

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ЗАТУХАНИЯ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ НАНОКРИСТАЛЛОВ ФТАЛОЦИАНИНА АЛЮМИНИЯ ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ

Ф.Г. Быстров¹, В.И. Макаров², Д.В. Поминова², А.В. Рябова^{1,2}, В.Б. Лощенов^{1,2}

¹Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ, Москва, Россия

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, Россия

Резюме

Работа посвящена исследованию кинетики фотолюминесценции коллоидных растворов молекулярных нанокристаллов фталоцианина алюминия при различных pH и при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками (макрофагами). Изучение кинетики проводилось при помощи системы регистрации, основанной на стрик-камере с пикосекундным разрешением (до 15 пс) C10627-13 Hamamatsu Photonics, сопряженной с волоконно-оптическим спектрометром, при пикосекундном лазерном возбуждении. В ходе эксперимента было зафиксировано изменение кинетики затухания флуоресценции, выраженное в появлении дополнительных компонент времени жизни флуоресценции. Количество компонент и длительность времени жизни изменялись при взаимодействии с клетками и в зависимости от pH. Так, при pH 2 было зафиксировано наличие двух времён жизни флуоресценции: 5 нс, что соответствует молекулярной форме в растворе, и 1,5 нс, что соответствует связанному состоянию молекулы фталоцианина. Так как кроме наночастиц в растворе других возможных объектов связывания нет, то, с большой степенью достоверности, можно предположить, что связывание происходит именно с наночастицами. Исследование времени жизни флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в макрофагах показало наличие двух компонент порядка 9 нс и 4,5 нс. Была предложена модель перехода поверхностных молекул фталоцианина алюминия из пара- в орто-положение относительно поверхности кристаллической наночастицы.

Ключевые слова: фталоцианин алюминия, фотолюминесценция, наночастицы, иммунокомпетентные клетки.

Для цитирования: Быстров Ф.Г., Макаров В.И., Поминова Д.В., Рябова А.В., Лощенов В.Б. Исследование кинетики затухания фотолюминесценции молекулярных нанокристаллов фталоцианина алюминия при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 1. – С. 3–8.

Контакты: Быстров Ф.Г., e-mail: augustbystrov@gmail.com

ANALYSIS OF PHOTOLUMINESCENCE DECAY KINETICS OF ALUMINUM PHTHALOCYANINE NANOPARTICLES INTERACTING WITH IMMUNE CELLS

Bystrov F.G.¹, Makarov V.I.², Pominova D.V.², Ryabova A.V.^{1,2}, Loschenov V.B.^{1,2}

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

²General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract

This work is dedicated to the study of the photoluminescence kinetics of aluminum phthalocyanine nanoparticles in colloidal solutions at different pH and in the interaction with immune cells (macrophages). For measurements we used a registration system based on Hamamatsu streak camera (C10627-13 Hamamatsu Photonics) with picosecond temporal resolution (15 ps), conjugated with the fiber-optic spectrometer and picosecond laser pumping. The changes in fluorescence decay kinetics as additional lifetime components of fluorescence were found during the experiment. The number of components and duration of lifetimes changed while interacting with cells and depends on pH. At pH 2 the presence of two fluorescence lifetimes was recorded: the first one was 5 ns, which corresponded to the molecular form in solution, and 1.5 ns, which corresponded to bound state of phthalocyanine molecules. Due to the absence of other possible objects for bounding in the solution except of the nanoparticles we can suggest with a high degree of accuracy that the bounding occurs with the very these nanoparticles. Analysis of the fluorescence lifetimes of aluminum phthalocyanine nanoparticles in macrophages indicated the presence of two components: 9 ns and 4.5 ns. A model of surface molecules transitions from parallel to perpendicular position, regarding to the plane of the crystal nanoparticle was proposed.

Keywords: aluminum phthalocyanine, photoluminescence, nanoparticles, immune cells.

For citations: Bystrov F.G., Makarov V.I., Pominova D.V., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Analysis of photoluminescence decay kinetics of aluminum phthalocyanine nanoparticles interacting with immune cells, *Biomedical Photonics*, 2016, T. 5, No. 1, pp. 3–8 (in Russian).

Contacts: Bystrov F.G., e-mail: augustbystrov@gmail.com

Введение

Использование кристаллических наночастиц органических фотосенсибилизаторов для флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ), например, наночастиц фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс), имеет ряд преимуществ по сравнению с молекулярными фотосенсибилизаторами. Таким фотосенсибилизатором является наноформа фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс). Находясь в водном коллоиде, НЧ-АІРс не флуоресцируют и фотодинамически не активны, но при попадании в организм под воздействием некоторого биологического окружения начинают проявлять флуоресцентные свойства. Так, в организме после аппликации НЧ-АІРс возникновение интенсивной флуоресценции и фотодинамической активности происходит преимущественно в патологически измененной ткани, при этом в здоровых тканях этот эффект значительно слабее. В работе [1] исследовалось применение НЧ-АІРс для оценки риска отторжения аутотрансплантатов кожи. Было установлено, что при аппликации коллоидного раствора НЧ-АІРс под аутотрансплантаты происходит увеличение интенсивности флуоресценции при воспалительном отторжении. В работе [2] оценивалась возможность приме-

нения НЧ-АІРс для ФД и ФДТ заболеваний суставов. После лазерного воздействия в области исследования наблюдался отчетливый фотобликинг, который отсутствует при использовании молекулярной формы данного фотосенсибилизатора.

Материал и методы

Для исследования кинетики фотолюминесценции НЧ-АІРс нами был разработан измерительный комплекс (рис. 1), основанный на стрик-камере с пикосекундным временным разрешением (15 пс) Hamamatsu C10627-13, сопряженной с волоконно-оптическим спектрометром. Для возбуждения использовали полупроводниковый лазер Hamamatsu с длительностью импульса 67 пс и с длиной волны 637 нм. В процессе измерений использовали метод время-коррелированного счета единичных фотонов [3, 4].

На рис. 2 представлен принцип работы электронно-оптического преобразователя. Фотолюминесценция, возбужденная в образце лазерным источником, собирается в оптическое волокно и далее попадает в монохроматор. Излучение, прошедшее монохроматор, формирует на фотокатод изображении, которое

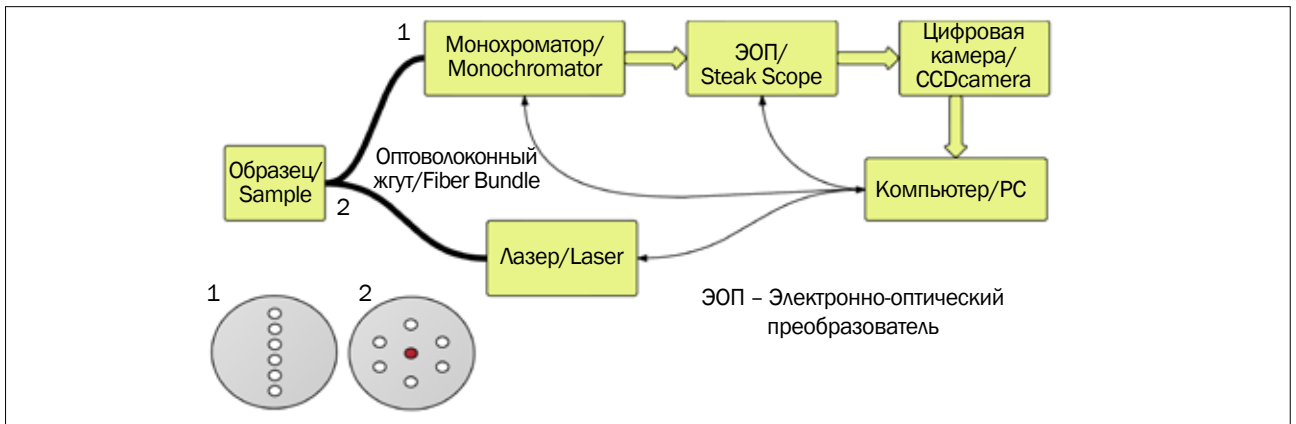


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 – выходной конец оптоволоконного жгута, 2 – дистальный конец оптоволоконного жгута

Fig. 1. Scheme of the experimental facility: 1 – outlet end of fiber bundle, 2 – distal end of fiber bundle

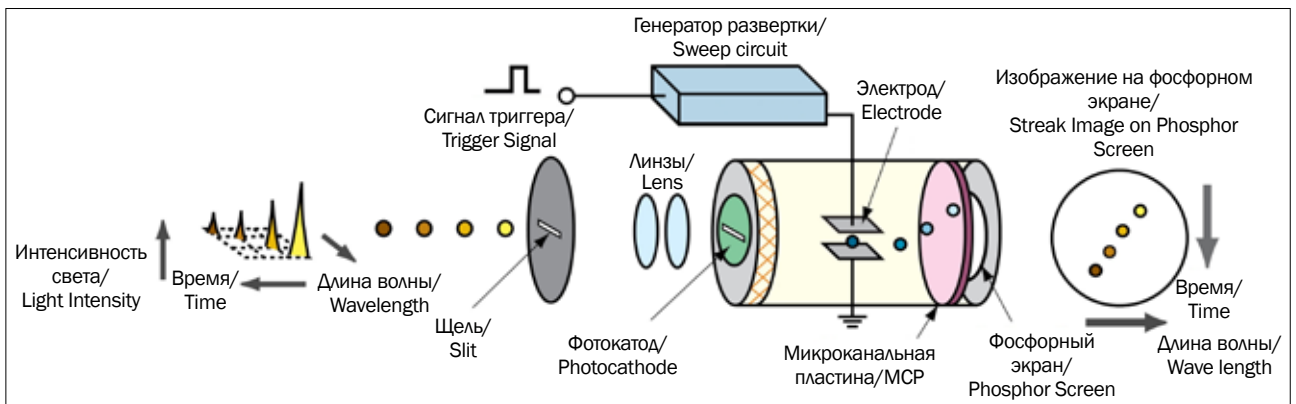


Рис. 2. Принцип работы электронно-оптического преобразователя

Fig. 2. Operating principle of electro-optical converter

конвертируется в электронный сигнал. Внутри электронно-оптического преобразователя параллельно оптической оси на электроны действует ускоряющее поле, которое заставляет их двигаться от фотокатода к фосфорному экрану. В процессе движения к экранам прикладывается переменное поле, перпендикулярное направлению их движения, осуществляющее развертку по времени. После развертки электроны попадают на микроканальную пластину, после чего сигнал регистрируется CCD камерой и передается на компьютер, где происходит математическая обработка полученного спектра тушения флуоресценции с целью получения информации о времени жизни флуоресценции и о распределении числа фотонов зарегистрированных стрик-камерой между компонентами времени жизни.

На подготовительном этапе работ были проведены исследования по изучению зависимости интенсивности коэффициента поглощения и флуоресценции коллоида наночастиц фталоцианина алюминия от pH. Полученные зависимости спектров поглощения и флуоресценции коллоида наночастиц фталоцианина алюминия от pH представлены на рис. 3 и рис. 4, соответственно. Измерение спектров поглощения проводилось на компьютеризированном спектрофотометре Hitachi U-3400. Для измерения спектров флуоресценции использовали лазерный спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК.

Из спектров флуоресценции, приведенных на рис. 4, видно, что интенсивность флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в коллоиде зависит от pH. Так, наиболее интенсивная флуо-

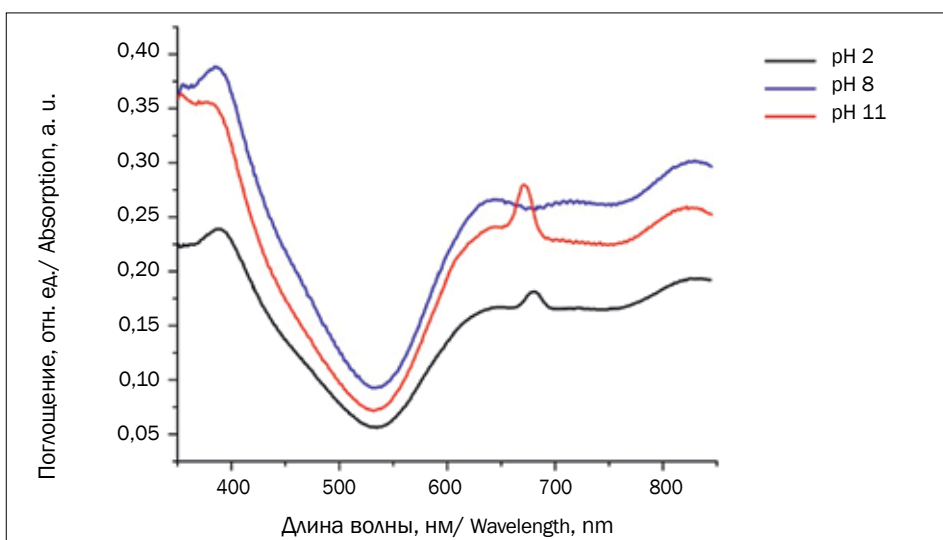


Рис. 3. Спектр поглощения НЧ-А1Рс в коллоиде в зависимости от pH
Fig. 3. Absorption spectrum of NP-A1Pc in colloidal solution depending on pH

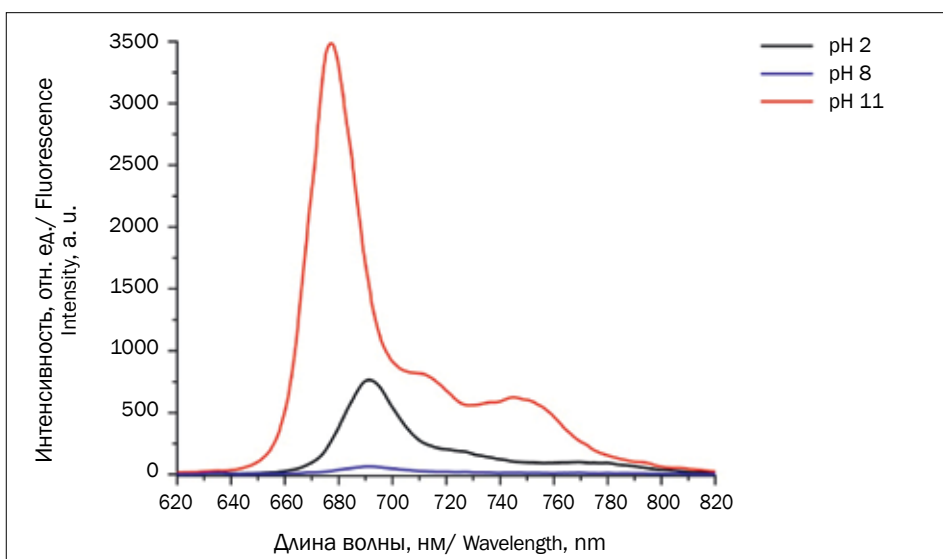


Рис. 4. Спектр флуоресценции НЧ-А1Рс в коллоиде в зависимости от pH
Fig. 4. NP-A1Pc fluorescence spectrum in colloidal solution depending on pH

ресценция была зафиксирована при pH 11; при pH 2 интенсивность флуоресценции была меньше чем в 3 раза; при нейтральном pH 8 практически полностью отсутствовала.

Результаты и обсуждение

Полученные с помощью стрик-камеры спектры кинетики тушения флуоресценции коллоида наночастиц фталоцианина при различных pH приведены на рис. 5 и рис. 6. При анализе спектра для pH 2 было установлено визуальное сходство со спектром затухания флуоресценции для молекулярной формы фталоцианина алюминия. Однако математическая обработка данного спектра показала наличие двух времен жизни флуоресценции: 5 нс (72% от общего числа фотонов) и 1,5 нс (28% от общего числа фотонов) с $\chi^2 = 1,092$, тогда как у водного раствора сульфированного фталоцианина алюминия одно время жизни длительностью 5 нс. При pH 11 было получено два времени жизни: 3 нс (51% от общего числа фотонов) и 0,5 нс (49% от общего числа фотонов) с $\chi^2 = 1,009$.

Величина χ^2 называется редуцированным распределением хи-квадрат и равна:

$$\chi^2 = \frac{1}{V} \sum_i \frac{(M_i - C_i)^2}{M_i}$$

где M_i – значение экспериментально исследуемой величины в i-ой точке, C_i – математически аппроксимированное значение исследуемой величины в i-ой точке, V – количество степеней свободы. С более детальным описанием модели, использованной для оценки качества аппроксимации, можно ознакомиться в работах [5, 6].

Особый интерес в рамках данной работы представляло исследование кинетики затухания флуоресценции НЧ-АІРс, находящихся внутри клеток и участвующих в процессе приживления. Для этого была использована культура моноцитов ТНР-1, широко применяемая для имитации макрофагов. Моноциты при воспалении трансформируются в макрофаги. Для индукции пролиферации ТНР-1 в культуре были использованы фитогемагглютинин-П (ФГА) и конканалин А (Кон А). ФГА и Кон А добавляли к моноцитам в концентрации 10 мкг/мл. Через 2 сут к активированным таким образом моноцитам добавляли коллоид НЧ-АІРс. Через 1 сут после добавления НЧ-АІРс клетки промывали, осаждали центрифугированием и полученную клеточную массу исследовали с использованием время-разрешенной спектроскопии.

Для контрольного образца моноцитов без активации лектинами анализ кинетики затухания флуоресценции (рис. 7) показал наличие двух времен жизни: 6 нс (93% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 1,5 нс (7% от общего числа зарегистрированных фотонов) с $\chi^2 = 1,024$.

Анализ кинетики затухания флуоресценции НЧ-АІРс в макрофагах, активированных ФГА и Кон А, показал схожесть их спектров. Кинетика затухания флуоресценции НЧ-АІРс в макрофагах, активированных ФГА, представлена на рис. 8. Кинетика затухания флуоресценции НЧ-АІРс в макрофагах, активированных Кон А, имеет такой же вид и схожие времена жизни.

Суммарно результаты исследования кинетики люминесценции НЧ- АІРс в макрофагах представлены в табл.

Результаты исследований показывают, что взаимодействие НЧ-АІРс с моноцитами/макрофагами приводит к изменению времени жизни их флуоресценции. Схожие наблюдения были зафиксированы в работе [7], где было предложено оценивать эффективность лече-

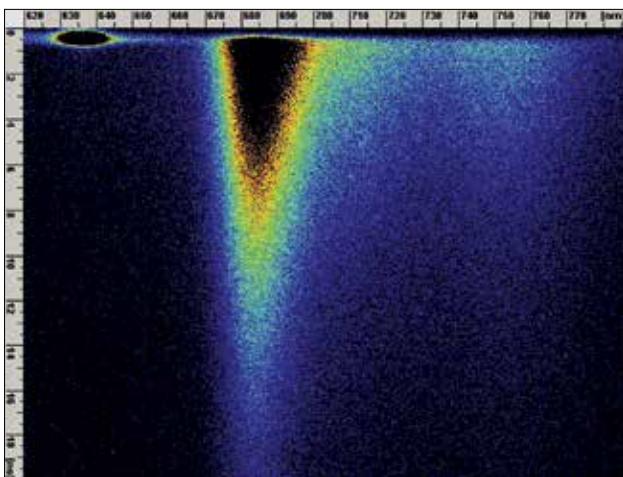


Рис. 5. Спектр кинетики деградации флуоресценции НЧ-АІРс в коллоиде при pH 2
Fig. 5. NP-A1Pc fluorescence decay kinetics spectrum in colloidal solution at pH 2

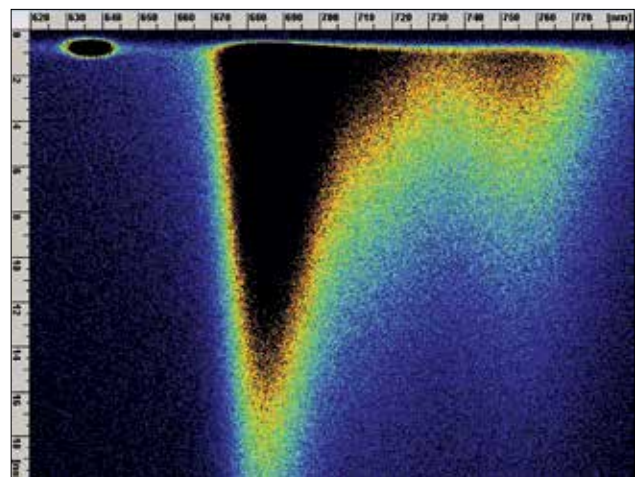


Рис. 6. Спектр кинетики деградации флуоресценции НЧ-АІРс в коллоиде при pH 11
Fig. 6. NP-A1Pc fluorescence decay kinetics spectrum in colloidal solution at pH 11

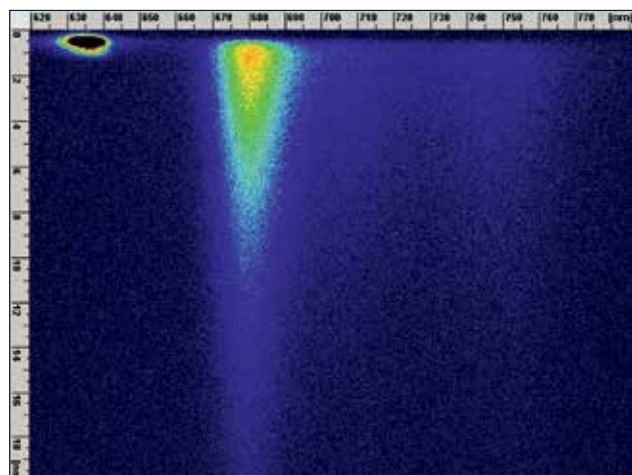


Рис. 7. Спектр кинетики тушения флуоресценции, полученный от клеточной массы моноцитов THP-1, инкубированных с НЧ-AIPc

Fig. 7. Fluorescence decay kinetics spectrum obtained from monocyte THP1 cell mass incubated with NP-A1Pc

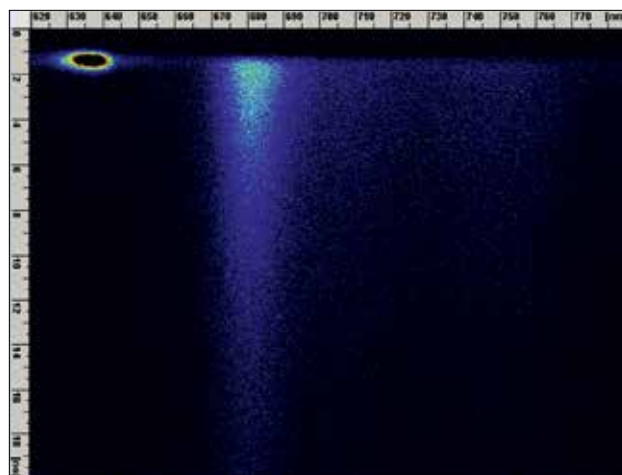


Рис. 8. Спектр кинетики тушения флуоресценции, полученный от клеточной массы моноцитов THP-1, активированных ФГА и инкубированных с НЧ-AIPc

Fig. 8. Fluorescence decay kinetics spectrum obtained from monocyte THP1 cell mass activated by PHA and incubated with NP-A1Pc

Таблица

Время жизни люминесценции НЧ-AIPc в активированных и не активированных макрофагах

Table

Duration of luminescence lifetime of NP-A1Pc in activated and non-activated macrophages

Образец Sample	Время жизни, τ нс Duration of life-time, τ ns	Распределение фотонов по τ Distribution of photons according to τ	Число фотонов пришедших за время t Number of photons arrived in a time t	Критерий согласия χ^2 Chi-squared test χ^2
Моноциты THP-1, инкубированные с НЧ-AIPc Monocytes THP1 incubated with NP-A1Pc	$\tau_1 = 6$ нс $\tau_1 = 6$ ns $\tau_2 = 1,5$ нс $\tau_2 = 1,5$ ns	93% фотонов 93% of photons 7% фотонов 7% of photons	6450 фотонов 6450 of photons	$\chi^2 = 1,024$
Клетки THP-1, активированные Кон А, инкубированные с НЧ-AIPc THP-1 cells activated by Con A and incubated with NP-A1Pc	$\tau_1 = 9$ нс $\tau_1 = 9$ ns $\tau_2 = 4,5$ нс $\tau_2 = 4,5$ ns	32% фотонов 32% of photons 68% фотонов 68% of photons	7335 фотонов 7335 of photons	$\chi^2 = 1,013$ $\chi^2 = 1,013$
Клетки THP-1, активированные ФГА, инкубированные с НЧ-AIPc THP1 cells activated by Con A and incubated with NP-A1Pc	$\tau_1 = 9,3$ нс $\tau_1 = 9,3$ ns $\tau_2 = 4,1$ нс $\tau_2 = 4,1$ ns	31% фотонов 31% of photons 69% фотонов 69% of photons	5391 фотонов 5391 of photons	$\chi^2 = 1,037$ $\chi^2 = 1,037$

ния рака по времени жизни флуоресценции. В данной работе для анализа кинетики тушения флуоресценции использовалось моноэкспоненциальное приближение. Результаты показали значительную разницу в длительности времени жизни флуоресценции в опухоли и в окружающих тканях до лечения и через 7 дней после лечения, когда размер опухоли стал соизмерим с ее размером до лечения. Была установлена строгая корреляция между временем жизни флуоресценции и связыванием молекул флуорофора с рецепторами.

Таким образом, время жизни флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия сильно зависит от конкретного этапа их взаимодействия с макрофагами и, исходя из полученных результатов, можно сделать предположение о том, что НЧ-AIPc имеют, как минимум, два возможных состояния:

- НЧ-AIPc пассивны, поверхностные молекулы фталоцианина алюминия находятся в пара-положении

относительно поверхности наночастицы (лежат на поверхности). В этом состоянии НЧ-AIPc не флуоресцируют. Но в результате взаимодействия отдельные молекулы фталоцианина алюминия могут быть оторваны окружающими биоорганическими молекулами. В таком случае взаимодействие между молекулой фталоцианина и биомолекулой можно охарактеризовать слабыми координационными или ван-дер-ваальсовыми связями и в этом случае время жизни флуоресценции не будет отличаться от времени жизни водорастворимой, молекулярной формы фталоцианина алюминия.

- НЧ-AIPc активны, поверхностные молекулы фталоцианина алюминия находятся в орто-положении (флотируют перпендикулярно поверхности НЧ-AIPc): одной связью держатся за поверхность наночастицы, другой соединяются с биоорганическими молекулами ковалентной связью.

В этом случае время затухания флуоресценции составляет 1–2 нс. Если на эту пару подать энергию, достаточную для активации фотодинамической реакции, то в спектре тушения флуоресценции появится третья компонента времени жизни, длительность которой будет менее 1 нс. Этот эффект примечателен тем, что таким образом НЧ могут дезактивировать активность макрофагов.

Заключение

В данной работе была исследована кинетика затухания флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия, инкубированных с макрофагами. В ходе работы для оценки типа связывания были подготовлены коллоиды наночастиц фталоцианина алюминия с различным значением pH, были измерены спектры флуоресценции и поглощения подготовленных коллоидов.

С помощью разработанного комплекса были получены значения времен жизни флуоресценции для каждого образца. При pH 2 расчет показал наличие двух времен жизни: 5 нс (72% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 1,5 нс (28% от общего числа зарегистрированных фотонов), причем компонента со временем жизни 5 нс совпадает со временем жизни флуоресценции молекулярной (растворенной) формы фталоцианина алюминия. При pH 11 расчет показал компоненты: 3 нс (51% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 0,5 нс (49% от общего числа зарегистрированных фотонов). Для образцов с макрофагами,

активированными конканавалином А, было получено два времени жизни: 9 нс (32% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 4,5 нс (68% от общего числа зарегистрированных фотонов). Для образцов с макрофагами, активированными фитогемагглютинином-П, было получено два времени жизни: 9,3 нс (31% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 4,1 нс (69% от общего числа зарегистрированных фотонов). В то же время для контрольного образца моноцитов без активации лектинами анализ кинетики затухания флуоресценции показал наличие двух следующих времен жизни: 6 нс (93% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 1,5 нс (7% от общего числа зарегистрированных фотонов).

Основываясь на том, что флуоресценция наночастиц фталоцианина алюминия подвержена фотобликингу, что не характерно для молекулярной формы фталоцианина алюминия, можно сделать предположение, что появление флуоресценции в патологически измененной ткани происходит не только за счет обычного растворения, но и за счет перехода поверхностных молекул в другие состояния, каждое из которых можно определить отдельным характером взаимодействия с окружением. Подтверждением этому служит возникновение нескольких компонент времен жизни флуоресценции, каждая из которых характерна для конкретного состояния молекул на поверхности наночастицы и их взаимодействия с окружением.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V. et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation. // *J. Biophoton.* – 2010. – Т. 3, № 5–6. – P. 336–346.
2. Макаров В.И., Бородин А.В., Лощёнов М.В. и др. Флуоресцентные методы контроля фотодинамической терапии артрозов с применением наночастиц фталоцианина алюминия (экспериментальное исследование) // *Российский химический журнал.* – 2013. – Т. LVII, № 5. – С. 35–38.
3. Demas J.N. Excited state lifetime measurements. – New York: Academic Press, 1983. – 273 p.
4. O'Connor D.V., Phillips D. Time-correlated single-photon counting. – New York: Academic Press, 1984.
5. Bevington P.R., Robinson D.K. Data reduction and error analysis for the physical sciences. – New York: McGraw-Hill, 2003. – 320 p.
6. Taylor J.R. An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements. – Sausalito, CA: University Science Books, 1996. – 327 p.
7. Ardeshirpour Y., Chernomordik V., Hassan M. et al. In vivo fluorescence lifetime imaging for monitoring the efficacy of the cancer treatment // *Clinical Cancer Research.* – 2014. – Vol. 20 (13). – P. 3531–3539.

REFERENCES

1. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Konov V.I., Mamedov A.A., Kuzmin S.G., Lukanets E.A. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation, *J. Biophoton.*, 2010, T. 3, No. 5–6, pp. 336–346.
2. Makarov V.I., Borodkin A.V., Loshchenov M.V., Nikolenko V.N., Zhavorova T.A., Ivannikov S.V., Loshchenov V.B. Fluorescentnyye metody kontrolya fotodina-micheskoi terapii artrozov s primeneniem nanochastits ftalotsianina alyuminiya (eksperimental'noe issledovanie) (Fluorescence methods for monitoring of photodynamic therapy for arthrosis), *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 2013, T. LVII, No. 5, pp. 35–38.
3. Demas J.N. Excited state lifetime measurements, New York, Academic Press Publ., 1983, pp. 1–273.
4. O'Connor D.V., Phillips D. Time-correlated single-photon counting, New York, Academic Press Publ., 1984.
5. Bevington P.R., Robinson D.K. Data reduction and error analysis for the physical sciences, New York, McGraw-Hill Publ., 2003, pp. 1–320.
6. Taylor J.R. An introduction to error analysis: the study of uncertainties in physical measurements, Sausalito, CA, University Science Books Publ., 1996, pp. 1–327.
7. Ardeshirpour Y., Chernomordik V., Hassan M., Zielinski R., Capala J., Gandjbakhche A. In vivo fluorescence lifetime imaging for monitoring the efficacy of the cancer treatment, *Clinical Cancer Research*, 2014, Vol. 20 (13), pp. 3531–3539.