

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОСКОПИИ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СУБКЛЕТОЧНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ

© 2025 г. И. В. Маркова^{а, *}, А. В. Рябова^{а, b},
Д. В. Поминова^{а, b}, И. Д. Романишкин^b, К. Г. Линьков^b

^аНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^bИнститут общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: 12.inessa.markova@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

В работе проведено исследование закономерностей лазерного нагрева наночастиц оксида железа в зависимости от их размеров, формы и агрегации на субклеточном уровне. Измерение температуры проводилось с помощью флуоресцентной термометрии с временным разрешением на основе красителя родамина С. Полученные температуры оказались выше 100°C, что создает благоприятные условия для инициации программируемой клеточной гибели опухолевых клеток при лазерной гипертермии.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, флуоресцентная термометрия, субклеточное зондирование, лазерная гипертермия

DOI: 10.56304/S2079562925010130

ВВЕДЕНИЕ

Фототермическая терапия представляет собой терапевтический метод индуцированного повышения температуры выше 43°C за счет доставки тепловой энергии к опухолевым клеткам [1]. Длительная тканевая гипертермия может приводить к апоптозу ткани-мишени, а при температуре выше 50°C – к денатурации белка и некрозу опухоли. Степень повреждения тканей и происходящая гибель клеток зависят от температуры, достигнутой в обрабатываемой ткани, и продолжительности времени, в течение которого эта температура поддерживалась.

Температура является ключевым параметром для регуляции клеточной функции, а ферментативные и биохимические реакции внутри клетки, в свою очередь, влияют на внутриклеточную температуру [2, 3]. Измерение температуры на тканевом уровне может быть полезно для диагностики онкологических и инфекционных заболеваний, воспалений и злокачественной гипертермии, поскольку эти заболевания вызывают повышенную теплопродукцию [4–7].

Люминесцентная термометрия привлекла большое внимание благодаря своей способности обеспечивать измерение температуры с высоким пространственным, временным и тепловым разрешением [8]. Этот метод является наи-

более перспективным для зондирования изменений локальной температуры в живых клетках с целью мониторинга термогенеза и изучения клеточной активности. На сегодняшний день в термометрии используются такие параметры люминесценции, как интенсивность флуоресценции, отношение интенсивностей флуоресценции (включая отношение интенсивности излучения на двух полосах возбуждения), положение спектральных линий, ширина полосы пропускания, время жизни затухания и анизотропия [9].

Люминесцентная термометрия основана на материалах, обладающих флуоресцентными свойствами, зависящими от температуры, что может быть использовано для дистанционного и высокочувствительного теплового считывания [10]. В настоящее время были обнаружены различные термочувствительные люминесцентные материалы, в том числе флуоресцентные белки, небольшие органические красители, нанокластеры металлов, полимерные наночастицы (НЧ), комплексы лантаноидов, квантовые точки и наногибриды [11–15].

В нашем исследовании ратиометрическое зондирование проводилось с использованием времени жизни родамина С (Rhodamine B, RhB). Для родаминовых красителей вращение диэтиламинной части зависит от температуры [8]. С повышением температуры безызлучательная релаксация от внутримолекулярного вращения увеличива-

Таблица 1. НЧ, исследуемые в работе

№	Форма	Размер магнитного ядра, нм	Фазовый состав
1	Сферы	6 ± 2	Fe_2O_3
2	Сферы-кластеры	35 ± 7	Fe_3O_4
3	Кубы	15 ± 4	Fe_3O_4
4	Кубы	37 ± 6	Fe_3O_4
5	Наностержни (Феринжект)	20 ± 5 нм (длина) 6 ± 1 нм (диаметр)	Карбоксимальтоза железа

Таблица 2. Характеристики водных коллоидов биосовместимых МНЧ с БХ, используемые в работе

Образец	Концентрация ядер частиц, мг/мл	Средний диаметр, нм	Индекс полидисперсности PDI	Концентрация БХ, мг/мл
МНЧ-ЧСА-ПЭГ	10.96	37.28 ± 0.11	0.22 ± 0.002	—
МНЧ-ЧСА-ПЭГ-БХ	2.35	59.01 ± 0.13	0.23 ± 0.01	1.22

ется, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции и времени жизни. Ратиометрический подход обычно предполагает добавление второго флуоресцентного зонда, интенсивность излучения которого не изменяется в зависимости от температуры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для регистрации изменения температуры магнитных НЧ (МНЧ) использовали НЧ с разными размерами магнитного ядра и разным содержанием оксида железа в них (табл. 1). Также использовали фармацевтический препарат Феринжект (Ferinject, Vifor Pharma, Швейцария). В качестве флуоресцентного сенсора температуры использовали родамин С (ГНЦ “НИОПИК”, Россия).

Кроме этого, для *in vitro* экспериментов в дальнейшем использовали биосовместимые МНЧ, покрытые человеческим сывороточным альбумином (ЧСА), нагруженные 13'-аминобутилкарбамоильным производным метилового эфира бактериохлорина (БХ). Наночастицы были синтезированы в НИТУ “МИСиС”. Синтез ядер МНЧ был проведен по протоколу [16]. Покрытие МНЧ-ЧСА ПЭГ осуществляли действием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (Sigma-Aldrich) и N-гидроксисукцинимид (Sigma-Aldrich) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Полученный МНЧ-ЧСА-ПЭГ отделяли от избытка ПЭГ гель-фильтрацией в ФСБ с использованием колонки NAP-10 (Sepadex G25, GE Healthcare Bio-Sciences). Синтез БХ проводили по методике [17], а иммобилизацию БХ на МНЧ-ЧСА-ПЭГ проводили по методике [18].

Загрузка БХ, измеренная по поглощению БХ, составила около 50 wt % относительно массы ядер наночастиц оксида железа. Для оценки размера и

формы МНЧ-ЧСА-ПЭГ-БХ использовали просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) высокого разрешения и динамическое светорассеяние (табл. 2). Магнитные ядра МНЧ показали почти монодисперсное распределение со средним размером 6.2 нм. Гидродинамический размер МНЧ-ЧСА-ПЭГ и МНЧ-ЧСА-ПЭГ-БХ составил порядка 37 и 60 нм, соответственно.

Измерения динамического рассеяния света проводились на серии Zetasizer Nano (Malvern, Великобритания). ПЭМ-анализ проводился с использованием микроскопа JEM-1400 (JEOL, Токио, Япония), 120 кВ. Коллоиды НЧ (10 мкл с $[\text{Fe}] = 0.1$ мг/мл) наносили на поверхность медной сетки, покрытой формваром, с последующим испарением растворителя. Анализ распределения размеров ядра проводился с использованием программного обеспечения ImageJ для 500 отдельных НЧ.

“Горячие точки”, индуцированные лазерным сканированием после инкубации с МНЧ, были изучены на культуре клеток HeLa. Клетки выращивали в среде DMEM (Gibco, Пейсли, Великобритания) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, BioSera, Nuaille, Франция), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США), 2 mM глутамина (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) и 1 mM пирувата натрия (Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂). Клетки субкультивировали каждые три дня. Для конфокальной микроскопии клетки высевали в чашку Петри со стеклянным дном POC-R2 (PeCon GmbH, Эрбах, Германия) с плотностью $100 \cdot 10^3$ клеток/см² за день до эксперимента. Через двадцать четыре часа за 30 мин до микроскопического исследования к клеткам добавляли НЧ в концентрации 10 мг/л по массе железа и RhB в концентрации 1 мкМ. Перед

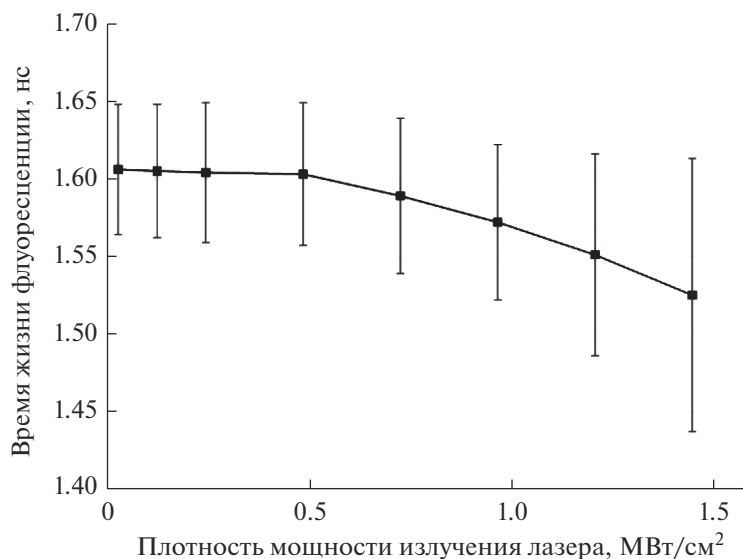


Рис. 1. График зависимости времени жизни флуоресценции RhB от плотности мощности излучения возбуждающего лазера 840 нм.

микроскопическим исследованием клетки трижды промывали предварительно нагретым фосфатно-солевым буфером.

Спектрально разрешенные флуоресцентные изображения регистрировались с помощью лазерного сканирующего конфокального инвертированного микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss AG, Германия), при двухфотонном возбуждении с длиной волны 840 нм фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (Coherent, США), с шириной импульса 140 фс, частотой повторения 80 МГц. Регистрация времени жизни флуоресценции проводилась модулем FLIM (Becker & Hickl GmbH, Германия), прикрепленным к LSM-710-NLO, состоящим из системы для счета одиночных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) SPC-150, гибридного фотодетектора GaAsP HPM-100-07 и программного обеспечения SPCM. Обработка время-разрешенных флуоресцентных изображений производилась с использованием программного обеспечения SPCImage 8.0 (Becker & Hickl GmbH, Германия).

При исследовании нагрева НЧ использовался диапазон плотностей мощности излучения возбуждающего излучения от 0.30 до 1.80 МВт/см² с шагом 0.15 МВт/см². Термостат на предметном стекле микроскопа (ReCon GmbH, Эрбах, Германия) использовался для калибровки определения температуры в клетках по времени жизни флуоресценции RhB. Время жизни RhB в клетках регистрировали при температуре 20–60°C с интервалом 5°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для качественной работы сенсорной системы необходимо было подобрать концентрацию RhB с моноэкспоненциальным характером затухания флуоресценции. К немоноэкспоненциальному виду приводят высокая концентрация красителя, агрегация, наличие примесей или релаксация растворителя. Раствор RhB с концентрацией 0.01 мг/мл обладал достаточным уровнем сигнала флуоресценции с моноэкспоненциальным характером затухания флуоресценции. Для данного раствора плотность мощности излучения возбуждающего лазера в 1.44 МВт/см² являлась предельной для используемого детектора одиночных фотонов. Как представлено на рис. 1, лазерное возбуждение само приводило к небольшому нагреву RhB при плотности мощности возбуждения более 0.48 МВт/см².

При нагреве термостатом время жизни флуоресценции раствора RhB в зависимости от температуры окружающей среды при плотности мощности возбуждения 0.24 МВт/см² представляет собой линейную зависимость с коэффициентом детерминации 0.986 (рис. 2).

Установив зависимость времени жизни флуоресценции RhB от температуры, готовили коллоиды НЧ с концентрацией 0.1 мг/л с RhB и сканировали их лазером 840 нм при плотностях мощности до 1.44 МВт/см². По изменению времени жизни флуоресценции RhB определяли интенсивность нагрева таких коллоидов. Практически для всех коллоидов исследованных НЧ наблюдался лишь незначительный нагрев окружающей водной среды не более чем на 10°C.

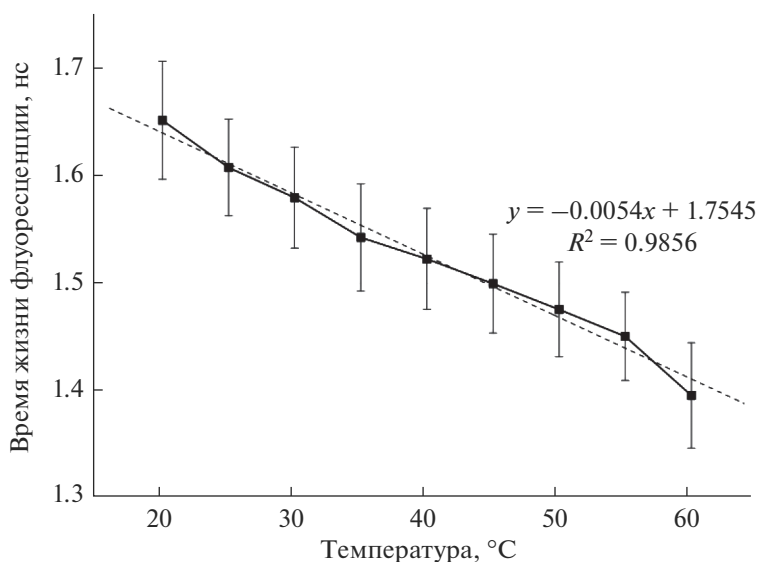


Рис. 2. Зависимость времени жизни флуоресценции RhB от температуры среды.

Далее клетки HeLa, накопившие НЧ, сканировали лазером с длиной волны 840 нм при плотности мощности 0.48 МВт/см^2 при комнатной температуре и записывали флуоресцентные изображения с разрешением по времени. В объеме клеток наблюдались участки цитоплазмы (при изображении в проходящем свете эти области содержали везикулы), которые демонстрировали укороченное время жизни флуоресценции RhB.

Характерное время жизни RhB, связанного с митохондриями, колебалось от $2.5 \pm 0.1 \text{ нс}$ (20°C) до $2.2 \pm 0.1 \text{ нс}$ (60°C) и по величине было больше, чем в водном растворе. Это может объясняться тем, что вязкость митохондрий на два порядка выше, чем у воды. В эксперименте на клетках RhB связывался с мембраной митохондрий, а НЧ захватывались лизосомами, следовательно, термометр и ансамбли НЧ были разнесены в пространстве, и поверхность НЧ не должна была влиять на время жизни флуоресценции RhB.

При аппроксимации температурной зависимости времени жизни флуоресценции RhB внутри клеток прямой линией расчетная температура “горячих точек” с НЧ превышает 100°C и достигает $120\text{--}140^\circ\text{C}$ (рис. 3). Оцененная температура локальных “горячих точек” для клеток, накопивших МНЧ@БХ, МНЧ (Сферы (Fe_2O_3) 6 нм @ЧСА-ПЭГ) и, особенно, БХ, оказалась еще выше: порядка 200°C для МНЧ@БХ и МНЧ и 290°C для БХ. Возможно, это связано с более высоким уровнем клеточного захвата НЧ, покрытых ЧСА, а в случае с БХ — его высоким коэффициентом экстинкции и степенью агрегации в лизосомах (для двухфотонного возбуждения при использовании лазера 840 нм, а также для однофотонного погло-

щения длинноволновым плечом агрегатов в БИК-области).

Таким образом, температура “горячих точек” также увеличивается с увеличением размера НЧ: наносферы Fe_2O_3 6 нм — $(122.6 \pm 48.5)^\circ\text{C}$, нанокубы Fe_3O_4 15 нм — $(129.3 \pm 55.4)^\circ\text{C}$, нанокубы Fe_3O_4 37 нм — $(133.8 \pm 68.5)^\circ\text{C}$, наносферы-кластеры Fe_3O_4 35 нм — $(139.3 \pm 59.4)^\circ\text{C}$. Однако для железокарбоксимальтозных стержней, 20 нм, с ядрами $\text{Fe}(\text{OH})_3$, температура “горячих точек” достигает $(119.0 \pm 46.0)^\circ\text{C}$. Такая неопределенность значений температуры обусловлена изменением времени жизни флуоресценции в “горячих точках”.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы было проведено исследование лазерного нагрева наночастиц оксида железа (Fe_2O_3 и Fe_3O_4) в зависимости от их размеров, формы и агрегации на субклеточном уровне. Для экспериментальной оценки температуры наночастиц использовалась флуоресцентная термометрия с использованием родамина С по его времени жизни флуоресценции.

Было выявлено, что в исследованных водных коллоидах наночастиц оксида железа нагрев не превышал 10°C . При помещении наночастиц в среду с высокой теплопроводностью (например, воду) происходит эффективный теплообмен со средой, и температура нагрева ансамбля не достигает высоких значений.

Наряду с этим, во время захвата наночастиц в клетках при лазерном нагреве вокруг скопления наночастиц могут возникать “горячие точки” с тем-

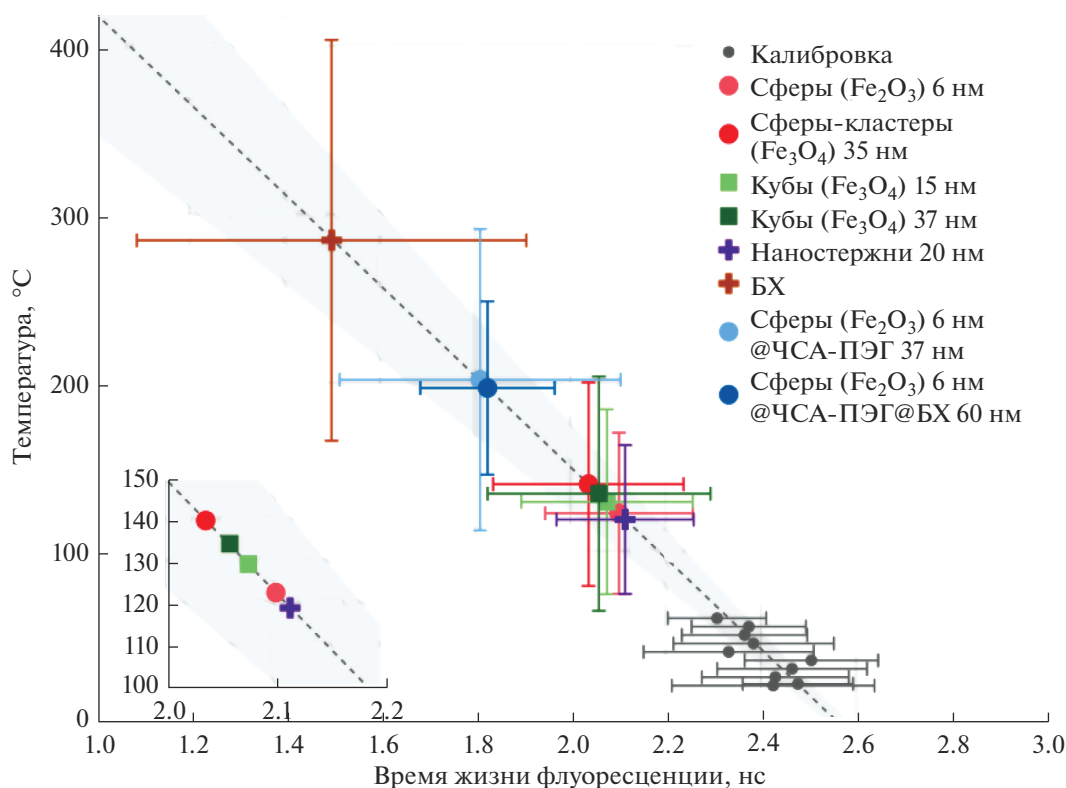


Рис. 3. Распределение времен жизни флуоресценции RhV внутри клеток при термостатном нагреве (серые точки) и аппроксимация температурной зависимостью для “горячих точек” в клетках с МНЧ, БХ и МНЧ@БХ. Пунктирная линия и заштрихованная область соответствуют зависимости температуры от времени жизни флуоресценции с доверительным интервалом 95%.

температурой более 100°C. Их распределение определяет тепловой отклик всего биологического образца. Такие высокие температуры, достигаемые внутри клеток в зоне лизосом, могут приводить к быстрому некрозу или, в случае несильных повреждений при меньших плотностях мощности к смешанным типам программируемой клеточной гибели: лизосом-зависимой (вследствие повреждения лизосом), апоптозу (за счет образования активных форм кислорода) и некроптозу (в результате разрушения белков из-за повышения температуры). Это может быть перспективно для противоопухолевой терапии.

По итогам экспериментов *in vitro* наночастицы нагревались эффективнее в сериях: сферические, кубы, стержнеобразные. Также установлено, что крупные наночастицы одинаковой формы нагреваются лучше мелких, а покрытие наночастиц фотосенсибилизатором улучшает эффективность их нагрева.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 21-52-12030 NNIO_а и государственного задания на фундаментальные научные

исследования для государственных академий наук “Физические методы в медицине, сельском хозяйстве и экологии” (“Жизнь”), FFWF-2023-0005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Schupper A.J., Chanenchuk T., Racanelli A., et al. // *Neuro-Oncology*. 2022. V. 24 (S6). P. S42.
2. Knapp B.D., Huang K.C. // *Annu. Rev. Biophys.* 2022. V. 51. P. 499.
3. Jóhannsson F., Yurkovich J.T., Guðmundsson S., et al. // *Metabolites*. 2024. V. 14 (2). P. 91.
4. Shao Q., Lundgren M., Lynch J., et al. // *Sci. Rep.* 2023. V. 13. P. 7727.
5. Mehrabanian K., Abbas Nejad A. // *Int. J. Therm. Sci.* 2023. V. 194. P. 108593.
6. Los B., Preußner M., Eschke K., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2022. V. 50 (12). P. 6769.
7. Singh P.K., Stan R.C. // *Int. Immunopharmacol.* 2024. V. 129. P. 111690.
8. Li S., Li Y., Zhang S., et al. // *Anal. Methods*. 2024. V. 16 (14). P. 1968.
9. Zhou J., del Rosal B., Jaque D., et al. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. P. 967.
10. Bradac C., Lim S.F., Chang H.-C., et al. // *Adv. Opt. Mater.* 2020. V. 8 (15). P. 2000183.

11. *Rodriguez-Sevilla P., Spicer G., Sagrera A., et al.* // *Adv. Opt. Mater.* 2023. V. 11 (11). P. 2201664
12. *Sun Y., Fu M., Bian M., et al.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120 (1). P. 7.
13. *Đačanić Far L., Dramićanin M.D.* // *Nanomaterials.* 2023. V. 13 (21). P. 2904.
14. *Tsai P.-C., Epperla C.P., Huang J.-S., et al.* // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017. V. 56 (11). P. 3025.
15. *Qiu X., Zhou Q., Zhu X., et al.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 4.
16. *Semkina A., Abakumov M., Grinenko N., et al.* // *Colloids Surf. B.* 2015. V. 136. P. 1073.
17. *Grin M.A., Reshetnikov R.I., Yakubovskaya R.I., et al.* // *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 2014. V. 18. P. 129.
18. *Ostroverkhov P.V., Semkina A.S., Naumenko V.A., et al.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2019. V. 537. P. 132.

Application of the Time-Resolved Microscopy to the Investigation of Subcellular Hyperthermia

I. V. Markova^{1, *}, A. V. Ryabova^{1, 2}, D. V. Pominova^{1, 2}, I. D. Romanishkin², and K. G. Linkov²

¹ *National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia*

² *Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: 12.inessa.markova@gmail.com*

Received June 17, 2024; revised June 17, 2024; accepted June 18, 2024

Abstract—In this paper, the regularities of laser heating of iron oxide nanoparticles depending on their size, shape, and aggregation at the subcellular level were investigated. The temperature was measured using time-resolved fluorescence thermometry based on rhodamine B dye. The obtained temperature estimates are over 100°C, which creates favorable conditions for initiation of programmed cell death of tumor cells at laser hyperthermia.

Keywords: iron oxide nanoparticles, fluorescent thermometry, subcellular sensing, laser hyperthermia