



A.M. PROKHOROV

GENERAL PHYSICS INSTITUTE

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES



Исследование механизмов гибели клеток с наночастицами оксида железа в ответ на лазерное воздействие

А.В. Рябова, **Д.В. Поминова**, И.В. Маркова, И.Д. Романишкин, А.А. Никитин, П.В. Островерхов, Е.А. Плотникова,
Н.Б. Морозова, М.А. Абакумов, А.А. Панкратов, Р.В. Штайнер, В.Б. Лощенов

1 - Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences

2 - National research nuclear university МЕРФИ

3 - National University of Science and Technology "MISIS"

4 - Hertsen Moscow Oncology Research Institute



NATIONAL RESEARCH
NUCLEAR UNIVERSITY МЕРФИ
Moscow Engineering Physics Institute

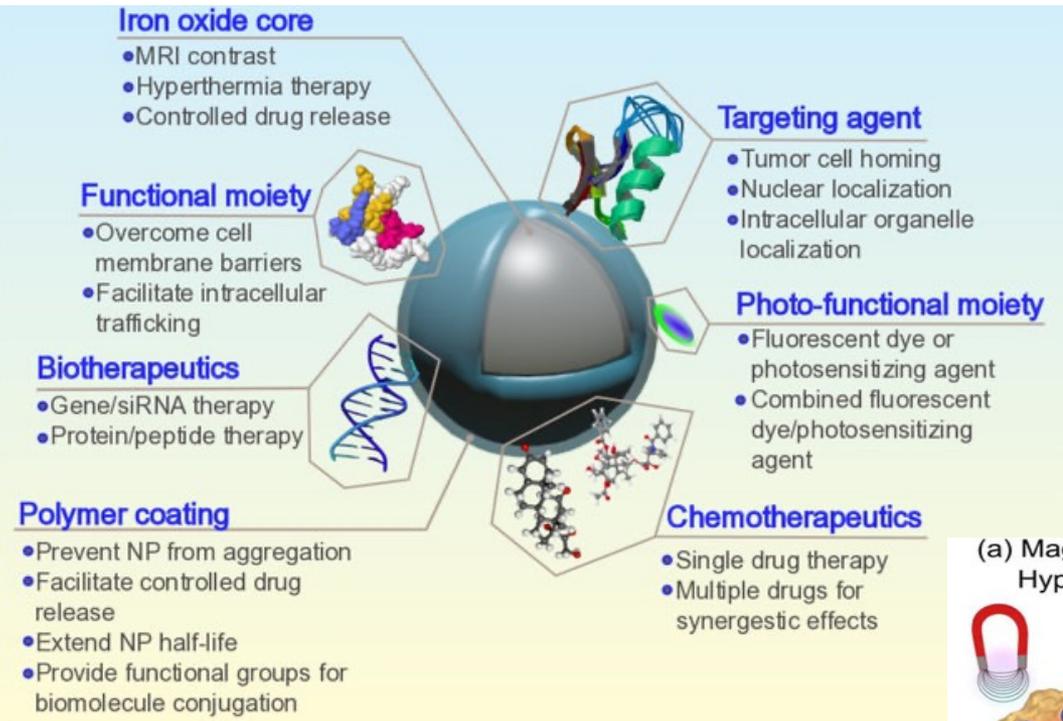


nastya.ryabova@gmail.com

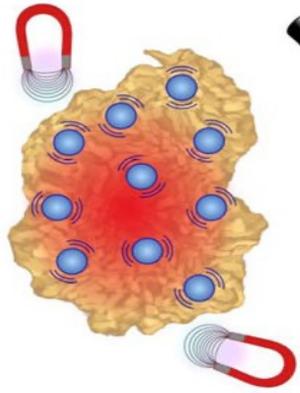
17 октября 2023, Санкт-Петербург, Россия

Введение

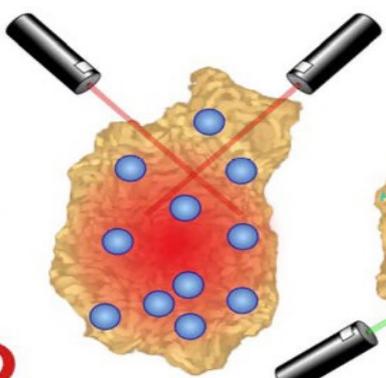
- Наночастицы оксида железа (IONPs) с магнитными свойствами перспективны, поскольку их можно использовать в качестве контрастных агентов для МРТ, можно покрывать фотосенсибилизатором для фотодинамической терапии и нагревать лазером или магнитом для гипертермической терапии.



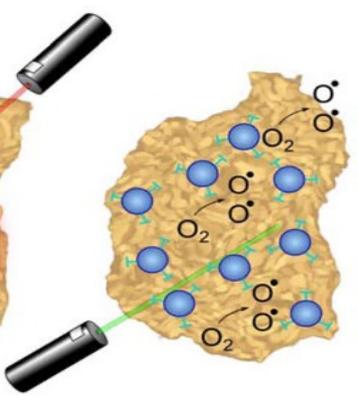
(a) Magnetic Hyperthermia



(b) Photothermal Therapy



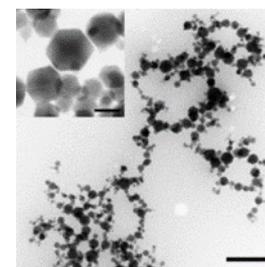
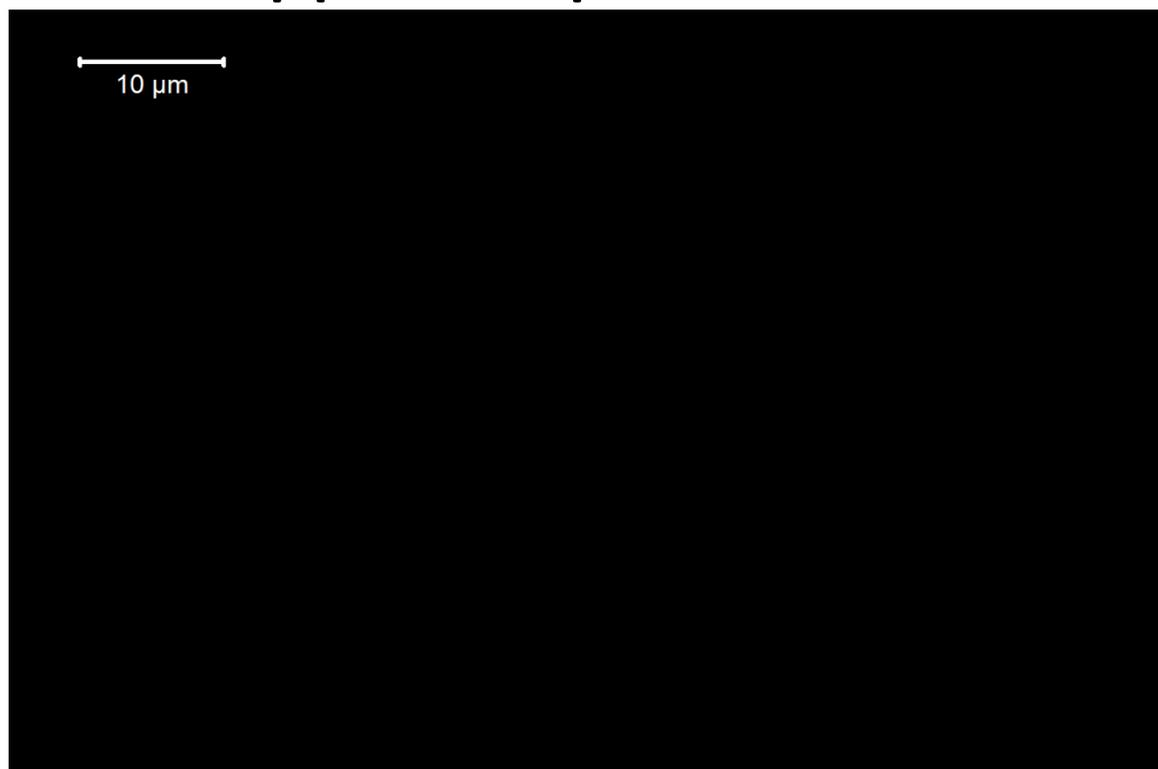
(c) Photodynamic Therapy



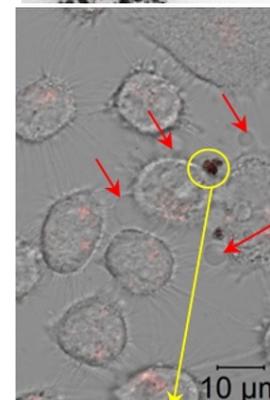
Введение

- Фототермическое преобразование IONPs показывает умеренную эффективность и более широкое оптическое поглощение, чем металлические аналоги.
- Данное исследование ИIONPs было сосредоточено на фотофизических аспектах формирования «горячих точек» под воздействием лазерного облучения.

Эффект “искрения” IONPs



20÷70 нм



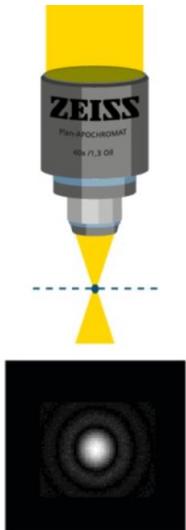
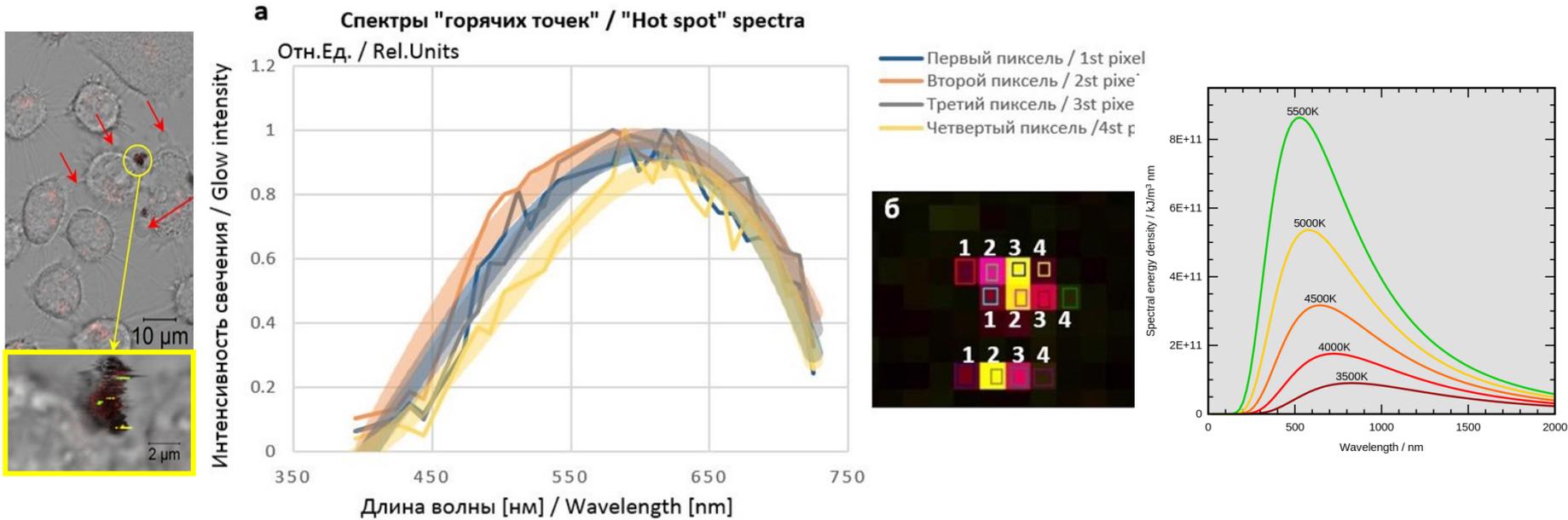
HeLa клетки NPs Fe₂O₃ (NanoArc® AlfaAesar®)

Лазерная сканирующая микроскопия с λ 561 нм.

Внутри агрегатов НЧ наблюдаются яркие вспышки – «горячие точки».

После возникновения вспышек наблюдается нарушение в плазматической мембране клетки.

Экспериментальная оценка нагрева НЧ для анализа возможного теплового воздействия на биологические ткани



Scanning was carried out with laser 800 nm 2P 690÷1040 nm.

The laser power at the exit from the lens was determined using a LabMax-TO laser power meter (Coherent, USA).

The intensity distribution of the scanning laser spot is calculated from considerations of the size of the area limited by the first order diffraction ring for the point distribution function PSF_{III} (or Airy disk), with and 800 nm, radius r :

$$r = \frac{0.61\lambda_{exc}}{NA}, (3)$$

where NA is the numerical aperture of the microscope objective, λ_{exc} is the wavelength of the exciting light.

For a 800 nm laser, 63x oil lens with $NA=1.4$, $r = 349$ nm,

Spot area $S = 0.38 \mu\text{m}^2$, measured power density at the exit from the lens = 1 mW,

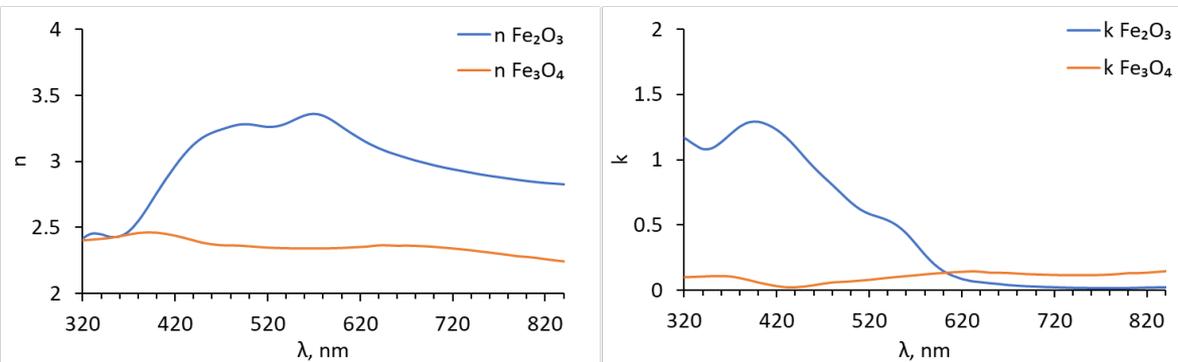
Scanning power density $\rho = 0.262 \text{ MW/cm}^2$

Scanning speed 1.62 $\mu\text{s/pixel}$

Radiation dose for a single scan = 0.42 J/cm^2

Экспериментальное моделирование

- Для моделирования «горячих точек» использовался метод конечных разностей во временной области, в частности его реализация в COMSOL Multiphysics.
- Использовалась пошаговая процедура, включающая расчет сечений поглощения и рассеяния (σ_{abs} и σ_{sca}), усиления ЭМ поля вблизи поверхности НЧ и изменения температуры при резонансном возбуждении НЧ ЭМ волной.
- Моделирование проводилось для отдельных кубических и сферических НЧ Fe_2O_3 и Fe_3O_4 , а также для ансамблей НЧ.



Зависимость показателя преломления n и коэффициента экстинкции k от длины волны. <https://refractiveindex.info>.

	k [W/m·K]	ρ [kg/m ³]	c_p [J/Mol·K]
Fe_2O_3	7	5240	104
Fe_3O_4	5.9	5170	104
water	0.6	1028	4182
cells	0.4	1028	4182
cell membrane	0.2	997	30

Параметры материалов, использованных при моделировании, k – теплопроводность, ρ – плотность, c_p – удельная теплоемкость.

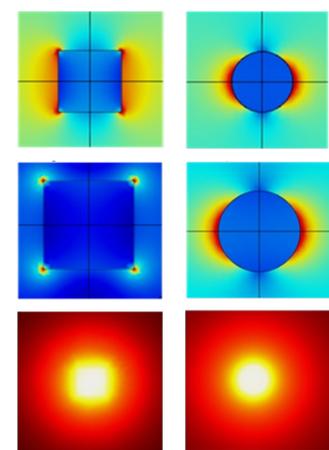
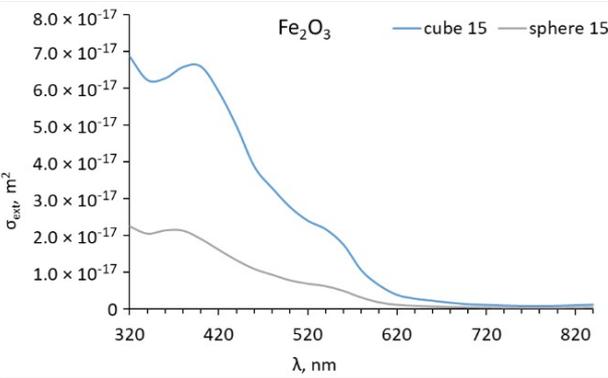
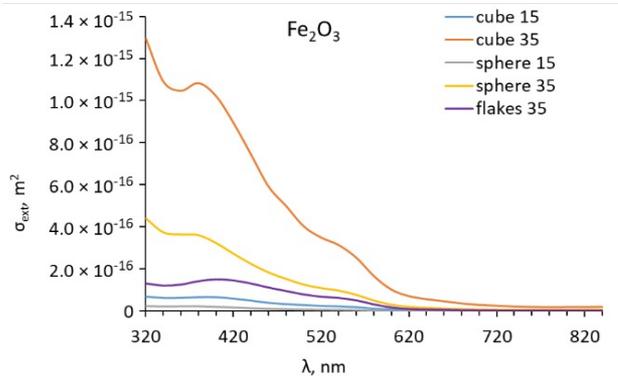
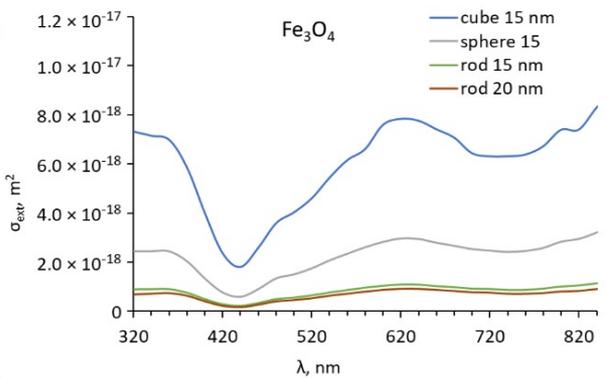
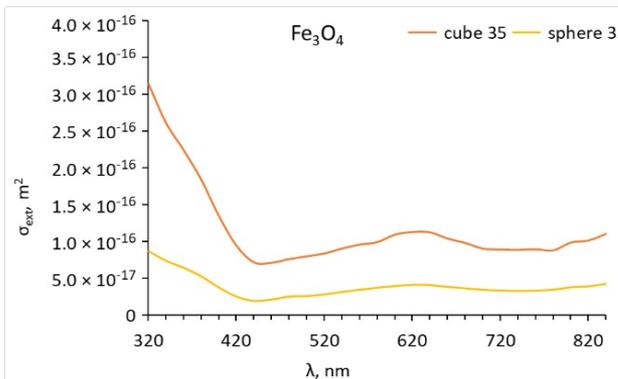
Расчет пространственного распределения ЭМ поля и локального усиления поля между частицами проводился для длин волн 420 нм (двухфотонное возбуждение) и 840 нм (одnofотонное возбуждение).

Интенсивность светового луча была оценена как 0.24 МВт/см², что соответствует мощности лазера, использованной в экспериментах (1% мощности лазера).

Время воздействия ЭМ-излучения на частицы принималось равным 1.7 мкс (время регистрации одного пикселя).

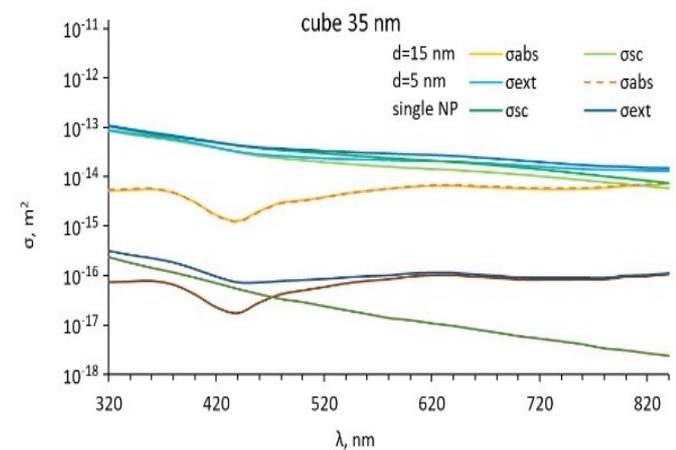
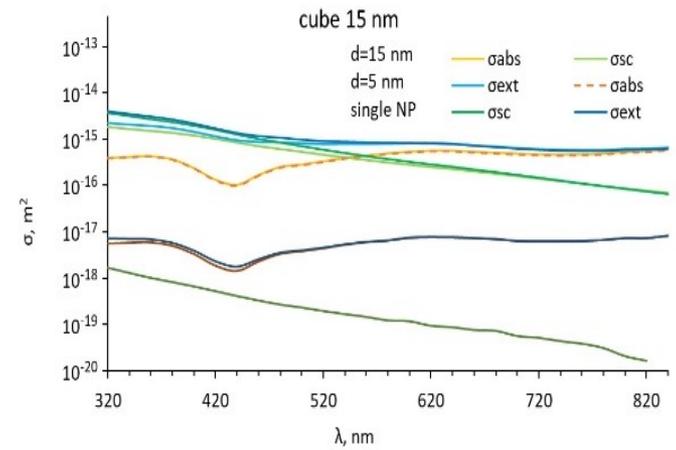
В качестве окружающей диэлектрической среды в модели использовалась вода или клеточная мембрана.

Моделирование: сечения экстинкции, поглощения и рассеяния



Карты распределения нормированного электрического поля (E/E_0)

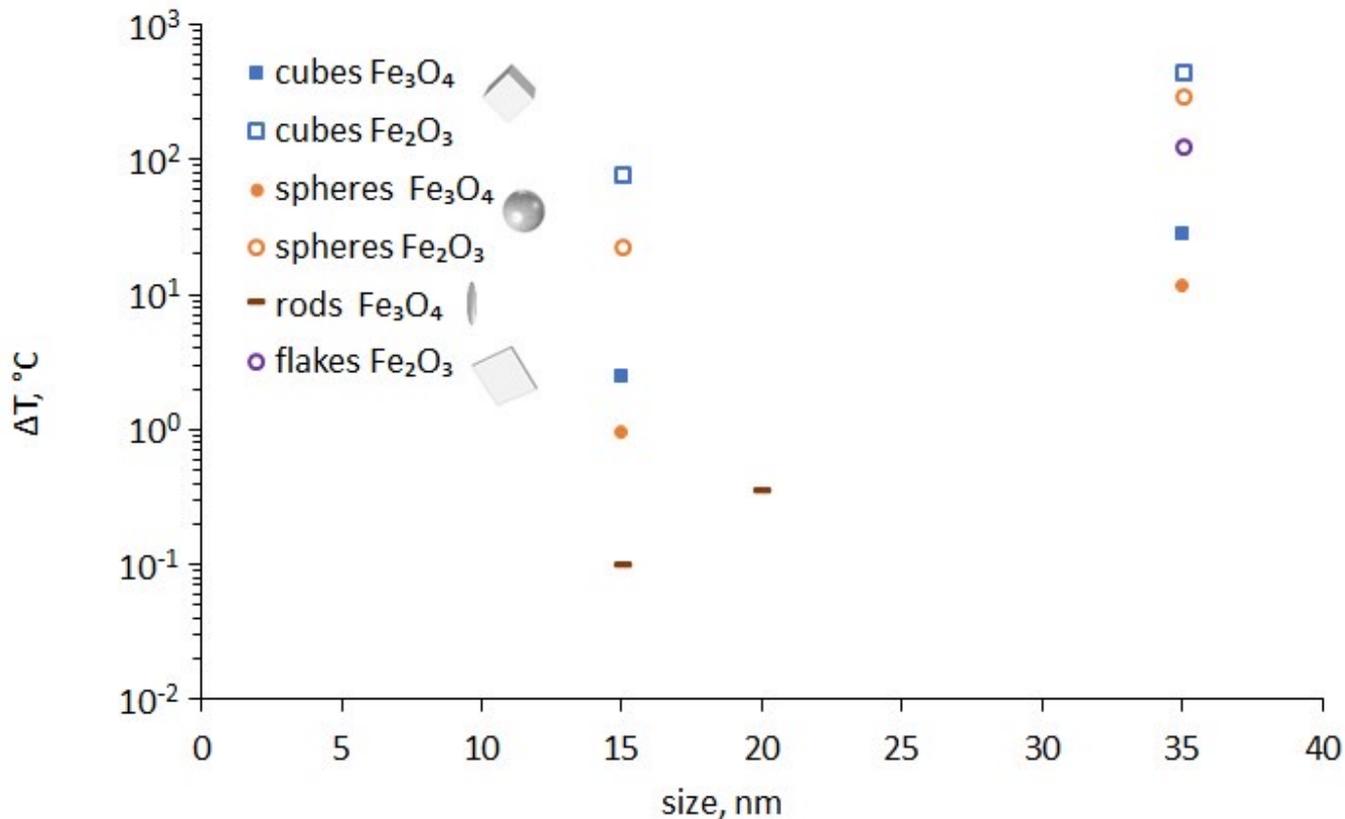
Одиночные Fe_3O_4 и Fe_2O_3 НЧ различных форм и размеров



Одиночные НЧ и ансамбли из $5 \times 5 \times 3$ НЧ, расстояние между НЧ $d = 5$ и 15 nm

Моделирование: температура нагрева одиночных НЧ

Энергия, поглощенная IONPs преобразуется в тепло, таким образом, НЧ является источником нагрева, который выделяет тепло в окружающую среду. Задавалась область взаимодействия с ЭМ волной (поверхность IONPs и окружающая среда), считалось, что система находится при комнатной температуре. Мощность, поглощаемая НЧ, оценивалась как интегральная мощность, рассеиваемая в объеме (т.е. общие потери системы) на основе рассчитанных ЭМ-полей.



Зависимость температуры нагрева от размера, формы и материала НЧ для длины волны 420 нм в воде 0.25 МВт/см², время облучения 1 μs.

Температура нагрева увеличивается с увеличением размера наночастиц.

Нагрев выше у кубических НЧ, что, вероятно, связано с большим усилением поля.

Более высокая температура нагрева НЧ Fe₂O₃ обусловлена более высоким сечением поглощения на длине волны 420 нм.

В то же время практически не наблюдается нагрева НЧ Fe₂O₃ на длине волны 840 нм, где сечение поглощения существенно ниже, чем у Fe₃O₄ НЧ.

Моделирование: температура нагрева одиночных НЧ и ансамблей

В зависимости от формы НЧ наблюдается существенное изменение пространственного распределения поля вблизи поверхности НЧ.

Для кубических НЧ наблюдается ЭМ поле высокой интенсивности, локализованное в областях нанометрового размера вблизи вершин куба.

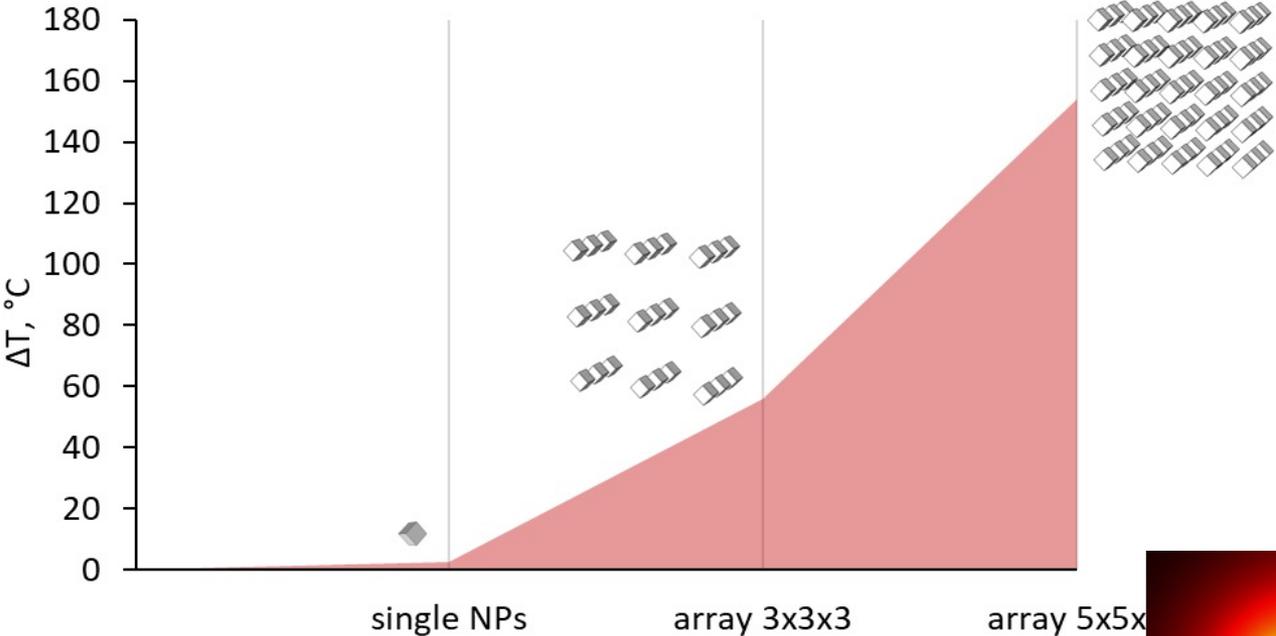
Температурное поле равномерно распределено в объеме вблизи НЧ.

Локальное усиление поля и повышение температуры относительно окружающей среды на 420 и 840 нм

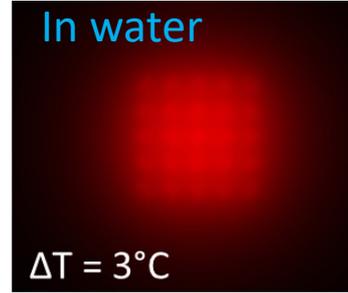
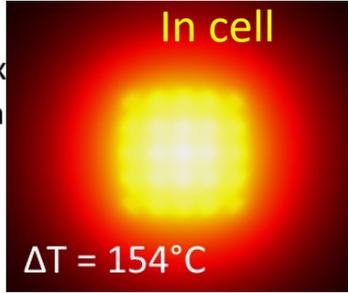
NPs		$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$ E/E_0 $	$\Delta T, ^\circ\text{C}$	$ E/E_0 $
		$\lambda = 420 \text{ nm}$		$\lambda = 840 \text{ nm}$	
Fe₃O₄					
cubes 15 nm	single NP	2.5	1.4	5.6	1.2
	array 3 × 3 × 3	55.9	1.5	127.0	1.3
	array 5 × 5 × 3	154.0	1.7	355.0	1.5
cubes 35 nm	single NP	28.8	1.8	66.7	1.2
spheres 15 nm	single NP	1.0	2.2	2.3	1.8
spheres 35 nm	single NP	11.8	2.0	26.7	1.8
rods 15 nm	single NP (along x)	0.0	1.6	0.1	1.5
	single NP (along y)	0.1	2.3	0.2	1.5
	single NP (along z)	0.0	1.6	0.1	2.2
rods 20 nm	single NPs (along x)	0.1	1.6	0.3	1.5
	single NP (along y)	0.4	2.5	0.8	1.7
	single NP (along z)	0.1	1.6	0.3	1.6
Fe₂O₃					
cubes 15 nm	single NP	76.8	1.6	0.8	1.4
cubes 35 nm	single NP	450.0	3.1	9.5	1.7
spheres 15 nm	single NP	22.6	2.9	0.3	2.1
spheres 35 nm	single NP	292.0	2.6	3.3	2.1
flakes 35 nm	single NP	124.0	2.3	1.2	1.7

Моделирование: температура нагрева одиночных НЧ и ансамблей

Нагрев без теплоотводной среды для кубических НЧ размером 15 нм



Локальный нагрев НЧ Fe_3O_4 в ансамбле достигает значительных температур, относительное изменение температуры около 154 °C для ансамбля НЧ Fe_3O_4 5 × 5 × 3 с расстоянием между НЧ 15 нм.



Температурные карты в течении нагрева ансамбля НЧ Fe_3O_4 5 × 5 × 3, d = 15 нм в клеточной мембране и в воде.

При помещении НЧ в среду с более высокой теплопроводностью происходит эффективный теплообмен со средой, в результате чего происходит рассеивание тепла, и температура нагрева ансамбля не достигает высоких значений.

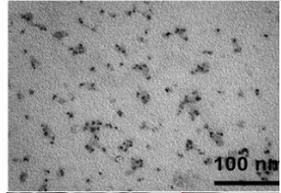
Синтез IONPs

Для экспериментального исследования температуры нагрева коллоидов IONPs мы использовали IONPs в виде сфер, сферических кластеров, кубов, стержней и октоподов с различными размерами и различным химическим составом. Помимо синтезированных нами в МИСиС, в работе были использованы два типа коммерчески доступных IONPs: γ -Fe₂O₃ NanoArc® (Alfa Aesar, Германия) и фармацевтический препарат Ferinject® (Vifor Pharma, Швейцария).

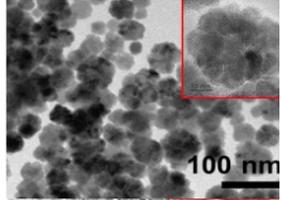


*Алексей Никитин
Петр Островерхов
Максим Абакумов*

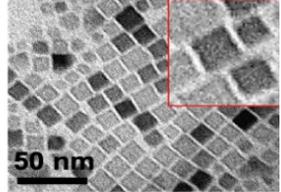
Spheres 6 nm
6 ± 2 nm
Fe₂O₃
1 Hydrodynamic diameter of clusters 37.28 ± 0.11 nm, average number of magnetic cores in a cluster 4 ± 2



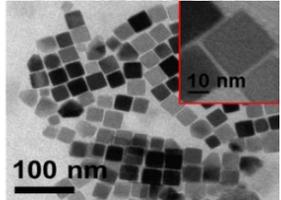
Sphere-clusters 35 nm
35 ± 7 nm
Fe₃O₄



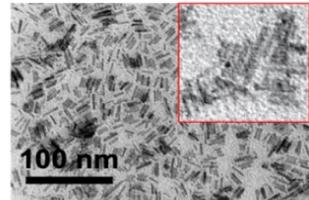
Cube 15 nm
15 ± 4 nm
Fe₃O₄



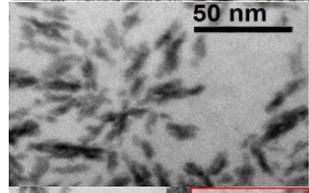
Cube 37 nm
37 ± 6 nm
Fe₃O₄



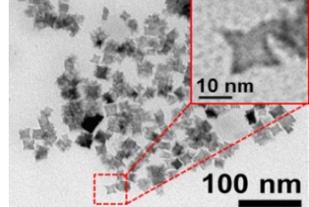
Rods 14 nm
14 ± 4 nm (length),
3 ± 1 nm (diameter)
β-FeOOH



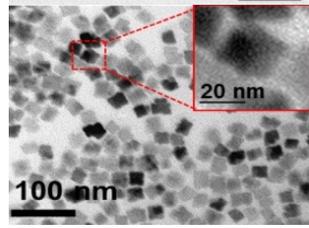
Rods 20 nm
20 ± 5 nm (length)
6 ± 1 nm (diameter)
iron carboxymaltose



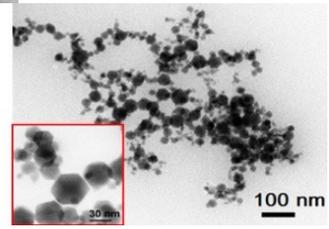
Octopodes 14 nm
14 ± 2 nm
Fe₃O₄



Octopodes 31 nm
31 ± 4 nm
CoFe₂O₄



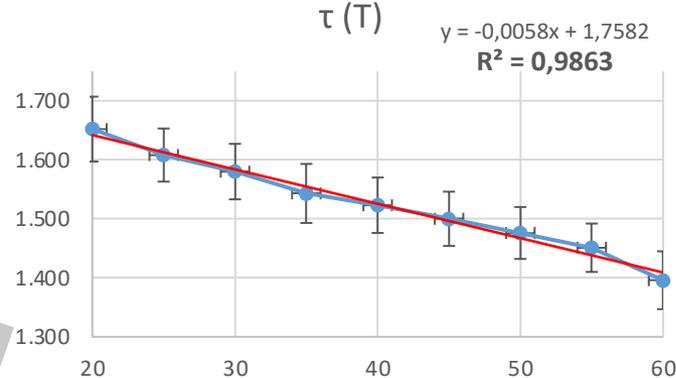
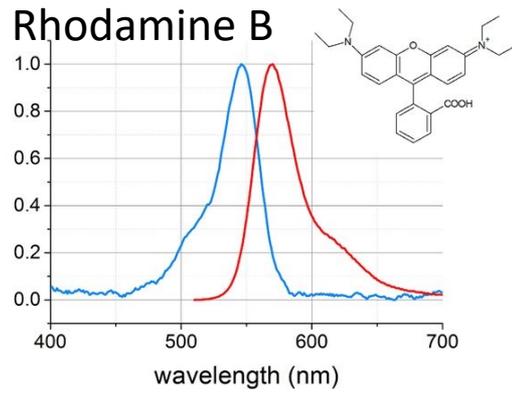
Hexagons 50 nm
50 ± 25 nm
γ-Fe₂O₃



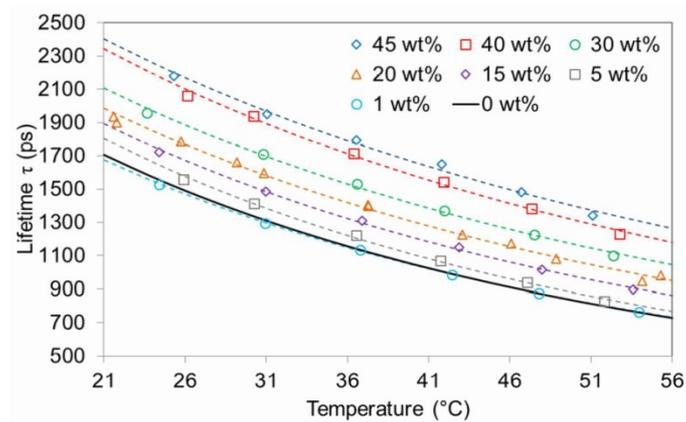
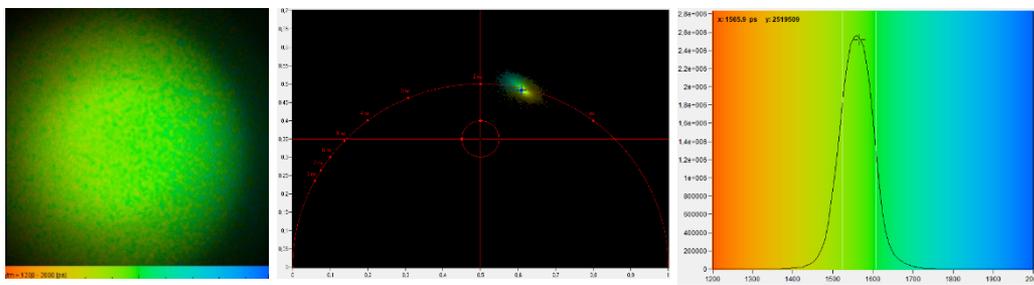
Измерение температуры флуоресцентной термометрией

Для оценки температуры нагрева было измерено зависящее от температуры время жизни флуоресценции родамина С (RhB). Изображения флуоресценции записывали с помощью инвертированного лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss). Время жизни флуоресценции RhB регистрировали с помощью модуля FLIM (Becker & Hickl) при двухфотонном возбуждении с длиной волны 840 нм фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (Coherent), длительность импульса 140 фс, 80 МГц.

Для калибровки температурной зависимости времени жизни флуоресценции раствора RhB использовали термостат в столике микроскопа (PeCon GmbH, Германия).



Зависимость времени жизни флуоресценции RhB от температуры в воде



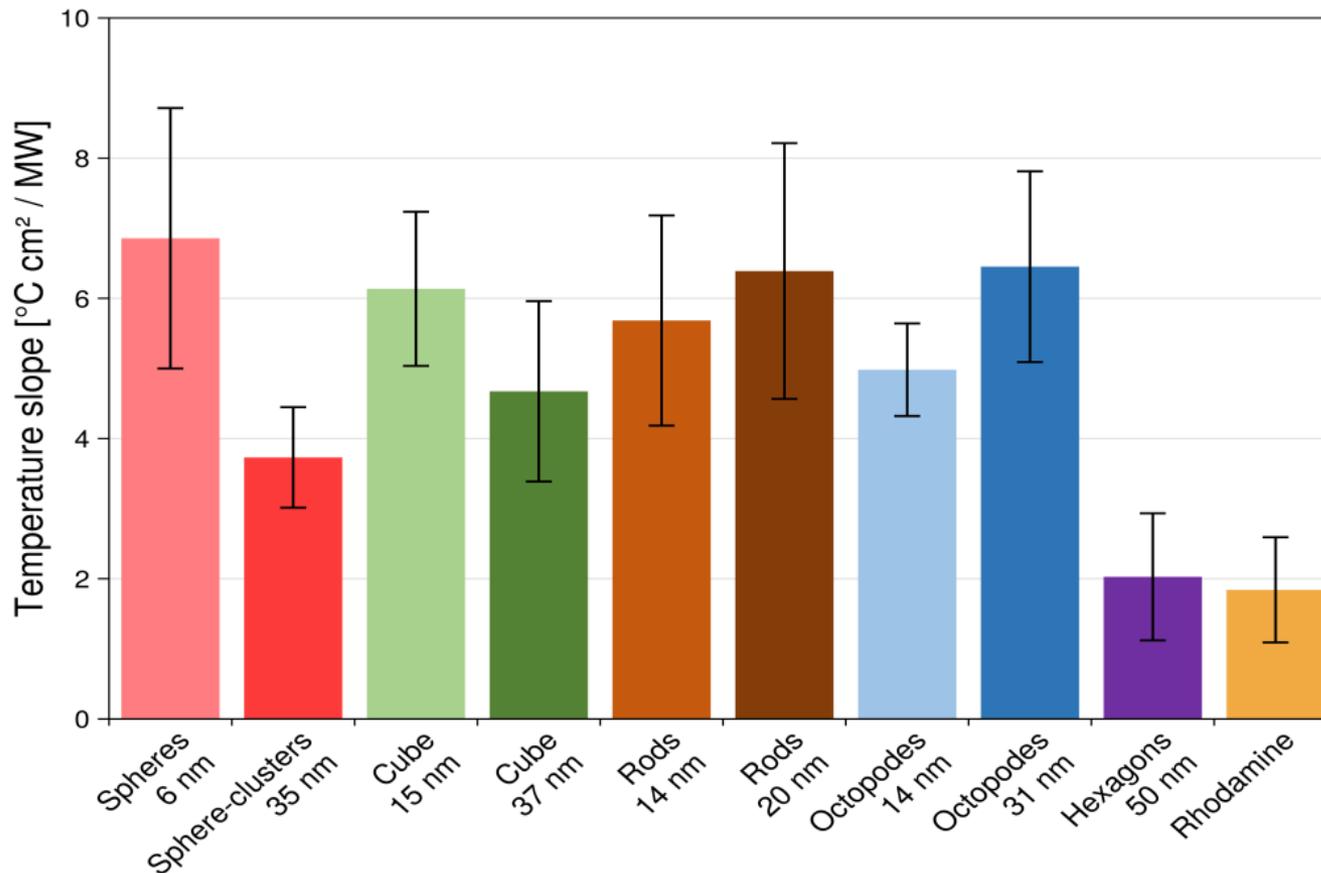
Среднее время жизни флуоресценции RhB в зависимости от температуры при различных концентрациях глюкозы *

*Mercadé-Prieto R. et al (2017). **Fluorescence lifetime of Rhodamine B in aqueous solutions of polysaccharides and proteins as a function of viscosity and temperature.** Photochemical & photobiological sciences. 16(11), 1727–1734.
<https://doi.org/10.1039/c7pp00330g>

Нагрев водных коллоидов IONPs

При исследовании нагрева НЧ использовался диапазон плотностей мощности возбуждающего лазерного излучения от 0.30 до 1.80 МВт/см² с интервалом 0.15 мВт/см².

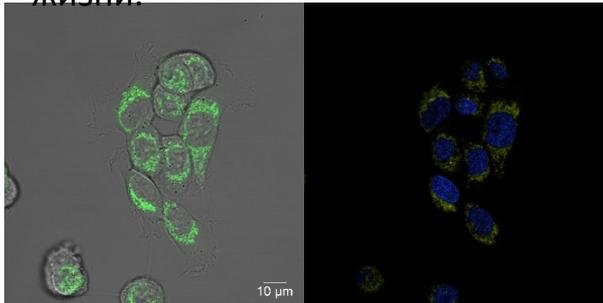
- Практически для всех коллоидов наблюдался незначительный нагрев окружающей водной среды не более чем на 10 °С.



Зависимости относительной температуры нагрева коллоидов НЧ [0.1 мг/л] импульсным лазером с длиной волны 840 нм, 1.8 МВт/см².

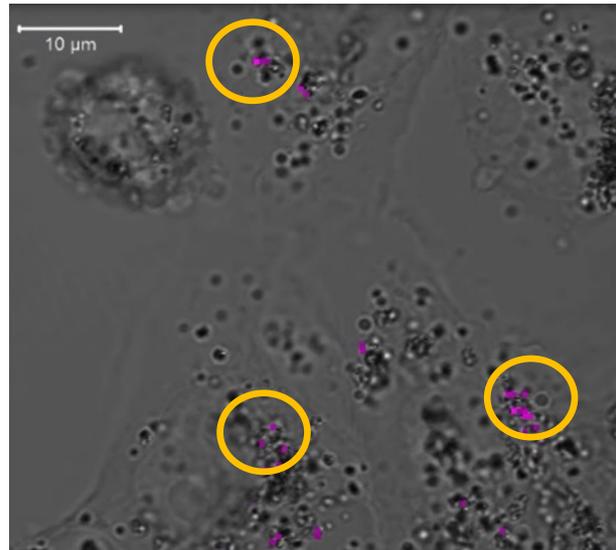
Измерение температуры IONPs “горячих точек” на клетках *in vivo*

- Культура клеток HeLa
- IONPs в концентрации 10 мг/л за 2 часа и 1 μM RhB за 30 минут до исследования были добавлены в питательную среду
- Для калибровки использовали термостат на предметном столике микроскопа (PeCon, Германия). Клетки с RhB регистрировали при температуре 20–60°C с интервалом 5°C.
- Сканировали лазером 840 нм, 0.48 МВт/см² и регистрировали FLIM изображения. Области цитоплазмы, содержащие везикулы, демонстрировали сокращенное время жизни флуоресценции RhB. Для анализа этих областей из изображения FLIM с помощью векторной диаграммы были извлечены пиксели с коротким временем жизни.

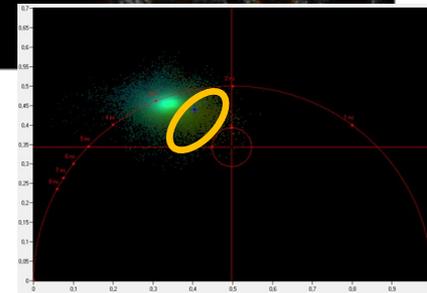
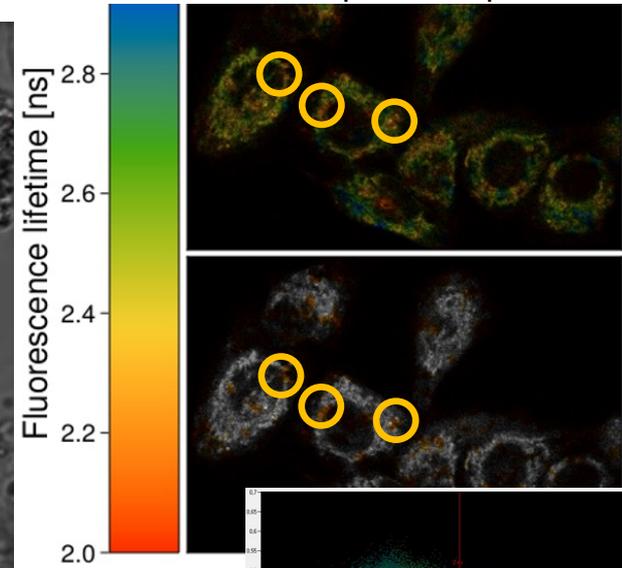


HeLa, кубические IONPs, 10 нм, RhB – флуоресцентное изображение

Спектрально-разрешенное флуоресцентное изображение при 2P возбуждении 840 нм



FLIM of RhB (510-590). Выбор «горячих точек» в клетках установлен по времени жизни флуоресценции RhB (цветные пиксели).

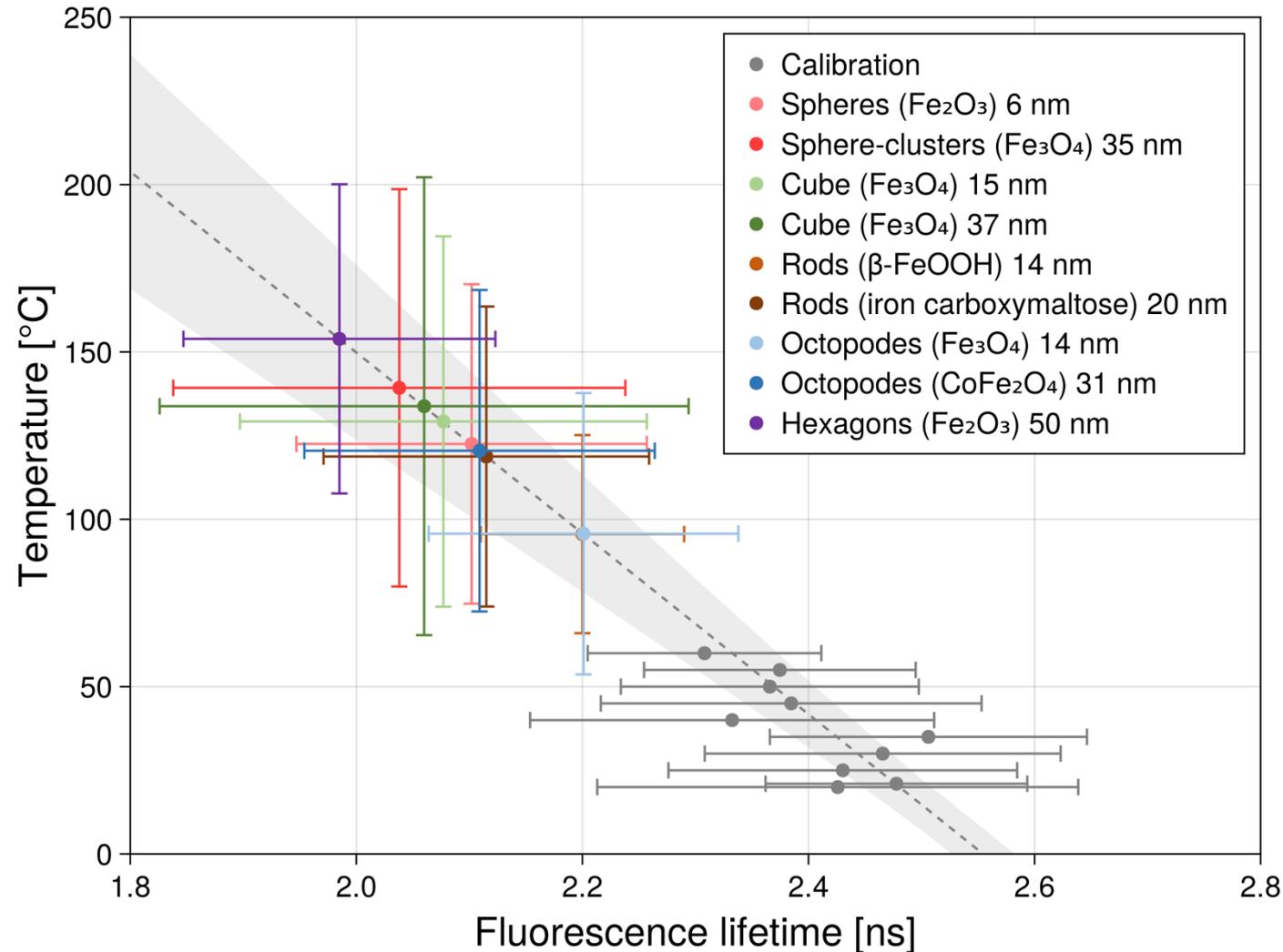


* RhB связывается с митохондриальной мембраной, а IONPs накапливаются в лизосомах; следовательно, термометр и область нагрева разделены в пространстве, с другой стороны, поверхность НЧ и кислая pH лизосом не влияет на время жизни флуоресценции чувствительного к pH и вязкости RhB.

Измерение температуры IONPs “горячих точек” на клетках *in vivo*

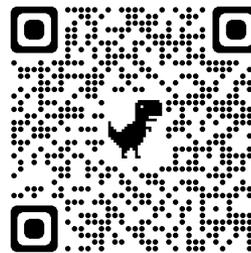
Результаты

- В эксперименте на клетках IONPs эффективнее нагревались в ряду: гексагоны/сферы/кубические/, стержни/октаподы.
- Крупные НЧ нагреваются лучше, чем мелкие, той же формы.
- Fe_2O_3 лучше греется чем Fe_3O_4 .
- Возможно, неполное соблюдение закономерностей, полученных в результате моделирования, связано с различным клеточным поглощением НЧ, которое мы не изучали в данной работе.



Распределение времен жизни флуоресценции RhV внутри клеток при термостатном нагреве (серые точки) и аппроксимация температурной зависимостью для «горячих точек» в клетках с IONPs. Пунктирная линия и заштрихованная область соответствуют зависимости температуры от времени жизни с доверительным интервалом 95%.

Спасибо за внимание!



Результаты моделирования

Закономерности лазерного нагрева IONPs:

- (1) большие НЧ греются лучше, чем маленькие;
- (2) ансамбли НЧ греются лучше, чем одиночные НЧ;
- (3) Fe_2O_3 греется лучше чем Fe_3O_4 ;
- (4) эффективность нагрева растет в ряду стержни/хлопушки/сферы/кубы.

При помещении ИОНЧ в среду с более высокой теплопроводностью (воду) происходит эффективный теплообмен со средой, приводящий к отводу тепла.

Результаты измерений *in vivo*

Внутри клетки IONPs накапливаются в лизосомах — липидных мешочках с меньшей теплопроводностью.

При лазерном облучении скопления IONPs в везикулах возникают «горячие точки» с температурой выше 100 °С.

Температура «горячих точек» определяет клеточный ответ: разрушения лизосом и запуск программируемой клеточной смерти

- В эксперименте на клетках IONPs грели эффективнее в ряду:
- (1) гексагоны/сферы/кубы/стержни/октаподы;
 - (2) большие НЧ греются лучше, чем малые;
 - (3) Fe_2O_3 греется лучше чем Fe_3O_4 .

Возможно, неполное соблюдение закономерностей, полученных в результате моделирования, и эксперимента связано с различным клеточным поглощением НЧ, которое мы не изучали в данной работе.

21-52-12030 NNIO_a