

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе Российской академии наук
Отделение физики плазмы, атомной физики и астрофизики
Лаборатория оптики биомолекул и кластеров

Жихорева Анна Александровна

Влияние кислотности, вязкости и полярности
микроокружения среды на фотофизические свойства
фотосенсибилизатора Радахлорин

Научный доклад

Направление подготовки: 1.3 Физические науки

Специальность: 1.3.6 Оптика

Санкт-Петербург

2023

Научный руководитель: Васютинский Олег Святославович
доктор физико-математических наук,
зав. лаб. Оптики биомолекул и кластеров,
главный научный сотрудник ФТИ им. А.Ф. Иоффе

Рецензент: Белик Виктор Петрович,
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник ФТИ им. А.Ф. Иоффе

Рецензент: Балбекин Николай Сергеевич,
кандидат физико-математических наук,
зав. лабораторией Университета ИТМО

Введение

Анализ интенсивности и параметров время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизаторов (ФС) широко используется для получения важной информации об эффективности фотодинамической терапии онкологических заболеваний [1] и об индивидуальном отклике клеток на генерируемые активные формы кислорода (АФК) в ходе терапии [2]. Кроме того, такие параметры как время жизни и анизотропия флуоресценции, а также время вращательной диффузии, определяемые время-разрешенными флуоресцентными методами, используются для анализа параметров микроокружения молекул ФС [3] в растворах и клетках.

Фотосенсибилизатор Радахлорин, используемый в фотодинамической терапии злокачественных новообразований, широко применяется в клинической практике и уже был исследован в ряде научных работ [4]. Влияние Радахлорина на клетки и на ткани как реагента, генерирующего активные формы кислорода, хорошо изучены, при этом свойства флуоресценции Радахлорина преимущественно исследованы лишь в водных растворах. Однако, как известно, параметры флуоресценции флуорофора позволяют определить свойства микроокружения, что может быть использовано для определения необходимой дозы препарата в зависимости от индивидуальных особенностей пациента и от типа опухоли. К настоящему времени было проведено лишь несколько всесторонних исследований параметров флуоресценции фотосенсибилизаторов в зависимости от условий микроокружения в растворах и клетках, в том числе для Фотофрина [5], РrIX [6], Фоскана [7], Себ [8], фотодитазина [9] и mTHPC [10]. Таким образом, исследование характеристик флуоресценции Радахлорина в различных условиях является актуальной задачей науки с широким применением в области медицины и цитологии.

В данной работе представлено комплексное исследование флуоресценции ФС Радахлорин с временным разрешением в растворах и в

живых клетках. Определены зависимости относительного квантового выхода, времени жизни, анизотропии флуоресценции и времени вращательной диффузии от кислотности, вязкости и полярности раствора ФС. Также был вычислен относительный квантовый выход фосфоресценции синглетного кислорода в зависимости от рН и полярности раствора. Полученные результаты были использованы для анализа внутриклеточной локализации и определения свойств микроокружения в живых клетках линии HeLa, где наблюдалась сильная корреляция между изменениями времени жизни флуоресценции ФС и различиями в значениях рН во внутриклеточных структурах.

Цель и задачи работы:

Исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в водных и органических растворах разной кислотности, вязкости и полярности, а также исследование его фотофизических свойств в различных внутриклеточных структурах для автоматизированного определения параметров микроокружения фотосенсибилизатора.

В ходе работы были решены следующие задачи:

1. Проведены эксперименты по мониторингу время-разрешенных сигналов флуоресценции для определения относительного квантового выхода и времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в водных растворах разной кислотности, а также водных растворах этанола и метанола с разной полярностью.
2. Анализ зависимости времени генерации и жизни синглетного кислорода (СК), генерируемого с помощью фотосенсибилизатора Радахлорин, а также относительного квантового выхода СК от рН и полярности раствора.
3. Определение анизотропии флуоресценции и времени вращательной диффузии в растворах разной вязкости, полярности и

кислотности с помощью регистрации ортогональных поляризованных компонент флуоресценции с временным разрешением при одно- и двухфотонном возбуждении ФС.

4. Проведение экспериментов по мониторингу флуоресценции Радахлорина и анализ времен жизни флуоресценции Радахлорина в живых клетках HeLa в зависимости от микроокружения ФС.

5. Разработка методики автоматической сегментации внутриклеточных областей разной кислотности по анализу пространственного распределения времен жизни флуоресценции Радахлорина. Определение параметров флуоресценции Радахлорина в областях разной кислотности для клеток разной степени онкогенности.

Объект исследования

Фотофизические свойства ФС Радахлорин исследовались в водных растворах PBS (фосфатный буфер) с разными значениями кислотности (pH). Уровень pH варьировался в диапазоне 3-10 и изменялся добавлением небольшого количества HCl и KOH. Концентрация Радахлорина в растворах варьировалась от 0,587 μM до 587 μM при исследовании влияния кислотности на свойства флуоресценции ФС. Исследование времен жизни, анизотропии флуоресценции и времен вращательной диффузии Радахлорина в водно-спиртовых растворах разной полярности проводилось при концентрации 15 μM и 30 μM для одно- и двух-фотонного возбуждения соответственно. Из-за слабого сигнала фосфоресценции СК, времена жизни и генерации СК и его относительный квантовый выход изучались в растворах с концентрацией ФС 180 μM .

Исследование флуоресценции ФС во внутриклеточной среде проводилось на живых клетках *in vitro*. Клетки постоянной линии HeLa (коллекция клеточных линий Институт цитологии РАН) культивировались в питательной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей

сыворотки и 1% пенициллин-стрептомицина при температуре 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂. Спустя 48 часов после посева клеток, в питательную среду добавлялся фотосенсибилизатор Радахлорин в концентрации 30 мкМ, после чего, в течение 24 часов инкубации клеток в растворе ФС происходила его диффузия и накопление во внутриклеточной среде.

Достоверность результатов

Степень достоверности полученных результатов и сделанных выводов обусловлена использованием широко применяемых на практике время-разрешенных флуоресцентных методов исследования. Для обработки экспериментальных данных и вычисления параметров время-разрешенных сигналов фосфоресценции и флуоресценции использовались известные математические алгоритмы. Полученные значения времени жизни и анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин находятся в соответствии с результатами, представленными в литературе.

Научная новизна работы

Обнаружена сильная нелинейная зависимость квантового выхода и времени жизни флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин от кислотности и полярности раствора. Продемонстрирована возможность использования оценки квантового выхода флуоресценции Радахлорина по измеренным значениям времени жизни флуоресценции. Обнаружена и теоретически проинтерпретирована значительная разница анизотропии флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин при одно- и двухфотонном возбуждении и ее зависимость от длины волны возбуждения. Разработан новый метод оценки накопления фотосенсибилизатора в живых клетках с учетом влияния pH микроокружения на основе время-разрешенной флуоресцентной микроскопии.

Апробация работы

Основные результаты работы докладывались на 13 научных конференциях, в том числе 9 конференциях международного уровня и на 4 конференциях всероссийского уровня: Laser Optics (Санкт-Петербург, 2022), European Conferences on Biomedical Optics (online, 2021), SPIE Photonics West BiOS (online, 2021), IX Съезд Российского фотобиологического общества (Шепси, 2021), Laser Optics (Санкт Петербург, 2020), OSA Frontiers in Optics (online, 2020), School of Advanced Science on Modern Topics in Biophotonics (Сан-Карлос, 2019), European Conferences on Biomedical Optics (Мюнхен, 2019), Международная конференция Физика - наукам о жизни (Санкт-Петербург, 2019), Конгресс «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика» (Москва, 2018), Международная конференция Физика.СПб (Санкт-Петербург, 2018), XXX симпозиум современная химическая физика (Шепси, 2018), 8 съезд Российского фотобиологического общества (Шепси, 2017).

Публикации по теме работы

- [A1] Belashov A. V., Zhikhoreva A. A et al. Analysis of Radachlorin localization in living cells by fluorescence lifetime imaging microscopy //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2023. – С. 112699.
- [A2] Zhikhoreva A. A. et al. Comparative analysis of Radachlorin accumulation, localization, and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescence microscopy //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2022. – Т. 39. – С. 102973.
- [A3] Gorbunova I. A., Sasin, M. E., Zhikhoreva, A. A., et al. Fluorescence Anisotropy in Radachlorin and Chlorin e6 in Water–Methanol Solutions under One-and Two-Photon Excitation //Photonics. – MDPI, 2022. – Т. 10. – №. 1. – С. 9.

- [A4] Zhikhoreva A. A. et al. Singlet oxygen generation in aerosol jet and on biological surfaces //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2022. – Т. 228. – С. 112395.
- [A5] Zhikhoreva A. A. et al. Comparative analysis of Radachlorin accumulation, localization, and photobleaching in three cell lines by means of holographic and fluorescence microscopy //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2022. – Т. 39. – С. 102973. (Q2)
- [A6] Zhikhoreva A. A. et al. Investigation of Radachlorin accumulation in 3T3 cells by fluorescence microscopy and holographic tomography //European Conference on Biomedical Optics. – Optica Publishing Group, 2021. – С. EW4A.19.
- [A7] Belashov A. V., Zhikhoreva, A. A., et al. Dependence of Radachlorin fluorescence lifetime on solution pH and localization in HeLa cells //2022 International Conference Laser Optics (ICLO). – IEEE, 2022. – С. 01-01.

1. Исследование время-разрешенных сигналов флуоресценции фотосенсибилизатора Радахлорин в растворах

Измерения времени жизни флуоресценции Радахлорина в растворах и клетках проводилось с помощью конфокального сканера DCS-120 счета одиночных фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) (Becker&Hickl), установленного на микроскопе Ti-2A (Nikon). Для возбуждения молекул ФС Радахлорин использовался пикосекундный лазер BDS-SM-405-PS-101 с длительностью импульсов 60 пс и частотой 20 МГц, излучающий на длине волны 405 нм, соответствующей максимуму полосы поглощения Радахлорина. Флуоресценция Радахлорина регистрировалась в режиме счета одиночных фотонов с использованием гибридного GaAsP-фотоприемника НРМ–100-40 (Becker&Hickl) с временным откликом 120 пс (IRF). Сигнал флуоресценции Радахлорина выделялся полосовым интерференционным фильтром ВР645/75 (Chroma), соответствующим максимуму спектра

флуоресценции Радахлорина. Также для отсеечения возбуждающего лазерного излучения и автофлуоресценции в живых клетках использовался длинноволновый фильтр LP425 (Chroma). Из-за значительных различий квантового выхода флуоресценции Радахлорина в растворах при различных значениях pH накопление сигнала варьировалась в диапазоне 10-100 сек для достижения уровня, по меньшей мере, 10^5 фотонов. Для исследования времен жизни ФС в клетках использовался объектив микроскопа 60x с числовой апертурой NA = 1,49 (Nikon) для достижения высокого пространственного разрешения флуоресцентных изображений. Вычисление времен жизни флуоресценции ФС и анализ сигналов флуоресценции с временным разрешением по пикселям выполнялись с помощью программного обеспечения SPCImage (Becker&Hickl), которое включало свертку одноэкспоненциальной или двухэкспоненциальной функции затухания и IRF.

1.1. Влияние pH раствора на время-разрешенные сигналы флуоресценции Радахлорина

Экспериментальные время-разрешенные сигналы флуоресценции Радахлорина, зарегистрированные в водных растворах при различных значениях pH, представлены на рис. 1(a). Как видно на рис. 1(a), сигналы флуоресценции ФС являются одноэкспоненциальными при всех исследуемых значениях pH раствора. Анализ зависимости параметров флуоресценции Радахлорина от pH раствора проводился путем определения относительного квантового выхода флуоресценции (FQY), а время жизни флуоресценции вычислялось в ходе фитирования экспериментальных данных ($\chi^2 < 1.25$). Соответствующие времена затухания флуоресценции τ_f показаны на рис. 1(b) в зависимости от концентрации ФС и pH раствора.

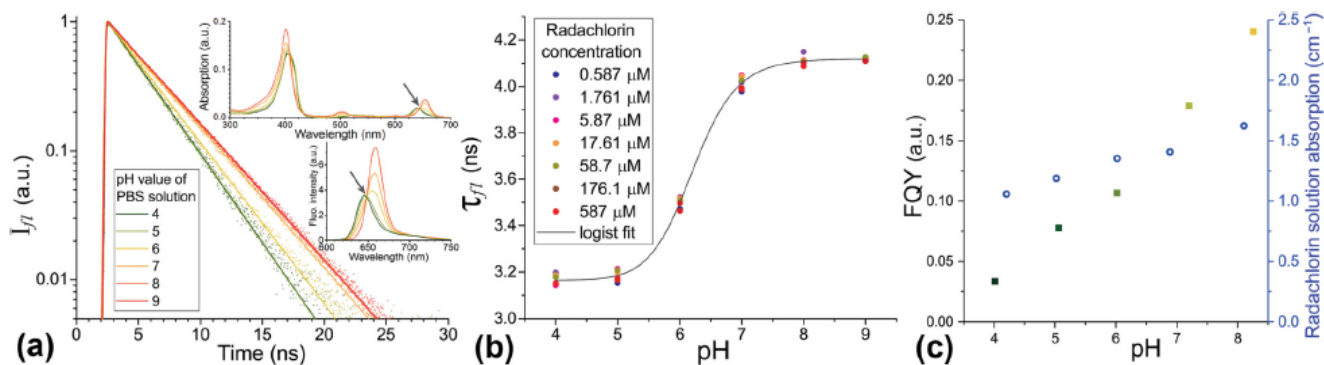


Рисунок 1. (a) Примеры время-разрешенных сигналов флуоресценции Радахлорина при различных значениях рН. Спектры поглощения и флуоресценции Радахлорина при различных значениях рН показаны на вставках, стрелки указывают точки изопроб; (b) Зависимость времени жизни флуоресценции Радахлорина τ_{fl} при разных концентрациях ФС и значениях рН; (c) Относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) и поглощение раствора Радахлорина в зависимости от рН.

Как видно из рис. 1(b), зависимость времени жизни флуоресценции τ_{fl} от рН раствора сильно нелинейна, где наиболее быстрые изменения происходят в диапазоне рН 5-7 и выходят на плато при рН более 7 и менее 5. Сам препарат Радахлорин является щелочным (рН \approx 9) и варьирование концентрации ФС приводило к изменению рН раствора. Однако, при корректировке и контроле уровня рН не наблюдалось существенных изменений τ_{fl} при изменении концентрации Радахлорина в широком диапазоне от 0,587 до 587 μM .

Нелинейная зависимость времени жизни флуоресценции τ_{fl} от рН (рис. 1(b)) может быть связана с одновременным существованием нескольких форм Радахлорина, обладающих различными физическими и химическими свойствами при разных рН раствора. Как известно, основной компонент Радахлорина, хлорин еб, представляет собой производную порфирина, содержащий ионизируемые карбоксильные группы, присоединенные к центральному кольцу, которые позволяют молекуле существовать в различных ионных формах с разными общими зарядами в зависимости от рН окружающей среды [13]. Изменение распределения молекулярных зарядов и межмолекулярного электростатического поля в зависимости от рН может

сильно влиять на вероятность безызлучательных релаксационных переходов [11], что приводит к изменению наблюдаемого времени жизни флуоресценции.

Зависимости квантового выхода флуоресценции (FQY) Радахлорина и его поглощения на длине волны 405 нм от pH раствора показаны на рис. 1(с). Как можно видеть, оба параметра монотонно увеличиваются с увеличением pH. Объединив данные на рис. 1(b) и (с), можно получить зависимость между FQY и τ_{fl} . Соотношение FQY и τ_{fl} является важным результатом и может быть использовано для оценки относительного квантового выхода флуоресценции, например в клетках, путем экспериментального измерения времени жизни флуоресценции ФС, в предположении, что внутриклеточный pH является основным фактором, влияющим на изменение времени жизни.

Было обнаружено, что изменения τ_{fl} в зависимости от pH раствора обратимы. Были проведены эксперименты, в ходе которых pH раствора Радахлорина несколько раз повышали примерно до pH \approx 10, а затем снижали до pH \approx 3. Такие циклические изменения pH раствора приводили к одинаковым временам жизни флуоресценции: τ_{fl} (pH=10) \approx 4,1 нс и τ_{fl} (pH=3) \approx 3,0 нс, что демонстрирует обратимость изменения времени жизни флуоресценции Радахлорина при изменении pH.

1.2. Влияние полярности раствора на время-разрешенные сигналы флуоресценции Радахлорина

Наблюдались значительные изменения квантового выхода и времени жизни флуоресценции Радахлорина при изменении концентрации этанола или метанола в водно-спиртовых растворах (см. рисунок 2). Увеличение концентрации спирта приводило к уменьшению полярности раствора (диэлектрическая проницаемость воды равна 80, в то время как диэлектрические проницаемости метанола и этанола равны 33 и 25 соответственно [14]). Как хорошо видно из рисунка 2 (а), при концентрации

спирта около 50% происходит нелинейное увеличение относительного квантового выхода флуоресценции (FQY) Радахлорина примерно в два раза, за которым следует плато. Стоит отметить, что не наблюдалось никакой разницы в FQY в растворах этанола и метанола (рис. 2 (a)).

В свою очередь, время жизни флуоресценции τ_{fl} нелинейно увеличивается с концентрацией спирта до 60-65%, а плато достигается при более высоких концентрациях. Однако, было обнаружено, что время жизни в растворах этанола ниже, чем в растворах метанола. В частности, τ_{fl} увеличилось с 3,5 нс в чистой воде (pH =6,2) примерно до 4,3 нс в EtOH и до 4,6 нс в MeOH (рис. 2 (b)). Стоит отметить, что практически не наблюдалось различий в свойствах флуоресценции Радахлорина в спиртовых растворах при одно- (ОРЕ) и двухфотонном (ТРЕ) возбуждении.

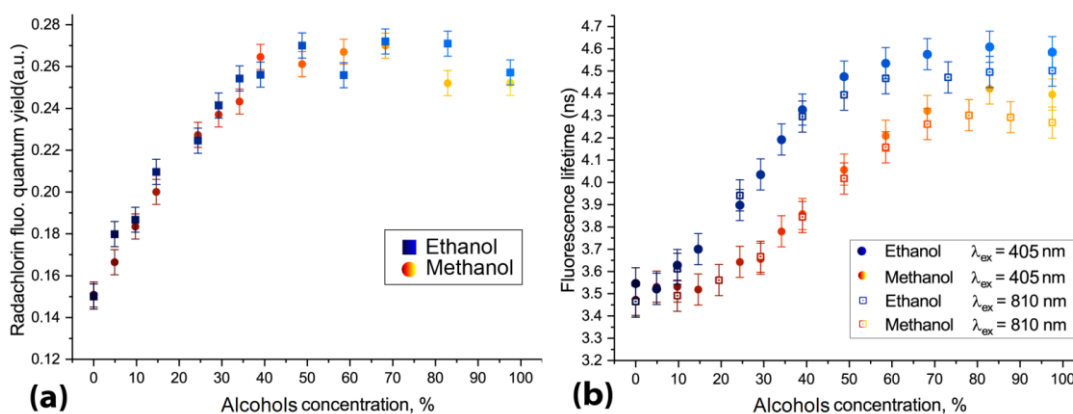


Рисунок 2. (a) Относительный квантовый выход флуоресценции Радахлорина в зависимости от концентрации спирта. (b) Время жизни флуоресценции Радахлорина в зависимости от концентрации спирта при одно- и двухфотонном возбуждении на длине волны 405 и 810 нм.

2. Исследование фосфоресценции синглетного кислорода, генерируемого Радахлорином в растворах

Времена генерации и жизни синглетного кислорода (СК), а также относительные квантовые выходы СК в водных растворах с разной кислотностью (pH) и в спиртовых растворах оценивали путем регистрации

фосфоресценции СК с временным разрешением. Для возбуждения молекул Радахлорина использовали 405 нм лазер с длительностью импульса 100 нс и частотой следования импульсов 80 кГц. Фотоумножитель NIR PMT H10330B-45 (Hamamatsu) использовался для детектирования фосфоресценции СК в режиме счета фотонов, а модуль TCSPC PicoHarp 300 (PicoQuant) использовался для анализа время-разрешенных сигналов фосфоресценции. Спектральную фильтрацию фосфоресценции СК в диапазоне 1269-1279 нм проводили с помощью монохроматора MDR-12 (LOMO). Сигналы с временным разрешением собирались в течение 600 сек с временным разрешением 512 псек. Расчет интенсивности фосфоресценции проводился путем интегрирования площади под время-разрешенными сигналами СК с учетом темнового шума и рассеянного света. На основе этих данных был рассчитан относительный квантовый выход синглетного кислорода (SOQY) с учетом коэффициента поглощения разных растворов.

2.1. Влияние pH раствора на фосфоресценцию синглетного кислорода, генерируемого с помощью Радахлорина

Сигналы фосфоресценции СК с временным разрешением и относительный квантовый выход СК (SOQY) показаны на рис. 4(a) и (b) соответственно.

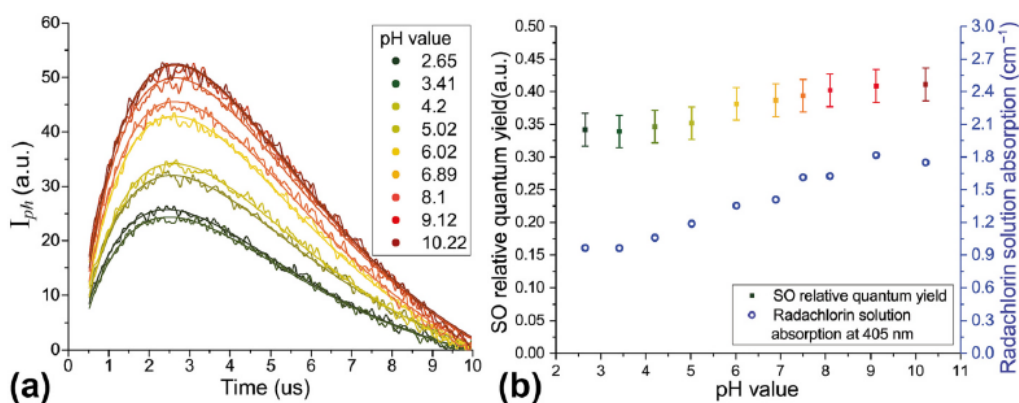


Рисунок 4. (a) - Сигналы фосфоресценции СК с временным разрешением (I_{ph}) при различных pH, (b) - относительный квантовый выход СК и поглощение раствора Радахлорина в зависимости от pH.

Несмотря на значительные различия FQY и времен жизни Радахлорина в зависимости от pH раствора, SOQY почти не изменяется от pH, как можно видеть на рис. 4(b). Незначительные изменения SOQY на рис. 4(b) находятся в пределах относительно больших экспериментальных погрешностей в условиях низкого отношения сигнал/шум сигнала флуоресценции СК. Вычисленные времена жизни и генерации СК, квантовый выход флуоресценции Радахлорина и квантовый выход СК для разных pH представлены в таблице 1.

Таблица 1. Время жизни флуоресценции Радахлорина τ_{fl} , относительный квантовый выход флуоресценции (FQY) и относительный квантовый выход синглетного кислорода (SOQY) в зависимости от pH раствора.

pH	4	5	6	7	8	9
τ_{fl} (ns)	3.16	3.18	3.50	4.04	4.11	4.12
FQY (a.u.)	0.033	0.077	0.107	0.179	0.240	–
SO QY (a.u.)	0.346	0.352	0.382	0.387	0.402	0.408

Как видно из таблицы 1 и рисунка 4, не наблюдалось статистически значимых изменений времен жизни флуоресценции СК в зависимости от pH.

2.2. Влияние полярности раствора на флуоресценцию синглетного кислорода, генерируемого с помощью Радахлорина

Изменения полярности растворителя приводили не только к изменению параметров флуоресценции Радахлорина, но и к изменению относительного квантового выхода СК (QY) и характерных времен сигнала его флуоресценции. Зарегистрированные сигналы флуоресценции СК с временным разрешением в водно-спиртовых растворах показаны на рисунке 5 (a). Относительные квантовые выходы СК в зависимости от концентрации спирта показаны на рис. 5 (b) .

Увеличение концентрации спирта в растворе сопровождается уменьшением полярности раствора и приводит к значительному увеличению количества генерируемого синглетного кислорода (SOQY), примерно в 10 раз в этаноле и в 6 раз в метаноле (рис. 5 (b)). В то же время увеличение концентрации спирта приводит к значительным изменениям обоих характерных времен сигнала фосфоресценции SO τ_1 и τ_2 . Так, наблюдалось уменьшение времени генерации СК τ_2 и увеличение времени жизни τ_1 (рис. 5 (c)). В то время как изменения τ_2 , вызванные увеличением концентрации этанола и метанола, были примерно одинаковыми, изменения τ_1 более выражены в растворах этанола.

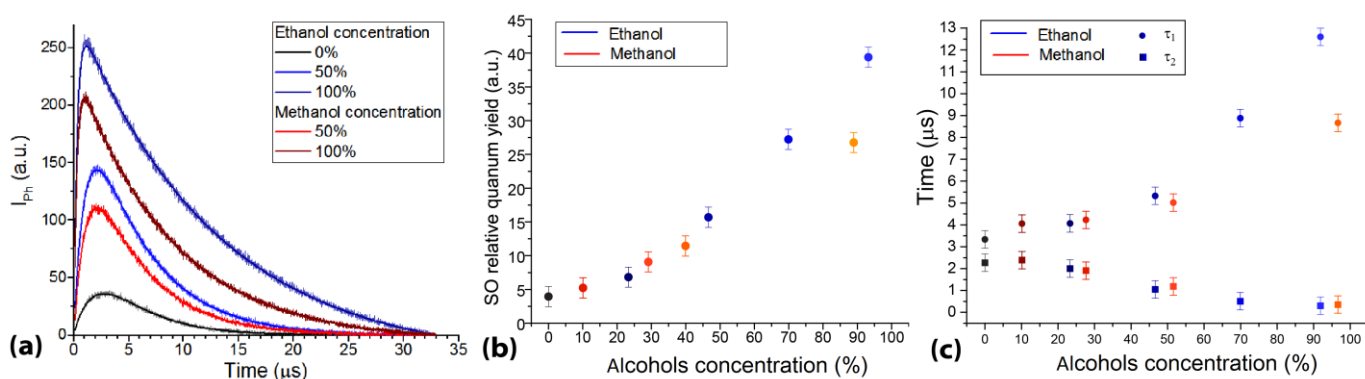


Рисунок 5. (a) Сигналы фосфоресценции СК с временным разрешением (I_{ph}) при разных концентрациях этанола и метанола, (b) относительный квантовый выход СК и (c) времена жизни синглетного кислорода в зависимости от концентрации водно-спиртовых растворов для этанола и метанола.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что микроокружение молекул Радахлорина может существенно влиять не только на их фотофизические свойства, но и на генерацию синглетного кислорода и, возможно, других активных форм кислорода. Наблюдаемый значительный рост SOQY, а также резкие изменения времен τ_1 и τ_2 с увеличением доли спирта в смесях вода/этанол и вода/метанол могут быть объяснены увеличением константы скорости радиационного перехода из возбужденного синглетного состояния молекулы кислорода в основное состояние от $0,16 \text{ c}^{-1}$ в воде до $0,42 \text{ c}^{-1}$ в метаноле и $0,5 \text{ c}^{-1}$ в этаноле [15].

3. Время-разрешенная поляризованная флуоресценция Радахлорина и анализ времен вращательной диффузии и анизотропии флуоресценции

В экспериментах в качестве источника возбуждающего излучения использовался фемтосекундный Ti:Sa лазер Mai-Tai HP DS (Spectra Physics) с возможностью перестройки длины волны излучения в спектральном диапазоне 690-1040 нм, длительностью импульса 100 фс и частотой следования импульсов 80,4 МГц. Флуоресценция Радахлорина возбуждалась в полосе поглощения Core с максимумом около 405 нм в условиях однофотонного (OPE) и двухфотонного (TPE) возбуждения в диапазонах длин волн 375-420 нм и 750-840 нм, соответственно, с шагом не более 5 нм. Излучение в схеме OPE было получено путем удвоения частоты основного выходного сигнала лазера генератором второй гармоники Inspire Blue (Spectra Physics). Плотность мощности лазерного импульса в фокальной области образца поддерживалась на уровне 0,2 МВт/см² в режиме OPE и 795 МВт/см² в режиме TPE. Степень линейной поляризации возбуждающего излучения была выше 0,995, а направление поляризации регулировалось пластиной $\lambda/2$. Лазерный луч фокусировался в центр кварцевой кюветы с раствором ФС, а сигнал флуоресценции собирали в направлении, перпендикулярном лазерному лучу. Ортогонально поляризованные компоненты флуоресценции I_{\parallel} и I_{\perp} разделялись призмой Глана и регистрировались двумя сверхбыстрыми фотоприемниками SPAD PD-050-CTC (MPD). Сигнал флуоресценции спектрально выделялся при помощи полосового фильтра BP645/75. В режиме TPE рассеянное возбуждающее лазерное излучение отсекалось от сигнала флуоресценции фильтром SP700 (Chroma), а в режиме OPE оно блокировалось фильтром LP470 (Chroma). Сигналы флуоресценции, накопленные в течение 3 минут с временным интервалом 4 псек в режиме счета фотонов, анализировались системой TCSPC PicoHarp 300 (ПикоКвант).

Зарегистрированные ортогональные компоненты I_{\parallel} и I_{\perp} сигналов флуоресценции ФС Радахлорин с временным разрешением использовались для определения времен жизни флуоресценции, анизотропии и времен вращательной диффузии [11]. Анизотропия $r(t)$ рассчитывалась из сигналов I_{\parallel} и I_{\perp} [12].

3.1. Анизотропия флуоресценции Радахлорина и время вращательной диффузии в растворах разной кислотности, вязкости и полярности при одно- и двухфотонном возбуждении

Параметры поляризованной флуоресценции, полученные в ходе анализа экспериментальных данных, представлены в таблице 2. Результаты, представленные в таблице 2, демонстрируют резкое различие значений параметра анизотропии флуоресценции, полученных в режимах OPE и TPE. В случае TPE значение анизотропии в воде $r_{(2)}^0 = 0,35$, в то время как в случае OPE значение $r_{(1)}^0$ оказалось довольно низким и отрицательным: $r_{(1)}^0 \approx -0,03$.

Таблица 2. Параметры флуоресценции Радахлорина при одно- и двухфотонном возбуждении.

	Water		40% MeOH	
	OPE, 405 nm	TPE, 810 nm	OPE, 405 nm	TPE, 810 nm
$\tau \pm 0.35,$ ns	3.3	3.5	3.5	3.8
$\tau_{rot} \pm 0.07,$ ns	0.32	0.24	0.44	0.34
$r_0 \pm 0.02,$ ns	-0.03	0.35	-0.02	0.39

Результаты, полученные в зависимости от pH раствора и доли спирта в водно-метанольных и водно-этанольных растворах, приведены на рисунке 8. Как видно из рисунка 8(a) изменение pH раствора не приводит к существенным изменениям во времени вращательной диффузии, поскольку этот параметр по существу характеризует вязкость окружающей среды, которая не меняется в зависимости от кислотности. В то же время наблюдалось некоторое снижение анизотропии флуоресценции в диапазоне

pH от 3 до 6 как при однофотонном, так и при двухфотонном возбуждении (рис. 8(с)).

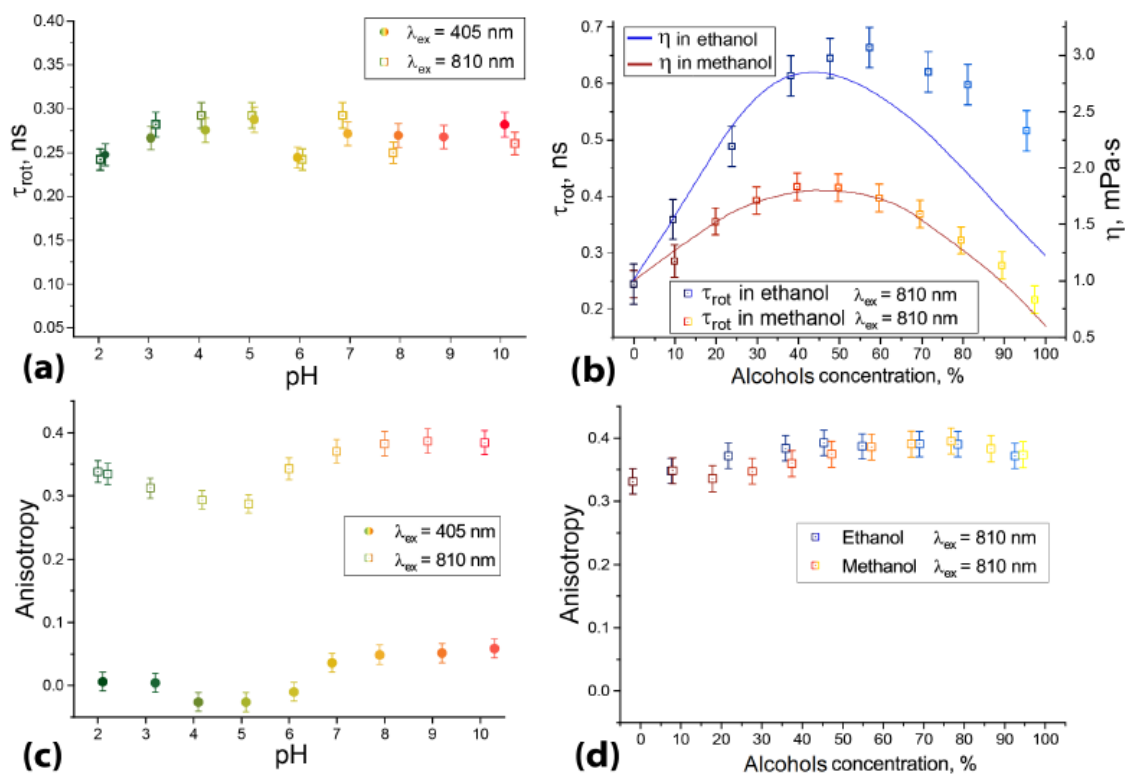


Рисунок 8. Время вращательной диффузии Радахлорина в зависимости от pH раствора (a) и концентрации спирта (b). Вязкость раствора в зависимости от концентрации спирта показана на рисунке (b) сплошными линиями. Анизотропия флуоресценции Радахлорина в зависимости от pH раствора (c) и концентрации спирта (d).

Как видно из рис. 8(с) значения параметра анизотропии, полученные при однофотонном и двухфотонном режимах возбуждения, существенно различаются. В случае однофотонного возбуждения молекул типа симметричного волчка или плоских молекул с внутривещными поляризованными переходами начальная анизотропия r_0 пропорциональна многочлену Лежандра второго порядка от косинуса угла Θ между дипольными моментами перехода поглощения и флуоресценции [12]. Следовательно, наблюдаемая небольшая отрицательная анизотропия Радахлорина при однофотонном возбуждении на длине волны 405 нм возникает из-за углового смещения дипольных моментов перехода поглощения и флуоресценции.

В случае двухфотонного возбуждения начальная анизотропия r_0 характеризуется компонентами тензора двухфотонного поглощения S , который определяется углом Ψ [16]. Основные компоненты тензора S могут не иметь прямого отношения к диполю перехода для однофотонного поглощения, что приводит к разнице между значениями анизотропии, полученными при одно- и двухфотонном возбуждении. Таким образом, небольшие изменения анизотропии r_0 на рис. 8 (с) от значения рН могут быть объяснены изменением угла Θ и угла Ψ при однофотонном и двухфотонном возбуждении соответственно.

В то же время, как показано в рисунке 9, изменение длины волны возбуждения в пределах полосы поглощения, как при однофотонном, так и при двухфотонном возбуждении может привести к некоторому изменению параметра анизотропии r_0 .

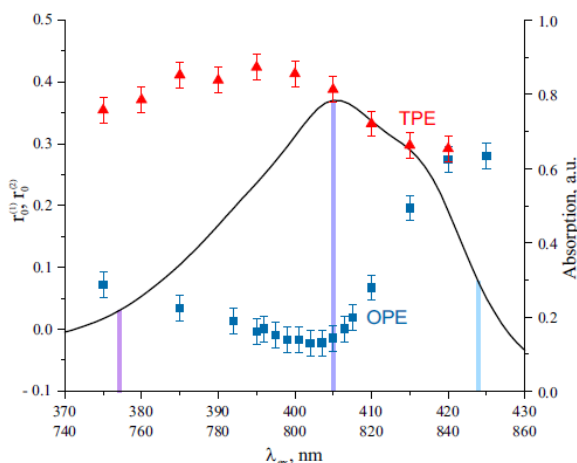


Рисунок 9. (а) Начальная анизотропия флуоресценции $r_0^{(1)}$ и $r_0^{(2)}$ Радахлорина в 40% МеОН в зависимости от длины волны возбуждения в режимах ОРЕ и ТРЕ. Спектр однофотонного поглощения в полосе Сорe показан черной кривой.

Полученные данные о времени вращательной диффузии в водных растворах метанола и этанола, а также вязкости растворов приведены на рис. 8 (б). Зависимость τ_{rot} от концентрации спирта демонстрирует идеальную корреляцию с вязкостью раствора для метанола и хорошее соответствие для этанола при концентрациях примерно до 50%. При более высоких

концентрациях этанола τ_{rot} демонстрирует более высокие значения, чем те, которые ожидаются исходя из вязкости раствора. При этом анизотропия в растворах метанола и этанола близка и незначительно увеличивается с увеличением концентрации спирта, почти в пределах погрешности, см. рис. 8(d).

Отклонение времени вращательной диффузии Радахлорина от прямой пропорциональности с η при высоких концентрациях этанола может быть связано с изменением Ван-дер-Ваальсова объема молекулы Радахлорина V и коэффициента трения C при различных условиях сольватации.

4. Анализ времени жизни флуоресценции Радахлорина в клетках HeLa в зависимости от микроокружения ФС

Примеры распределений интенсивности флуоресценции и времени жизни Радахлорина в живых клетках HeLa представлены на рис. 10 (b) и (c), соответственно. Как видно из рисунка 10 (c), во внутриклеточном пространстве наблюдается значительная неоднородность значений τ_{fl} . Фитинг сигналов флуоресценции ФС с временным разрешением проводили с использованием одноэкспоненциальной модели с точностью $\chi^2 < 1,25$.

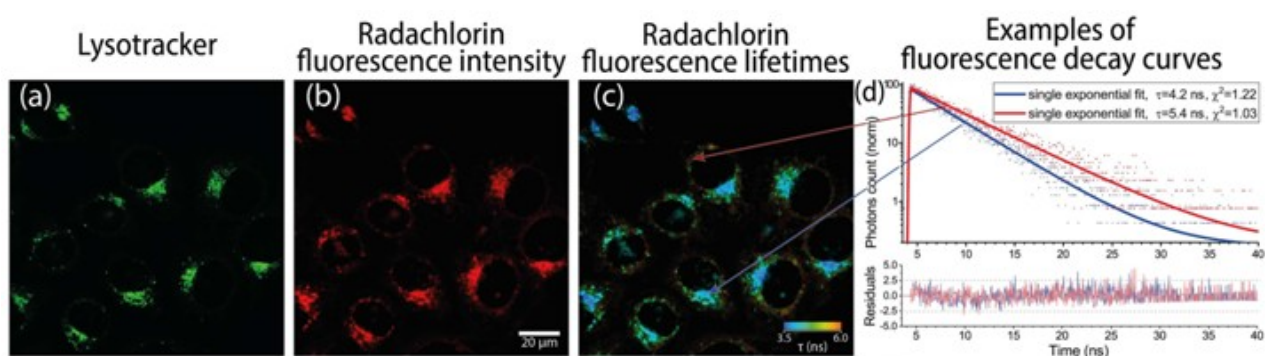


Рисунок 10. (a) Распределение интенсивности флуоресценции маркера лизосом LysoTracker в клетках HeLa. (b) Распределение интенсивности флуоресценции Радахлорина в тех же клетках. (c) Пространственное распределение времен жизни флуоресценции Радахлорина в тех же клетках. (d) Примеры время-разрешенных сигналов затухания флуоресценции Радахлорина во внутриклеточных областях с относительно длинным и коротким временем жизни флуоресценции.

Наиболее сильные пространственные вариации времени жизни флуоресценции Радахлорина наблюдались вблизи ядер клеток, где времена жизни находились в диапазоне 3,2–3,3 нс, в то время как в других областях клеток τ_{fl} достигало 6,0 нс (см. рис. 10(с)).

Стоит отметить, что типичное время жизни флуоресценции Радахлорина внутри клеток несколько больше, чем в водных растворах. Возможно, разница может быть объяснена разницей в параметрах микросреды, в частности ее полярности, которая в живых клетках несколько ниже, чем в водных растворах. Как было показано ранее, в растворе метанола, где диэлектрическая проницаемость в 2,5 раза меньше, чем в воде [14], время жизни флуоресценции ФС составило около 4,4 нс. Между тем, в растворе этанола, где диэлектрическая проницаемость в 3,6 раза меньше, чем в воде [14], τ_{fl} Радахлорина достигло значения около 4,7 нс. Поэтому можно предположить, что увеличение времени жизни флуоресценции (τ_{fl}) Радахлорина внутри живых клеток может быть вызвано главным образом низкой полярностью внутриклеточной среды.

Кроме неоднородности распределения τ_{fl} внутри клеток, было обнаружено, что интенсивность флуоресценции Радахлорина в околядерных областях клеток HeLa в несколько раз выше, чем в других частях клетки. Более того, области высокой интенсивности флуоресценции на рис. 11 почти полностью совпадают с областями с низким временем жизни флуоресценции τ_{fl} . Корреляция между интенсивностью флуоресценции и значениями времени τ_{fl} жизни проиллюстрирована на рис. 11 (b), где области высокой интенсивности окрашены синим, а области низкой интенсивности - желтым.

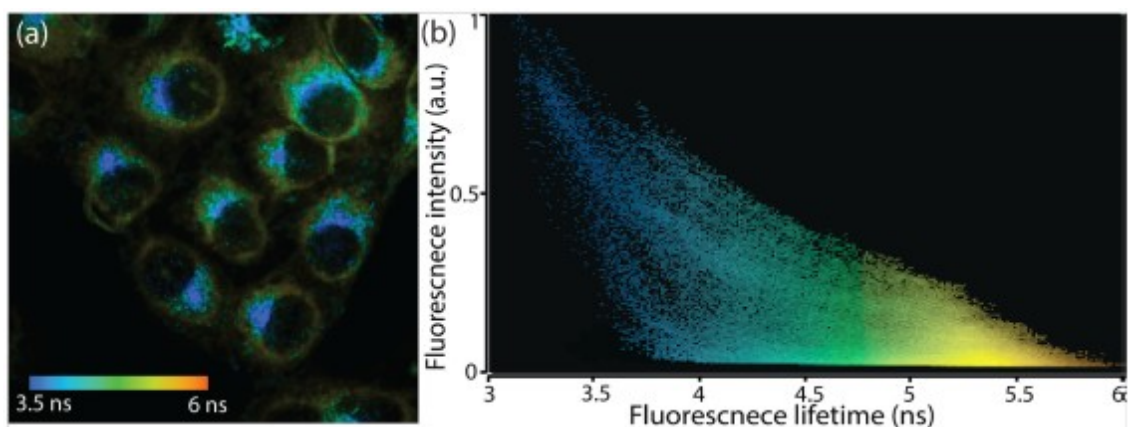


Рисунок 11. (а) Пример пространственного распределения времени жизни флуоресценции Радахлорина в клетках HeLa, (б) Диаграмма рассеяния, демонстрирующая корреляцию между интенсивностью и временем жизни флуоресценции Радахлорина

Основываясь на результатах изменения свойств флуоресценции Радахлорина в растворах, можно предположить, что вариации интенсивности и времени жизни флуоресценции Радахлорина внутри клетки связано не только с полярностью, но и с разными значениями рН внутри клеток. Как известно [4], и как видно из рисунка 10 (а) и (б) Радахлорин преимущественно накапливается в лизосомах, где значение рН значительно ниже, чем в остальных областях клетки. Поэтому в околоядерной области, где преимущественно локализуются лизосомы, наблюдаются низкие времена жизни флуоресценции ФС около 3,3 нс.

Для подтверждения влияния рН на пространственное распределение времен жизни флуоресценции ФС был проведен эксперимент по выравниванию внутриклеточного рН с помощью препарата бафиломицин А1 (Baf A1). Выравнивание рН внутри клетки приводило к более однородной картине распределения времен жизни флуоресценции ФС, что доказывает ведущую роль рН в вариации интенсивности и времен жизни флуоресценции Радахлорина внутри клетки.

4.1. Автоматическая сегментация внутриклеточных областей с помощью кластеризации участков на phasor-plot и параметров флуоресценции

Значительная разница во времени жизни флуоресценции внутри одной клетки (см. рисунок. 10 и 11) свидетельствует о существенном разнообразии внутриклеточного микроокружения, влияющего на параметры флуоресценции. Принимая во внимание наблюдаемую разницу во времени жизни флуоресценции Радахлорина в околоядерных и других областях клеток, была проведена сегментация внутриклеточных областей и их классификация на две группы, соответствующие относительно коротким и длинным временам жизни флуоресценции. Чтобы упростить процедуру сегментации и получить надежные данные, был разработан алгоритм автоматической кластеризации «фазовых» графиков, пример которого представлен на рис. 13(а).

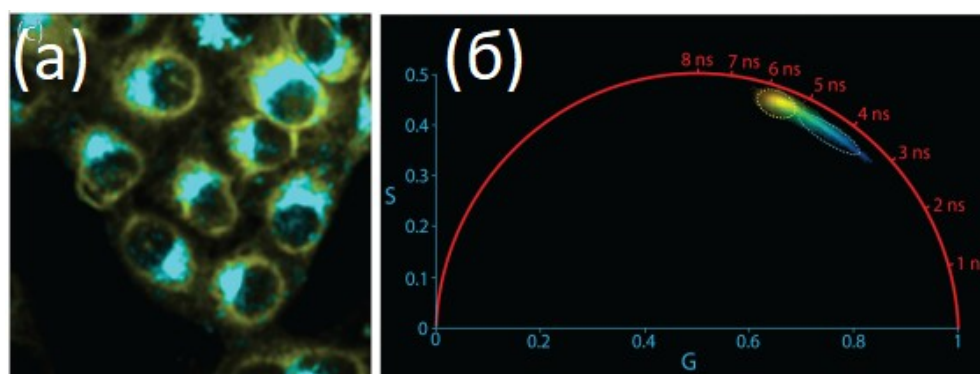


Рисунок 13. (а) Результат кластеризации клеток, (б) Фитирование phasor-plot двумя 2D гауссовыми функциями, обозначенными пунктирными эллипсами голубого и желтого цветов.

Анализ проводился на нескольких десятках время-разрешенных пространственных распределений сигнала флуоресценции Радахлорина в клетках разных линий (HeLa- рак шейки матки, A549 – рак легкого, 3T3- псевдонормальные клетки). Кластеризация двумерных графиков рассеяния на две 2D гауссовы функции была реализована путем сопоставления экспериментальных данных с двумя 2D гауссовыми распределениями с

использованием программного обеспечения собственной разработки на базе MatLab.

На рис. 13 (б) показан типичный phasor-plot и его кластеризация (рис. 13(a)) с помощью двух 2D функций Гаусса, где первый кластер, окрашенный голубым, относится к группе относительно коротких времен жизни флуоресценции, а второй кластер, окрашенный желтым, относится к группе относительно длинных времен. Полученные данные о средних интенсивностях и временах жизни флуоресценции первого и второго кластеров представлены в таблице 3.

Таблица 3. Среднее время жизни флуоресценции Радахлорина в двух автоматически выделяемых кластерах и соотношение интенсивностей флуоресценции в этих кластерах в клетках разных линий. Данные были получены путем анализа нескольких десятков живых клеток, а затем усреднены.

Area type	HeLa	A549	3T3
I-st cluster τ_{fl} (ns)	4.3	4.3	4.3
II-nd cluster τ_{fl} (ns)	5.2	4.9	4.8
I_{I-st}/I_{II-nd} (a.u.)	2.7	2.3	2.0

Анализ флуоресценции Радахлорина в клетках разных линий и автоматическая кластеризация областей на phasor-plot позволила получить средние времена жизни флуоресценции Радахлорина τ_{fl} в областях разной кислотности для каждой клеточной линии. Как видно из таблицы 3, средние значения τ_{fl} различаются как между типами раковых клеток (HeLa и A549), так и между раковыми и не раковыми клетками. Таким образом, разработанная методика может быть в дальнейшем расширена и применена для определения типа клеток или для определения их состояния по анализу флуоресценции ФС Радахлорин.

Заключение

В ходе работы были выполнены все поставленные задачи и проведено комплексное исследование фотофизических свойств фотосенсибилизатора Радахлорин в водных и органических растворах разной кислотности, вязкости и полярности. Были получены зависимости времен жизни и относительного квантового выхода флуоресценции Радахлорина, а также времен генерации и жизни синглетного кислорода и его квантового выхода от кислотности и полярности раствора. Получена зависимость времени вращательной диффузии молекул Радахлорина от вязкости раствора и продемонстрирована зависимость анизотропии флуоресценции Радахлорина от длины волны возбуждения. Обнаруженная нелинейная зависимость квантового выхода и времени жизни флуоресценции Радахлорина от рН и полярности раствора была применена для анализа микроокружения Радахлорина в живых клетках.

Распределения время-разрешенного сигнала флуоресценции Радахлорина в живых клетках были проанализированы с использованием phasor-plot, аппроксимированного двумя двумерными распределениями Гаусса. Наблюдалась сильная корреляция между временами жизни флуоресценции Радахлорина внутри клеток и различиями в значениях рН во внутриклеточных структурах. Эксперименты по колоколизации и выравниванию кислотности внутриклеточной среды с помощью бафиломицина А1 выявили преимущественное накопление Радахлорина в лизосомах, а также преимущественное влияние рН на вариации времени жизни ФС внутри клеток. Кроме того, было показано, что фактическое количество Радахлорина в околядерной области (с низким рН), оцениваемое исключительно по интенсивности его флуоресценции, может быть недооценено, в частности, из-за сильной зависимости квантового выхода флуоресценции от рН.

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для точной оценки накопления ФС в областях с разной кислотностью и полярностью, а также для определения параметров микроокружения молекул ФС по анализу время-разрешенных сигналов флуоресценции. Разработанный метод автоматической сегментации участков с разными рН в дальнейшем может быть использован для статистических исследований внутриклеточных параметров клеток индивидуальных пациентов.

Список литературы

1. Sarbadhikary P., George B. P., Abrahamse H. Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer //Theranostics. – 2021. – Т. 11. – №. 18. – С. 9054.
2. Oliveira C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency //Free Radical Biology and Medicine. – 2011. – Т. 51. – №. 4. – С. 824-833.
3. Reshetov V. A. et al. Fluorescence methods for detecting the kinetics of photosensitizer release from nanosized carriers //Journal of Applied Spectroscopy. – 2011. – Т. 78. – С. 103-109.
4. Belashov A. V. et al. Analysis of Radachlorin localization in living cells by fluorescence lifetime imaging microscopy //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2023. – С. 112699.
5. Yeh S. C. A. et al. Monitoring photosensitizer uptake using two photon fluorescence lifetime imaging microscopy //Theranostics. – 2012. – Т. 2. – №. 9. – С. 817.
6. Russell J. A. et al. Characterization of fluorescence lifetime of photofrin and delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in living cells using single- and two-photon excitation //IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics. – 2008. – Т. 14. – №. 1. – С. 158-166.

7. Lassalle H. P. et al. Fluorescence imaging of Foscan® and Foslip in the plasma membrane and in whole cells //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2008. – T. 92. – №. 1. – C. 47-53.
8. Valanciunaite J. et al. A non-covalent complex of quantum dots and chlorin e 6: Efficient energy transfer and remarkable stability in living cells revealed by FLIM //RSC Advances. – 2014. – T. 4. – №. 94. – C. 52270-52278.
9. Ono B. A. et al. Subcellular localization and photodynamic activity of Photodithazine (glucosamine salt of chlorin e6) in murine melanoma B16-F10: an in vitro and in vivo study //Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII. – SPIE, 2018. – T. 10476. – C. 138-147.
10. Connelly J. P. et al. Time-resolved fluorescence imaging of photosensitiser distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2001. – T. 142. – №. 2-3. – C. 169-175.
11. Gorbunova I. A. et al. Two-photon excited fluorescence dynamics in NADH in water–methanol solutions: The role of conformation states //The Journal of Physical Chemistry B. – 2020. – T. 124. – №. 47. – C. 10682-10697.
12. Lakowicz J. R. (ed.). Principles of fluorescence spectroscopy. – Boston, MA : springer US, 2006.
13. Mocanu M. N., Yan F. Ultrasound-assisted interaction between chlorin-e6 and human serum albumin: pH dependence, singlet oxygen production, and formulation effect //Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2018. – T. 190. – C. 208-214.
14. Mirbagheri M., Mohebbi-Kalhari D., Jirofti N. Evaluation of mechanical properties and medical applications of polycaprolactone small diameter artificial blood vessels //International Journal of Basic Science in Medicine. – 2017. – T. 2. – №. 1. – C. 58-70.

15. Jarnikova E. S. et al. Effect of solvent dielectric properties on the spontaneous-emission rate constant of molecular singlet oxygen //Journal of Applied Spectroscopy. – 2017. – T. 83. – C. 903-908.
16. Callis P. R. Two-photon–induced fluorescence //Annual Review of Physical Chemistry. – 1997. – T. 48. – №. 1. – C. 271-297.