавался импульс, осциллограмма которого представлена на рис. 1.3б. Электродинамический расчет учитывает неполное согласование на частотах Фурье выше 500 МГц на переднем фронте импульса. Кроме того, на динамику поля в образце влияет асимметричная геометрия системы. Электрическое поле в среде в центре кюветы с объектом воздействия показано на рис. 1.4, линия 1. Учет дисперсии диэлектрической проницаемости среды не приводит к заметному различию результатов, так как максимальная значимая частота на переднем фронте импульс составляет около 1,5 ГГц, что значительно ниже частоты гамма-дисперсии для воды ω_γ ~20 ГГц.



(а) (б)

Рисунок 1.3. (а) Схема экспериментальной установки, где показана область обработки с образцом в кювете на конце коаксиального волновода. (б) Осциллограмма импульса в линии высокого напряжения (амплитуда импульса 25 кВ, время нарастания 150 пс).

Для расчета распределения электрического поля внутри ячейки был выбран объем размером 200 мкм, для которого решалась электростатическая задача (8). Электрическое поле в культуральной среде клеток, цитоплазме и среде внутри органелл также показано на рис. 1.4. Граничные условия ставились таким образом, чтобы решения систем (7) и (8) для электрического поля в центре образца совпадали.

$$\nabla J = Q_{j,V} \quad J = \sigma E + \frac{\partial D}{\partial t} + J_e \quad E = -\nabla V \qquad (8)$$

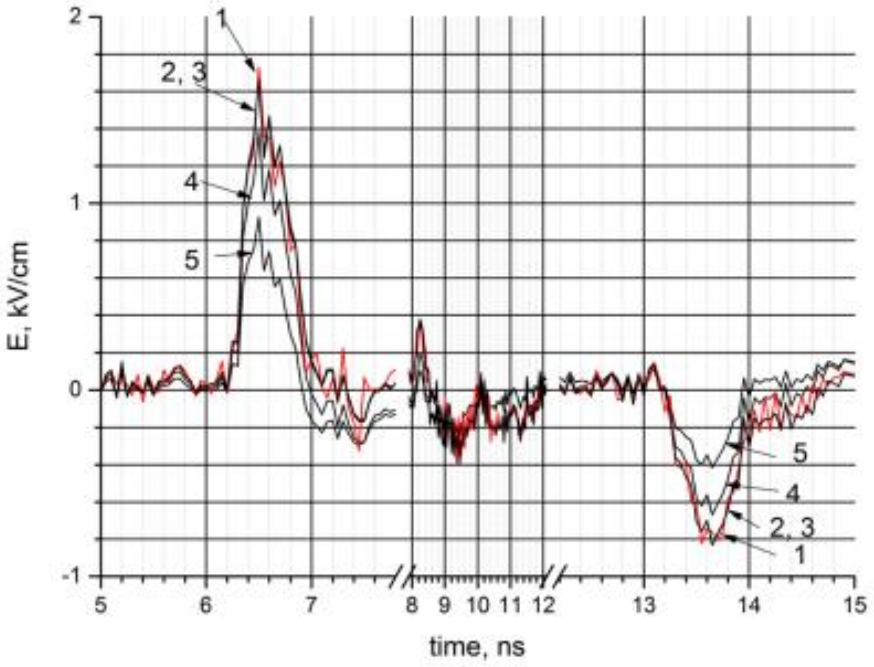


Рисунок 1.4. Напряженность электрического поля в жидкости: 1 — поле в культуральной среде клеток, результат моделирования системы уравнений (3); 2, 3 – две совпадающие линии, поле в культуральной среде и в цитоплазме 10 мкм-клетки, результат расчета по системе (4); 4 — поле внутри органеллы размером 500 нм; 5 — поле внутри 100-нм органеллы, расчет по системе (4).

Подобная работа проводилась и в статье нашей научной группы [35]. С помощью моделирования в программе OrCAD Pspice рассматривалось изменение

параметров импульса для варьировавшихся вариантов нагрузок, в качестве которых использовались различные биологические среды. Для расчёта электрических параметров сопротивления и ёмкости нагрузок использовались данные значений диэлектрической проницаемости ε и проводимости σ, представленные в работе [36].

1.1.2. Модели электропорации

Клеточную мембрану можно рассматривать как диэлектрик с потерями, разделяющий два проводящих раствора [37], так что она действует как диэлектрик в конденсаторе, который поляризуется в присутствии внешнего поля. Основные модели теоретического рассмотрения электропорации описаны в работе [38]. Согласно этой работе, теории электропорации делятся на две широкие категории:

1) Непоровые модели, которые основаны на детерминистских описаниях взаимодействия мембраны и поля, при этом не подразумевая создание пор. В одной из них основным предположением выступает то, что под действием электрического поля вся мембрана сжимается и может испытать механический коллапс, приводящий к её разрыву. В этом подходе мембрана рассматривается как упругий конденсатор с постоянной эластичностью $Y_м$. Давление на мембрану за счет электрического поля определяется выражением (9):

$$P_{\text{эл}} = \frac{\varepsilon_{\text{м}} U^2}{2h^2} \qquad (9)$$

где $\varepsilon_{\text{м}}$ – относительная диэлектрическая проницаемость мембраны, h – толщина мембраны, U – трансмембранное напряжение. В то же время, поскольку $Y_м$ постоянна, сила упругости на единицу площади $P_м$ определяется выражением (10):

$$P_{\text{м}} = -Y_{\text{м}} \int_{h_0}^{h} \frac{dx}{x} \qquad (10)$$

где h_0 — толщина мембраны при $U = 0$. Решение уравнений (1) и (2) для условия электромеханического равновесия, $P_{\text{эл}} = P_{\text{м}}$, дает значение равновесной толщины h, которая является функцией трансмембранного напряжения U. Когда трансмембранное напряжение оказывается выше некоторого критического значения, определяемого $Y_м$ и h_0, происходит разрыв мембраны [39]. В качестве альтернативных подходов рассматривают порообразование через анализ электрогидродинамической неустойчивости плоского слоя непроводящей жидкости, устойчивости возникающих в мембране волн или вязкоупругих свойств мембраны [38].

2) Поровые модели, которые включают стохастическое описание образования пор. В основном подходе к образованию пор в мембране рассматривается энергетический баланс в мембране, который в ненарушенном состоянии имеет энергию $Г$ на единицу площади. Когда образуется круглая пора, возникает выигрыш в энергии из-за создания круглого «обода» при деформации, обозначаемой γ (энергия на длину по окружности, необходимая для образования поры, «краевая энергия»), но также происходит уменьшение энергии за счет потери дискообразной «выемки» на поверхности мембраны. Выражение для изменения энергии между мембраной без поры и мембраной с порой радиуса r выглядит следующим образом:

$$\Delta W_{\text{p}}(\text{r}) = 2\gamma r - \Gamma \pi r^2 \qquad (11)$$

При учёте спонтанных тепловых флуктуаций, зависимости от размера пор, транспорта ионов через поры, а также других факторов, представляется возможным разработать самосогласованную схему, в которой $\Delta W_{\text{p}}(\text{r})$ саморегулируется в процессе образования пор.

Соединяя выражение (11) с уравнением Смолуховского для динамики плотности заполнения пор:

$$\frac{\partial n(r,t)}{\partial t} - \frac{D}{k_B T}\frac{\partial}{\partial r}\left(n(r,t)\frac{\partial n}{\partial r}\right) - D\frac{\partial^2 n(r,t)}{\partial r^2} = S(r) \qquad (12)$$

можно предсказать влияние внешнего электрического поля. В последнем выражении $n(r,t)$ – функция распределения плотности пор, $S(r)$ — член порообразования, k_B – постоянная Больцмана, а D = 5×10^{-14} м^2/с – постоянная диффузии пор. Эта модель подтверждает, что при соответствующих условиях рост пор контролируется и что при снятии внешнего поля мембрана может вернуться к стабильному, равновесному распределению пор [40–41]. Другая модель электропорации, основанная на уравнении Смолуховского, была разработана в работе [42], где было выведено обыкновенное дифференциальное уравнение, легко решаемое численно и дающее приближённое распределение пор.

1.1.3. Методы молекулярной динамики

В исследованиях электропоративных процессов исследования нередко обращаются к методам молекулярной динамики (ММД), обеспечивающим элегантный способ для исследования внутренних физических и механических деталей биофизических процессов на малых размерах и длительностях. Эти методы, например, активно применяются для моделирования проницаемости мембраны в биохимических исследованиях по доставке лекарств внутрь клетки [43]. В этих исследованиях клеточная мембрана, в которой образуются поры, рассматривается как обычный липидный бислой, как показано на рисунке 1.5 [44].

На основе ММД было проведено несколько моделирований воздействия электрического поля на мембраны, которые предоставили основанную на физике информацию и детали процесса электропорации липидных бислоев. В частности, в [45] было показано, что порообразование обусловлено локальными градиентами

электрического поля на границе раздела вода / липид: молекулы воды движутся в этих градиентах поля, что увеличивает вероятность проникновения дефектов воды внутрь бислоя, которые вызывают дальнейшее увеличение локального электрического поля, ускоряя процесс порообразования.

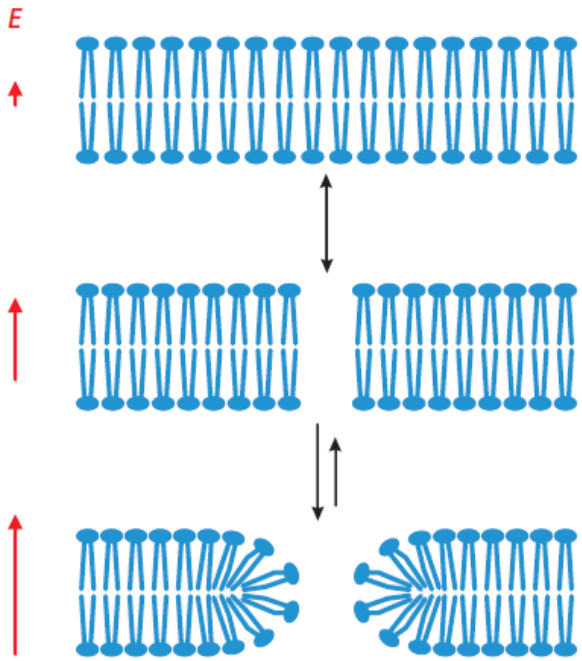


Рисунок 1.5. Электрически индуцированное образование водных пор в липидном бислое показано в два этапа: молекулы воды сначала проникают в бислой и, таким образом, образуют нестабильную гидрофобную пору (в середине), а соседние липиды затем переориентируются своими полярными головными группами в сторону этих молекул воды, таким образом, образуя метастабильную гидрофильную пору (внизу).

В работе [46] рассматривались мембранные системы в воде, подверженные воздействию сильных электрических полей. Было показано, что молекулы воды образуют своеобразные «столбы», вокруг которых в гидрофильном бислое мембраны и образуются поры. Примечательно, что в этой работе моделируется не только образование пор, но и последующий транспорт крупных молекул через мембрану.

Моделирование молекулярной динамики требует очень больших вычислительных ресурсов и поэтому ограничено периодом времени, который может быть промоделирован; так, моделирование процесса электропорации в мембране, проведённое в работе [46], охватывает период всего в 10 нс.

1.1.4. Закон подобия для электрических импульсов

Основными параметрами, определяющими эффекты воздействия ультракороткими импульсами на биологические образования, являются длительность и амплитуда импульсов, а также их количество [2]. По результатам экспериментов, где на различные клетки подавалось разное количество импульсов, в связи с чем проявлялись разные клеточные эффекты, было предложено сформулировать общий «закон подобия» – правило, благодаря которому было бы возможно заранее предсказывать результат воздействия для разного набора электрических параметров или, по крайней мере, предоставить некоторую информацию о предпочтительных параметрах для конкретных опытов [47].

Первоначальная версия такого закона подобия была предложена в [48], где предполагалось, что выживаемость биологических клеток при воздействии обратно пропорциональна плотности энергии, определяемой как произведение квадрата амплитуды электрического поля E^2, длительности импульса τ и количества импульсов N.

$$S \sim (E^2 \tau N)^{-1} \qquad (13)$$

Однако этот вывод основывался на результатах экспериментов с импульсами одинаковой длительности. Позже, в [49], был сформулирован новый закон, согласно которому биоэлектрические эффекты наносекундных импульсов определяются произведением амплитуды электрического поля и длительности импульса, а также квадратного корня от количества импульсов.

$$S = S(E\tau N^{\frac{1}{2}}) \qquad (14)$$

Такой закон подобия можно интерпретировать следующим образом: биологические эффекты, проявляющиеся при воздействии нано- и субнаносекудными импульсами, пропорциональны общему количеству ионов, проходящих через поры клеточной мембраны. Другими словами, проявляется зависимость биоэффектов от произведения плотности тока и длительности импульса [47]. Однако подобные варианты закона подобия для наносекундных импульсов были выведены только для монополярных импульсов – что касается импульсов иных форм, для этих случаев закон требуется модифицировать.

1.1.5. Влияние параметров импульсов при воздействии

Актуальной задачей является поиск режимов воздействия и подбор характеристик импульсов воздействия для решения конкретных проблем. Помимо вопросов об уточнении вышеупомянутого закона подобия, одним из основных направлений представляется изучение влияния иных характеристик подаваемых импульсов при воздействии. Последние исследования дают понять, что форма импульсов имеет решающее значение для электропоративных процессов и определяет другие параметры воздействия, такие как амплитуда и длительность воздействия [50]. В зарубежных работах обычно рассматриваются три основные формы импульсов: прямоугольные, многоимпульсные и экспоненциально затухающие [51]. Наиболее стандартизированной и широко используемой формой из них является импульс прямоугольной формы. Основными параметрами типичного прямоугольного импульса с резким переходом нарастания и спада являются его пиковая амплитуда, длительность и частота. Однако в реальных приложениях из-за паразитных элементов индуктивности и емкости в любой системе импульсу напряжения требуется время, чтобы достичь пика плато, и дополнительное время, чтобы затухнуть до нуля, поэтому большое значение имеют

также времена нарастания и спада, используемые для описания перехода импульса. Во время нарастания импульса может произойти выброс как на фронте, так и во время падения. Стоит также отметить, что генерация импульсов напряжения зависит от элементов накопления энергии (конденсаторов или катушек индуктивности), которые повышают входное напряжение и обеспечивают быструю доставку импульса к нагрузке, по причине чего пик импульса немного затухает и его «плато» наклоняется. Это можно заметить по значениям емкости или индуктивности и постоянной времени элементов. В эквивалентной схеме биологической клетки, данной ранее, присутствуют емкостные и резисторные элементы; таким образом, ток можно использовать как индикатор электропорации. Во время нарастания преобладает емкостная составляющая, поскольку её емкость заряжается, после чего она затухает до фиксированного значения. Когда в клетке происходит электропорация, её проницаемость увеличивается; это означает уменьшение сопротивления, приводящее к увеличению тока, который колеблется, а затем стабилизируется на новом значении.

Также в задачах с электропорацией имеет значение полярность импульсов. У монополярных импульсов полярность может быть только положительной или отрицательной, а у биполярных импульсов – как положительная, так и отрицательная полярность. Два импульса могут иметь либо одинаковые параметры и подаваться без задержки между ними, либо разные параметры и подаваться с задержкой. Пик импульса определяет эффективность работы, количество импульсов, время нарастания и спада, а также форму импульса. Исследования показали, что доставка биполярных импульсов более перспективна, чем монополярных: так, монополярные импульсы могут привести к смещению электродов и сокращению мышц, что приводит к усилению боли, в то время как биполярные импульсы смягчают сокращение мышц, смещение электродов и потери на них, а также могут ускорить время лечения благодаря тому, что вызывают механическое воздействие на клетки в дополнение к электрическому [52]. Помимо этого, было обнаружено, что действие на биологический объект

одного монополярного импульса может быть нейтрализовано вторым монополярным импульсом противоположной полярности – этот эффект называется «биполярным аннулированием» [53]. В настоящее время активно изучается способ обхода этого явления, «эффект CANCAN»: два правильно сформированных и синхронизированных биполярных наносекундных импульса накладываются на монополярный импульс, тем самым подавляя биполярное аннулирование [54].

Ведутся исследования о влиянии других факторов импульсного воздействия: например, в работе [55] исследуется вопрос о том, что зарядный ток генератора ультракоротких импульсов тоже может повлиять на биологические реакции при обработке.

Стоит также отметить, что редко когда для какого-либо приложения требуется подать на нагрузку только один импульс напряжения. Вместо этого импульсы напряжения подаются последовательно в разном количестве и с варьирующейся частотой повторения, а также комбинируются различным образом для получения лучшего эффекта. Так, в работе [56] предлагается увеличить эффективность воздействия путём суммирования нескольких наносекундных импульсов в пачку с частотой повторения до нескольких МГц.

1.1.6. Температурные эффекты воздействия

За счёт ультракороткой длительности приложенных высокоинтенсивных импульсов их энергия оказывается достаточно мала, чтобы воздействие считалось практически безнагревным процессом. Однако следует учитывать, что клетки и ткани определяются конечными удельным сопротивлением и диэлектрической проницаемостью, поэтому взаимодействие электрических полей с этими объектами всегда так или иначе приводит к нагреву. Поэтому в проводимых экспериментах большое внимание уделялось ограничению средней мощности серии импульсов с

целью избежания излишнего нагревания объекта, что достигалось, например, путём уменьшения частоты повторения импульсов [12].

Выделяют две основных причины нагревания объекта при воздействии на него мощными ультракороткими импульсами. Первой из них является джоулевское нагревание (резистивное нагревание). Оно основывается на переносе импульса от ионов, ускоренных электрическим полем, к заряжённым или нейтральным молекулам путём эластичных столкновений. Это приводит к случайному движению частиц (тепловому движению), которое накладывается на направленное движение ионов вдоль силовых линий («дрейфовое» движение). Принято считать, что почти вся энергия, приобретенная ионами из электрического поля, преобразуется в тепловую энергию. В этом случае повышение температуры $\Delta\mathrm{T}$, вызванное прямоугольным импульсом с амплитудой электрического поля E и длительностью τ, составит:

$$\Delta\mathrm{T} = \frac{\sigma E^2 \tau}{\rho c} \qquad (15)$$

где ρ — плотность (масса/объем), c — удельная теплоемкость, а σ — электропроводность (обратная величина удельного сопротивления) [57]. Температура снижается после импульса и достигает базового уровня через достаточное время, которое определяется процессами потери тепла, главным образом за счет теплопроводности. Такой вид повышения температуры в большей степени проявляется при подаче импульсов миллисекундного и микросекундного диапазона и даже наносекундных импульсов с длительностью, большой по сравнению с 10 нс.

Что касается повышения температуры с использованием одноразрядных, наносекундных и субнаносекундных импульсов, рассматривается вторая причина нагревания: нагревание за счет диэлектрической релаксации, которое основано на воздействии быстро меняющихся электрических полей на постоянные диполи в органических тканях. На низких частотах диполи легко следуют за электрическим

полем и почти все из них поляризованы и обладают большой емкостью. Когда частота превышает определенное значение, диполи не могут полностью следовать за электрическим полем, и их емкость уменьшается, поэтому они демонстрируют кратковременные колебания. При этом диэлектрические потери в среде увеличиваются, поскольку частая переориентация диполей вызывает столкновения с соседними, что приводит к выделению большого количества тепловой энергии. Эффекты диэлектрической релаксации клеточной мембраны начинают преобладать в диапазоне ~10-100 МГц [58], тогда как диэлектрическая релаксация молекул воды и растворенных ионов, из которых состоит цитоплазма клетки, начинается в гигагерцовом диапазоне. В работе [59] было обнаружено, что, если учесть релаксацию мембраны и значительно уменьшить необходимое электрическое поле, можно ускорить процесс электропорации в клеточной мембране.

Главным тепловым эффектом, проявляющимся при нагревании биологической ткани, является гипертермия – процесс повышения температуры ткани до такого уровня, при котором происходит клеточная гибель. Однако было обнаружено, что кратковременное нагревание органических тканей до умеренных температур выше физиологической, но значительно ниже порога гипертермии, позволяет повысить проводимость клеточной мембраны [60], благодаря чему снижается энергия, необходимая для электропорации. Таким образом, возможно совместное использование электропорационных методов и нагрева области воздействия, позволяющее уменьшить амплитуду, длительность и количество импульсов, тем самым снизив нагрузку на здоровье пациентов [61].

1.1.7. Дальнейшие направления исследований

Существует несколько перспективных направлений дальнейших исследований в области. Помимо всего вышеперечисленного, интерес

представляет также изучение уникальных различий параметров клеток, которые необходимо учитывать при воздействии: так, в работе [62] численно оценивалась электропорация здоровых и злокачественных клеток в зависимости от рабочей частоты воздействия – было обнаружено, что эти клетки имеют различные значения пороговых частот, выше которых электропорация не наблюдается.

Активно исследуются способы усиления эффектов воздействия наносекундными импульсами с помощью других средств. Помимо описанного в предыдущем разделе предложения о дополнительном кратковременном нагревании объекта, прорабатываются идеи об увеличении эффективности метода с применением наночастиц на основе металлов и полимеров [63]. Это позволяет повысить восприимчивость отдельной клетки к воздействию электрического поля и усилить электропорационные эффекты без необходимости увеличения подачи энергии или времени обработки. Ещё один способ был предложен в работах [64–65], где рассматривается возможность комбинации наносекундных и микросекундных импульсов, подаваемых с одного генератора, который способен работать в обоих диапазонах длительности. Данный метод при использовании с дополнительным применением специально созданных наночастиц продемонстрировал в онкологических применениях такие преимущества, как более высокая эффективность уничтожения клеток и усиленное инициирование клеточной смерти для запуска иммунного ответа [66].

Что касается биологических аспектов, большая часть исследований по этой тематике сосредоточена в основном на изучении воздействия на клеточном уровне, рассматривая воздействие на клетку в целом или её отдельные части вроде клеточной мембраны. Так, в качестве следующего шага в развитии исследований предлагается переход таким биологическим структурам, как макромолекулы и биомолекулы (ДНК, РНК) [12]. Активно и углублённо рассматриваются вопросы о воздействии мощных ультракоротких импульсов на внутриклеточные компоненты, (например, на митохондрии [67]) и проявляющихся при этом эффектах.

1.1.8. Тенденции по укорочению импульсов

Одной из наиболее ярко выраженных тенденций дальнейшего исследования является дальнейшее укорочение длительности импульсов до пикосекундного диапазона. В настоящее время технологии импульсной генерации настолько развиты, что становится возможным производить импульсы длительностью 100 пс и амплитудой в десятки кВ [68–69], при использовании которых открываются перспективы для обнаружения новых биологических эффектов воздействия [70].

В случае воздействия на клетку длинным импульсом (мс, мкс) поле в определённый момент будет отражаться от клетки, поскольку её плазматическая мембрана успеет зарядиться. Однако при подаче импульсов достаточно короткой длительности возможно достичь того, что электрическое поле сумеет проникнуть внутрь клетки, не успев зарядить мембрану [71]. За счёт этого попавший внутрь клетки импульс сможет воздействовать на её компоненты (в частности, на ядро), а также вызывать прямые и мгновенные изменения в строении клеточной мембраны [72]. Также использование пикосекундных электрических импульсов представляет возможность применять чрезвычайно большие электрические поля и не вызывать тепловых эффектов из-за более низкой энергии коротких импульсов [73].

Кроме того, с целью сфокусированного воздействия на глубокие и труднодоступные ткани сверхкороткие импульсы могут быть доставлены к объекту бесконтактным способом [73]. В этом свете одним из главных практических преимуществ перехода в пикосекундный диапазон воздействия считается открывающаяся возможность использования неинвазивных широкополосных антенн вместо входящих в прямой контакт с объектом электродов. Эта тема будет более подробно рассмотрена далее в обзоре.

1.2. Экспериментальные методы и техника для исследования эффектов воздействия ультракоротких импульсов

1.2.1. Принципы и способы генерации импульсов

Ультракороткие электрические импульсы, способные возбуждать в клетках различные биологические эффекты, создаются с помощью высокомощных генераторов импульсов. Такие генераторы имеют в своей конструкции дискретные компоненты, способные выдерживать высокие напряжения и большие выходные токи. Типичный генератор импульсов представляет собой систему, где зарядное устройство накачивает переменный или импульсный ток в накопитель энергии (конденсатор, катушка индуктивности или их комбинация). После окончания зарядки накопленная энергия при включении переключателя высвобождается на нагрузку, которой в биоэлектрических приложениях является клеточная среда или органическая ткань [12].

При генерации импульсов высокого напряжения для их длительности и частоты повторения решающее значение имеет производительность переключателя. В наносекундном диапазоне наиболее часто используются искровые разрядники и МОП-транзисторы. Если рассматривать задачу выбора переключателя для генерации наносекундных импульсов, предпочтительнее использовать искровые разрядники для коротких наносекундных импульсов (<100 нс), тогда как МОП-транзисторы предназначены для длинных наносекундных импульсов (> 100 нс), позволяя регулировать их ширину [74].

Что касается субнаносекундных электрических импульсов, они генерируются путем «обострения» наносекундных или более длинных импульсов. Это обычно реализуется с помощью обостряющей схемы в повышающем трансформаторе или генераторе Маркса. Этот подход обычно подразумевает использование следующих конструкций:

1. Диоды с резким восстановлением (ДРВ). Они обладают особым профилем легирования, таким, что инжектированные носители находятся близко к *p*-*n*-переходу, что приводит к быстрому выключению при обратном смещении. При прямом смещении неосновные носители сохраняются на уровне истощения *p*-*n*. При обратном смещении неосновные носители полностью разряжаются, что приводит к быстрому прерыванию обратного тока и образованию быстрого переходного процесса. При определённых условиях ДРВ можно использовать как генераторы импульсов, формирующие узкие пики.
2. Лавинные транзисторы (*n*-*p*-*n* или *p*-*n*-*p*). Они создают лавинный процесс в области обеднения база-коллектор, который имеет обратное смещение. При напряжении лавинного пробоя эта область имеет сильное поле, способствующее ударной ионизации. Когда электроны, инжектированные из эмиттера, дрейфуют к коллектору, они сталкиваются с решеткой материала и образуют новые электроны и дырки. По механизму, аналогичному лавинному процессу в газовом разряднике, этот процесс ударной ионизации обеспечивает сверхбыстрое размножение носителей заряда. Транзистор быстро включается и поэтому его можно использовать для генерации импульсов наносекундной длительности и ниже.
3. Динисторы с быстрой ионизацией (ДБИ). Их принцип работы заключается в быстром распространении волны ионизации внутри нескольких полупроводниковых слоев. При наличии соответствующих схем запуска на основе динисторов с быстрой ионизацией можно создать генератор импульсов с низким джиттером <100 пс.

В соответствии с тенденцией на дальнейшее укорочение длительности импульсов, возникает необходимость в импульсно-периодических генераторах, способных работать в пикосекундном диапазоне. В настоящее время существуют

подобные генераторы, способные генерировать достаточно мощные и короткие импульсы разной формы с настраиваемой частотой повторения и при этом отличающиеся компактностью, что идёт на пользу в практическом использовании в реальном эксперименте [75].

1.2.2. Способы подачи электромагнитных импульсов на объект

Не менее важной для дальнейших исследований является задача о нахождении подходящей системы подачи импульса на биологический объект для нетеплового воздействия. Далее будут рассмотрены два основных вида таких систем: электроды и антенны.

1.2.2.1. Инвазивные и неинвазивные электроды

В большинстве теоретических и экспериментальных исследований для этой цели используются электроды. Изучение влияния электромагнитного поля на биологические объекты в основном проводится с использованием игольчатых электродов (см. рис. 1.6), где электрическое поле генерируется с использованием игл в качестве анодов и катодов. Такие электроды полезны для подачи электрических импульсов на глубоко расположенные раковые опухоли в экспериментах *in vivo*. Помимо этого, они открывают возможность для свободной настройки воздействия путём введения игл в различные участки поражённой области, что позволяет лечить злокачественные образования произвольной формы и различающихся размеров.

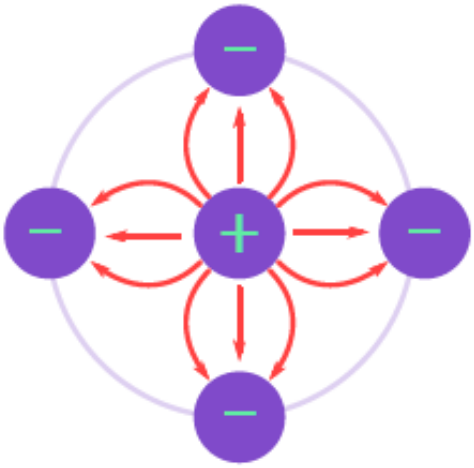


Рисунок 1.6. Схематичное изображение игольчатых электродов (один электрод – положительный, четыре вокруг – отрицательные).

Недостатком игольчатых электродов является неравномерность генерируемого ими поля, которое в рассматриваемом случае концентрируется вблизи самих игл и напряжённость которого уменьшается по мере отдаления от них, что осложняет обработку результатов и грозит повреждением ткани или нежелательной и слабо контролируемой стимуляцией биологических внутриклеточных эффектов [76]. Для биологических сред применение игольчатых электродов также осложняется тем, что необходимо учитывать потенциальное загрязнение образца при воздействии, связанное с высвобождением ионов металла с поверхности электродов при подаче на них электрического импульса [77], что является объективным недостатком игольчатых электродов, которые подразумевают нарушение целостности поверхности при их вводе в объект. Чтобы избежать вредного влияния на органический материал, необходимо обеспечить такую подачу импульса на нагрузку, которая бы исключала соприкосновение металлических электродов с поверхностью биологического объекта.

Популярной альтернативой воздействия на биологические клетки в исследованиях *in vitro* является использование емкостной связи. Она подразумевает использование двух электродов, представляющих собой две

параллельно расположенные металлические пластины (пластинчатых электродов, см. рис. 1.7), между которыми и помещается объект воздействия. В отличие от игольчатых электродов, в рассматриваемом случае можно избежать прямого соприкосновения с биологическим объектом, поскольку между поверхностями электродов и объекта можно поместить слой из диэлектрического материала. В качестве примера можно привести микропланшет, в который обычно помещают клеточную суспензию для экспериментов *in vitro*: его пластмассовые стенки и крышка устраняют проблемы прямого контакта и обеспечивают однородное воздействие электрическим полем на объект [78].

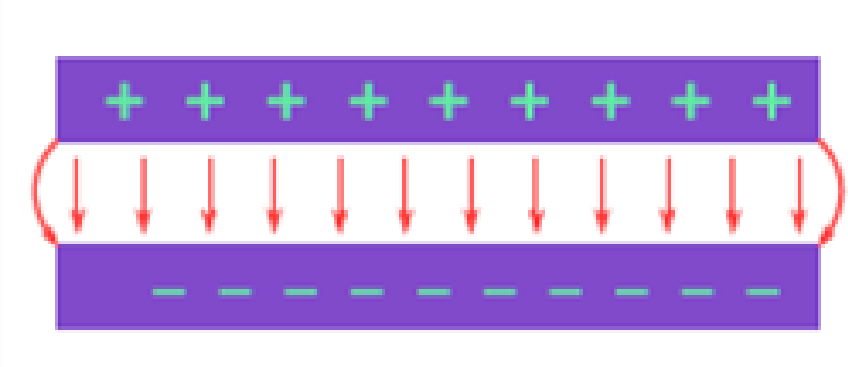


Рисунок 1.7. Схематичное изображение пластинчатых электродов.

При использовании параллельных пластинчатых электродов необходимо точно подбирать их размеры и форму для конкретных задач. Так, при применении нетеплового воздействия ультракороткими электрическими импульсами для терапии раковых опухолей необходимо обеспечивать полное покрытие поражённой области электродом. Помимо этого, расстояние между двумя пластинчатыми электродами должно быть меньше минимального поперечного размера пластин для равномерного распределения электрического поля по нагрузке. В связи с этим на пластинчатые электроды накладываются жёсткие размерные ограничения, которые не позволяют в полной мере проводить терапию слишком маленьких или слишком больших опухолей, а также опухолей, находящихся глубоко внутри здоровой ткани [79]. Также, поскольку большинство исследований по воздействию проводилось с помощью игольчатых электродов,

распределение поля на нагрузке, достигнутое с помощью пластинчатых электродов и диэлектрической прослойки, по-прежнему остаётся недостаточно изученным. В связи с этим возникают опасения, что возможная трансформация импульса на нагрузке может сильно изменить и биологические внутриклеточные эффекты, что становится особенно важным для высокомощных импульсов с амплитудой, необходимой для возникновения электропорации [39]. В настоящее время эта задача остаётся нерешённой.

Существуют также зажимные электроды (см. рис. 1.8), которые имеют практически ту же форму, что и пластинчатые электроды. Они состоят из двух электродов, прикрепленных к внутренней стороне зажима, который используется для удержания органа или тканей в прямом контакте с электродами. Как и пластинчатые электроды, их можно использовать только для доступных опухолей.

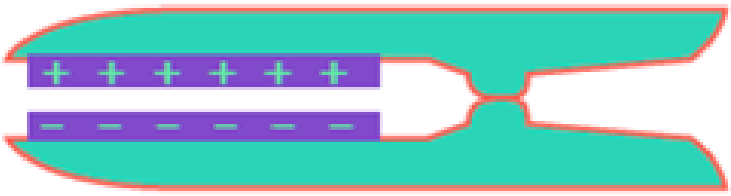


Рисунок 1.8. Схематичное изображение зажимных электродов.

Помимо описанных выше, существуют и другие виды электродов, например, катетерные электроды, вставляемые в катетерные трубки для достижения пораженного органа [11], специальные трубчатые электроды для обработки и обеззараживания жидких пищевых продуктов [80], а также широкополосные электроды-биочипы, действующие в качестве линии передачи, для воздействия *in vitro* на клеточные суспензии с подачей высокоинтенсивных пикосекундных импульсов [81]. У каждой разновидности есть свои достоинства и недостатки, и на данный момент конструкция «идеальной» системы подачи импульса, сочетающей в себе преимущества всех видов электродов, ещё не предложена. В нашем исследовании был сделан выбор в пользу параллельных электродов.

1.2.2.2. Широкополосные антенны

В случае применения для воздействия импульсов с длительностью в субнаносекундном диапазоне, представляется возможным применять в медицине импульсные электрические поля без инвазивных электродов, используя вместо них антенны. Пикосекундные антенны отличаются точностью и широкополосностью [82–83], а также относительно малы в размерах, что даёт возможность использовать их для практических био- и медицинских приложений. Для излучения и фокусировки сверхширокополосных, мощных сигналов высокой направленности могут применяться импульсные излучающие антенны (IRA, англ. Impulse Radiating Antenna) [84]. Распределение во времени амплитуды излучаемой части электромагнитного поля в дальней зоне приближается к производной дельта-функции, что и делает IRA привлекательным средством доставки электрических импульсов для инициирования апоптоза в клетках тканей [84].

В 2007 г. была предложена конструкция вытянутой сфероидальной антенны с импульсным излучением (PSIRA, англ. Prolate-Spheroidal Impulse Radiating Antenna) – это антенна рефлекторного типа для излучения на короткие расстояния [85]. В этой антенне используется эллипсоидальный рефлектор, имеющий два фокуса: источник находится в первом фокусе, а объект воздействия – во втором фокусе. Волны, рассеянные на поверхности рефлектора, становятся точной неоднородной сферической ТЕМ-волной, распространяющейся в сторону второго фокуса. Таким образом, структура импульса на самом объекте воздействия (во втором фокусе) будет состоять из двух основных компонент: «предимпульс», который будет представлять собой непосредственно поданный на антенну импульс, и основной импульс, который будет представлять собой совокупность сходящихся во втором фокусе волн, отражённых от рефлектора. В итоге получается, что чем меньше время нарастания входного импульса, тем короче будет импульс на объекте воздействия [86].

Позже, в 2010 г. была предложена уменьшенная версия PSIRA с диаметром апертуры 0,5 м, предназначенная для отображения в ближнем поле или для терапевтических применений [87]. Этот вариант PSIRA был разработан чуть более приспособленным к реальным практическим применениям, где требуется, чтобы антенна была компактной и портативной. Исследования показали, что можно генерировать желаемое распределение электрического поля в сложной биологической ткани путем изменения диэлектрических свойств линзы, используемой совместно с отражательной антенной [88]. Ещё одна итерация конструкции PSIRA была предложена для биологических экспериментов в работе [89] и испытана, будучи погружённой в воду, и полученные результаты показали возможность генерирования в воде электрических полей с амплитудой около 50 кВ/см.

Рассматривая использование IRA для воздействия, необходимо учитывать, что электрическое поле в биологических тканях сильно уменьшено из-за потерь при отражении падающей волны на границу раздела между воздухом и тканью в связи с разницей в импедансах. Избежать этой проблемы позволяет применение так называемой диэлектрической антенны, конструкция которой была предложена в 2016 г. [90]. Один из вариантов антенны представлен на рисунке 1.9.

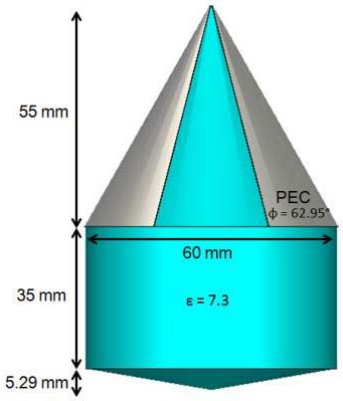


Рисунок 1.9. Вариант конструкции диэлектрической антенны и её характерные размеры.

Эта антенна состоит из трех секций: (1) полый конический ТЕМ-волновод, заполненный диэлектриком; (2) диэлектрический стержень, т.е. цилиндрический волновод, который используется для ограничения электромагнитных волн и направления их к излучающей секции; (3) диэлектрический конус в качестве участка, излучающего волну, который действует как выпуклая линза, ограничивая электрическое поле небольшой площадью и обеспечивая соединение диэлектрической границы раздела между антенной и тканью, уменьшая отражения. С помощью такой антенны связь излучения с объектом может быть значительно увеличена за счет установления прямого контакта с тканью. Такая диэлектрическая антенна позволяет передать импульсы на объекты воздействия, которые находятся на глубине 1-2 см. Кроме того, поскольку антенна нагружена диэлектриком, она может быть намного меньше вытянутой сфероидальной антенны, что, в совокупности со сравнительно меньшим расстоянием до объекта воздействия, позволит увеличить амплитуду импульса в биологической ткани [91].

В описанной выше конструкции антенны решающее значение для работы при высоком напряжении имеет используемый диэлектрический материал, который по этой причине должен быть тщательно подобран с учётом его характеристик [92]. В 2020 г. была сконструирована мощная диэлектрическая биконическая антенна (DiBiCA, англ. Dielectric BiConical Antenna), где использовался диэлектрический материал с $\varepsilon = 28$ [93]. DiBiCA, представленная на рисунке 1.10, состоит из конической секции передачи импульса, переходного стержня и конической секции излучения волн. На диэлектрической поверхности секции передачи сигнала размещается V-образная антенна, на которую подаются пикосекундные импульсы. На переходном стержне, который можно рассматривать как диэлектрический волновод, размещается кольцо резистора, которое призвано подавить вредное для генератора обратное напряжение. Теоретическое моделирование этой антенны показало её эффективность для неинвазивной доставки субнаносекундных импульсов в подкожную ткань [94].

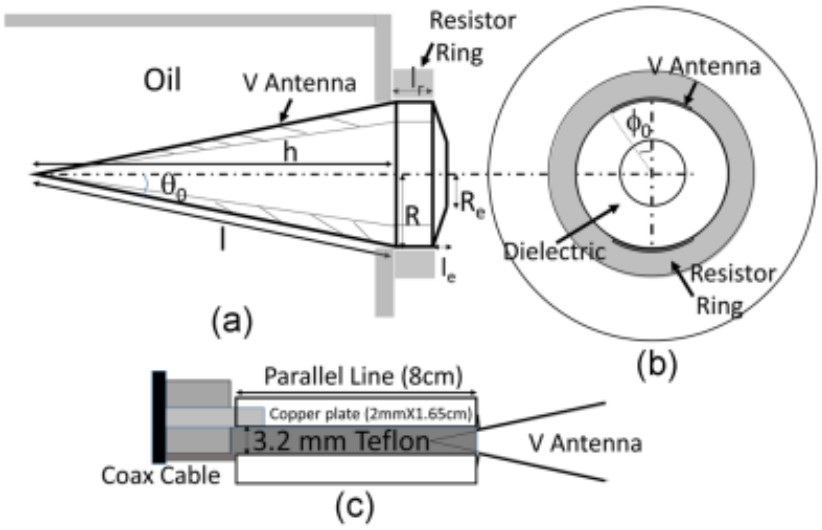


Рисунок 1.10. Диэлектрическая биконическая антенна: (a) – вид сбоку; (b) – поперечное сечение; (c) – подключение через коаксиальный кабель.

Очевидно, что возможны и другие конструкции системы воздействия электромагнитных импульсов пикосекундной длительности на биологические среды: например, в работе [95] было предложено использовать для этой задачи конструкцию с антенной Кошелева. Отметим, что в большинстве случаев исследованные варианты конструкций антенн были представлены в основном в виде компьютерного моделирования или экспериментов *in vitro*. Однако в настоящее время отсутствуют работы по непосредственному применению разработанных устройств в экспериментах *in vivo* или реальных биомедицинских приложениях.

1.2.3. Регистрация мощных ультракоротких импульсов

При рассмотрении нетеплового воздействия на биоподобные среды нужны системы регистрации мощных ультракоротких импульсов в реальном времени. Это связано с необходимостью мониторинга возможности пробоя среды из-за высокой интенсивности импульсов, а также изменения формы импульсов после их подачи

на нагрузку. Следует отметить, что высокомощные импульсы сложно измерить напрямую, поскольку большинство осциллографов обычно имеют диапазон амплитуд до 10 В. В связи с этим для измерения характеристик ультракоротких импульсов пользуются резистивными или емкостными делителями напряжения, которые делают импульс низкомощным и подходящим для регистрации [12].

Емкостные делители напряжения сложны в производстве в связи с их высокой чувствительностью, поэтому для решения поставленной задачи уменьшения амплитуды импульсов обычно используют более простые и доступные резистивные делители. Типичный резистивный делитель напряжения состоит из двух сопротивлений R_1 и R_2 (R_1>>R_2), как показано на рис. 1.11. Пусть V – измеряемое напряжение на нагрузке, а V_2 – напряжение, наблюдаемое на осциллографе. Тогда отношение между ними будет определено выражением (15):

$$V = \frac{R_1 + R_2}{R_2} V_2 \cong \frac{R_1}{R_2} V_2, \qquad (16)$$

где величина $\frac{R_1}{R_2}$ называется коэффициентом ослабления, и она не должна быть слишком большой, поскольку сильно ослабленный сигнал подвержен зашумлению. Паразитные параметры минимизируются, чтобы сохранить исходную форму импульса.

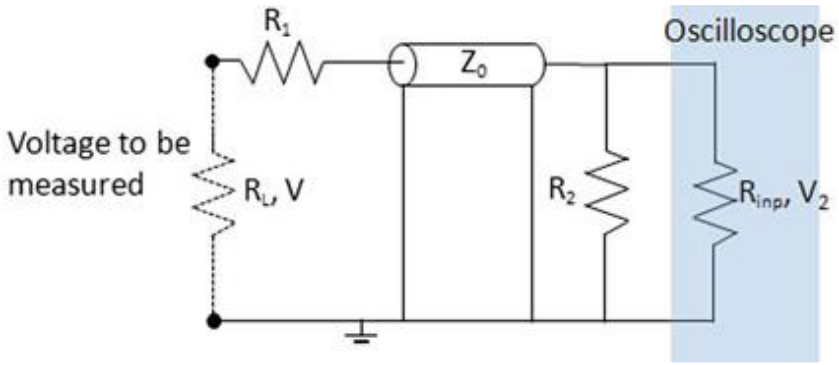


Рисунок 1.11. Общая схема резистивного делителя напряжения. Z_0 – импеданс кабеля, R_L – сопротивление нагрузки, R_{inp} – импеданс осциллографа.

Когда для подключения используются коаксиальные кабели с сопротивлением 50 Ом, высокопроизводительный резисторный аттенюатор обычно обеспечивает конечное сопротивление 50 Ом как на входе, так и на выходе. Такой аттенюатор можно использовать для понижения выходного напряжения генератора импульсов. В качестве конкретной конструкции аттенюатора в экспериментах было предложено использовать π-сеть резисторов, изображённую на рис. 1.12 [96]. Такая π-сеть поглощает отражения от двух электродов, погруженных в среду культуры клеток. Поскольку резисторы расположены симметрично, сопротивление, наблюдаемое со стороны левого порта, идентично сопротивлению, наблюдаемому со стороны правого порта.

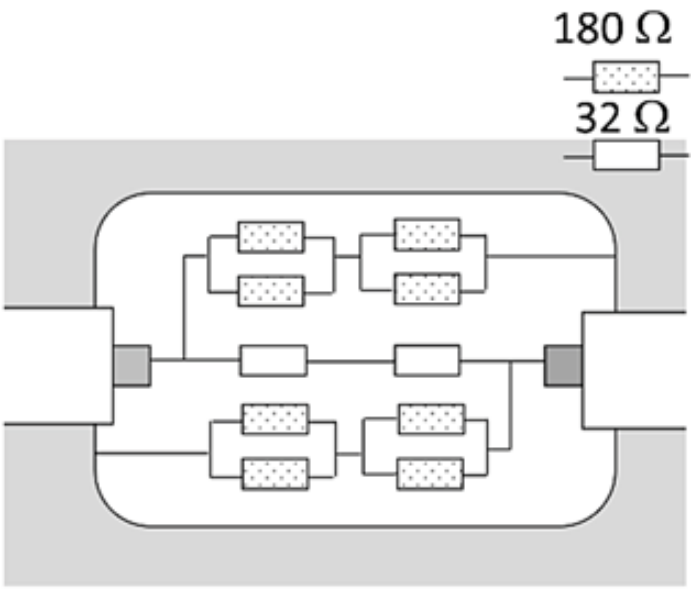


Рисунок 1.12. Подробное расположение резисторов в π-сети, используемой в качестве аттенюатора.

Другими элементами, которые можно использовать для регистрации мощных ультракоротких импульсов, являются датчики B-dot и D-dot (схемы представлены на рис. 1.13) [96]. Датчик D-dot представляет собой электрод с емкостной связью, который измеряет напряжение, создаваемое током смещения между высоковольтным электродом и электродом датчика. Датчик B-dot представляет

собой датчик с индуктивной связью, представляющий собой небольшую петлю, которая улавливает часть создаваемого импульсом магнитного поля, когда он проходит положение датчика. Достоинством таких датчиков является то, что они легко калибруются и моделируются, очень компактны, недороги и имеют полосу пропускания до нескольких ГГц. Более того, их можно использовать в любой импульсной системе питания, где источник импульсов соединяется с нагрузкой коаксиальным кабелем.

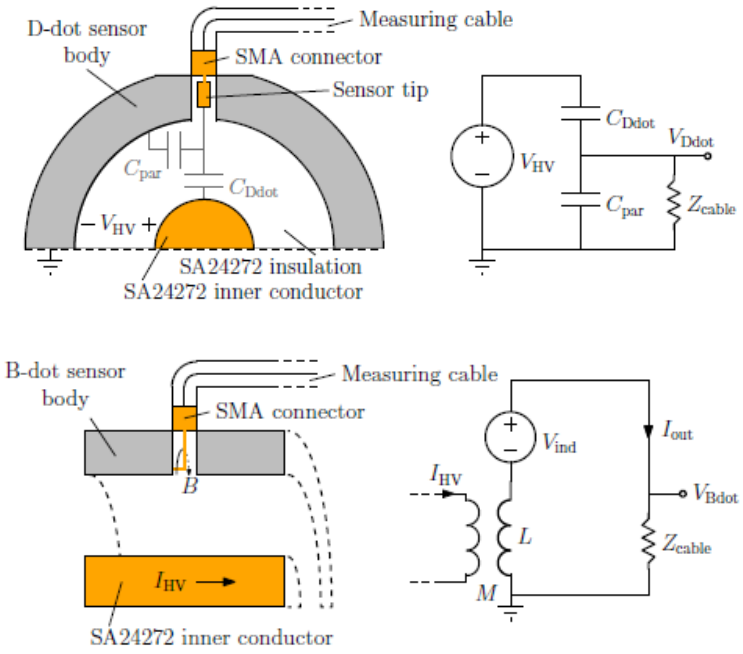


Рисунок 1.13. Сверху: чертёж в разрезе датчика D-dot и радиофизическая эквивалентная схема (V_{Ddot} — напряжение от датчика D-dot, V_{HV} — напряжение на внутреннем проводнике кабеля, C_{Ddot} – паразитная емкость от электрода датчика D-dot до земли, C_{par} – емкость от электрода датчика D-dot до внутреннего проводника кабеля с импедансом Z_{cable}). Снизу: чертёж в разрезе датчика B-dot и радиофизическая эквивалентная схема (V_{Bdot} — напряжение с датчика B-dot, I_{HV} — ток через внутренний проводник кабеля, V_{ind} — наведенное напряжение вдоль электрода B-dot, I_{out} — ток в электроде датчика B-dot).

Стоит отметить, что на систему контроля/диагностики импульсов также накладывает серьёзные требования широкополосность сигнала от генератора ультракоротких высокомощных импульсов. В связи с этим и осциллографы, и делители напряжения для его регистрации также должны быть широкополосными. Например, для субнаносекундного импульса с длительностью ~100 пс регистрирующие элементы системы должны иметь полосу пропускания ~20-30 ГГц, из-за чего они сложны в производстве и отличаются дорогой стоимостью.

1.3. Биологические эффекты при воздействии электрическими импульсами

1.3.1. Механизмы клеточной гибели при воздействии

Воздействие наносекундными импульсами на клетки может вызывать их гибель в зависимости от параметров воздействия и типов клеток. Основным и наиболее часто регистрируемым при воздействии механизмом гибели клеток, индуцированной наносекундными импульсами, является апоптоз. Апоптоз — это регулируемый процесс программируемой клеточной гибели, в результате которого клетка распадается на отдельные тельца, ограниченные плазматической мембраной. Апоптоз не вызывает воспаления и обычно характеризуется четкими морфологическими характеристиками и энергозависимыми биохимическими механизмами [97].

Вторым механизмом является некроз – это повреждение клетки, которое приводит к их преждевременной гибели в живой ткани путем саморастворения под действием собственных гидролитических ферментов. Это быстрая, неконтролируемая гибель клеток, вызванная экстремальными условиями (жара, радиация, инфекция), которая приводит к потере клеточного гомеостаза и характеризуется разрывом клеточной мембраны [98].

Помимо апоптоза и некроза воздействие наносекундными импульсами способно вызывать пироптоз и некроптоз. Оба из них являются высоковоспалительными формами программируемой гибели клеток, а отличаются в основном ключевыми ферментами. Иногда их объединяют единым понятием «иммуногенная клеточная смерть», которое используется в более широком контексте различных типов гибели клеток, которые могут вызвать иммунный ответ мембраны [99].

Из всех представленных механизмов клеточной гибели апоптоз является наиболее упорядоченным и «чистым», и следовательно, более предпочтительным для индуцирования на практике. Более того, было показано, что с помощью наносекундных импульсов можно контролировать прогрессирование апоптоза путем выбора параметров импульсов [100]. Однако стоит отметить, что в настоящее время механизмы клеточной гибели из-за воздействия ультракороткими электрическими импульсами пока недостаточно изучены. В частности, хотя известно, что электропоративное воздействие вызывает своего рода «повреждение» клетки и вызывает её гибель, неизвестно, является ли гибель клеток результатом множественных повреждений клеток, одного конкретного способа воздействия на конкретный объект, или же различные способы инициируются различными используемыми электрическими импульсами [99].

1.3.2. Прочие эффекты воздействия

Ещё одним эффектом воздействия наносекундными импульсами на клетки является увеличение ионного транспорта через клеточную мембрану благодаря повышению её проницаемости из-за электропорации [100]. Повреждение плазматической мембраны позволяет ионам Ca^{2+} проникать в клетку из внеклеточного пространства, нарушая внутриклеточный гомеостаз кальция.

Стоит отметить, что Ca^{2+} в цитоплазме поддерживается в низкой концентрации и ограничен внутренними запасами, следовательно, после воздействия наносекундными импульсами Ca^{2+} может либо высвобождаться из митохондрий в клетке, либо поглощаться извне клетки благодаря проницаемости клеточной мембраны. На данный момент неизвестно, является ли высвобождение Ca^{2+} прямым или косвенным эффектом наносекундных импульсов [101]. Примечательно, что использование импульсов пикосекундной длительности так же увеличивает транспорт ионов Ca^{2+} через мембрану, однако это происходит путём, отличным от обычной электропорации, поскольку открытие пор не удалось зарегистрировать обычными методами [102].

Увеличение ионного транспорта может быть использовано в качестве детектора проявления эффектов нетеплового импульсного воздействия. Так, ионы Ca^{2+} и Ba^{2+} продемонстрировали свою эффективность в качестве электропорационных маркеров с высокой чувствительностью [103], причем Ba^{2+} было предложено использовать для наблюдения повреждений в мембране, а также её повторного закрытия при обратимой электропорации.

Помимо влияния на ионный транспорт через поры, было обнаружено, что наносекундные импульсы могут регулировать и модифицировать также и электронный транспорт, который отвечает за окислительно-восстановительные реакции в клетке [104]. Это открытие оказывает существенное влияние на понимание того, как ультракороткие импульсы влияют на структуру и функции клеток.

1.3.3. Медицинские применения за рубежом и в России

Воздействие мощными ультракороткими импульсами применимо во многих сферах биологической практики, в частности, для обеззараживания пищевых продуктов [105] и дистанционной доставки лекарств [106]. Что касается

медицинских применений воздействия мощными ультракороткими импульсами, одним из первых предложений было использование метода для терапии онкологических заболеваний и, в частности, для уничтожения злокачественных образований. Большинство исследований *in vivo* в этой области проводятся на лабораторных мышах с различными прививаемыми опухолями. Главным преимуществом метода явилось отсутствие нагревания объекта при воздействии: так, эксперименты по подаче импульсов с длительностью 100 и 300 нс на привитые опухоли у мышей не показали значительного нагревания [107]. В экспериментах рассматриваемое воздействие продемонстрировало эффективность в воздействии на клетки рака печени [108] и рака груди [109], причём данный метод лечения на основе электропорации индуцировал у здоровых клеток антиопухолевый иммунный ответ, что имеет решающее значение для ликвидации опухолей в долгосрочной перспективе и предотвращения рецидивов.

Работы российских специалистов, где эффекты воздействия мощными ультракороткими импульсами используются в прикладной медицине, также в основном сосредоточены на терапии онкологических заболеваний, как в совокупности с другими методами [14], так и отдельно [15–17]. В этих работах было отмечено, что данный метод хорошо тормозит рост опухолевых клеток за счет индукции в них процесса апоптотической гибели, демонстрирует эффективность для разных видов онкологических образований и отличается общей простотой исполнения в реальном применении.

Применение воздействия мощными ультракороткими импульсами не ограничено борьбой с онкологическими образованиями. Так, было предложено использовать наносекундные импульсы в дерматологии, а именно, для запуска регулируемой гибели клеток с целью устранения повреждений кожи, которые имеют клеточную природу [110]. Полученные результаты продемонстрировали, что обработка кожи лица наносекундными импульсами пригодна для точного и быстрого удаления поражений эпидермиса. В работе [111] также были проведены начальные эксперименты по использованию наносекундных импульсов в борьбе с

кожными угрями, по результатам которых отмечена безопасность и эффективность данного метода терапии, хотя остаются вопросы о долгосрочности эффектов воздействия.

Исследуется также применение наносекундных импульсов в исследованиях по воздействию на стволовые клетки. Так, предложено использовать наносекундные импульсы для увеличения пролиферации различных стволовых клеток, например, остеобластов (клеток костных тканей) и миобластов (клеток мышечных тканей), что может иметь медицинское применение для инициирования соответственно костной и мышечной регенерации [112].

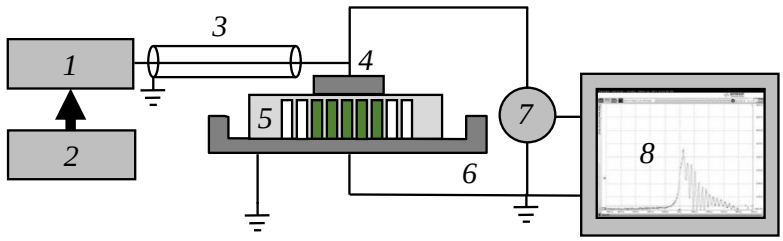
Важным новым применением индуцирования гибели клеток с помощью наносекундных импульсов является лечение сердечной аритмии. Современные методы лечения страдают от значительной частоты рецидивов и тепловых побочных эффектов, а также отличаются большой длительностью процедуры, в то время как мощные ультракороткие импульсы, не нагревая ткани, создает более равномерную абляцию сердечной ткани и позволяют сократить порядок времени лечения с минут до секунд [113].

Наконец, ещё одно возможное применение внутриклеточных электроэффектов — генная терапия. Эксперименты по воздействию ультракороткими импульсами на клеточную мембрану показали, что поры в этой мембране открываются кратковременно, не повреждая клетку навсегда [27]. Если после применения импульса электропорации генам дается достаточно времени для того, чтобы диффундировать в сторону ядра, благодаря применению ультракороткого импульса для открытия ядерной мембраны можно увеличить поток генов в ядро. В работе [94] проводились эксперименты по воздействию на клетки растений Arabidopsis thaliana, и было выявлено ограниченное увеличение уровня экспрессии некоторых генов, поэтому в этом направлении необходимы дальнейшие исследования.

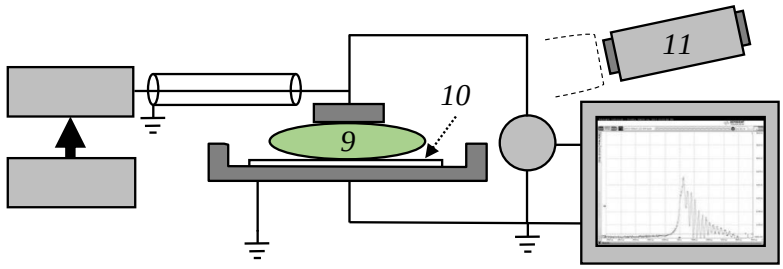
Глава 2. Технология эксперимента и теоретические исследования нетеплового воздействия мощными электромагнитными импульсами на биологические среды

2.1. Описание схемы экспериментальной установки

Для изучения эффектов нетеплового воздействия мощных импульсов на различные биологические объекты используется экспериментальная установка, схема которой изображена на рисунке 2.1.



(а)



(б)

Рисунок 2.1. Схема экспериментальной установка для экспериментов *in vitro* (а) и *in vivo* (б). 1 – генератор мощных импульсов, 2 – задающий генератор, 3 – высоковольтный коаксиальный кабель, 4 – верхний электрод (диск), 5 – микропланшет с образцом для экспериментов *in vitro,* 6 – нижний электрод (чашка), 7 – ВЧ щуп-делитель напряжения, 8 – цифровой осциллограф, 9 – лабораторная мышь с привитой опухолью для экспериментов *in vivo,* 10 – подложка из оргстекла, 11 – термограф.

В установке используется высоковольтный генератор наносекундных импульсов FID Technology (1), показанный на рисунке 2.2.

(а)

(б)

Рисунок 2.2. Высоковольтный генератор наносекундных импульсов FID Technology: (а) – лицевая панель с управлением частотой следования и амплитудой импульсов, (б) – задняя панель с высоковольтным выходом.

Это модель из серии высоковольтных наносекундных импульсных генераторов на основе сверхбыстрых твердотельных переключателей FID (Fast Ionization Dynistors, рус. «динисторы с быстрой ионизацией»). FID имеют два стационарных состояния: непроводящее и высокопроводящее – быстрый (около 1 нс) переход из непроводящего состояния в высокопроводящее индуцируется приложением короткого (наносекундного) импульса высокого напряжения к блокирующему p-n-переходу многослойной n-p-n-p полупроводниковой структуры. Благодаря регенеративной обратной связи FID может оставаться в высокопроводящем состоянии бесконечно долго. FID обладают рядом электронных характеристик, недоступных одновременно другим электронным переключателям: пиковая коммутационная мощность может достигать ~10 МВт; время включения составляет ~1 нс и меньше; максимальное рабочее напряжение превышает 5 кВ. В нашем генераторе используется 10 сборок 3 кВ с длительностью импульса 7,5 нс.

В процессе работы экспериментальной установки с рисунка 2.1 импульс формируется на выходе высоковольтного генератора, когда на его вход внешней синхронизации поступают задающие низковольтные импульсы от внешнего источника, генератора RIGOL DG4102. Внешний источник может работать как в режиме одиночных импульсов, так и с задаваемой частотой повторения (обычно от 0.5 до 100 Гц). Пуск и остановка импульсов запуска производятся вручную по секундомеру, благодаря чему контролируется общее количество воздействующих импульсов.

В схеме с рисунка 2.1 с выхода основного генератора по высоковольтному коаксиальному кабелю (3) импульсы амплитудой до 60кВ и длительностью ~5нс поступают на электроды: верхний электрод (4) в форме диска диаметром до 50 мм (есть возможность использования электродов меньшего диаметра в зависимости от исследуемого объекта) и нижний электрод в форме чашки (6). Между электродами, которые образуют плоский конденсатор, помещается исследуемый объект, выполняющий при воздействии функцию нагрузки – микропланшет, заполненный

раствором опухолевых клеток (5), или лабораторная мышь с привитой в области бедра раковой опухолью (9), зафиксированная на подложке из оргстекла (10). К электродам подключен высокочастотный высоковольтный щуп-делитель напряжения Актаком АСА-6039 (7) для контроля амплитуды и формы поступающих импульсов. С выхода щупа уменьшенные по напряжению в 1000 раз импульсы поступают на вход цифрового осциллографа Infinium MSO9404 (8) для регистрации (осциллограмма типичного зарегистрированного импульса представлена на рисунке 2.3). Полоса пропускания этого цифрового осциллографа 4 ГГц, что позволяет регистрировать импульсы длительностью ~3-10 нс без искажения формы. Для контроля температуры объекта в экспериментах *in vivo* используется медицинский инфракрасный термограф ИРТИС 2000 (11).

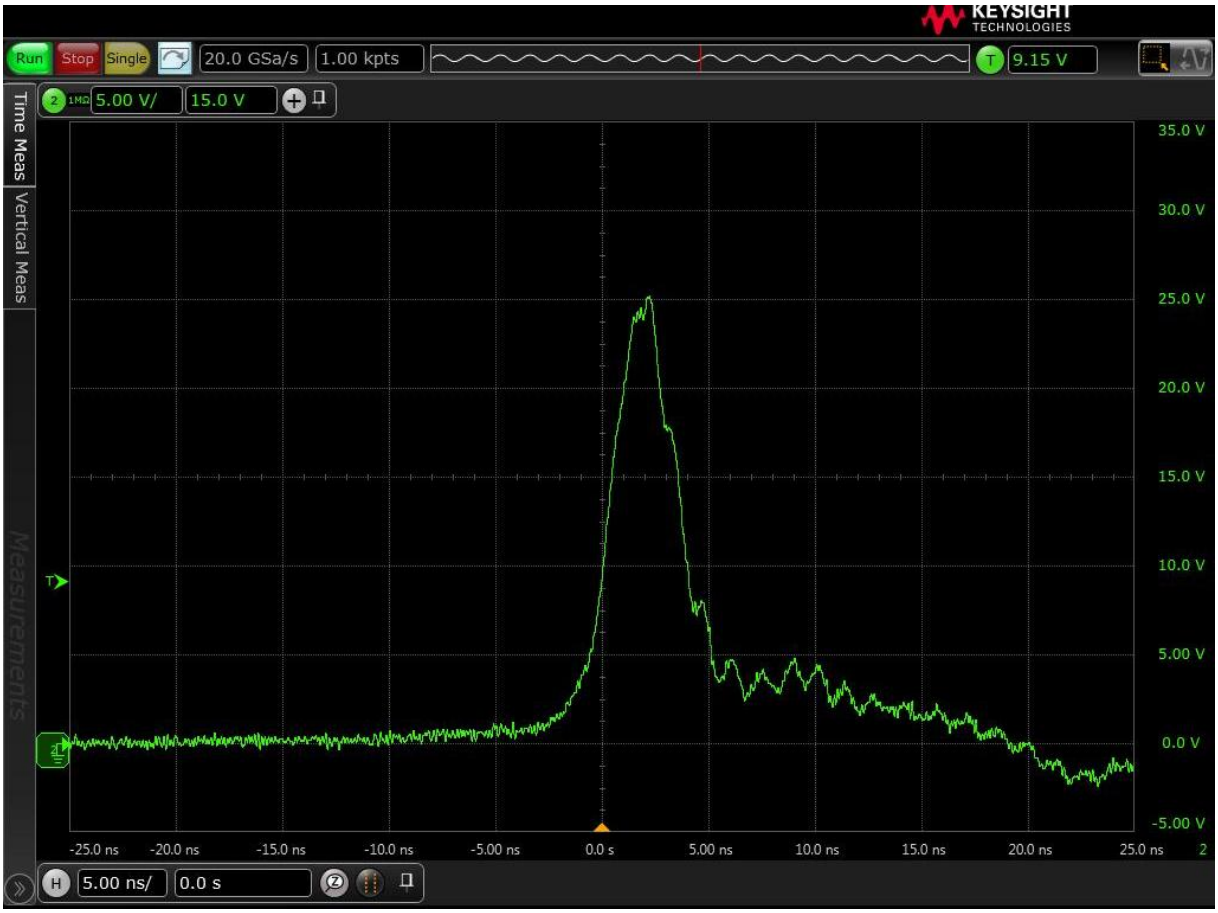


Рисунок 2.3. Осциллограмма наносекундного импульса на нагрузке.

Рассмотрим более подробно исследуемые биологические объекты.

Микропланшет с образцом, использовавшийся в экспериментах *in vitro,* представляет собой пластиковый параллелепипед высотой 16,5 мм. Внутри микропланшета с шагом 9 мм расположены 96 цилиндрических лунок высотой 10,5 мм и диаметром 6,5 мм. Для проведения эксперимента в центре микропланшета выбирается «квадрат» 5×5 лунок, который заполняется биологическим материалом и помещается на нижний электрод-чашку так, чтобы верхний электрод полностью закрывал данную область (см. рис. 2.4). Лунки занимают не весь объём микропланшета: есть воздушно-пластиковые промежутки сверху, снизу и между лунками. Эти промежутки существенно ослабляют степень воздействия на образец высоковольтных импульсов, подаваемых на электроды.

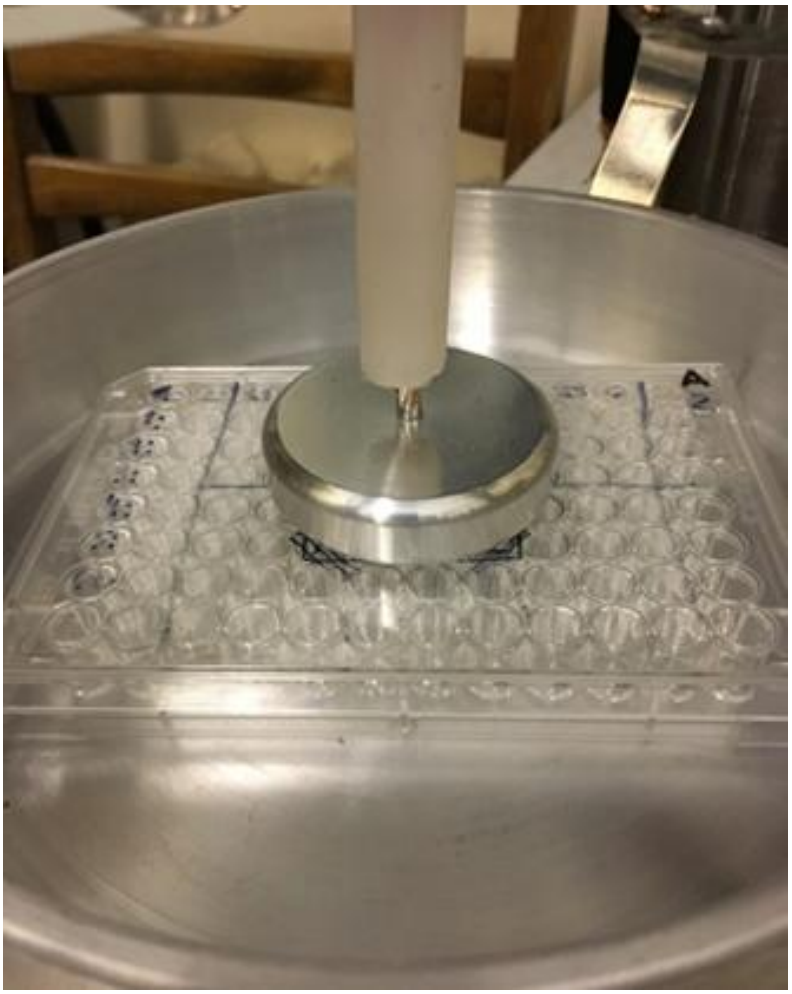


Рисунок 2.4. Общий вид схемы воздействия: микропланшет с высоковольтным электродом.

Что касается экспериментов *in vivo*, обрабатываемая в их ходе лабораторная мышь с привитой опухолью в области бедра фиксируется с помощью резинок в неподвижном положении на подложке из оргстекла. После этого, как и в экспериментах *in vitro*, мышь на подложке располагается на нижнем электроде большого диаметра (см. рис. 2.5) таким образом, чтобы область опухоли на бедре полностью закрывал верхний электрод диаметром D = 10 мм.

Рисунок 2.5. Лабораторная мышь на подложке из оргстекла, помещённая между верхним и нижним электродами в экспериментальной установке.

Стоит отметить, что технология эксперимента, описанная выше, является достаточно гибкой и применима для широкого спектра задач помимо рассмотренных в данной диссертации. Так, подобная методика с реализованной экспериментальной установкой применялась нашей группой и для обработки других объектов и сред: в качестве примеров можно назвать исследования по импульсному воздействию на золотосодержащие горные породы [114], а также

работы [106] и [115] по импульсной декапсуляции нанокомпозитных липосом (дистанционная доставка лекарств). В качестве примера воздействия на искусственные среды можно назвать исследования стойкости полупроводниковой элементной базы электроники к мощным электромагнитным импульсам излучения [116]. Это дополнительно подчёркивает гибкость приложения данного метода для решения задач в различных областях.

2.2. Применение метода эквивалентных схем

Большинство работ по тематике нетеплового воздействия ультракороткими импульсами на живые органические среды касаются в основном биологических эффектов, в то время как физические механизмы воздействия до сих пор недостаточно исследованы. Так, существует недостаточное количество работ, где анализируется трансформация импульса на разных конфигурациях нагрузок (биологических объектов). Предлагается представлять различные варианты нагрузок в виде радиофизических эквивалентных схем, позволяющих промоделировать характерные для каждого варианта изменения импульса на объекте, а также численно оценить некоторые физические величины.

2.2.1. Эквивалентная радиофизическая схема объекта в экспериментах in vitro

Для численной оценки той части напряжения и тока, которая поступает непосредственно на импульсно обрабатываемый биологический материал, микропланшет, используемый в экспериментах *in vitro*, можно представить в виде эквивалентной радиофизической схемы (см. рис. 2.6). На рисунке 2.6а образец (лунки с биологическим материалом), обладающий суммарной емкостью C_3 и суммарным сопротивлением R_2, последовательно соединен с воздушно-

пластиковыми промежутками сверху и снизу лунок. На эквивалентной схеме все эти промежутки упрощённо показаны общей областью сверху с суммарной емкостью C_2 (также соответствует конденсатору C_2 на рисунке 2.6б). Параллельно этой цепочке подключен конденсатор C_1, обозначающий суммарную емкость воздушно-пластиковых промежутков между лунками, находящихся между электродами. Импульсное напряжение подаётся с генератора G через коаксиальный кабель с волновым сопротивлением R_1. Напряжение на микропланшете (цепочка элементов C_1, C_2, C_3, R_2 на рисунке 2.6б) контролируется высоковольтным щупом-вольтметром V.

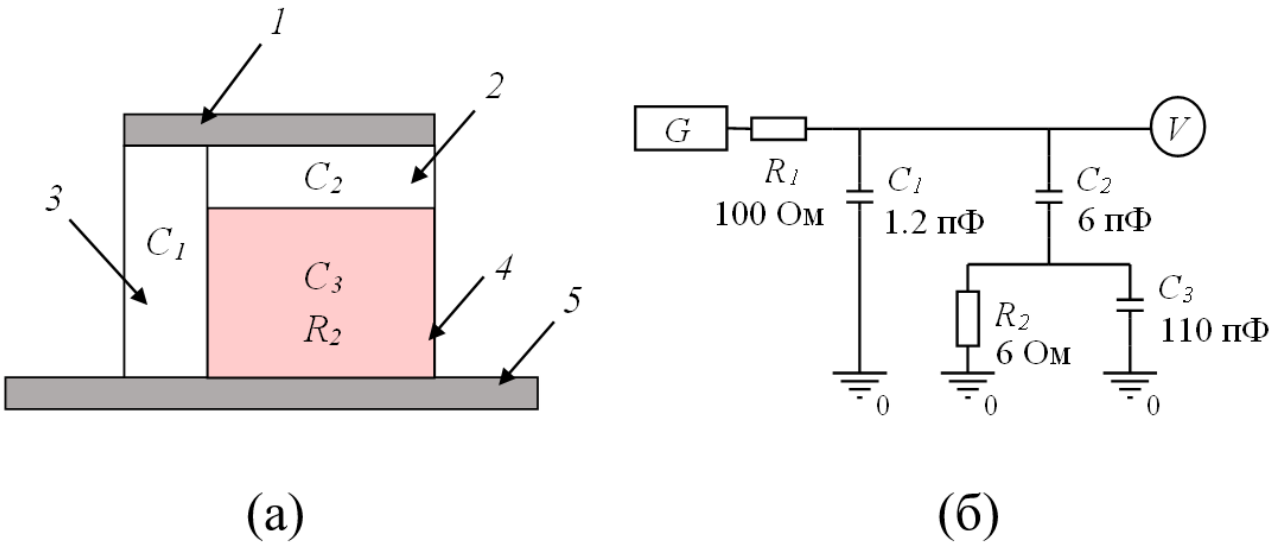


Рисунок 2.6. Схема расположения (а) и эквивалентная радиофизическая схема (б) микропланшета с биологическим образцом. 1 – верхний электрод, 2 – воздушно-пластиковые зазоры снизу и сверху от лунок в микропланшете (на рисунке упрощённо показано только сверху), 3 – воздушно-пластиковые зазоры между лунками в планшете, 4 – лунки с биологическим материалом, 5 – нижний электрод.

Численные значения элементов эквивалентной схемы можно оценить следующим образом.

1. R_1, волновое сопротивление коаксиального кабеля, известно и равно 100 Ом.
2. C_1, суммарную емкость промежутков между лунками, можно оценить исходя из геометрических размеров, а именно, из соотношения суммарных площадей сечения лунок и общей площади сечения микропланшета. Тогда C_1 составляет часть емкости цилиндрического конденсатора, площадь сечения которого задаётся верхним электродом, а расстояние между обкладками – толщиной зажатого между электродами микропланшета. Для случая такого конденсатора C_0 с пустым микропланшетом была измерена напрямую емкость пустого микропланшета с помощью измерителя Instek LCR-810: было получено значение 3 пФ. Таким образом, $C_1 = 0.4 \times C_0 = 1.2$ пФ (численный коэффициент в формуле выбран из геометрических соображений с учётом формы микропланшета).
3. C_2, суммарную емкость зазоров снизу и сверху от лунок, можно аналогично оценить по соотношению величин рассматриваемых зазоров и толщины микропланшета. Поэтому $C_2 = 2 \times C_0 = 6$ пФ (численный коэффициент выбран исходя из тех же соображений, что и выше).
4. Чтобы определить значения C_3 и R_2 (суммарную емкость и электрическое сопротивление лунок с биологическим материалом соответственно), была использована специальная кювета в форме параллелепипеда, на торцах которого расположены электроды. Кювета заполнялась исследуемым биологическим материалом (клеточным раствором), и его емкость и сопротивление были измерены напрямую измерителем Instek LCR-810. Зная внутренние длину, ширину и высоту заполненной части кюветы, а также суммарную площадь сечения лунок под верхним электродом и их высоту, можно вычислить $C_3 = 110$ пФ по формуле $C = \frac{\varepsilon \varepsilon_0 S}{d}$. Сопротивление образца среды R_2 вычисляется по формуле: $R = \frac{d}{\sigma S}$, его значение равняется 6 Ом.

2.2.2. Эквивалентная радиофизическая схема объекта в экспериментах in vivo

Аналогично схеме выше, можно составить эквивалентную радиофизическую схему для объекта в экспериментах *in vivo*: лабораторной мыши с опухолью, привитой в области бедра. При проведении расчетов принималось, что толщина части бедра в области воздействия между электродами установки составляет d_1 = 10 мм. Также принималось, что бедро мыши состоит в основном из мышечной ткани с электропроводностью σ = 0.5 См/м и диэлектрической проницаемостью порядка ε_1 = 80 (оба значения соответствуют таковым для воды) для значений времени, соответствующих длительности воздействующего импульса ~1-10 нс, что по частоте соответствует области между бета- и гамма-дисперсиями.

Область воздействия, представленная в виде эквивалентной радиофизической схемы, изображена на рис. 2.7. Как и в случае экспериментов *in vitro*, импульсное напряжение подаётся с генератора *G* через волновое сопротивление коаксиального кабеля R_1, а напряжение на объекте (цепочка элементов C_1, C_2, R_2) контролируется высоковольтным щупом-вольтметром *V*.

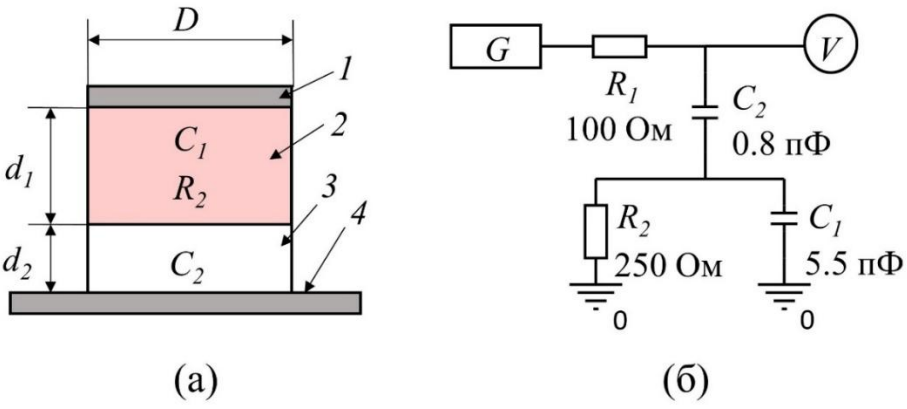


Рисунок 2.7. Схема расположения (а) и эквивалентная радиофизическая схема (б) бедра лабораторной мыши (на подложке из оргстекла) для воздействия высоковольтными импульсами. 1 – верхний электрод, 2 – объект, 3 – подложка, 4 – нижний электрод.

Оценим численные значения элементов данной эквивалентной радиофизической схемы похожим на вышеописанный для случая *in vitro* образом.

1. R_1, волновое сопротивление кабеля, известно и равно 100 Ом.
2. C_1, ёмкость бедра мыши, представляет собой ёмкость цилиндрического конденсатора. Площадь сечения S такого конденсатора задаётся верхним электродом диаметром D = 10 мм, а расстояние между обкладками – толщиной бедра мыши d_1 = 10 мм, зажатого между верхним электродом и подложкой из оргстекла. Значение C_1 вычисляется по формуле $C = \frac{\varepsilon\varepsilon_0 S}{d}$ и составляет 5.5 пФ.
3. R_2, сопротивление бедра мыши, вычисляется по формуле $R = \frac{d}{\sigma S}$ и составляет 250 Ом.
4. C_2, ёмкость подложки из оргстекла с диэлектрической проницаемостью ε_2 = 3.5 и высотой d_2 = 3 мм, рассчитывается аналогично и составляет C_2 = 0,8 пФ. Отметим, что на эквивалентной радиофизической схеме на рисунке 2.7б для удобства моделирования емкость подложки расположена выше емкости и сопротивления бедра мыши. Это сделано для удобства моделирования и никак не влияет на работу схемы, так как электрически они соединены последовательно.

Ёмкость C_2 вносит большой вклад в ослабление импульса на объекте-нагрузке, так что целесообразно также рассмотреть теоретический случай отсутствия подложки из оргстекла при воздействии на лабораторную мышь. Радиофизическая эквивалентная схема такого эксперимента, где отсутствует емкость C_2, представлена на рисунке 2.8.

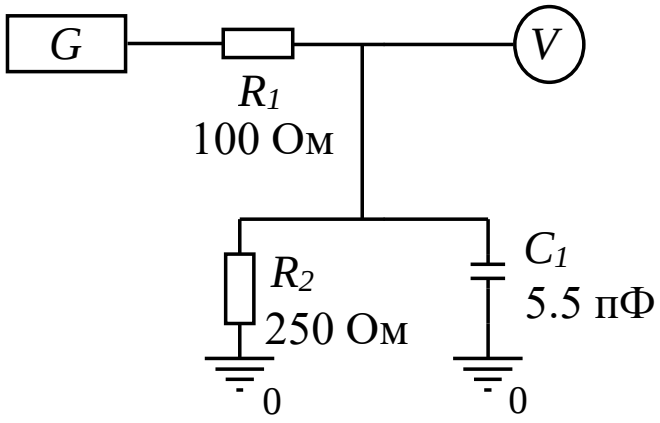


Рисунок 2.8. Эквивалентная радиофизическая схема (б) бедра лабораторной мыши (без подложки из оргстекла) для воздействия высоковольтными импульсами.

2.3. Численная оценка переходных процессов в эквивалентных радиофизических схемах объектов

2.3.1. Моделирование переходных процессов и их численная оценка в экспериментах in vitro

В эквивалентной радиофизической схеме эксперимента *in vitro* с рисунка 2.6 производилось моделирование переходных процессов и численно оценивались некоторые характерные физические величины. Моделирование производилось в программе OrCAD PSpice. На вход *G* схемы подавался импульс треугольной формы с амплитудой 70 кВ и временем нарастания и спада по 3 нс. Из рисунка 2.9 видно, что его форма после прохождения коаксиального кабеля слегка сглаживалась, а амплитуда испытывала падение до 58 кВ.

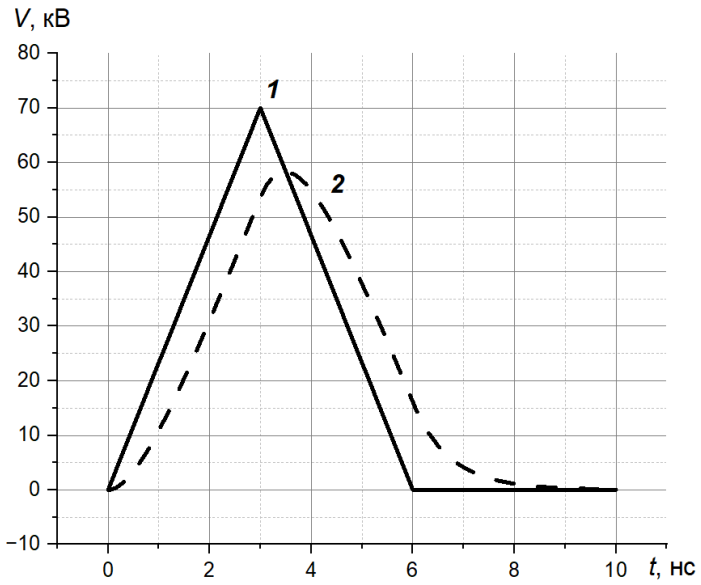


Рисунок 2.9. Зависимости напряжения импульса на входе системы (1) и после прохождения коаксиального кабеля (2) от времени для случая воздействия *in vitro*.

Импульс напряжения после резистора R_1 на эквивалентной радиофизической схеме приобретает форму, амплитуду и длительность, близкие к таковым у импульса, наблюдаемого на осциллограмме, снятой с помощью высоковольтного щупа-делителя напряжения. Моделирование показало, что на лунках с биологическим материалом амплитуда напряжения падает почти на 2 порядка – до 780 В (см. рис. 2.10). Форма импульса при этом сильно искажается, он становится биполярным, так как напряжение поступает через малую ёмкость конденсатора C_2 = 6 пФ, почти полностью заряженного и оказывающегося подключенным с обратной полярностью.

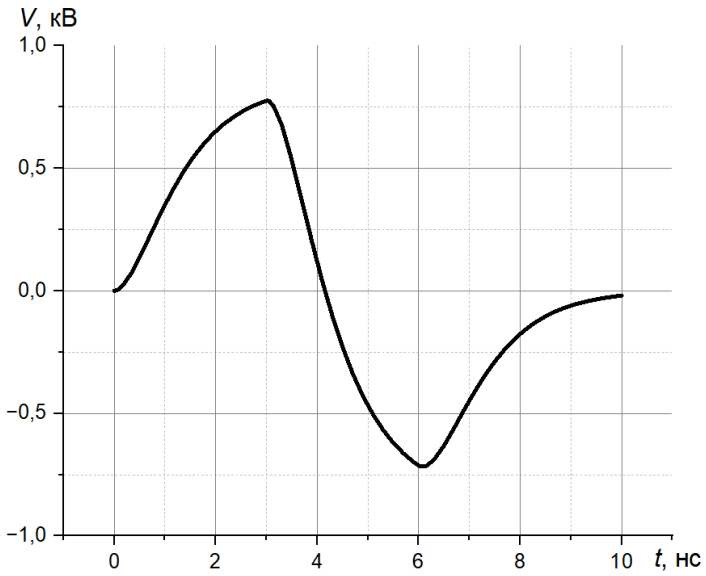


Рисунок 2.10. Зависимость напряжения на биологической нагрузке от времени для случая воздействия *in vitro*.

В схему поступает мощность, достигающая в пике 8.8 МВт. Она представляет собой произведение тока, который идёт по коаксиальному кабелю, и напряжения на генераторе, а её график имеет вид, показанный на рис. 2.11.

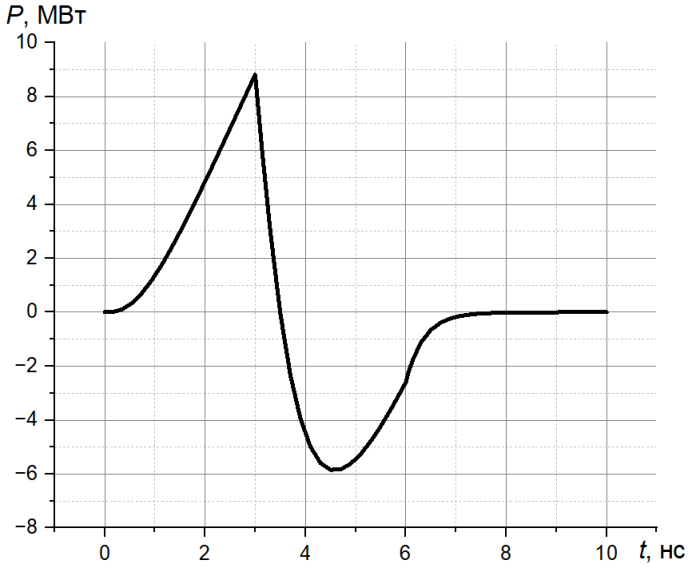


Рисунок 2.11. Зависимость мощности одного импульса на входе системы от времени для случая воздействия *in vitro*.

Поступающая мощность рассеивается на лунках в виде двух импульсов с пиками уменьшенной величины: 100 кВт и 86 кВт, что видно из рис. 2.12. Максимумы мощности достигаются в точках 3 нс и 6 нс: первый максимум соответствует ситуации, когда напряжение на выходе генератора аналогичным образом достигает максимума, а второй появляется за счёт тока разряда емкости C_2, который затем экспоненциально спадает до 0.

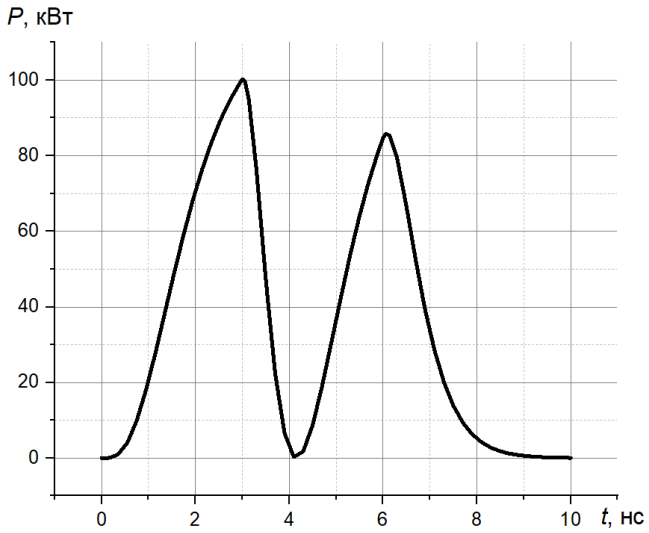


Рисунок 2.12. Зависимость мощности импульса, рассеиваемого на биологической нагрузке, от времени для случая воздействия *in vitro*.

На следующем шаге оценим энергию одного импульса, проинтегрировав зависимость мощности от времени (как для поступающего импульса, так и для рассеивающегося на объекте). Результаты моделирования представлены на рисунках 2.13 и 2.14: из них видно, что от генератора поступает 12.3 мДж, в то время как рассеивается в среде в виде тепла 0.35 мДж. Настолько малые значения энергии, рассеиваемой на нагрузке, позволяют сделать вывод, что воздействие наносекундным импульсом (70 кВ, 6 нс), производящееся на данную систему опухолевых клеток, можно считать безнагревным, чему будет уделено внимание далее в тексте.

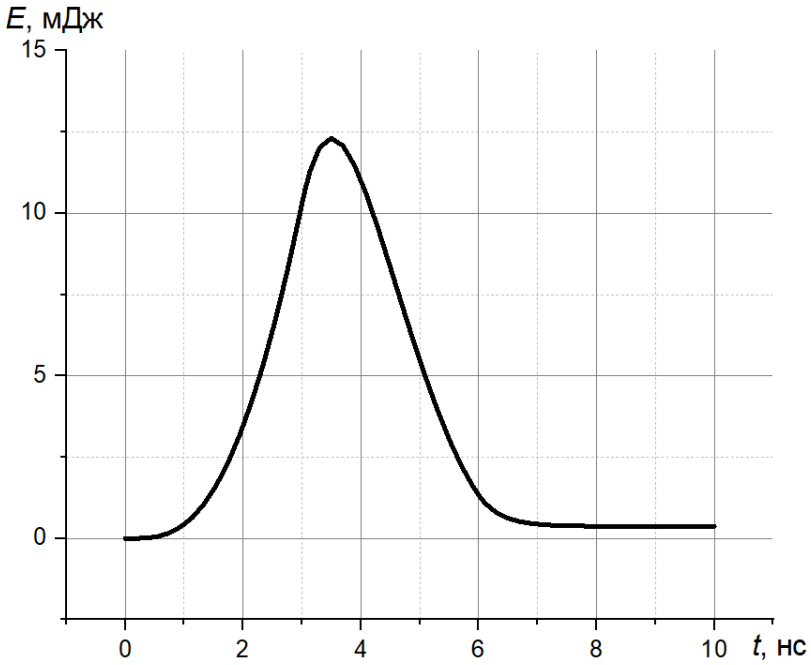


Рисунок 2.13. Зависимость энергии одного импульса на входе системы от времени для случая воздействия *in vitro*.

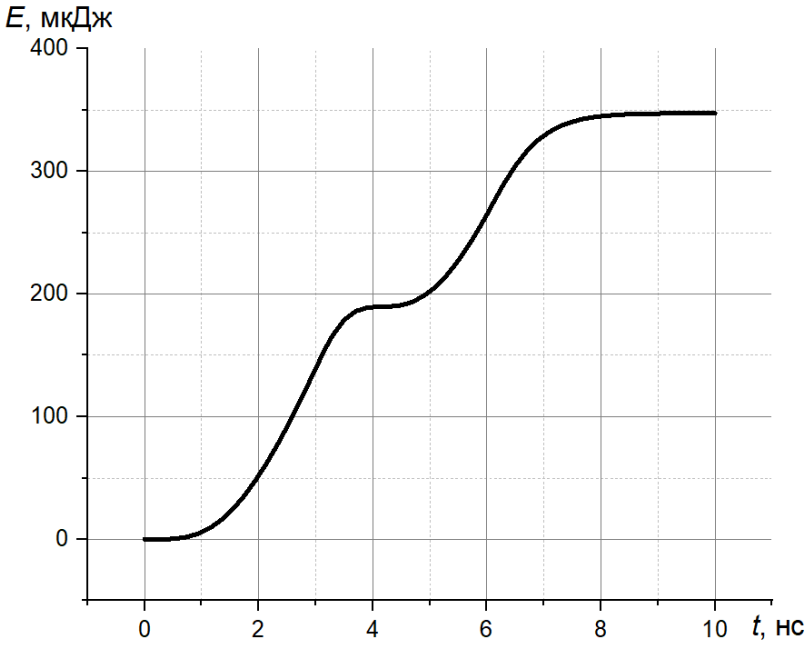


Рисунок 2.14. Зависимость энергии импульса, рассеиваемого на лунках микропланшета с раствором опухолевых клеток, от времени для случая воздействия *in vitro*.

2.3.2. Моделирование переходных процессов и их численная оценка в экспериментах in vivo

Аналогично случаю воздействия *in vitro*, была выполнена численная оценка переходных процессов в схеме эксперимента *in vivo*, которая была дана выше на рисунке 2.7.

В этом случае при моделировании на вход схемы с генератора *G* подавался треугольный импульс с амплитудой 30 кВ и временем нарастания и спада по 3 нс, который примерно соответствовал профилю экспериментального импульса (рис. 2.15а). Моделирование показало, что на бедре мыши амплитуда напряжения через 3 нс не поднимается выше 1,7 кВ (рис. 2.15б), так как оно поступает через малую ёмкость C_2 = 0,8 пФ. Как и в случае моделированной схемы эксперимента *in vitro*, это объясняется тем, что за время с 3 до 6нс, когда напряжение на выходе генератора спадает до 0, на бедре мыши его амплитуда меняет знак в связи с поступлением на бедро напряжения с заряженного почти до 30 кВ конденсатора C_2, который оказывается подключенным с обратной полярностью.

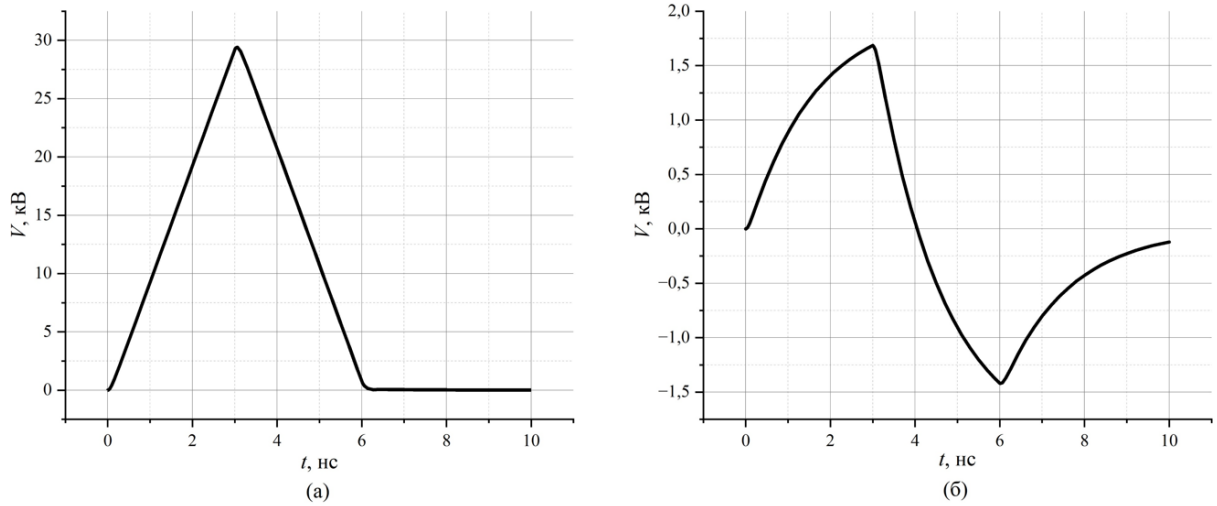


Рисунок 2.15. Графики зависимости напряжений на выходе высоковольтного генератора (а) и на нагрузке (б) от времени для случая воздействия *in vivo*.

Пиковая мощность импульса, поступающая в схему, достигает 230 кВт (см. рис. 2.16а), в то время как её величина при рассеивании импульса на бедре спадает до двух пиков с амплитудами около 11 и 8 кВт (рис. 2.16б).

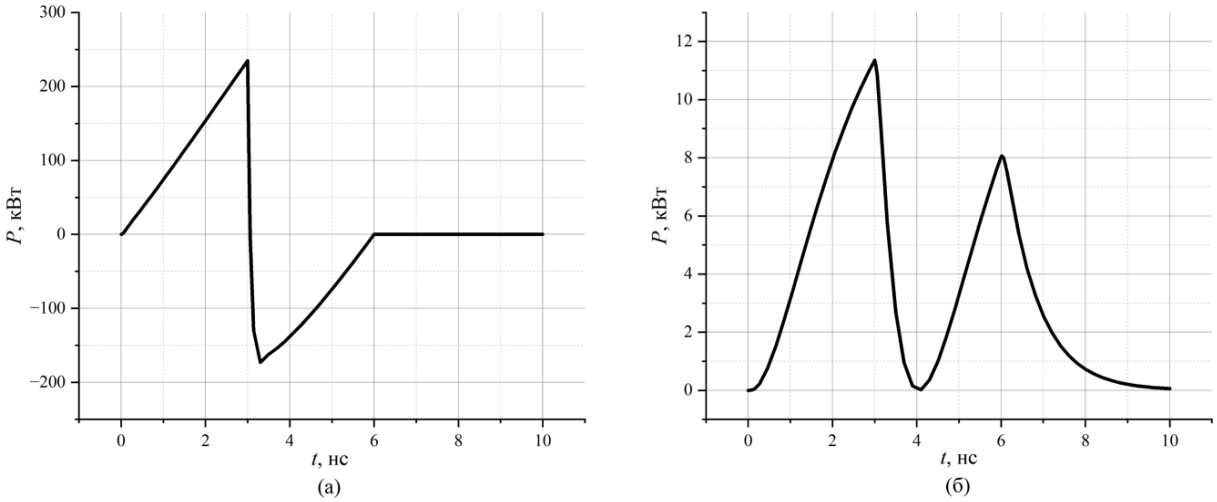


Рисунок 2.16. Графики зависимости мощности, поступающей от генератора (а), и тепловой мощности, рассеиваемой на нагрузке (б), от времени для случая воздействия *in vivo*.

Как и в случае моделирования *in vitro*, максимумы мощности проявляются в точках 3 нс и 6 нс – соответственно в момент максимального напряжения на выходе генератора и момент начала экспоненциального разряда емкости C_2 до 0.

Наконец, проинтегрировав обе зависимости мощности от времени с рисунка 2.16, оценим энергию одного импульса. Из рисунка 2.17, демонстрирующего результаты интегрирования, видно, что от генератора за время 3 нс поступает накопленная величина энергии, равная 340 мкДж, большая часть которой затем возвращается обратно в генератор (рис. 2.17а). Это можно объяснить несогласованностью нагрузки, имеющей преимущественно емкостной характер. Далее, когда все переходные процессы в теле мыши затухают, за время от 0 до 9 нс на R_2, соответствующем обрабатываемому биологическому объекту, рассеивается 34 мкДж активной (тепловой) энергии (рис. 2.17б).

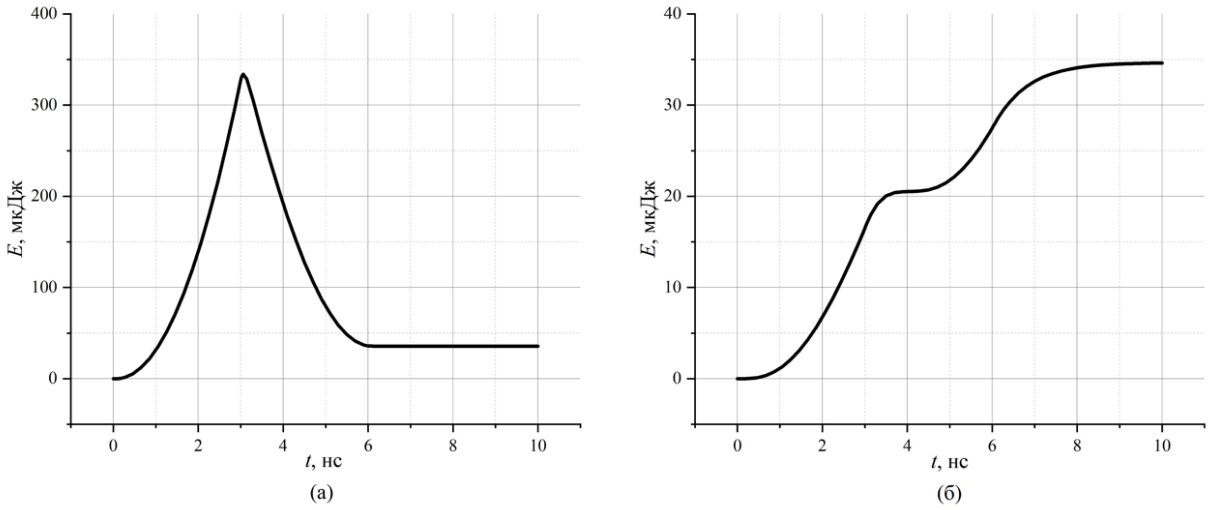
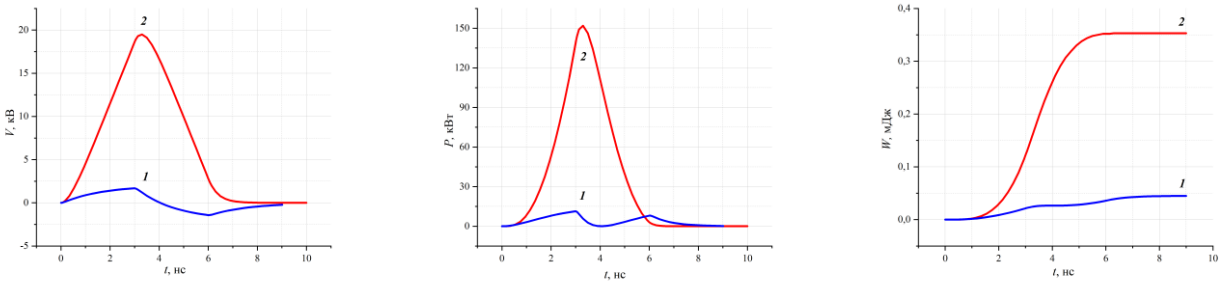


Рисунок 2.17. Графики зависимости энергии одного импульса, поступающей от генератора (а), и энергии одного импульса, рассеиваемой на нагрузке (б), от времени для случая воздействия *in vivo*.

2.3.3. Влияние емкости подложки в радиофизической эквивалентной схеме эксперимента in vivo

Аналогичным образом рассмотрим радиофизическую эквивалентную схему рисунка 2.8 и произведём численную оценку переходных процессов в схеме эксперимента *in vivo* с исключением подложки из оргстекла (и емкости, соответствующей ей в эквивалентной схеме). Результаты оценки амплитуды, а также мощности и энергии одного импульса, рассеиваемого на нагрузке представлены на рис. 2.18. Для наглядности на нём также представлены результаты моделирования переходных процессов схемы рис. 2.7.



(а) (б) (в)

Рисунок 2.18. Графики зависимости амплитуды (а), мощности (б) и энергии (в) одного импульса, рассеиваемого на нагрузке, от времени для случая воздействия *in vivo* с включением подложки из оргстекла (линия 1) и с её исключением (линия 2). Для удобства сравнения форм графиков на рисунках (б) и (в) линии 2 показывают значения мощности и энергии, делённые на 10.

Как видно из графиков, зависимости всех характерных физических величин от времени для случая без подложки имеют иной вид, отличающийся от зависимостей для случая с включённой подложкой. В частности, амплитуда импульса остаётся монополярной и испытывает значительно меньшее падение величины. Таким образом, при воздействии подложка из оргстекла также оказывает влияние на результирующий импульс на нагрузке, а эффекты воздействия можно регулировать, изменяя тем или иным способом параметры подложки, например, её геометрические размеры.

Полученные результаты численной оценки методом эквивалентных схем были представлены в статьях [35, 117–119], а также сборниках трудов конференций [120–122].

2.4. Оценка физических величин для случая электропорации в клеточной мембране

Общая теория электропорации в клеточных мембранах под воздействием коротких импульсов общепринято определяется формулами характерных физических величин, представленными в статье [30], которые уже были отмечены в главе 1, см. выражения (3), (4), (5). Эти же формулы дублируются без изменений в более актуальных работах [12]. По этим формулам оцениваются характерные для электропорации физические величины для параметров воздействия, проводимого в реальных экспериментах *in vitro* и *in vivo* на нашей схеме установки.

Согласно [30], если считать клеточную мембрану идеальным изолятором, при воздействии мощным электромагнитным импульсом увеличение напряжения на клеточной мембране ΔU, добавленное к разности потенциалов покоя мембраны, составляет, по формуле (3) из главы 1:

$$|\Delta U(t)| = fE\frac{D}{2}|cos\ \theta|(1 - exp(-t/\tau))$$

Здесь:

$\Delta U(t)$ – изменение трансмембранного потенциала во времени t воздействия коротким импульсом;

f – коэффициент формы, для сферических клеток равный 1,5;

E – напряжённость постоянного электрического поля;

D – диаметр сферической клетки, равный 20 мкм [30];

θ определяет угловую зависимость $\Delta U(t)$ относительно направления приложенного поля (на полюсах клетки $cos\ \theta = 1$);

$\tau -$ постоянная времени зарядки клеточной мембраны, для клеток млекопитающих оценочно находящаяся в диапазоне от 75 нс [30] до 1 мкс [123, 124].

Рассчитаем изменение трансмембранного потенциала для импульса в смоделированном эксперименте *in vivo* из подраздела 2.3.2: амплитуда на входе 30 кВ, длительность 6 нс. Значение напряженности получим, зная амплитуду импульса (1.7 кВ, учтено падение на нагрузке на 1-2 порядка) и расстояние между электродами 1 см: оно составит 1.7 кВ/см. Таким образом, ΔU на полюсах клетки при воздействии данного импульса должно по оценке находиться в диапазоне от 0.02 В до 0.2 В.

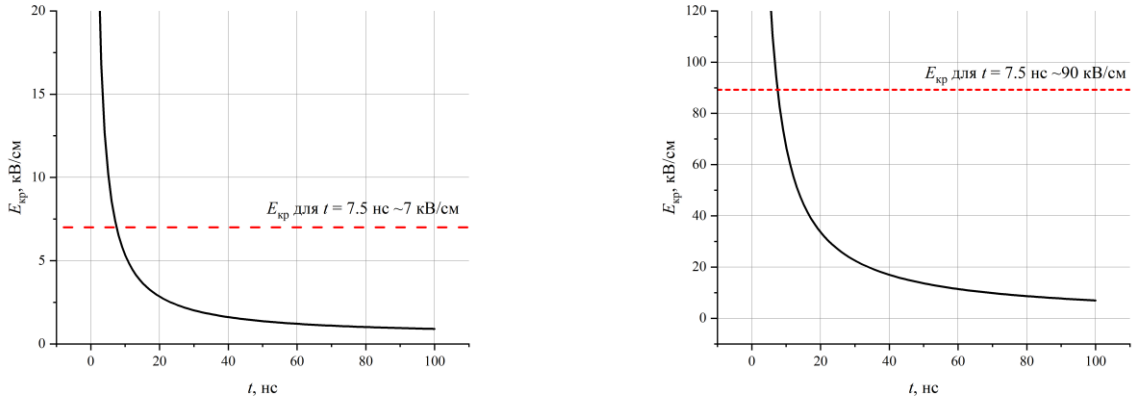
Согласно [30], для возникновения электропорации в течение заданной длительности импульса напряжённость поля $E_{\text{кр}}$ должна быть такой, чтобы мембранное напряжение на полюсах клетки достигло критического значения $U_{\text{кр}}$ (по формуле (4) из главы 1):

$$E_{\text{кр}} = \frac{U_{\text{кр}}}{f\frac{D}{2}(1 - exp(-t/\tau))}$$

В той же статье [30] со ссылкой на [125] указывается, что $U_{\text{кр}}$ для клеточной мембраны примерно равно 1 В. Более актуальные работы утверждают, что эта величина для случая воздействия наносекундными импульсами может быть больше, достигая 1.2 – 1.5 В [12]. Полученная оценка ΔU на порядок меньше этих значений, из чего следует, что данный импульс не создаёт нужное критическое напряжение на мембране для электропорации.

Произведём ещё одну оценку, взяв для простоты нижний предел $U_{\text{кр}}$ = 1 В, и построим графики зависимости критической напряжённости поля от длительности импульса (см. рис. 2.19). Как видно из рисунка, $E_{\text{кр}}$ в случае импульса длительности 7,5 нс будет лежать в диапазоне от ~7 кВ/см до ~90 кВ/см. Оценки похожего порядка с помощью других методов были проведены в работах [126] и [127], также

подтверждающих данные критические значения для проявления электропорации при данной длительности импульса.



(а) (б)

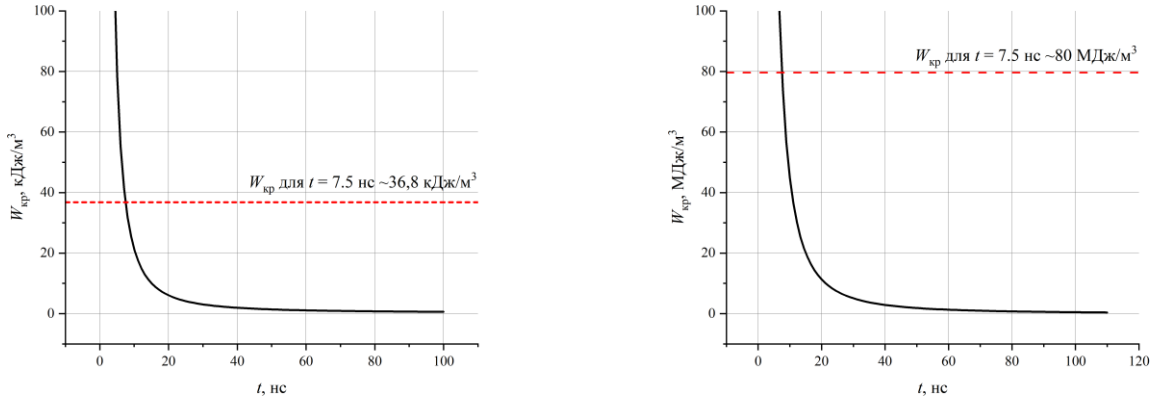
Рисунок 2.19. График зависимости критической напряжённости поля от длительности импульса для τ = 75 нс (а) и τ = 1 мкс (б).

В указанных работах, однако, не учитывается изменение импульса на объекте, на которое указывалось в подразделе 2.3. Согласно данной ранее численной оценке с помощью метода эквивалентных схем, импульс на биологической нагрузке испытывает падение амплитуды на 1-2 порядка, что также должно уменьшить результирующую напряжённость. Полученный диапазон величин напряжённости $E_{кр}$ от 7 до 90 кВ/см в случае импульса длительности 7,5 нс превышает реальные значения напряжённости на объекте-нагрузке, которые может создавать источник в схеме нашей установки. Это различие также подразумевает, что типичный импульс на выходе используемого в нашей установке генератора не обязательно может инициировать электропорацию в клеточной мембране.

Далее оценим критическое значение плотности электрической энергии по объёму, необходимое для пробития мембраны. Оно определяется выражением (5), согласно работе [30]:

$$W_{\text{кр}} = \frac{{E_{\text{кр}}}^2 \tau}{\rho_1}$$

где ρ_1 – удельное сопротивление клеточной среды, взятое равным 100 Ом×см [30]. На рис. 2.20 даны графики зависимости критической плотности энергии от длительности импульса. Как видно из рисунка, $W_{\text{кр}}$ в случае импульса длительности 7,5 нс лежит в диапазоне от ~36,8 кДж/м^3 до ~80 МДж/м^3.



(а) (б)

Рисунок 2.20. График зависимости критической плотности энергии по объёму от длительности импульса для τ = 75 нс (а) и τ = 1 мкс (б).

Оценим объём области воздействия, возьмём минимальный случай для эксперимента *in vivo* (диаметр d верхнего электрода и расстояние h между верхним и нижним электродами равняются 1 см). Объём цилиндрической области воздействия $V = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 h$ = 7,85×10^{-7} м^3. Умножив плотность энергии на объём, получим примерный диапазон значений критической энергии от ~30 мДж до ~62 Дж. Полученные значения энергии на несколько порядков выше, чем величины энергии одного импульса на объекте-нагрузке, численно оценённые с помощью метода эквивалентных схем для обоих случаев *in vitro* (0,35 мДж) и *in vivo* (34 мкДж). Это также подразумевает, что подаваемый на объект экспериментальный импульс нашего источника не обладает энергией, достаточной того, чтобы в клеточной мембране происходила какая-либо электропорация. Таким образом,

исходя из оценок критических напряжённости и энергии, можно предположить, что возможные биологические эффекты, которые данные импульсы могут инициировать в клетках, не обязательно вызваны явлением электропорации (обратимой или необратимой).

Некоторые актуальные работы уточняют, что применимость вышеуказанных формул была подтверждена экспериментально только для синусоидальных радиоимпульсов с длительностью более 1 мкс [11] [28]. Тем не менее, для импульсов иных форм, а также длительностей субмикросекундного диапазона и ниже подобных формул на данный момент не выведено [28], и указанные формулы предлагается считать применимыми в том числе и для наносекундных и пикосекундных электрических импульсов (см. [12], с. 7, и [123]). Таким образом, хотя данная модель является условной, указанными формулами можно воспользоваться для получения качественных оценок физических величин импульсов экспериментальной установки, описанной в настоящей работе. В целом вопрос определения всеобъемлющих формул для расчёта порогов электропорации остаётся открытым.

2.5. Оценка нетеплового эффекта воздействия мощными импульсами на биологические объекты в экспериментах

Оценим повышение температуры ΔT для случая воздействия на лунки микропланшета с раствором опухолевых клеток (высота планшета 1.65 см). Расчёт производится для импульса со следующими характеристиками на входе: амплитуда 70 кВ, длительность 6 нс. С учётом расчётов в подразделе 2.3.1 напряжённость поля на объекте равна 472 В/см, и на нагрузке в виде тепла рассеивается энергия 350 мкДж. В микропланшете клеточным раствором заполнено $N = 25$ лунок по $V = 100$ мкл. Для оценки возьмём табличные характеристики воды: плотность $\rho = 1000$ кг/м^3 и удельную теплоёмкость $c = 4200$ Дж/(кг×ºС). Тогда повышение температуры

можно оценить из формулы $Q = cm\Delta T$, где $m = N\rho V$. Численное значение ΔT получается оценочно равным 3×10^{-7} ºС для одного импульса.

Оценим повышение температуры ΔT другим способом, который применялся в работе [12] также для случая микропланшета с раствором клеток. При воздействии импульсом с напряжённостью электрического поля E и длительностью τ, ΔT можно найти по формуле (15) главы 1:

$$\Delta T = \frac{\sigma E^2 \tau}{\rho c}$$

где ρ = плотность среды, равная 1000 кг/м^3, c — удельная теплоемкость, также соответствующая воде 4200 Дж/(кг×ºС); σ — электропроводность (обратная величина удельного сопротивления) воды, равная 1 См/м [57].

С учётом тех же параметров импульса (напряжённость 472 В/см и длительность 6 нс) получим $\Delta T = 3\times10^{-6}$ ºС, также достаточно малое изменение температуры в случае подачи одного импульса.

Подчеркнём, что все вышеуказанные оценки повышения температуры произведены для единичного импульса, в то время как в реальной схеме эксперимента *in vitro* импульсы подаются в большом количестве (до 5×10^4) при частоте повторения (~10^2 Гц). Без учёта влияния скважности импульсов ~10^5–10^6 общее за время воздействия ΔT будет составлять 0.015–0.15 ºС. Таким образом, общая величина ΔT должна оставаться в достаточно малых пределах.

Далее оценим повышение температуры ΔT для случая воздействия на бедро мыши с опухолью. Расчёт производится для импульса со следующими характеристиками на входе: амплитуда 30 кВ (согласно расчёту из подраздела 2.3.2, это соответствует напряжённости 1.7 кВ/см) и длительность 6 нс. Согласно моделированию соответствующей радиофизической схемы, на бедре мыши в виде тепла рассеивается энергия одного импульса величиной 34 мкДж. Масса мыши примерно равна 20 г, а масса привитой опухоли на бедре m составляет примерно 10% от общей массы. Положим, что удельная теплоёмкость опухоли находится в

диапазоне табличных значений мышечной ткани животного $c \approx 3560$ Дж/(кг×ºС) [128], так как опухолевые штаммы перед экспериментами *in vivo* поддерживаются внутримышечно. Тогда получаем для $\Delta T \approx 4.7 \times 10^{-6}$ ºС.

Как и в случае клеточного раствора, при воздействии импульсами в количестве 10^5–10^6 с частотой повторения ~10^2 важную роль играет большая скважность импульсов, из-за которой снижается общий нагрев. Также для случая воздействия *in vivo* нужно принимать во внимание тот факт, что для живых организмов характерна терморегуляция (способность поддерживать температуру тела в определённых границах, даже если температура внешней среды значительно отличается), в определённой степени нивелирующая опасность нежелательной гипертермии.

Полученные результаты ΔT для опухоли на бедре мыши соответствуют данным динамической термометрии, проводимой во время экспериментов, ход которых будет описан далее в главе 3, с использованием медицинского инфракрасного термографа ИРТИС 2000. Типичная термограмма лабораторной мыши показана на рис. 2.21 в случае подачи импульса со следующими параметрами: напряженность электрического поля на электродах 20 кВ/см, время воздействия 60 минут, частота повторения импульсов 100 Гц, общее количество импульсов 360 000.

Как видно из рисунка, в зоне действия электрода с увеличение температуры не наблюдается. В следующих экспериментах с другим набором параметров также не наблюдалось нежелательного излишнего нагрева поверхности тел обрабатываемых лабораторных мышей.

Таким образом, при нетепловом воздействии импульсов на мышь можно считать, что используемый метод не оказывает заметного влияния на температуру мыши, а при определённых режимах воздействия с небольшим количеством импульсов нагрев может быть пренебрежимо мал.

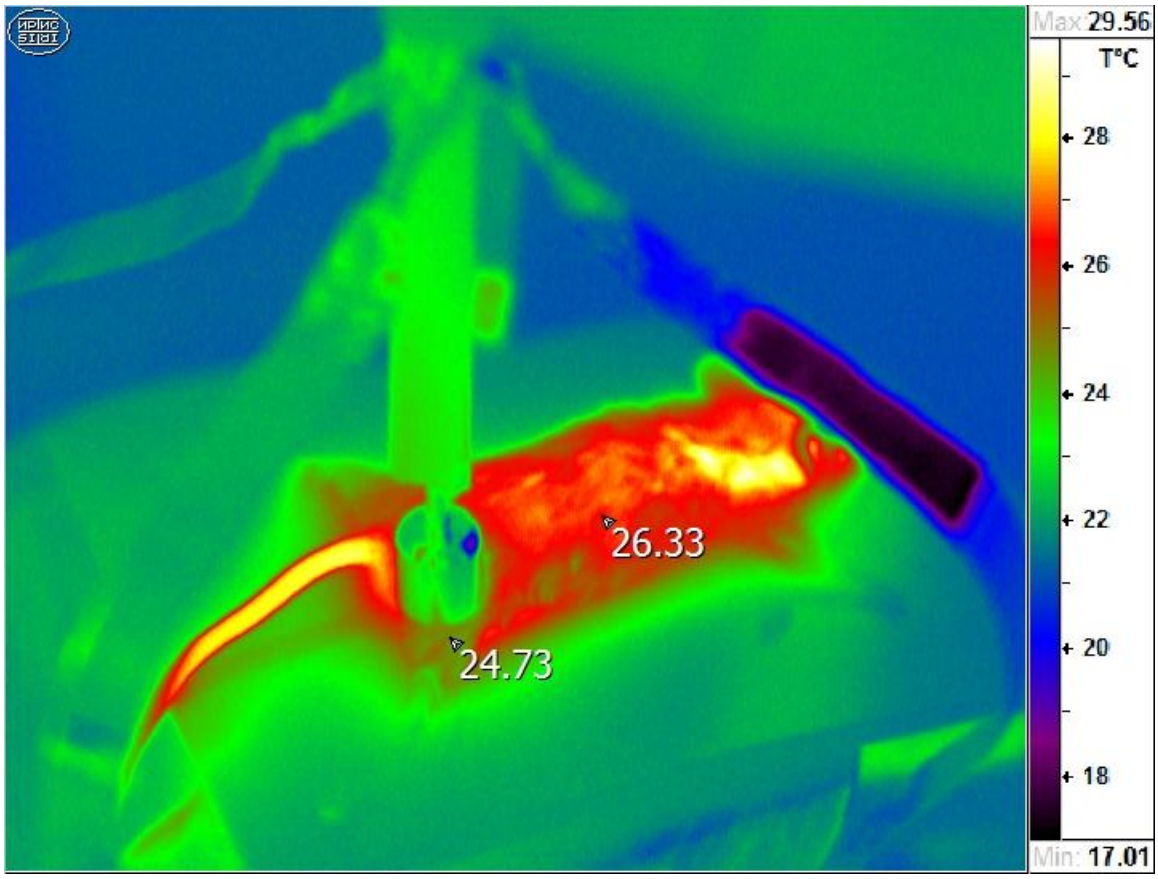


Рисунок 2.21. Термограмма лабораторной мыши во время эксперимента после однократного воздействия с частотой 100 Гц в течение 60 минут.

Глава 3. Проведение экспериментов по нетепловому воздействию мощными электромагнитными импульсами на биологические среды

3.1. Эксперименты *in vitro*

3.1.1. Материалы и методы

Изучение нетеплового воздействия *in vitro* мощными электрическими импульсами проводилось на клетках мышиной карциномы легкого Льюиса (LLC), полученных из коллекции клеточных культур банка CLS (Германия). В экспериментах также использовались следующие вспомогательные материалы:

- В качестве среды для культивирования клеток: среда RPMI 1640, L-глутамин, эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС), растворы Хэнкса и Версена (ПанЭко, Россия).
- В качестве реагентов: 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5 дифенилтетразолия бромида (МТТ) и диметилсульфоксид (ДМСО) (Sigma, США);
- В качестве резервуаров для клеточного раствора: культуральные флаконы (25 $см^2$), центрифужные пробирки (15 и 50 мл), 24- и 96-луночные культуральные планшеты, наконечники и другие расходные материалы для культивирования клеток (продукция фирмы Costar, США).

Культивирование клеток производилось в среде RPMI 1640 с добавлением L-глутамина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки при стандартных условиях: при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием углекислого газа в CO_2-инкубаторе. В работе использовали опухолевые клетки от 3 до 10 пассажей, пассирование проводилось согласно рекомендациям, указанным в сертификате культуры клеток. В качестве исследуемого химического препарата использовался

цитостатик Цисплатин-Тева (Teva Pharmaceutical Industries Ltd, Израиль) 0,5 мг/мл, концентрат для приготовления раствора для инфузий, 100 мл.

В экспериментах *in vitro* оценивалось оказываемое мощными наносекундными импульсами цитотоксическое действие – повреждающее воздействие, которое приводит к глубоким структурным и функциональным изменениям в клетках, завершающимся их гибелью. Перед проведением эксперимента клетки рассевались в 96-луночные микропланшеты в количестве 15×10^4 кл/мл. Проводилась инкубация в течение 20-24 часов в стандартных условиях, после чего на клетки оказывалось нетепловое воздействие электромагнитными импульсами с параметрами в следующих диапазонах: напряженность электрического поля ~ 24 кВ/см; длительность импульса: 7.5 нс (по основанию); частота следования импульсов: 1, 5, 10, 25, 50 и 200 Гц; суммарное количество импульсов: 100, 500, 10 000, 25 000, 50 000. Электромагнитное воздействие проводилось через электрод диаметром 50 мм, поэтому внесение клеточной суспензии осуществлялось таким образом, чтобы электрод закрывал все лунки микропланшета с опухолевыми клетками.

Исследование цитотоксического действия наносекундных импульсов оценивалось как отдельно, так и сочетанно с препаратом Цисплатин-Тева (концентрат для приготовления раствора для инфузий с концентрацией 0,5 мг/мл активного вещества, серия 20123КА, Израиль). Для оценки эффективности сочетанного применения нетеплового воздействия и Цисплатина-Тева по отношению к опухолевым клеткам, после электромагнитного воздействия проводилась 3-х часовая инкубация в стандартных условиях, после чего делался внос Цисплатина-Тева в последовательных разведениях в триплетах с варьируемой концентрацией 0,03 – 80 мкг/мл. Далее все планшеты помещались в CO_2-инкубатор на 24 часа.

Оценка выживаемости клеток проводилась двумя методами:

1) визуально с помощью световой микроскопии путём оценки морфологических изменений клеток;

2) колориметрическим методом с использованием МТТ–теста (основан на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана), где число жизнеспособных клеток прямо пропорционально количеству восстановленного формазана, которое измеряется спектрофотометрически после растворения в органическом растворителе.

При результирующей оценке из лунок планшета удалялась среда инкубации и вносилось по 200 мкл среды без ЭТС. Далее вносилось по 20 мкл 0,5% раствора 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенилтетразолия бромида, предварительно растворенного в растворе Хэнкса, и проводилась инкубация планшеты в течение 2 часов при 37°С в CO_2-инкубаторе. После завершения инкубации, проводился отбор, после чего в лунки вносилось по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Планшет размещался на шейкере для лучшего растворения образовавшихся кристаллов, занимавшем 2-3 минуты. Оптическая плотность раствора формазана в лунках измерялась на многоканальном планшетном ридере (λ = 550 нм). Из полученных значений оптической плотности определялся уровень ингибирования роста клеток по следующей формуле:

$$\text{ИП}\ (\%) = \frac{\text{ОП}_\text{к} - \text{ОП}_\text{о}}{\text{ОП}_\text{к}} \times 100\%, \qquad (17)$$

где ИП – уровень ингибирования роста клеток в культуре; $\text{ОП}_\text{о}$ – оптическая плотность раствора формазана в опытных лунках; $\text{ОП}_\text{к}$ – оптическая плотность раствора формазана в контрольных лунках.

Статистический анализ полученных результатов осуществлялся с помощью компьютерных программ Microsoft Excel и OriginPro 8.0.

3.1.2. Экспериментальные результаты

Оценка цитотоксической активности нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами на опухолевые клетки в зависимости от частоты повторения импульсов и их суммарного количества. Данные результатов, иллюстрирующих режимы нетеплового воздействия, приводящие к полному и частичному повреждению опухолевых клеток в культуре, показаны в таблице 1.

Таблица 1. Цитотоксическая активность нетеплового воздействия в зависимости от параметров физического воздействия *in vitro*.

Напряжённость поля, кВ/см	Режимы ЭИ воздействия		Ингибирование пролиферации, %
	Частота, Гц	Суммарное кол-во импульсов	
24	25	25 000	24±7
	50	10 000	34±6
	50	50 000	85±2
	200	50 000	90±4

Цитотоксическая активность нетеплового воздействия повышалась при увеличении частоты повторения импульсов и суммарного количества импульсов за процедуру обработки. Биологически значимых положительных эффектов при начальных режимах (1 Гц, 100 импульсов; 5 Гц, 500 импульсов; 10 Гц, 10 000 импульсов) не наблюдалось, поэтому результаты воздействия для этих наборов параметров не включены в таблицу 1. Наибольший процент гибели опухолевых клеток воздействие вызывало при частотах 50 и 200 Гц и суммарном числе импульсов 50 000: ингибирование пролиферации (ИП) опухолевых клеток в культуре составило 85 % и 90 % соответственно. Как следует из полученных данных, ИП для двух наилучших по эффективности режимов было сопоставимо, в связи с чем для дальнейшего изучения нетеплового воздействия наносекундных

импульсов относительно опухолевых клеток была использована частота 50 Гц (для экспериментов с сочетанным с химиопрепаратом воздействием). Также стоит обратить внимание на тот факт, что снижение числа импульсов до 10 000 приводило к снижению повреждающего эффекта нетеплового воздействия (ИП составило 34%).

Фотографии опухолевых клеток карциномы легкого Льюиса до и после воздействия в различное время наблюдения представлены на рис. 3.1.

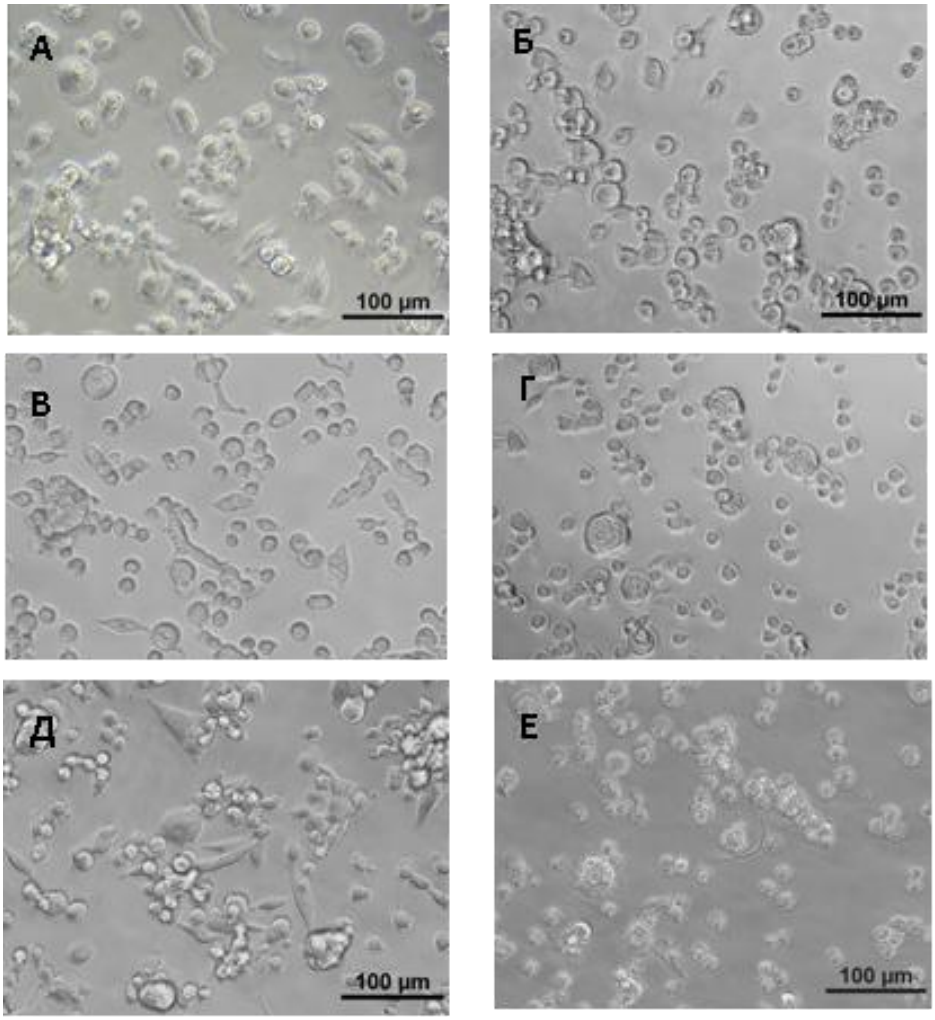


Рисунок 3.1. Микрофотографии опухолевых клеток карциномы легкого Льюиса до (слева) и после воздействия (справа). Время после воздействия – 30 минут (А, Б), 3 часа (В, Г), 16 часов (Д, Е). Параметры воздействия – 50 Гц, суммарное количество импульсов – 50 000.

Опухолевые клетки культуры LLC до и после нетеплового воздействия мощных электромагнитных импульсов наносекундной длительности анализировались визуально:

- *До воздействия*: клеточная культура представлена в виде субконфлюэнтного монослоя; формы клеток – преимущественно округло-овальные и умеренно веретенообразные; размеры клеток – небольшие (30-50 мкм); ядра клеток – крупные, расположены в центрах клеток и занимают практически всю цитоплазму.
- *После воздействия*: необратимые изменения в клетках нарастали с увеличением временного интервала.
    - В течение 3-х часов инкубации: незначительные изменения ядер клеток (уплотнение) и небольшое увеличение клеток шарообразной формы; видимое нарастание деструктивных изменений целостности цитоплазматической мембраны (блеббинг).
    - Через 16 часов инкубации: выявлена тотальная гибель клеток культуры; изменение формы клеток на перстневидную; ядра округлой формы, сморщены, частично дефрагментированы, контуры ядер неровные и волнистые; цитоплазма увеличена, деструктирована (зафиксирован выход ядер за пределы цитоплазмы), что
    - Общий вывод: визуальные данные свидетельствуют о необратимых повреждениях как внутриклеточных структур, так и цитоплазматической мембраны.

Таким образом, в системе *in vitro* были определены цитотоксические режимы нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами, приводящие к значительному ингибированию пролиферации клеток карциномы легкого Льюиса в культуре (85–90%), а также режимы, при которых ингибирование пролиферации было умеренным и составило 24–34%. При проведении морфологических

исследований показано, что гибель опухолевых клеток в культуре происходит в течение 16 часов после нетеплового воздействия.

Оценка выживаемости опухолевых клеток (культура LLC) после нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами в зависимости от частоты повторения импульсов. На следующем этапе производилось более подробное исследование выживаемости опухолевых клеток после нетеплового воздействия с изменением частоты повторения импульсов (в диапазоне, показавшем наибольшее значение ИП на прошлом этапе). Воздействие проводилось в режимах с фиксированным набором параметров, которые указаны в таблице 2. Далее оценивалась эффективность выбранных режимов воздействия с помощью МТТ-теста, результаты которого представлены в таблице 3. В таблице 3 даны средние значения оптической плотности, которая варьировалась от лунки к лунке. Причиной вариаций могут быть внутренние различия в структуре области микропланшетов, на которую велось воздействие, и, в частности, связанные с этим отличающиеся условия электрического пробоя в каждой из лунок.

Таблица 2. Параметры воздействия в исследованиях выживаемости опухолевых клеток после нетеплового воздействия в зависимости от частоты повторения импульсов.

№ опыта	Напряженность электрического поля, кВ/см	Суммарное количество импульсов	Частота повторения импульсов, Гц	Время воздействия
1	24	50 000	50	16 мин 40 сек
2			100	8 мин 20 сек
3			200	4 мин 10 сек

Таблица 3. Оптическая плотность в МТТ-тесте и вычисленное ингибирование пролиферации опухолевых клеток линии LLC в зависимости от режима нетеплового воздействия

№ опыта	Частота повторения импульсов, Гц	Оптическая плотность, усл. ед.	Ингибирование пролиферации (ИП), %
1	50	140,6	79
2	100	181,5	73
3	200	122,3	82
Без воздействия	-	681,2	-

В целом исследование показало, что оптическая плотность в лунках после нетеплового воздействия заметно ниже, чем в необработанных контрольных лунках. Вычисленные значения ИП для нетеплового воздействия относительно опухолевых клеток культуры LLC для каждого из режимов также представлены в таблице 3: 79% для частоты повторения импульсов 50 Гц, 73% для 100 Гц и 82% для 200 Гц. Разброс значений достигает ~11%, поскольку расчёт вёлся на основании значений оптической плотности, также имевших разброс по указанным ранее причинам (мелкие дефекты микропланшетов, разные условия пробоя между лунками). Таким образом, явно выраженный математически закон зависимости эффектов нетеплового воздействия от частоты повторения импульсов для клеточной структуры LLC зафиксировать на данной стадии не представляется возможным.

Оценка цитотоксического действия комбинированного применения нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами и препарата Цисплатин-Тева *in vitro*. На следующем этапе производилась оценка цитотоксического действия комбинированного применения ЭИ и препарата Цисплатин-Тева *in vitro*. Результаты оценки представлены в таблице 4.

Таблица 4. Цитотоксическое действие комбинированного применения нетеплового воздействия и препарата Цисплатин-Тева в зависимости от параметров физического воздействия и концентрации цитостатика *in vitro* (культура опухолевых клеток LLC).

№ п/п	Напряженность поля, кВ/см	Частота импульсов, Гц	Суммарное кол-во импульсов	Концентрация Цисплатина-Тева, мкг/мл					Только ЭИ (контроль)
				80	50	40	12,5	3	
				ИП, %					
1	40	25	10000	65	42	34	27	2	2
2			25000	81	64	54	26	0	18
3		50	10000	66	–	31	–	2	12
4	Только Цисплатин-Тева (контроль)	–	–	53	35	19	12	5	–

Данные таблицы 4 демонстрируют, что комбинированное воздействие мощных импульсов наносекундной длительности с химиопрепаратом Цисплатин-Тева имеет ингибирующий эффект, оказываемый на опухолевые клетки культуры карциномы легкого Льюиса (LLC). Отметим, что для некоторых сочетанных режимов воздействия данный эффект является потенцирующим (общий сочетанный эффект превосходит сумму эффектов отдельных компонентов воздействия) Яркий пример данного явления наблюдается при использовании нетеплового воздействия в режиме 25 Гц, 25 000 импульсов и Цисплатина-Тева в концентрации 40 мкг/мл: ИП в сочетании составляет 54%, в то время как эффект отдельного воздействия импульсов и химпрепарата даёт ИП в 18 и 19% соответственно (сумма двух ИП 37%, что меньше ИП в сочетании). При этом, как видно из таблицы 4, для случая с применением отдельно Цисплатина-Тева в концентрации 80 мкг/мл ингибирование пролиферации составило 53% – таким

образом, почти аналогичный результат цитотоксического эффекта может быть получен при вдвое меньшей концентрации химического препарата, если вкупе с ним используется нетепловое импульсное воздействие.

Дополнительно отметим, что при некоторых других режимах сочетанного применения ЭИ и препарата Цисплатин-Тева (например, концентрация препарата Цисплатин-Тева – 80 мкг/мл, частота повторения импульсов – 25 Гц, суммарное количество импульсов – 25 000) цитотоксический эффект также суммировался с незначительным потенцированием. В то же самое время, как видно из данных таблицы 4, при малых концентрациях Цисплатина-Тева при сочетанном применении с ЭИ (при определённых параметрах) получено значительно меньшее значение ИП, чем при воздействии в монорежимах. Данный факт, вероятно, требует дополнительных исследований с целью подбора оптимальных режимов воздействия, дающих положительное потенцирующее суммирование эффектов.

3.2. Эксперименты *in vivo*

3.2.1. Материалы и методы

Изучение нетеплового воздействия *in vivo* мощными электрическими импульсами проводилось на мышах-гибридах первого поколения F_1 (CBA × C57Bl/6), самках (категории MD), а также мышах линии C57Bl/6, самках (категории SPF). Возраст мышей обеих групп составлял от 8 до 10 недель. Животные содержались на стандартной сбалансированной диете с использованием экструдированного комбикорма для содержания мелких лабораторных грызунов SPF категории «ЧАРА» и получали чистую питьевую воду, фильтрованную через систему с обратным осмосом. При содержании использовался специальный сертифицированный гигиенический подстил REHOFIX МК 2000 (J. Rettenmaer & Sohne, Германия).

Подчеркнём, что все манипуляции с животными проводили в соответствии с национальными и международными стандартами, регламентирующими использование экспериментальных животных в научных целях [129–135]. Комиссия по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных в научных целях (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России) подтвердила соответствие исследования «Нетепловое воздействие мощных электромагнитных импульсов наносекундной длительности на биологические объекты в задачах биомедицины» принципам биоэтики и вынесла решение о разрешении его проведения по заявке № 2-ДИ-00011 от 12.09.2018 г.

В качестве опухолевых моделей для прививания мышам использовались следующие штаммы:

- *Саркома мягких тканей мыши S37*. Данный опухолевый штамм поддерживали на самцах мышей линии CD1 путём внутрибрюшинной инокуляции (введения материала в ткани животных) опухолевых клеток в виде неразведенной асцитической жидкости (жидкость, которая накапливается в брюшной полости) через каждые 7 – 9 дней. Объём асцитической жидкости составлял 0,3–0,4 мл, где содержалось 40–60 × 10^6 клеток на мышь. Для экспериментов асцитическую жидкость разводили раствором Хенкса до концентрации 10 × 10^6 клеток/мл, и инокулировали исследуемым животным под кожу на наружную поверхность бедра в количестве 1,0 × 10^6 клеток/мышь в объеме 0,1 мл.
- *Карцинома легкого Льюиса (LLC)*. Данный опухолевый штамм поддерживали на самцах мышей линии C57Bl/6 путем внутримышечной инокуляции каждые 9 – 11 дней взвеси опухолевой ткани в количестве 30 мг в объеме 0,3 мл раствором Хенкса. Для экспериментов мышам инокулировали по 10 мг взвеси опухолевой ткани, разведенной в растворе Хенкса, под кожу на наружную поверхность бедра в объеме 0,1 мл (как и в случае саркомы S37).

Исследовалась эффективность нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами в зависимости от ряда параметров: напряжения электромагнитного поля, частоты следования импульсов, времени воздействия. Помимо этого, в целях изучения менялась кратность воздействия: предпринималось единоразовое воздействие в течение 60 минут (однократный режим) и пять единоразовых воздействий на протяжении пяти дней с интервалом в 24 часа (пятикратный режим).

В экспериментах длительность единичных импульсов была постоянной и равнялась 7,5 нс. Другие параметры воздействия варьировались в широком диапазоне: напряжение генератора – от 8 кВ (в случае саркомы S37) или 11 кВ (в случае карциномы LLC) до 30 кВ, частоту следования импульсов – от 100 до 500 Гц, время воздействия – от 0,5 до 60 минут. Напряжение между двумя электродами устанавливалось перед каждым воздействием.

Исследования проводились у мышей на 7 – 9 день роста опухолей, размер которых на начало воздействия составлял: 130 ± 20 мм^3 для саркомы S37 и 120 ± 20 мм^3 – для карциномы LLC.

За 5-7 минут до начала воздействия производилась седация мышей введением 0,25% раствора дроперидола внутрибрюшинно по 0,06 мл/мышь. Перед воздействием мышь фиксировалась на подложке из оргстекла и помещалась между электродами таким образом, чтобы верхний электрод располагался над опухолью, а сама опухоль полностью попадала в поле действия импульсов. Животным из контрольной группы (не подвергавшейся воздействию) однократно внутрибрюшинно вводили раствор дроперидола в той же дозе.

Клинический осмотр животных проводился через 1 и 24 часа после проведенного лечения; в последующем каждые 3-4 сутки до гуманной конечной точки. Указанная конечная точка характеризовалась в проводимых исследованиях следующими признаками (но не ограничивалась ими): превышение массы опухоли

величины, равной 10% массы тела животного; изъявление/некроз/инфицирование опухолей, доступных визуальному осмотру.

В ходе клинического осмотра оценивалось внешнее состояние животных, регистрировались размеры опухоли в 3-х взаимно перпендикулярных проекциях, с целью чего использовался электронный цифровой кронциркуль STORM_{TM} 3С301 «Central». Размеры первичного опухолевого очага фиксировались в течение 20 суток после нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами.

Критериями оценки эффективности нетеплового воздействия мощными импульсами являлись фиксируемая динамика роста опухолевых узлов, а также следующие величины:

– Торможение роста опухоли (ТРО), рассчитываемое по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{V_{\text{к}} - V_{\text{оп}}}{V_{\text{к}}} \times 100\%, \qquad (18)$$

где $V_{\text{оп}}$ и $V_{\text{к}}$ – средний объем опухоли в опытной и контрольной группах соответственно. Объем опухоли рассчитывается по формуле; $V = 0{,}52 \times a \times b \times c$; где a, b, c – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (численный коэффициент в формуле объёма выбран из геометрических соображений).

– Период удвоения объёма опухоли (ПУОО), рассчитываемый следующим образом: объем опухоли до воздействия умножается на 2, после чего определяются сутки роста опухоли, которые соответствуют данному размеру. В ходе обработки результатов рассчитывалось среднее значение ПУОО из индивидуальных значений для каждой мыши;

– Увеличение продолжительности жизни (УПЖ), рассчитываемое по формуле:

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{СПЖ}_{\text{к}} - \text{СПЖ}_{\text{оп}}}{\text{СПЖ}_{\text{к}}} \times 100\%, \qquad (19)$$

где $СПЖ_{оп}$ и $СПЖ_{к}$ – средняя продолжительность жизни в опытной и контрольной группах соответственно. Отдельно уточним понятие продолжительности жизни (ПЖ): это количество суток, которое прожила мышь после начала воздействия до конечной точки. В случае полной ремиссии опухолевого процесса (излеченности) конечной точкой считался отрезок в 90 суток после лечения.

– Критерий излеченности (КИ), характеризующий процент полной регрессии опухоли у группы лабораторных мышей, подвергавшихся воздействию.

Отдельное исследование эффектов нетеплового воздействия мощнцми наносекундными импульсами на метастатическую активность опухоли проводилось на мышах с саркомой мягких тканей S37. Саркома S37 примечательна тем, что имеет лимфогенный путь метастазирования и в 100% случаев поражает лимфатические узлы следующих групп (локализаций): паховые, подмышечные (брахиальные и аксиллярные), подчелюстные, брюшной полости (мезентериальные), помимо прочих.

В исследованиях эффектов нетеплового воздействия по метастазированию опухолевые клетки саркомы, полученные от мыши-донора, имплантировали подкожно на бедро по 1×10^6 клеток на мышь в 0,1 мл раствора Хенкса. Воздействие импульсами осуществлялось на 8 сутки после инокуляции опухолевого материала однократно по методике, описанной для вышеуказанных экспериментов, с использованием определённого по их результатам (см. подраздел 3.2.2) эффективного (терапевтического) режима. Объём первичного опухолевого узла на момент начала обработки был равен 110 ± 10 мм^3. На 20 сутки после проведенного лечения (или 27 сутки после имплантации опухолевого материала) все животные опытной и контрольной групп помещали в CO_2-бокс для эвтаназии (ZOONLAB GmbH, Германия). В последующей аутопсии мышей выявлялись увеличенные лимфатические узлы, пораженные метастазами. Извлечённые у мышей образцы лимфатических узлов взвешивались на аналитических весах «Ohaus Corporation SPS202F», USA.

Критериями оценки антиметастатической активности нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами являлись следующие величины:

– Частота метастазирования опухоли (ЧМ), представляющая собой процентную долю животных с метастазами по отношению к общему количеству животных в группе.

– Величина средней массы метастазов в лимфоузлах, вычисляемая путём вычитания из показателя массы лимфоузлов, пораженных метастазами, среднюю массу лимфоузлов здоровых животных, примерно равную 0,01 мг.

– Уровень торможения метастазирования (ТМ) опухоли в лимфоузлах определялся по формуле:

$$\text{ТМ} = \frac{\text{М}_\text{к} - \text{М}_\text{оп}}{\text{М}_\text{к}} \times 100\%, \qquad (20)$$

где $\text{М}_\text{оп}$ – средняя масса метастазов в пересчете на одну мышь в опытной группе; М_k – средняя масса метастазов в пересчете на одну мышь в контрольной группе.

Помимо этого, как и в экспериментах *in vitro*, с целью определения способов улучшения эффективности лечения оценивались результаты сочетанного нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами и химиотерапии. Сначала на мышей проводилось воздействие импульсами в эффективном терапевтическом режиме (300 Гц, 20 кВ в течение 60 минут, количество импульсов 1 080 000, обоснование эффективности режима будет дано ниже в разделе 3.2.2). Затем, через 24 часа, мышам внутривенно вводился препарат Цисплатин-Тева (ЦП) в полной или половинной терапевтической дозе (ТД, количество лекарственного препарата, превышающее минимальную действующую дозу и вызывающее требуемый лечебный эффект): ТД для мышей – 8,0 мг/кг или ½ ТД – 4,0 мг/кг. Контрольным животным внутривенно вводился физиологический раствор (0,9% NaCl) в тех же объемах.

Критериями оценки сочетанного действия выступали указанные выше ПУОО, ТРО, УПЖ и КИ, рассчитанные относительно группы контрольных животных. Помимо них, рассчитывался достигаемый сочетанным применением терапевтический выигрыш (ТВ), который определялся относительно каждого компонента комбинированного действия (воздействия импульсами и химиотерапии с использованием препарата ЦП в соответствующей дозе) по формуле:

$$\text{ТВ} = \frac{V_{\text{комп}} - V_{\text{соч}}}{V_{\text{комп}}} \times 100\%, \qquad (21)$$

где $V_{\text{соч}}$ и $V_{\text{комп}}$ – средний объем опухоли в группе с сочетанным лечением и в группе с лечением одним из компонентов соответственно.

При статистической обработке всех рассчитываемых количественных величин с целью обеспечения достоверности полученных результатов вычислялось групповое среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка среднего (m). Различия между опытной и контрольной группами было принято считать статистически достоверными при $p \leq 0{,}05$.

Важным являлся критерий биологической значимости воздействия: противоопухолевый эффект считался биологически значимым, если ТРО в опытной группе сохранялось на уровне 50% длительное время. При этом также учитывалась достоверность отличий средних объемов опухоли в опытной и контрольной группах. Биологически значимыми также считались показатели УПЖ на уровне не менее 25%, показатели ПУОО – не менее чем в 2 раза, показатели ТМ – не менее 30%.

3.2.2. Экспериментальные результаты

Эксперименты *in vivo* проводились в несколько этапов, вынесенных далее в отдельные подпункты.

Оценка влияния кратности нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами. Проводилось наблюдение за ростом объёма привитой опухоли у мышей с саркомой мягких тканей S37 для однократного и пятикратного режимов воздействия. Полученные экспериментальные результаты для объёма опухоли и ТРО показаны в таблице 5 и на рисунке 3.2. Как наглядно показано на рисунке, наибольшую эффективность показал пятикратный режим воздействия (параметры: 20 кВ, 100 Гц в течение 60 минут, суммарное количество импульсов 1 800 000) – динамика роста объёма опухоли заметно медленнее, чем при других режимах (соответствующая линия значений лежит ниже других). ПУОО в этом режиме был в 2.3 раза выше, чем в контрольной группе, ТРО достигало 63% и сохранялось на биологически значимом уровне в течение 28 суток после лечения, УПЖ равнялось 28%.

Таблица 5. Динамика роста первичного опухолевого узла саркомы S37 после однократного и пятикратного воздействия с частотой следования 100 Гц.

Время после воздействия, сутки	Параметры воздействия				
	Однократное 360 000 импульсов 100 Гц		Пятикратное 1 800 000 импульсов 100 Гц		Контроль
	$V_{опухоли}$, мм^3	ТРО, %	$V_{опухоли}$, мм^3	ТРО, %	$V_{опухоли}$, мм^3
До воздействия	129±19	-	133±22	-	131±19
4	268±57	30	213±57	44	382±47
8	393±90	44	296±90	58	697±81
11	744±126	32	470±88	57	1096±116
14	1521±246	29	839±67	61	2144±264
18	2611±231	14	1135±105	63	3032±357
21	4004±302	0	1614±273	59	3947±471
25	5488±356	0	2039±290	64	5587±342
28	6203±639	0	2781±415	56	6265±613
Количество животных в опытных группах – 3, в контрольной группе – 5.					

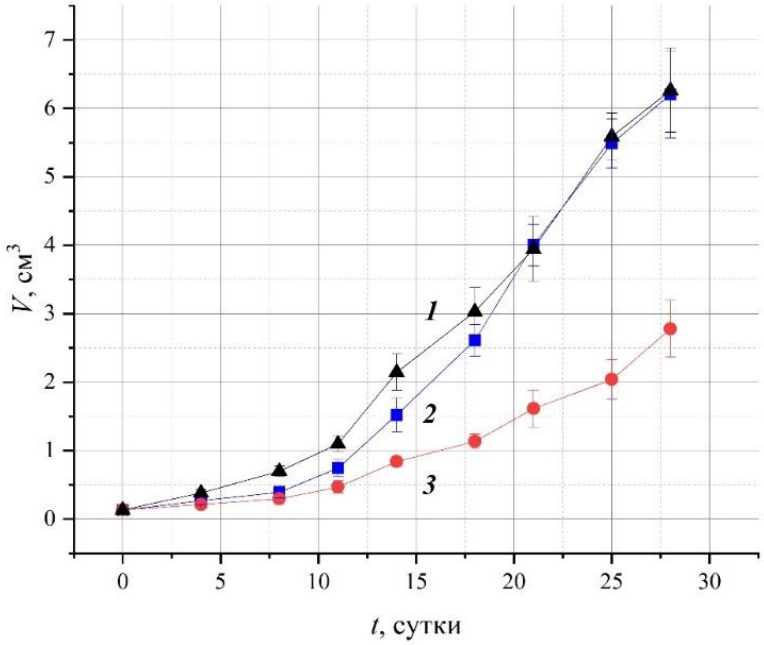


Рисунок 3.2. График зависимости объёма опухоли саркомы мягких тканей (S37) от времени после воздействия при различных режимах обработки: 1 – контрольная группа, 2 – однократное воздействие с частотой повторения 100 Гц, 3 – пятикратное воздействие с частотой повторения 100 Гц.

Аналогичным образом производилось исследование противоопухолевого эффекта у мышей с карциномой легкого LLC. Как и в случае саркомы S37, при увеличении кратности воздействия наблюдается повышение эффективности, что видно из данных таблицы 6 и рисунка 3.3, где представлены результаты по динамике ТРО и роста объёма опухоли. При этом наиболее высокий противоопухолевый эффект получен при использовании однократного режима нетеплового воздействия импульсами, где частота повторения импульсов была увеличена до 300 Гц (20 кВ, 300 Гц в течение 60 минут, количество импульсов 1 080 000): как демонстрирует рисунок 3.3, динамика роста опухоли была медленнее, чем в прочих режимах. ПУОО в этом случае имело значения в 2.5 раза выше, чем в контрольной группе, ТРО достигало 67% и сохранялось на

биологически значимом уровне в течение 28 суток после лечения, УПЖ равнялось 35%.

По результатам вышеуказанных исследований при проведении дальнейших экспериментов было решено отказаться от пятикратного режима, поскольку увеличение эффективности воздействия нивелировалось значительной нагрузкой на исследуемых мышей в течение 5 дней. В связи с этим на дальнейших этапах экспериментов использовался однократный режим нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами с целью установления его эффективных терапевтических режимов.

Таблица 6. Динамика роста первичного опухолевого узла карциномы легкого LLC после однократного воздействия с частотами следования 100 и 300 Гц, а также пятикратного воздействия с частотой следования 100 Гц.

Время после воздействия, сутки	Параметры воздействия						
	Однократное 360 000 импульсов 100Гц		Пятикратное 1 800 000 импульсов 100Гц		Однократное 1 080 000 импульсов 300Гц		Контроль
	$V_{опухоли}$, $мм^3$	ТРО, %	$V_{опухоли}$, $мм^3$	ТРО, %	$V_{опухоли}$, $мм^3$	ТРО, %	$V_{опухоли}$, $мм^3$
До воздействия	119±18	-	112±21	-	119±28	-	121±18
4	138±25	13	112±21	29	119±28	25	158±27
8	233±70	19	153±31	40	140±26	51	286±38
11	309±73	25	232±81	44	179±20	57	415±84
14	370±56	38	328±87	45	258±40	57	598±112
18	519±37	53	477±78	56	366±90	67	1094±108
21	708±58	46	629±141	52	496±128	62	1312±187
25	1135±232	36	911±178	49	708±161	60	1771±252
28	1734±373	27	1423±173	40	1035±339	57	2391±340
32	2468±549	24	2185±351	32	1764±402	45	3228±450
Количество животных в опытных группах – 3, в контрольной группе – 5.							

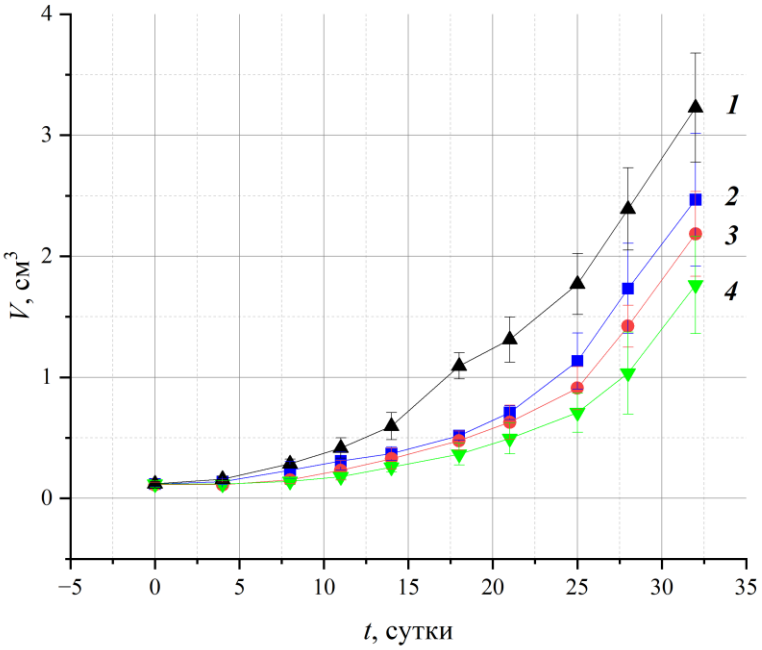


Рисунок 3.3. График зависимости объёма опухоли карциномы легкого (LLC) от времени после воздействия при различных режимах обработки: 1 – контрольная группа, 2 – однократное воздействие с частотой повторения 100 Гц, 3 – пятикратное воздействие с частотой повторения 100 Гц, 4 – однократное воздействие с частотой повторения 300 Гц.

Дополнительно следует подчеркнуть, что в ходе данных экспериментальных исследований не было отмечено негативных эффектов на коже животных. Фиксируемая путём термометрии температура поверхности тел мышей и, в частности, области воздействия также сохранялась в пределах нормы (37–39 °C).

Изучение противоопухолевой активности нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами у мышей с саркомой S37. Проводилось наблюдение изменений противоопухолевой активности у мышей с саркомой мягких тканей S37 в зависимости от напряжения и частоты повторения импульсов. Обобщенные результаты исследований приведены в таблице 7 в порядке снижения амплитуды напряжения импульсов.

Таблица 7. Отработка эффективного режима нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами на модели саркомы мягких тканей S37.

Параметры воздействия			Количество импульсов	Критерии оценки эффективности воздействия							
					Время после воздействия, сутки						
					ТРО, %*						
Напряжение, кВ	Частота, Гц	Время, минуты		ПУОО, %*	4	6	8	11	15	20	УПЖ, %*
30	100	60	360 000	66	30	40	44	32	29	0	0
30	300	60	1 080 000	Паралич в области воздействия, последующая гибель в течение суток							
20	200	60	720 000	60	52	39	60	67	75	81	19
	300	60	1 080 000	167	44	68	70	66	48	65	4
	300	40	720 000	0	15	30	43	44	44	29	18
	400	60	1 440 000	Паралич в области воздействия, последующая гибель в течение 2 часов							
		15	360 000	Паралич в области воздействия, последующая гибель в течение 2 часов							
		5	120 000	29	23	32	52	58	53	39	0
	500	24	720 000	0	0	23	37	33	Гибель на 14 сутки после ЭИ воздействия		-80
8	400	60	1 440 000	29	5	21	17	14	12	0	26
* – Количество животных в опытных группах – 5, в контрольных группах – 5											

Как следует из данных таблицы 7, наиболее высокий противоопухолевый эффект, выражаемый в наибольших биологически значимых (>50%) показателях ТРО (70 – 81%), получен при использовании частот повторения импульсов 200 и 300 Гц в течение 60 минут (количество импульсов 720 000 и 1 080 000, соответственно). Режимы воздействия с данными наборами параметров были определены как эффективные терапевтические. Отметим, что указанный уровень ТРО сохранялся у обработанных мышей в течение всего срока наблюдения в 20 суток.

В случае иных режимов воздействия противоопухолевый эффект варьировался. Уменьшение времени воздействия до 40 минут приводило к снижению эффективности подаваемых импульсов, а увеличение частоты

повторения импульсов до 400 Гц (как в течение 60 минут, так и при последующем уменьшении периода до 15 минут) приводило к нарастанию побочных местных реакций на коже и гибели животных в течение 2-х часов после лечения. Дальнейшее снижение времени воздействия до 5 минут не вызывало местных реакций, однако эффективность нетеплового воздействия наносекундными импульсами лишь кратковременно достигала биологически значимого уровня. При использовании частоты повторения импульсов 500 Гц в течение 24 минут противоопухолевый эффект не фиксировался, а продолжительность жизни обработанных при этом режиме животных сокращалась на 80% по сравнению с контрольной группой.

Использование напряжения 30 кВ и воздействия в течение 60 минут при частоте следования импульсов 300 Гц приводило к параличу мышц бедра мыши сразу после лечения. Данный негативный эффект усиливался в течение суток и приводил к гибели животных. При использовании частоты 100 Гц нежелательные реакции у мышей отсутствовали, однако ТРО не превышало 44%, оставаясь ниже биологически значимых показателей. Использование еще более низкого напряжения в 8 кВ, (вкупе с частотой повторения импульсов 400 Гц в течение 60 минут) не оказывало существенного влияния на рост опухоли.

Изучение противоопухолевой активности нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами у мышей с карциномой легкого LLC. Проводилось наблюдение изменений противоопухолевой активности у мышей с карциномой легкого LLC в зависимости от напряжения и частоты повторения импульсов. Обобщенные результаты исследований приведены в таблице 8 в порядке снижения амплитуды напряжения импульсов.

Таблица 8. Отработка эффективного режима нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами на модели карциномы легкого LLC.

Параметры воздействия			Количество импульсов	Критерии оценки эффективности воздействия							
Напряжение, кВ	Частота, Гц	Время, минуты		ПУОО, %*	Время после воздействия, сутки ТРО, %*						УПЖ, %*
					4	6	8	11	15	20	
30	100	60	360 000	43	33	41	46	46	40	44	16
26	500	0,5	15 000	9	22	49	30	-11	0	-13	13
20	100	60	360 000	58	13	19	25	38	53	46	12
	300	60	1 080 000	155	25	51	57	57	67	62	35
				89	67	73	68	44	44	42	26
				130	40	48	47	50	46	40	26
	400	5	120 000	-7	18	31	21	-3	0	-26	0
	500	36	1 080 000	Паралич в области воздействия, последующая гибель в течение суток							
		2	60 000	-20	6	21	4	-38	-25	-8	21
16		20	600 000	-35	-24	10	-8	-50	-34	-13	-13
11		20	600 000	-20	0	33	18	-27	-17	2	3
* – Количество животных в опытных группах – 5, в контрольных группах – 5											

Как следует из данных таблицы 8, наиболее высокий противоопухолевый эффект (биологически значимое ТРО в 50–73%) был получен при использовании режима 300 Гц в течение 60 минут (1 080 000 импульсов). По результатам трёх независимых экспериментов, проведённых в разное время, среднее значение ПУОО составляло 125%, ТРО на биологически значимом уровне (более 50%) сохранялось в течение 15 суток после ЭИ воздействия, УПЖ достигало 29% по сравнению с контрольными группами. Режим воздействия с данным набором параметров, достаточно близкий к таковому для вышеописанного случая саркомы S37, был также определён как эффективный терапевтический.

При использовании более высоких значений напряжения электромагнитного поля 30 или 26 кВ противоопухолевая эффективность не достигала биологически значимого уровня. Отсутствие эффекта фиксировалось вне зависимости от частоты повторения импульсов и времени воздействия: режимы 100 Гц в течение 60 минут и 500 Гц в течение 0,5 минут, (количество импульсов 360 000 и 15 000,

соответственно) дали результирующие показатели ТРО, не превышавшие 46 и 49%, соответственно. Помимо этого, использование режима 26 кВ, 500 Гц в течение 0,5 минут приводило к негативному эффекту: образованию у мышей повреждений кожи в области воздействия.

Использование режима 20 кВ, 500 Гц в течение 36 минут (1 080 000 импульсов) приводило к параличу мышц бедра мышей сразу после окончания процедуры лечения. Данный негативный эффект проявлялся в области наложения верхнего электрода, усиливался в течение суток и приводило к гибели мышей. Остальные режимы воздействия с другими значениями частоты повторения импульсов и времён воздействия: 100 Гц в течение 60 минут, 400 Гц в течение 5 минут, 500 Гц в течение 2 минут – не оказывали существенного влияния на рост опухолевого узла или увеличение продолжительности жизни животных.

Что касается исследованных пониженных значений напряжения, режимы воздействия при 16 и 11 кВ, частоте повторения импульсов 500 Гц в течение 20 минут (600 000 импульсов) не давали биологически значимых показателей ТРО, равно как и не приводили к увеличению продолжительности жизни мышей. В некоторые сроки после воздействия даже был отмечен обратный эффект, выражавшийся в небольшой стимуляции роста опухоли, однако отличия от контрольных групп были статистически незначительными.

Оценка влияния нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами на метастазирование у мышей с саркомой S37. Контролировалась динамика роста объёма опухоли со временем для исследуемой и контрольной групп. Воздействие проводилось в ранее установленном эффективном терапевтическом режиме для модели саркомы мягких тканей S37 (300 Гц, 20 кВ в течение 60 минут, количество импульсов 1 080 000). Результаты исследования представлены в таблице 9.

Таблица 9. Влияние нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами в эффективном терапевтическом режиме на метастатическую активность саркомы S37.

Оценка противоопухолевой эффективности			
Время после воздействия, сутки	Воздействие в эффективном терапевтическом режиме		Контроль
	$V_{опухоли}$, мм^3	ТРО, %	$V_{опухоли}$, мм^3
До воздействия	107±15	-	113±13
4	133±52*	40	221±19
6	221±67*	41	373±70
8	270±69*	41	454±83
11	414±36*	51	851±241
13	573±157*	51	1168±173
15	874±130*	61	2250±421
19	1347±299*	66	3932±498
21	1813±415*	61	4609±373
Оценка влияния на метастазирование			
Критерии оценки эффективности		Воздействие в эффективном терапевтическом режиме	Контроль
Средняя масса метастазов в лимфоузлах в пересчете на одну мышь, мг		0,41±0,33	0,59±0,17
ЧМ, %		100%	100%
ТМ, %		31%	-
* – различия биологически значимы при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$) Количество животных в опытных группах – 5, в контрольной группе – 5			

Из таблицы 9 видно, что рост объёма первичной опухоли у мышей обработанной импульсами группы меньше в сравнении с контрольной группой, а показатели ТРО достигают биологически значимого уровня (максимальное значение 61–66 % к 19-м суткам). Что касается антиметастатической активности воздействия, было зафиксировано торможение развития метастазов в лимфатических узлах со значением ТМ в 31%, ЧМ (процент животных с метастазами по отношению к общему количеству животных в группе) в опытной и контрольной группах составила 100%. Также выявлены отличия средней массы метастазов в лимфатических узлах в опытной и контрольной группах, однако из-за минимальной выборки животных они признаны биологически незначительными.

Изучение противоопухолевой эффективности сочетанного действия химиотерапии и нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами в терапевтическом режиме у мышей с саркомой S37. Как и в описанных выше экспериментах, воздействие электромагнитными импульсами (далее в таблицах для краткости указано как ЭИ) проводилось в установленном эффективном терапевтическом режиме для модели саркомы мягких тканей S37 (300 Гц, 20 кВ в течение 60 минут, количество импульсов 1 080 000) во всех нижеуказанных режимах: как отдельно (моно-режим), так и в сочетании с препаратом Цисплатин-Тева (в таблицах для краткости указан как ЦП). Результаты исследования представлены в таблице 10.

Как видно из таблицы, во всех опытных группах сочетанного лечения, а также в группах лечения каждым из компонентов в моно-режиме, объем опухоли был существенно ниже, чем у контрольных животных, которым вводили только 0,9% раствор NaCl. Зафиксированные отличия были биологически значимы в течение всего срока наблюдения в 21 день. ТРО в группах с использованием сочетанного режима лечения было выше, чем при использовании моно-режимов лечения. Отличия от группы, в которой проводили воздействие ЭИ в моно-режиме, были биологически значимыми.

График изменения ТРО со временем для разных режимов обработки наглядно продемонстрирован на рисунке 3.4.

Таблица 10. Динамика роста первичного опухолевого узла саркомы S37 после сочетанного нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами и химиотерапии препаратом Цисплатин-Тева.

Время после воздействия, сутки	Объем опухоли, мм^3					Контроль
	Параметры воздействия					
	ЭИ+ЦП 8,0 мг/кг	ЭИ+ЦП 4,0 мг/кг	ЭИ	ЦП 8,0 мг/кг	ЦП 4,0 мг/кг	
До воздействия	99±14***	100±2***	103±10*	108±16*	96±8*	116±14
4	0***	45±50**	139±7*	124±14*	136±24*	217±36
6	2±4***	75±104**	223±27*	87±42*	165±53*	369±100
8	2±4***	79±113**	282±19*	156±88*	203±91*	451±78
11	2±4***	125±142**	410±13*	298±212*	314±173*	823±212
13	87±144**	178±141**	558±153*	439±409*	480±233*	1195±353
15	177±245**	324±213**	888±153*	651±599*	865±437*	2313±446
19	293±392**	513±285**	1411±254*	917±840*	1420±704*	3889±409
21	394±507**	711±347**	1871±440*	1179±1037*	1755±862*	4555±467

* – различия биологически значимы при сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$)
** – различия биологически значимы при сравнении с контрольной группой и с группой, в которой проводили только нетепловое воздействие мощными наносекундными импульсами
*** – различия биологически значимы при сравнении с контрольной группой, группой, в которой проводили только нетепловое воздействие мощными наносекундными импульсами и группой, в которой животным вводили Цисплатин-Тева в соответствующей дозе
Количество животных в опытных группах – 5, в контрольной группе – 5

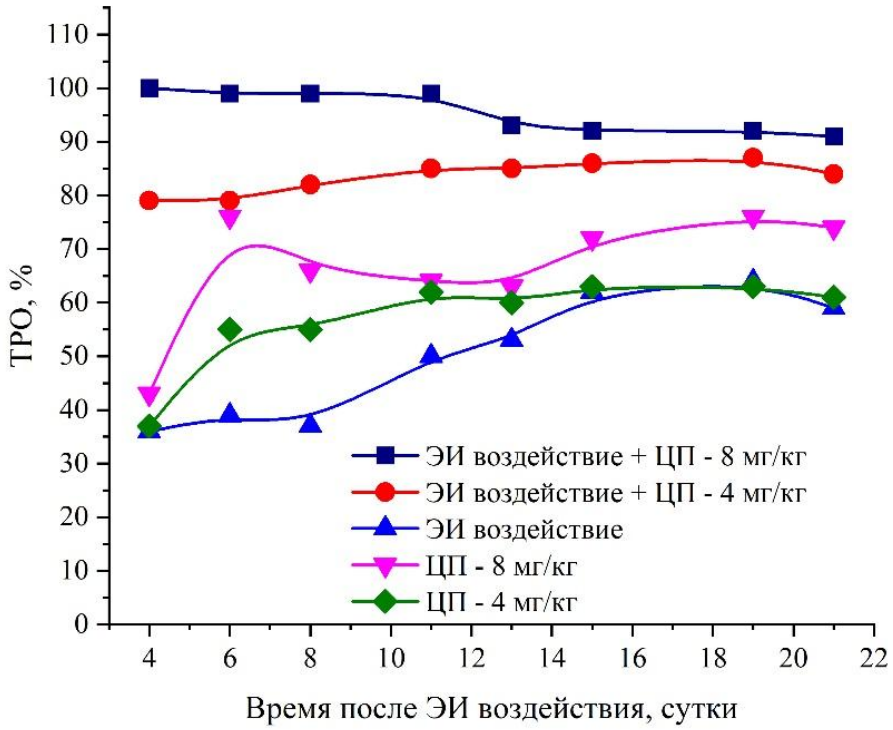


Рисунок 3.4. Противоопухолевая активность сочетанного действия химиотерапии и воздействия импульсами у мышей с саркомой S37 по торможению роста опухоли (ТРО). Частота следования импульсов 300 Гц, напряжение электромагнитного поля 20 кВ. Количество животных в опытных группах – 5, в контрольной группе – 5.

Из рисунка 3.4 видно, что при использовании сочетанного воздействия с дозами Цисплатина-Тева по 8,0 мг/кг и 4,0 мг/кг максимальные значения ТРО достигали 100 – 91% и 87 – 79% соответственно. Отметим, что нетепловое воздействие наносекундными импульсами в моно-режиме и лечение Цисплатином-Тева в дозе ½ ТД не имели существенных отличий по динамике роста опухоли и ТРО, что, предположительно, указывает на примерную равнозначность противоопухолевых эффектов данных методов терапии.

Исследования показали, что ПУОО значительно выше в группах лечения Цисплатином-Тева:

- Для случая полной ТД – 186% в группе сочетанного лечения в сравнении с 114% в группе, где для лечения использовался только химпрепарат;
- Для случая половинной ТД – 145% в группе сочетанного лечения в сравнении 66% в группах, в которых в схеме лечения присутствовал только химический препарат.

Аналогичную картину наблюдали при оценке эффективности по УПЖ. На рисунке 3.5 показано сравнение количественных характеристик (ПУОО, СПЖ, УПЖ и КИ) сочетанного воздействия и воздействия отдельных компонентов в моно-режимах.

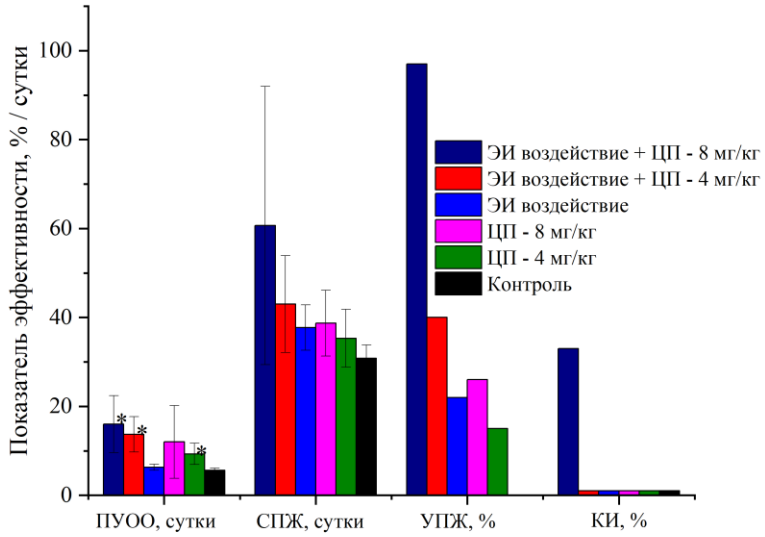


Рисунок 3.5. Противоопухолевая активность сочетанного действия химиотерапии и нетеплового воздействия мощными наносекундным импульсами у мышей с саркомой S37. Критерии оценки: ПУОО – период удвоения объема опухоли, СПЖ – средняя продолжительность жизни мышей, УПЖ – увеличение продолжительности жизни мышей, КИ – критерий излеченности. Частота следования импульсов 300 Гц, напряжение электромагнитного поля 20 кВ. Количество животных в опытных группах – 5, в контрольной группе – 5. * – различия биологически значимы при сравнении с контрольной группой.

Как видно из рисунка, максимальная продолжительность жизни выявлена у мышей при использовании сочетанного режима ЭИ воздействия и ЦП в дозе 8,0 мг/кг, УПЖ составило 97%; при использовании ЦП в дозе 4,0 мг/кг – 39%.

Отдельно подчеркнём полученный критерий излеченности КИ в 33%, полученный при сочетанном режиме лечения с Цисплатином-Тева в полной ТД 8,0 мг/кг: эта величина означает, что у двух животных из группы выявлена полная резорбция первичного опухолевого узла. При проведении плановой аутопсии на 90 сутки после лечения, у излеченных животных не было зафиксировано рецидивов, увеличенных лимфоузлов с признаками метастатического поражения и других патологических изменений.

Эффективность использования сочетанного режима воздействия импульсами и химиотерапии демонстрируют также данные по терапевтическому выигрышу (ТВ), рассчитанному относительно каждого компонента лечения в моно-режиме. Результаты представлены в таблице 11.

Таблица 11. Терапевтический выигрыш от применения сочетанного нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами и химиотерапии препаратом Цисплатин-Тева у мышей с саркомой S37.

Время после воздействия, сутки	ТВ сочетанного лечения, %			
	Режимы сочетанного лечения			
	ЭИ + ЦП 8,0 мг/кг		ЭИ + ЦП 4,0 мг/кг	
	Относительно ЭИ	Относительно ЦП 8,0 мг/кг	Относительно ЭИ	Относительно ЦП 4,0 мг/кг
4	100*	100*	68*	67*
6	99*	98*	66*	55
8	99*	99*	72*	61
11	99*	99*	70*	60
13	84*	80	68*	63
15	80*	73	64*	63
19	79*	68	64*	64
21	79*	67	62*	59
* – различия биологически значимы при сравнении с контрольными группами ($p < 0,05$) Количество животных в опытных группах – 5, в контрольной группе – 5				

Как видно из таблицы, ТВ при использовании сочетанных режимов лечения составляет 79 – 100% относительно нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами в эффективном терапевтическом режиме и 67 – 100% относительно химиотерапии с Цисплатином-Тева в ТД (8,0 мг/кг) в моно-режиме. При использовании Цисплатина-Тева в ½ ТД (4,0 мг/кг) ТВ имеет несколько меньшие, но также биологические значимые значения: 62 – 72% относительно отдельного воздействия импульсами в эффективном терапевтическом режиме и 55 – 67% относительно химиотерапии в моно-режиме. Как видно из рассчитанных значений ТВ, общий фармакологический эффект сочетания двух методов лечения интенсивнее, чем действие одного из компонентов, однако несколько меньше суммы их противоопухолевых эффектов в моно-режимах.

Касательно УПЖ мышей по рассчитанным для этого значениям ТВ вырисовывается аналогичная ситуация: использование Цисплатина-Тева в полной ТД 8,0 мг/кг даёт ТВ (по продолжительности жизни) в 61% относительно нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами в эффективном терапевтическом режиме и в 57% относительно использовании химпрепарата в моно-режиме. Половинная доза Цисплатина-Тева 4,0 мг/кг в сочетанной схеме лечения даёт биологически незначимые показатели ТВ (по продолжительности жизни): 14% и 22% для указанных случаев моно-режимов соответственно.

В целом, полученные данные для саркомы S37 демонстрируют увеличенную эффективность сочетанного применения нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами со средством химиотерапии, указывая на перспективность данной комбинации методов для лечения злокачественных новообразований.

3.3. Основные экспериментальные результаты и их обсуждение

Как показали эксперименты *in vitro* и *in vivo*, обработка мощными наносекундными импульсами опухолевых моделей саркомы мягких тканей S37 и карциномы лёгкого Льюиса LLC приводила к значительному торможению развития опухолевых образований. Это выражается в первую очередь в том, что для характерных величин ИП в экспериментах *in vitro* и ТРО в экспериментах *in vivo* удавалось достигнуть значений >50% (в максимуме 80–90%). Стоит подчеркнуть, что данный диапазон значений ИП и ТРО был достигнут в случаях, где производилось исключительно воздействие мощными наносекундными импульсами. В то же самое время по результатам исследований на тест-системах клеточных растворов и мышей с привитыми опухолями заметно влияние варьируемых параметров воздействия: напряжённости электрического поля, частоты следования и количества импульсов, а также кратности воздействия. Несмотря на то, что явно выраженной математической зависимости ИП и ТРО от параметров воздействия выявлено не было, аккуратным изменением этих параметров были экспериментально достигнуты оптимальные режимы нетеплового воздействия импульсами с конкретным набором параметров. Эти оптимальные режимы продемонстрировали наилучшие результаты, что позволяет предположить о необходимости дальнейшей настройки параметров для улучшения эффектов воздействия.

Отметим, что напряжённость электромагнитного поля, рассчитываемая по формуле $E=U/d$ (U – напряжение на электродах, d = 10 мм – расстояние между электродами) при наших наиболее эффективных режимах составляет порядка 20 кВ/см. Подчеркиваем, что всех статьях с экспериментами по ЭИ воздействию на мышей (в частности, [19–23]) в качестве параметров импульсов указывается напряжённость электромагнитного поля на обкладках электродов также порядка 20-30 кВ/см. Однако в статье [21] утверждается, что для инициации апоптоза в клетках достаточно напряжённости около 2 кВ/см, и при этом, исходя из

полученных в статье данных, делается вывод, что для достижения оптимального эффекта требуется напряжённость поля больше 30 кВ/см. В связи с этим обратим внимание, что в указанных статьях не учитывается изменение формы и амплитуды импульса непосредственно на биологической нагрузке, состоящей из мышечной ткани, которая имеет собственные электрофизические характеристики. Из результатов моделирования нашей эквивалентной радиофизической схемы видно, что в области между электродами, заполненной средой бедра мыши с опухолью, в связи с падением амплитуды фактическая напряжённость электрического поля составляет 1,7 кВ/см, что примерно соответствует предполагаемому достаточному для инициации апоптоза значению из [21].

Моделирование эквивалентных схем также показало пренебрежимо малое значение энергии одного импульса, рассеиваемой на объектах в виде тепла, из которого следует крайне малая величина повышения температуры при воздействии. Стоит также указать, что данные оценки произведены для единичного импульса. В реальном эксперименте генератор высоковольтных импульсов позволяет подавать много импульсов с заданной частотой повторения (в указанном терапевтическом режиме: 1 080 000 импульсов с частотой повторения 300 Гц, скважность импульсов имеет порядок 10^5–10^6). В статье [50], где обсуждается влияние параметров воздействия на эффективность, предлагается поднимать частоту повторения наносекундных импульсов до диапазона до 1 Гц–10 кГц, поскольку это должно обеспечить улучшенное лечение без существенных изменений интенсивности мышечных сокращений. Тем не менее, данное предложение основано на результатах экспериментов на клеточных суспензиях (статьи [136] и [137]), а не на лабораторных животных. Реальные эксперименты *in vivo* на лабораторных мышах показали, что увеличение частоты повторения наносекундных импульсов уже до 400 Гц приводило к параличу и смерти животного, так что, вероятно, дальнейшее повышение до килогерцового диапазона может быть вредоносным для живого организма и потому излишним.

В любом случае, динамическая термометрия, произведённая на мышах с помощью термографа ИРТИС 3000, продемонстрировала, что при обработке мышей в рамках установленных оптимальных режимов нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами аномальных изменений температуры поверхностей тел не зафиксировано. Отметим также, при оптимальных режимах не наблюдалось некротических повреждений кожи и иных патологических изменений.

Исследование сочетанного использования нетеплового воздействия мощными наносекундными импульсами и химиотерапии как *in vitro*, так и *in vivo* продемонстрировало увеличение эффективности. В совместном режиме лечения с Цисплатином-Тева эффективность (выражаемая в биологически значимых показателях ИП и ТРО) повышается: общее воздействие даёт лучшие результаты, чем воздействие отдельных компонентов. Дополнительно подчеркнём выявленный в наших экспериментах случай полного излечения с отсутствием рецидивов и патологических изменений у двух животных при изучении *in vivo* сочетанного режима лечения с воздействием импульсами и Цисплатином-Тева в терапевтической дозе 8,0 мг/кг. Можно предположить, что при оптимизации электрофизических характеристик воздействия (амплитуда, частота следования, количество импульсов и др.) возможно полное излечение обрабатываемых животных.

Представленные в третьей главе результаты исследований были опубликованы в работах [118, 119, 138], а также сборнике трудов [139].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итоги, отметим основные результаты проделанной работы.

Разработана схема и реализована экспериментальная установка, предназначенная для нетеплового воздействия мощными электрическими импульсами наносекундной длительности на биологические объекты. Представлены конструкции вариантов нагрузок, позволяющие применять нетепловое воздействие для обработки биологических объектов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Составлены радиофизические схемы различных вариантов конструкций эксперимента на указанной установке, с помощью которых оценены характерные физические величины амплитуды, мощности и энергии импульса на биологическом объекте. Отмечено изменение формы треугольного импульса на нагрузке с монополярной на биполярную, а также падение амплитуды на 1-2 порядка.

Произведены численные оценки изменения трансмембранного потенциала в клетке, а также критических значений напряжённости электрического поля и энергии, необходимых для образования электропорационных каналов в мембране. Проведённые оценки показывают, что мощные наносекундные импульсы реализованной экспериментальной установки не вызывают электропорацию в мембранах клеток при нетепловом воздействии. Однако, учитывая разнообразие электрофизических характеристик живых клеток, это предмет специального исследования, выходящего за рамки настоящей работы.

Численно оценено двумя способами увеличение температуры на объекте, происходящее при воздействии. На основании численных оценок на основе моделирования радиофизических эквивалентных схем, а также экспериментальных данных динамической термографии сделан вывод, что нагрев объекта при обработке незначителен.

Продемонстрировано наличие противоопухолевого эффекта нетеплового воздействия в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Определены эффективные режимы воздействия с терапевтическим эффектом. Показано влияние параметров воздействия на общую эффективность процедуры как отдельно нетепловым воздействием импульсами, так и совместно со средством химиотерапии Цисплатин-Тева. При совместном применении Цисплатина-Тева и нетеплового воздействия в определённых режимах выявлен синергетический эффект, повышающий результативность комбинированной обработки в сравнении с отдельным применением двух методов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

СВЧ – сверхвысокие частоты

ЭИ – электрические импульсы

LLC – Lewis lung carcinoma (карцинома лёгкого Льюиса)

ЦП – препарат Цисплатин-Тева

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

ИП – ингибирование пролиферации

ОП – оптическая плотность

ПУОО – период удвоения объёма опухоли

ТРО – торможение роста опухоли

КИ – критерий излеченности

УПЖ – увеличение продолжительности жизни

СПЖ – средняя продолжительность жизни

ТД – терапевтическая доза

ТП – терапевтический выигрыш

ЧМ – частота метастазирования опухоли

ТМ – торможение метастазирования опухоли.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девятков Н.Д., Чернов З.С., Бецкий О.В. и др. Нетепловое воздействие СВЧ импульсов наносекундной длительности на трансэпителиальный перенос ионов натрия // Биофизика. – 1982. – Т. 28 – № 3. – С. 558-560.
2. Девятков Н.Д., Плетнев С.Д., Чернов З.С. и др. Воздействие низкоэнергетического импульсного КВЧ- и СВЧ-излучения наносекундной длительности с большой пиковой мощностью на биологические структуры (злокачественные образования) // Докл. РАН. – 1994. – Т. 336. – № 6. – С. 826-828.
3. Девятков Н.Д., Плетнев С.Д., Бецкий О.В. и др. Воздействие низкоэнергетического импульсного СВЧ-излучения наносекундной длительности с большой пиковой мощностью на развитие злокачественных новообразований // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000. – №10. – С. 29-36.
4. Бецкий О. В., Девятков Н. Д., Кислов В. В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии //Биомедицинская радиоэлектроника. – 1998. – Т. 4. – С. 13-29.
5. Бецкий О. В. Пионерские работы по миллиметровой электромагнитной биологии, выполненные в ИРЭ РАН //Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. – 2003. – Т. 8. – С. 11-20.
6. Девятков Н. Д. и др. Диагностика и коррекция функционального состояния организма человека лечебно-диагностическим комплексом" Шарм" //Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии. – 2018. – Т. 10. – №. 2. – С. 257-268.
7. Bray F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries //CA: a cancer journal for clinicians. – 2024. – Т. 74. – №. 3. – С. 229-263.

8. Xia Z. et al. Removable Nanopore Sealing and In Situ Iron Oxide Nanoparticle Synthesis on Thin Silicon Nitride Membranes //ACS Nanoscience Au. – 2026.
9. Sherif S., Ghallab Y. H., Ismail Y. Integrated electrical modeling of circulating tumor cells for enhanced dielectrophoretic trapping and electroporation //Scientific Reports. – 2026. – Т. 16. – №. 1. – С. 12072.
10. Bier M. et al. Kinetics of sealing for transient electropores in isolated mammalian skeletal muscle cells //Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association. – 1999. – Т. 20. – №. 3. – С. 194-201.
11. Alshahat M. A. et al. Cancer treatment: An overview of pulsed electric field utilization and generation //Applied Sciences. – 2023. – Т. 13. – №. 18. – С. 10029.
12. Beebe S. J. et al. Ultrashort electric pulse effects in biology and medicine. – New York: Springer, 2021.
13. Varshney A. et al. A Comprehensive Review on the use of nanosecond pulsed electric fields in cancer therapy //Ceramics International. – 2026.
14. Астахов Д. А. и др. Необратимая электропорация при местнораспространенном раке поджелудочной железы //Анналы хирургической гепатологии. – 2018. – Т. 23. – №. 2. – С. 59-68.
15. Булдаков М. А. и др. Влияние импульсно-периодического СВЧ-излучения на опухолевые и нормальные клетки. Механизм действия //Сибирский онкологический журнал. – 2007. – №. S2. – С. 26-27.
16. Панченков Д. Н. и др. Необратимая электропорация метастазов колоректального рака в печеньс использованием системы" nanoknife" //Клиническая практика. – 2013. – №. 1 (13). – С. 37-42.
17. Патютко Ю. И. и др. Необратимая электропорация нерезектабельного местно-распространенного рака поджелудочной железы //Современная онкология. – 2017. – Т. 19. – №. 3. – С. 58-63.
18. Просекина Е. А. Повышение эффективности доксорубицина за счёт электропорации мембран опухолевых клеток импульсно-периодическим

микроволновым излучением //Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины. – 2018. – С. 489-491.

19. Chen X. et al. Long term survival of mice with hepatocellular carcinoma after pulse power ablation with nanosecond pulsed electric fields //Technology in cancer research & treatment. – 2012. – Т. 11. – №. 1. – С. 83-93.
20. Nuccitelli R., McDaniel A. Nano-pulse stimulation therapy in oncology //Bioelectricity. – 2024. – Т. 6. – №. 2. – С. 72-79.
21. Nuccitelli R. et al. Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment //International Journal of Cancer. – 2010. – Т. 127. – №. 7. – С. 1727-1736.
22. Guo F. et al. In vivo evidences of nanosecond pulsed electric fields for melanoma malignancy treatment on tumor-bearing BALB/c nude mice //Technology in cancer research & treatment. – 2014. – Т. 13. – №. 4. – С. 337-344.
23. Wu S. et al. Nanosecond pulsed electric fields as a novel drug free therapy for breast cancer: an in vivo study //Cancer letters. – 2014. – Т. 343. – №. 2. – С. 268-274.
24. Stampfli R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node //An Acad Brasil Ciens. – 1958. – Т. 30. – №. 1. – С. 57-61.
25. Vadalà M. et al. Mechanisms and therapeutic effectiveness of pulsed electromagnetic field therapy in oncology //Cancer medicine. – 2016. – Т. 5. – №. 11. – С. 3128-3139.
26. Schoenbach K. H. et al. The effect of pulsed electrical fields on biological cells //Digest of Technical Papers. 11th IEEE International Pulsed Power Conference (Cat. No. 97CH36127). – IEEE, 1997. – Т. 1. – С. 73-78.
27. Baldwin W. H. et al. Membrane permeability and cell survival after nanosecond pulsed-electric-field exposure—significance of exposure-media composition //IEEE transactions on plasma science. – 2010. – Т. 38. – №. 10. – С. 2948-2953.
28. Kotnik T., Miklavčič D. Transmembrane voltage induced by applied electric fields //Handbook of Electroporation. – 2016. – Т. 1. – С. 1111-1127.

29. Guo F., Zhang L., Liu X. Nonlinear dispersive cell model for microdosimetry of nanosecond pulsed electric fields //Scientific Reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 19456.
30. Schoenbach K. H. et al. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells //Proceedings of the IEEE. – 2004. – Т. 92. – №. 7. – С. 1122-1137.
31. Schoenbach K. H. et al. The effect of pulsed electric fields on biological cells: Experiments and applications //IEEE transactions on plasma science. – 2002. – Т. 25. – №. 2. – С. 284-292.
32. Schoenbach K. H. et al. Bioelectric effects of intense nanosecond pulses //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2007. – Т. 14. – №. 5. – С. 1088-1109.
33. Salimi E., Bridges G. E., Thomson D. J. The effect of dielectric relaxation in nanosecond pulse electroporation of biological cells //2010 14th International Symposium on Antenna Technology and Applied Electromagnetics & the American Electromagnetics Conference. – IEEE, 2010. – С. 1-4.
34. Petrov A. A. et al. The action of the pulsed electric field of the subnanosecond range on human tumor cells //Bioelectromagnetics. – 2022. – Т. 43. – №. 5. – С. 327-335.
35. В. А. Вдовин, Р. А. Денисов, С. А. Сапецкий, В. А. Черепенин. Технология экспериментов нетеплового воздействия мощных электромагнитных импульсов на естественные и искусственные среды. // Радиотехника и электроника. – 2023. – Т. 68 – № 9. – С. 910–916.
36. Costa J. A. et al. Sensitivity analysis of a nuclear electroporation model—A theoretical study //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2022. – Т. 28. – №. 6. – С. 1850-1858.
37. Tien H. T., Ottova A. The bilayer lipid membrane (BLM) under electrical fields //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2003. – Т. 10. – №. 5. – С. 717-727.
38. Chen C. et al. Membrane electroporation theories: a review //Medical and Biological Engineering and Computing. – 2006. – Т. 44. – №. 1. – С. 5-14.

39. Weaver J. C., Chizmadzhev Y. A. Theory of electroporation: a review //Bioelectrochemistry and bioenergetics. – 1996. – Т. 41. – №. 2. – С. 135-160.
40. Joshi R. P., Schoenbach K. H. Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulses: a numerical simulation study //Physical review E. – 2000. – Т. 62. – №. 1. – С. 1025.
41. Joshi R. P. et al. Improved energy model for membrane electroporation in biological cells subjected to electrical pulses //Physical review E. – 2002. – Т. 65. – №. 4. – С. 041920.
42. Neu J. C., Krassowska W. Asymptotic model of electroporation //Physical review E. – 1999. – Т. 59. – №. 3. – С. 3471.
43. Shinoda W. Permeability across lipid membranes //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2016. – Т. 1858. – №. 10. – С. 2254-2265.
44. Kotnik T. et al. Membrane electroporation and electropermeabilization: mechanisms and models //Annual review of biophysics. – 2019. – Т. 48. – №. 1. – С. 63-91.
45. Tieleman D. P. The molecular basis of electroporation //BMC biochemistry. – 2004. – Т. 5. – №. 1. – С. 10.
46. Tarek M. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation //Biophysical journal. – 2005. – Т. 88. – №. 6. – С. 4045-4053.
47. Pakhomov A. G. et al. Characterization of the cytotoxic effect of high-intensity, 10-ns duration electrical pulses //IEEE Transactions on Plasma Science. – 2004. – Т. 32. – №. 4. – С. 1579-1586.
48. Schoenbach K. H. et al. A scaling law for membrane permeabilization with nanopulses //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2009. – Т. 16. – №. 5. – С. 1224-1235.
49. Schoenbach K. H. From the basic science of biological effects of ultrashort electrical pulses to medical therapies //Bioelectromagnetics. – 2018. – Т. 39. – №. 4. – С. 257-276.
50. Novickij V. et al. Does the shape of the electric pulse matter in electroporation? //Frontiers in oncology. – 2022. – Т. 12. – С. 958128.

51. Elgenedy M. A. et al. A modular multilevel voltage-boosting Marx pulse-waveform generator for electroporation applications //IEEE Transactions on Power Electronics. – 2019. – Т. 34. – №. 11. – С. 10575-10589.
52. Chen W. et al. Development of bipolar pulse power supply based on peak closed-loop control method //IEEE Transactions on Plasma Science. – 2022. – Т. 51. – №. 1. – С. 211-219.
53. Pakhomov A. G. et al. Cancellation of cellular responses to nanoelectroporation by reversing the stimulus polarity //Cellular and molecular life sciences. – 2014. – Т. 71. – №. 22. – С. 4431-4441.
54. Pakhomov A. G. et al. Interference targeting of bipolar nanosecond electric pulses for spatially focused electroporation, electrostimulation, and tissue ablation //Bioelectrochemistry. – 2021. – Т. 141. – С. 107876.
55. Asadipour K. et al. Ultra-low intensity post-pulse affects cellular responses caused by nanosecond pulsed electric fields //Bioengineering. – 2023. – Т. 10. – №. 9. – С. 1069.
56. Pakhomov A. G. et al. Excitation and electroporation by MHz bursts of nanosecond stimuli //Biochemical and biophysical research communications. – 2019. – Т. 518. – №. 4. – С. 759-764.
57. Pliquett U., Nuccitelli R. Measurement and simulation of Joule heating during treatment of B-16 melanoma tumors in mice with nanosecond pulsed electric fields //Bioelectrochemistry. – 2014. – Т. 100. – С. 62-68.
58. Klösgen B. et al. Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration //Biophysical journal. – 1996. – Т. 71. – №. 6. – С. 3251-3260.
59. Salimi E., Thomson D. J., Bridges G. E. Membrane dielectric dispersion in nanosecond pulsed electroporation of biological cells //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2013. – Т. 20. – №. 4. – С. 1256-1265.
60. Camp J. T. et al. Cell death induced by subnanosecond pulsed electric fields at elevated temperatures //IEEE Transactions on plasma science. – 2012. – Т. 40. – №. 10. – С. 2334-2347.

61. Schoenbach K. H. Thermal Effects in Bioelectrics //Ultrashort Electric Pulse Effects in Biology and Medicine. – Singapore: Springer Singapore, 2021. – С. 275-299.
62. Baker C. et al. Selective electroporation of tumor cells under AC radiofrequency stimulation: A numerical study //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2023. – Т. 71. – №. 1. – С. 114-121.
63. Petrella R. A. et al. Polymer nanoparticles enhance irreversible electroporation in vitro //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2022. – Т. 69. – №. 7. – С. 2353-2362.
64. Yao C. et al. Nanosecond pulses targeting intracellular ablation increase destruction of tumor cells with irregular morphology //Bioelectrochemistry. – 2020. – Т. 132. – С. 107432.
65. Rao X. et al. A digital controlled pulse generator for a possible tumor therapy combining irreversible electroporation with nanosecond pulse stimulation //IEEE transactions on biomedical circuits and systems. – 2020. – Т. 14. – №. 3. – С. 595-605.
66. Peng W. et al. Optimal Irreversible Electroporation Combined with Nano-Enabled Immunomodulatory to Boost Systemic Antitumor Immunity //Advanced Healthcare Materials. – 2023. – С. e2302549-e2302549.
67. Nuccitelli R. et al. Nano-pulse stimulation induces changes in the intracellular organelles in rat liver tumors treated in situ //Lasers in Surgery and Medicine. – 2020. – Т. 52. – №. 9. – С. 882-889.
68. Aggrawal H. et al. Gone in a picosecond: Techniques for the generation and detection of picosecond pulses and their applications //IEEE Microwave Magazine. – 2016. – Т. 17. – №. 12. – С. 24-38.
69. Huynh K. A Dual Resonant Transformer and a Dielectric Antenna for Picosecond Pulse Radiation. – Old Dominion University, 2018.
70. Schoenbach K. H., Xiao S. Nanosecond Pulses and Beyond–Towards Antenna Applications //1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies: Portorož,

Slovenia, September 6–10, 2015. – Singapore: Springer Singapore, 2016. – С. 24-27.

71. Schoenbach K. H. et al. The effect of intense subnanosecond electrical pulses on biological cells //IEEE Transactions on plasma science. – 2008. – Т. 36. – №. 2. – С. 414-422.
72. Xiao S. et al. Subnanosecond electric pulses cause membrane permeabilization and cell death //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2011. – Т. 58. – №. 5. – С. 1239-1245.
73. Zamponi M., Petrella R., Mollica P. A. Picosecond pulsed electric fields and promise in neurodegeneration research //Bioelectricity. – 2021. – Т. 3. – №. 3. – С. 176-185.
74. Xiao S. et al. Nanosecond bipolar pulse generators for bioelectrics //Bioelectrochemistry. – 2018. – Т. 123. – С. 77-87.
75. Месяц Г. А., Яландин М. И. Пикосекундная электроника больших мощностей //Успехи физических наук. – 2005. – Т. 175. – №. 3. – С. 225-246.
76. Yin S. et al. Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) treatment for hepatocellular carcinoma: a novel locoregional ablation decreasing lung metastasis //Cancer Letters. – 2014. – Т. 346. – №. 2. – С. 285-291.
77. Robinson V. S. et al. Calculated plasma membrane voltage induced by applying electric pulses using capacitive coupling //Biomedical Physics & Engineering Express. – 2017. – Т. 3. – №. 2. – С. 025016.
78. Balint R., Cassidy N. J., Cartmell S. H. Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering //Tissue Engineering Part B: Reviews. – 2013. – Т. 19. – №. 1. – С. 48-57.
79. Hornef J. et al. Thermal analysis of infrared irradiation-assisted nanosecond-pulsed tumor ablation //Scientific Reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 5122.
80. Garner A. L. Pulsed electric field inactivation of microorganisms: from fundamental biophysics to synergistic treatments //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – Т. 103. – №. 19. – С. 7917-7929.

81. Gao M. et al. A wideband picosecond pulsed electric fields (psPEF) exposure system for the nanoporation of biological cells //Bioelectrochemistry. – 2021. – Т. 140. – С. 107790.
82. Ruan C. et al. Picosecond ultra-wideband short pulse radiated by antenna arrays //Microwave and Optical Technology Letters. – 2007. – Т. 49. – №. 5. – С. 1148-1151.
83. Andreev Y. A. et al. Generation and emission of high-power ultrabroadband picosecond pulses //Journal of communications technology and electronics. – 2011. – Т. 56. – №. 12. – С. 1429-1439.
84. Kumar P. et al. A hyperband antenna to launch and focus fast high-voltage pulses onto biological targets //IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. – 2011. – Т. 59. – №. 4. – С. 1090-1101.
85. Baum C. E. Focal waveform of a prolate-spheroidal impulse-radiating antenna //Radio Science. – 2007. – Т. 42. – №. 06. – С. 1-11.
86. Schoenbach K. H., Xiao S. Nanosecond Pulses and Beyond–Towards Antenna Applications //1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies: Portorož, Slovenia, September 6–10, 2015. – Singapore: Springer Singapore, 2016. – С. 24-27.
87. Xiao S. et al. A reflector antenna for focusing subnanosecond pulses in the near field //IEEE Antennas and wireless Propagation letters. – 2010. – Т. 9. – С. 12-15.
88. Guo F. et al. Simulation study of delivery of subnanosecond pulses to biological tissues with an impulse radiating antenna //Bioelectromagnetics. – 2014. – Т. 35. – №. 2. – С. 145-159.
89. Novac B. M. et al. Generation of intense PEFs using a prolate spheroidal reflector attached to the bipolar former of a 10-GW pulsed power generator //IEEE Transactions on Plasma Science. – 2018. – Т. 46. – №. 10. – С. 3547-3551.
90. Petrella R. A., Schoenbach K. H., Xiao S. A dielectric rod antenna for picosecond pulse stimulation of neurological tissue //IEEE Transactions on Plasma Science. – 2016. – Т. 44. – №. 4. – С. 708-714.

91. Petrella R. A., Schoenbach K. H., Xiao S. A dielectric rod antenna driven by a pulsed power system //IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation. – 2017. – Т. 24. – №. 4. – С. 2157-2163.
92. Xiao S. et al. Development of a High-Power Dielectric Antenna for Delivery of Picosecond Pulses //2018 18th International Symposium on Antenna Technology and Applied Electromagnetics (ANTEM). – IEEE, 2018. – С. 1-3.
93. Xiao S. et al. A High-Power Dielectric Biconical Antenna for Treatment of Subcutaneous Targets //Bioelectromagnetics. – 2020. – Т. 41. – №. 6. – С. 413-424.
94. Porcher A. et al. Changes in gene expression after exposing Arabidopsis thaliana plants to nanosecond high amplitude electromagnetic field pulses //Bioelectromagnetics. – 2024. – Т. 45. – №. 1. – С. 4-15.
95. Xiao S. et al. A subnanosecond electric pulse exposure system for biological cells //Medical & biological engineering & computing. – 2017. – Т. 55. – №. 7. – С. 1063-1072.
96. Huiskamp T. et al. B-dot and D-dot sensors for (sub) nanosecond high-voltage and high-current pulse measurements //IEEE Sensors Journal. – 2016. – Т. 16. – №. 10. – С. 3792-3801.
97. Napotnik T. B. et al. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review //Bioelectrochemistry. – 2016. – Т. 110. – С. 1-12.
98. Napotnik T. B., Polajžer T., Miklavčič D. Cell death due to electroporation–a review //Bioelectrochemistry. – 2021. – Т. 141. – С. 107871.
99. Beebe S. J. et al. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues //DNA and cell biology. – 2003. – Т. 22. – №. 12. – С. 785-796.
100. Schoenbach K. H. et al. Ion transport into cells exposed to monopolar and bipolar nanosecond pulses //Bioelectrochemistry. – 2015. – Т. 103. – С. 44-51.
101. Tolstykh G. P. et al. Nanosecond pulsed electric field induced dose dependent phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate signaling and intracellular

electro-sensitization //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2017. – Т. 1859. – №. 3. – С. 438-445.

102. Semenov I. et al. Cell stimulation and calcium mobilization by picosecond electric pulses //Bioelectrochemistry. – 2015. – Т. 105. – С. 65-71.

103. Bo W. et al. Probing Nanoelectroporation and Resealing of the Cell Membrane by the Entry of Ca2+ and Ba2+ Ions //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Т. 21. – №. 9. – С. 3386.

104. Asadipour K. et al. Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) modulate electron transport in the plasma membrane and the mitochondria //Bioelectrochemistry. – 2024. – Т. 155. – С. 108568.

105. Novac B. M. et al. Demonstration of a novel pulsed electric field technique generating neither conduction currents nor Joule effects //Ieee Transactions on Plasma Science. – 2013. – Т. 42. – №. 1. – С. 216-228.

106. Gulyaev Y. V. et al. Remote decapsulation of nanocomposite liposomal capsules containing gold nanorods by ultrashort electric pulses //Journal of Communications Technology and Electronics. – 2016. – Т. 61. – №. 1. – С. 56-60.

107. Schoenbach K. H., Beebe S. J., Buescher E. S. Intracellular effect of ultrashort electrical pulses //Bioelectromagnetics: Journal of the Bioelectromagnetics Society, The Society for Physical Regulation in Biology and Medicine, The European Bioelectromagnetics Association. – 2001. – Т. 22. – №. 6. – С. 440-448.

108. Chen R. et al. A protective effect after clearance of orthotopic rat hepatocellular carcinoma by nanosecond pulsed electric fields //European journal of cancer. – 2014. – Т. 50. – №. 15. – С. 2705-2713.

109. Guo S. et al. Nano-pulse stimulation induces potent immune responses, eradicating local breast cancer while reducing distant metastases //International journal of cancer. – 2018. – Т. 142. – №. 3. – С. 629-640.

110. Newman J. et al. A dose-response study of nanosecond electric energy pulses on facial skin //Journal of cosmetic and laser therapy. – 2020. – Т. 22. – №. 4-5. – С. 195-199.

111. Katz B. E. et al. Safety and effectiveness of nano-pulse stimulation™ technology to treat acne vulgaris of the back //Journal of Cosmetic Dermatology. – 2023. – Т. 22. – №. 5. – С. 1545-1553.

112. Xie F. et al. Ablation of myocardial tissue with nanosecond pulsed electric fields //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 12. – С. e0144833.

113. Vadlamani R. A. et al. Nanosecond pulsed electric field induced proliferation and differentiation of osteoblasts and myoblasts //Journal of the Royal Society Interface. – 2019. – Т. 16. – №. 155.

114. Вдовин В.А., Гуляев Ю.В., Чантурия В.А., Черепенин В.А. Нетепловое воздействие мощных электромагнитных импульсов на золотосодержащую горную породу //Радиотехника и электроника. – 2005. – Т. 50. – №. 9. – С. 1129-1133.

115. Гуляев Ю. В. и др. Активация нанокомпозитных липосомальных капсул в проводящей водной среде ультракоротким электрическим воздействием //Радиотехника и электроника. – 2021. – Т. 66. – №. 1. – С. 82-90.

116. Вдовин В. А. и др. Влияние мощных электромагнитных импульсов на работу типовых интегральных микросхем //Журнал радиоэлектроники. – 2020. – №. 11. – С. 3-3.

117. В.А. Вдовин, Р.А. Денисов, С.А. Сапецкий, В.А. Черепенин. Особенности экспериментов по воздействию интенсивных ультракоротких электрических импульсов на биоподобные среды. // Журнал радиоэлектроники. – 2024. – №. 9. DOI: 10.30898/1684-1719.2024.9.6 (ВАК, РИНЦ)

118. В.А. Вдовин, Н.Б. Морозова, А.А. Панкратов, С.А. Сапецкий, Р.А. Денисов, Репецкая Л.В., Черепенин В.А. Противоопухолевый эффект in vivo при нетепловом воздействии мощных электромагнитных импульсов. // Биофизика / Biophysics. – 2026. – Т. 71. – №1. – С. 173–190.

119. Вдовин В.А., Плютинская А.Д., Панкратов А.А., Воронцова М.С., Сапецкий С.А., Денисов Р.А., Черепенин В.А. Влияние мощных

электромагнитных импульсов наносекундной длительности на опухолевые клетки в системе in vitro. // Журнал радиоэлектроники. – 2026. – №. 3.

120. R. A. Denisov, V. A. Vdovin, S. A. Sapetskiy and V. A. Cherepenin, Transient Processes Analysis in Experiments on Nanosecond Electric Pulses Exposure on Similar to Biological Media //2024 IEEE 9th All-Russian Microwave Conference (RMC). – IEEE, 2024. – С. 252-255.

121. Р.А. Денисов, В.А. Вдовин, С.А. Сапецкий. Особенности воздействия интенсивными ультракороткими электрическими импульсами на различные варианты нагрузок с биоподобными средами. // Сборник научных статей по материалам VII Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы развития радиотехнических и инфокоммуникационных систем» («Радиоинфоком-2023»), г. Москва, РТУ МИРЭА: сборник научных статей. – М.: МИРЭА – Российский технологический университет, 2023. – с. 193-198.

122. Р.А. Денисов, В.А. Вдовин, С.А. Сапецкий. Применение метода эквивалентных схем для анализа воздействия наносекундными импульсами на биологические среды. // Сборник трудов XXXV Всероссийской школы-семинара «Волновые явления: физика и применения» имени профессора А.П. Сухорукова – 2024 г. – с. 163-165.

123. Gul K., Mumtaz S. Nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) for precision intracellular oncotherapy: recent advances and emerging directions //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – Т. 26. – №. 23. – С. 11268.

124. Semenov I. et al. Resolving nanosecond kinetics of the optical membrane potential in pulsed electric fields //Bioelectrochemistry. – 2025. – С. 109143.

125. Zimmermann U., Neil G. A. The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications //Electromanipulation of cells. – 1996. – Т. 1. – С. 106.

126. Retelj L., Pucihar G., Miklavčič D. Electroporation of intracellular liposomes using nanosecond electric pulses—A theoretical study //IEEE Transactions on Biomedical Engineering. – 2013. – Т. 60. – №. 9. – С. 2624-2635.

127. Yarmush M. L. et al. Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges //Annual review of biomedical engineering. – 2014. – Т. 16. – №. 1. – С. 295-320.

128. Giering K., Lamprecht I., Minet O. Specific heat capacities of human and animal tissues //Laser-Tissue Interaction and Tissue Optics. – 1996. – Т. 2624. – С. 188-197.

129. ГОСТ 33216-2014 «Правила работы с лабораторными грызунами и кроликами» («Стандартинформ», М., 2016).

130. ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организации процедур при работе с лабораторными животными» («Стандартинформ», М., 2016).

131. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях, под ред. Н.Н. Каркищенко и С.В. Грачева («Профиль», М., 2010).

132. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union (2010).

133. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А., Морозова Н.Б., Панкратов А.А., Плютинская А.Д., Феофанов А.В., Чиссов В.И., Зебрев А.И. и Тихомирова А.В. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В сб. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, под ред. А.Н. Миронова и др. («Гриф и К», М., 2012): сс. 657-671.

134. Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К., Амосова Е.Н., Разина Т.Г. и Гольдберг В.Е. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. В сб. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, под ред. Р.У. Хабриева («Медицина», М., 2005), сс. 674-682.

135. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Восьмое издание, пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова и М.С. Красильщиковой («ИРБИС», М., 2017).

136. Vernier P. T., Sun Y., Gundersen M. A. Nanoelectropulse-driven membrane perturbation and small molecule permeabilization //BMC cell biology. – 2006. – Т. 7. – №. 1. – С. 37.

137. Romeo S. et al. Water influx and cell swelling after nanosecond electropermeabilization //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2013. – Т. 1828. – №. 8. – С. 1715-1722.

138. В.А. Черепенин, В.А. Вдовин, Н.Б. Морозова, А.Д. Плютинская, С.А. Сапецкий, Р.А. Денисов. Нетепловое воздействие мощных электромагнитных импульсов на онкологические объекты in vitro и in vivo. // Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки. – 2026. – Т.528. – С. 50–57.

139. Р. А. Денисов, В.А. Вдовин, А.А. Панкратов, А.Д. Плютинская. Оценка выживаемости опухолевых клеток культуры LLC при воздействии наносекундными электрическими импульсами // Сборник трудов XXXVI Всероссийской школы-семинара «Волновые явления: физика и применения» имени профессора А.П. Сухорукова. – 2025. – С. 306-308.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории №201 математических методов в радиофизике и биомедицине ИРЭ им. В.А.Котельникова РАН и за предоставленную возможность проведения исследований с использованием новейших электронных приборов и устройств воздействия. Особую благодарность автор хочет выразить своему научному руководителю Владимиру Алексеевичу Черепенину, а также ведущему научному сотруднику Владимиру Александровичу Вдовину за содействие в разработке и конструкции экспериментальной установки, в проведении опытов по воздействию и в обработке данных, а также за общую поддержку в ходе выполнения научно-исследовательской работы и важные замечания при написании диссертации и её подготовке к защите. Помимо этого, автор благодарит сотрудников филиала ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России (филиал МНИОИ им. П.А. Герцена) Наталью Борисовну Морозову и Анну Дмитриевну Плютинскую за предоставление биологических объектов для экспериментов, а также дополнительную обработку экспериментальных данных биомедицинскими методами; а также сотрудника ИРЭ им. В.А.Котельникова РАН Сергея Александровича Сапецкого за помощь в освоении программного обеспечения для теоретических задач работы. Наконец, автор желает поблагодарить своих родителей, Денисовых Татьяну Борисовну и Андрея Александровича за всеобъемлющую моральную поддержку как в ходе всего обучения, проведения научных исследований и процесса написания кандидатской диссертации, так и по жизни.