



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 1. С. 30–40

Izvestiya of Saratov University. Physics, 2024, vol. 24, iss. 1, pp. 30–40

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-1-30-40>, EDN: CNJXOT

Научная статья

УДК 535:544



Оптическая маркировка индивидуальных клеток меланомы с использованием фотоконвертируемых микрочастиц

П. А. Демина[✉], И. О. Кожевников, А. М. Абрамова, И. Ю. Горячева

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Демина Полина Анатольевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» Научного медицинского центра, polina.a.demina@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9203-582X>

Кожевников Илья Олегович, заведующий учебной лабораторией по полупроводниковой электронике Института физики, kozhevnikov_io@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8911-3084>

Абрамова Анна Михайловна, кандидат химических наук, доцент кафедры общей и неорганической химии Института химии, vostrikova2401@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0666-7685>

Горячева Ирина Юрьевна, доктор химических наук, профессор, директор Института химии, goryacheva_i@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1781-6180>

Аннотация. Фотоконвертируемые маркеры – полезный подход для проведения комплексных фундаментальных и прикладных исследований в медицине и биологии. Обычно используют фотоконвертируемые белки или красители, но они имеют ряд недостатков (низкая стабильность, необходимость генетической модификации и т. д.). Целью этого исследования была разработка безопасных и стабильных фотоконвертируемых маркеров для применения на клетках. Полимерные маркеры получали из полиэлектролитных микрокапсул методом гидротермального синтеза с флуоресцентным красителем родамином Б. Спектральные свойства изучали методами конфокальной микроскопии и спектрометрии. Фотоконверсия микрочастиц под действием лазерного излучения осуществлялась за счёт способности молекул родамина Б к гипсохромному сдвигу полосы излучения, катализируемому углеродными структурами, образующимися в оболочках микрочастиц во время гидротермального синтеза. Гидротермальный синтез, в свою очередь, существенно изменял размер и форму микрочастиц. Термообработанные полиэлектролитные микрочастицы обладали высокой стабильностью и ярким флуоресцентным сигналом относительно используемых клеточных красителей. Микрочастицы активно захватывались клетками линии мышинной меланомы V16F10, обеспечивая маркировку 70% всех клеток в популяции при соотношении 10 микрочастиц на клетку. При этом метаболическая активность не падала ниже 85%, а морфология и способность клеток V16F10 к синтезу меланина оставалась в пределах нормы. Было показано, что микрочастицы могут быть безопасно фотоконвертированы внутри клеток V16F10 под действием лазерного излучения. Предложенная стратегия полезна для комплексных исследований поведения отдельных раковых клеток меланомы в генетически и фенотипически гетерогенных популяциях, а также для изучения процесса метастазирования.

Ключевые слова: оптические метки, флуоресцентные микрочастицы, лазерное воздействие, меланин

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-23-00313, <https://rscf.ru/project/22-23-00313/>).

Для цитирования: Демина П. А., Кожевников И. О., Абрамова А. М., Горячева И. Ю. Оптическая маркировка индивидуальных клеток меланомы с использованием фотоконвертируемых микрочастиц // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2024. Т. 24, вып. 1. С. 30–40. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-1-30-40>, EDN: CNJXOT

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Optical labeling of individual melanoma cells using photoconvertible microparticles

P. A. Demina[✉], I. O. Kozhevnikov, A. M. Abramova, I. Yu. Goryacheva

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Polina A. Demina, polina.a.demina@list.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9203-582X>

Ilya O. Kozhevnikov, kozhevnikov_io@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8911-3084>

Anna M. Abramova, vostrikova2401@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0666-7685>

Irina Yu. Goryacheva, goryacheva_i@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1781-6180>

© Демина П. А., Кожевников И. О., Абрамова А. М.,
Горячева И. Ю., 2024



Abstract. Background and Objectives: Photoconvertible markers are a useful approach for conducting complex fundamental and applied research in medicine and biology. Usually, photoconvertible proteins or dyes are used for this, but have some disadvantages (low stability, requirement for genetic modification, etc.). The goal of this research was to develop safe and stable photoconvertible markers for cell application.

Materials and Methods: The polymer markers were obtained from polyelectrolyte microcapsules under hydrothermal synthesis with fluorescent dye rhodamine B. The spectral properties were studied using confocal microscopy and spectrometry. **Results:** Photoconversion of microparticles under the influence of laser irradiation was carried out due to the ability of rhodamine B molecules to hypsochromic shift the emission band, catalyzed by carbon structures formed in the shells of microparticles during hydrothermal synthesis. Hydrothermal synthesis also significantly changed the size and shape of microparticles. The thermally treated polyelectrolyte microparticles had high stability and a bright fluorescent signal. The microparticles were actively internalized by the B16F10 mouse melanoma cell line, providing labeling for 70% of all cells in the population at a ratio of 10 microparticles per cell. At the same time, metabolic activity did not decrease below 85%, and the morphology and ability of B16F10 cells to synthesize melanin remained within normal limits. It has been shown that microparticles can be safely photoconverted inside B16F10 cells under laser irradiation. **Conclusion:** The proposed strategy is useful for complex studies on the behavior of individual melanoma cancer cells in genetically and phenotypically heterogeneous populations, and also for studying a metastatic process.

Keywords: optical markers, fluorescent microparticles, laser irradiation, melanin

Acknowledgments: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-23-00313, <https://www.rscf.ru/en/project/22-23-00313/>).

For citation: Demina P. A., Kozhevnikov I. O., Abramova A. M., Goryacheva I. Yu. Optical labeling of individual melanoma cells using photoconvertible microparticles. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2024, vol. 24, iss. 1, pp. 30–40 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2024-24-1-30-40>, EDN: CNJXOT

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC0-BY 4.0)

Введение

Фотоконвертируемые метки широко востребованы во всем мире для решения ряда сложных фундаментальных и прикладных задач в биологии и медицине. К таким задачам, например, можно отнести отбор фенотипически редких и высоко инвазивных лидерных клеток в гетерогенных популяциях раковых клеток и создание очищенных линий [1], изучение поведения и миграции стволовых и прогениторных клеток в природных и биоинженерных 3D-матрицах с целью отбора наиболее подвижных клеток для регенеративной медицины [2]. Эти метки также используются для наблюдения за миграцией мелких паразитов внутри хозяина и изучения хемотаксиса на клеточном уровне [3–6].

К данным меткам можно отнести фотоконвертируемые органические красители и соединения флуорофора и тушителя через фоторасщепляемый/светочувствительный линкер [7]. Для маркировки обычно выбирают красители, у которых спектр излучения донора перекрывает спектр поглощения акцептора для обеспечения эффективного внутримолекулярного тушения флуорофора [8]. Отметим, что эти условия во многом ограничивают выбор длины волны возбуждения. Некоторые мембранные красители (такие как DiR, DiD и DiO) способны проявлять фотоконвертируемые свойства [9] и высокую флуоресцентную стабильность [10, 11]. Тем не менее, для них характерна миграция молекул красителя на мембраны соседних клеток, находящихся в тесном контакте [12], что существенно снижает точность проводимых исследований.

GFP-подобные белки, такие как Dronpa, mEosFP, Dendra, Kaede, mOrange и другие [13], способны изменять спектральное излучение при облучении ультрафиолетовым (УФ) или синим светом, что делает их востребованным инструментом для исследователей по всему миру. Однако, несмотря на явные преимущества в мечении отдельных клеточных структур (участки мембран, органеллы), эти методы предполагают генную модификацию исследуемой линии клеток [14]. Генная модификация, в свою очередь, помимо возможного существенного изменения свойств клеточной культуры, также ставит под сомнение безопасность дальнейшего использования этих полученных клеток и их клонов (в частности, стволовых клеток) в персонализированной медицине для аутотрансплантации [15]. Кроме того, некоторые GFP-подобные белки проявляют цитотоксические свойства [16]. Некоторые склонны к деградации [17] и агрегации [18]. Также для определённых клеточных культур генная модификация неприменима, так как нарушает основные свойства клеток. Это, например, характерно для клеточных линий меланомы, генная модификация которых может приводить к нарушению синтеза эндогенного меланина за счет повреждения широкого спектра генов, регулирующих выработку меланина [19]. Поэтому изучение сложных процессов миграции и метастазирования индивидуальных клеток меланомы требует подбора альтернативных методов индивидуального мечения клеток.

Достоверно известно, что полиэлектролитные флуоресцентные микрокапсулы могут ис-



пользоваться не только в качестве систем пролонгированной доставки лекарств [20], но и в качестве меток для надежной маркировки и отслеживания клеток [21]. Они легко усваиваются различными клеточными линиями и могут удерживаться ими в течение нескольких дней [22, 23]. Кроме того, возможно синтезировать микрокапсулы с фотоконвертируемыми свойствами, благодаря включению в их состав фотоконвертируемых белков [24] или красителей со склонностью к смещению пиков эмиссии в УФ-область [25–27].

Целью этой работы стало изучение влияния углеродных структур на процесс фотокатализа красителя родамин Б (RhB) и оценка изменения спектральных характеристик микрокапсул, полученных на их основе, под воздействием лазерного излучения. На примере мышинной меланомы B16F10 изучалась связь между влиянием количества микрокапсул на жизнеспособность клеток и эффективность их интернализации. Особое внимание было уделено влиянию микрокапсул на процесс синтеза меланина клетками и сохранению их жизнеспособности после маркировки с применением фотоконвертируемых микрокапсул.

1. Материалы и методы

1.1. Материалы

Поли(аллиламина гидрохлорид) (PAH, $M_w = 17.5$ кДа), натриевая соль поли(4-стиролсульфоната) (PSS, $M_w = 70$ кДа), натриевая соль декстрансульфата (DS, $M_w = 40$ кДа), родамин Б (RhB), дигидрат хлорида кальция, карбонат натрия, соляная кислота и хлорид натрия производства Sigma (Merck, Германия). Агароза RA производства Helicon (Хеликон, Россия). Фосфатно-солевой буфер (PBS), флуоресцентный краситель кальцеин (Calcein-AM) и набор для анализа пролиферации клеток МТТ производства Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, США).

Для приготовления всех растворов использовали деионизированную воду (ДВ) (удельное сопротивление более 18.2 МОм/см) из системы очистки воды Milli-Q Direct 8 (Merck, Германия).

1.2. Фотокаталитическое разложение красителя под действием УФ излучения

Кварцевую кювету с раствором красителя RhB (0.1 мг/мл, 10 мл) без и в присутствии УНС (2.5 мг/мл) при постоянном перемешивании помещали под ртутно-кварцевую лампу ДРТ-240

(мощность 240 Вт). Облучение проходило 2 ч, каждые 30 мин отбирали пробу и проводили измерение спектральных свойств.

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Shimadzu, Япония). Спектры испускания и возбуждения получали с помощью многофункционального флуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, Австралия).

1.3. Получение и характеристика термообработанных полимерных микрочастиц

Микрочастицы CaCO_3 были синтезированы по методу Володькина и соавт. [28]. Равные объемы (2 мл) эквимольных солей 0.33 М CaCl_2 и 0.33 М Na_2CO_3 смешивали при интенсивном перемешивании. Затем на микрочастицах CaCO_3 в течение 15 мин проводилась поочередная адсорбция полиэлектролитов (PAH и PSS, 1 мг/мл в 0.15 М NaCl) с последующими тремя стадиями ДВ-отмывания/центрифугирования (900 г, 1 мин). Соляная кислота использовалась для растворения частиц CaCO_3 . Затем микрокапсулы $(\text{PAH/PSS})_4$ диспергировались в водном растворе DS (1 мл, 2 мг/мл) в течение 1 ч, промывались, а затем диспергировались в водном растворе RhB (2 мл, 0.5 мг/мл). После этого суспензию помещали в автоклав высокого давления для гидротермальной обработки и нагревали при 180°C в течение 3 ч. Полученные микрочастицы трижды промывались ДВ (12000 г, 30 мин) и фильтровались через фильтр Millipore Millex-SV 5.0 мкм (Merck, Германия).

Анализ размера и морфологии поверхности термообработанных полимерных микрочастиц проводили методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с использованием MIRA II LMU производства TESCAN (Чехия). Образцы готовили путем нанесения капли частиц или суспензии капсул на кремниевую пластину и оставляли ее высыхать при комнатной температуре. Перед визуализацией образцы были покрыты золотой пленкой толщиной примерно 5 нм с использованием напылительного устройства Emitech K350 (Emitech Ltd, Англия). Изображения были сделаны при напряжении 30 кВ.

1.4. Флуоресцентная визуализация термообработанных полимерных микрочастиц и методика фотоконверсии

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (КЛСМ) проводили с использованием конфокального лазерного сканирующего



микроскопа Leica TCS SP8 X (Leica, Германия), оснащенного объективом $20\times/0.70$ NA. Для визуализации использовался импульсный лазерный источник белого света (средняя мощность 1.5 мВт), интегрированный с Leica TCS SP8 X и позволяющий выбирать длины волн возбуждения в диапазоне 470–670 нм с точностью 1 нм. Флуоресценцию RhB возбуждали линиями 488 и 554 нм, выбранными из возможных длин волн WLL. Чтобы усилить воздействие на микрокапсулы света с длиной волны 554 нм, были выбраны наименьшая возможная область сканирования (12.11×12.11 мкм) с пространственным разрешением 512×512 пикселей и скорость сканирования 10 Гц. Для КЛСМ-визуализации микрочастиц и клеток с интернализированными микрочастицами использовали следующие длины волн возбуждения: $\lambda_{ex} = 554$ нм (диапазон обнаружения 560–650 нм, красный канал) и $\lambda_{ex} = 488$ нм (диапазон обнаружения 500–545 нм, зеленый канал).

1.5. Культивация клеточной линии B16F10

Клетки мышинной меланомы (B16F10) культивировали в модифицированной среде Игла Дульбекко (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4.5 г глюкозы на 1 л) с L-глутамином (Invitrogen) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% раствора пенициллин-стрептомицина. Количество клеток определяли с использованием автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США) по стандартной методике с применением 0.4% раствора трипанового синего.

1.6. Исследование фотоконверсии термообработанных полимерных микрочастиц внутри клеток

Культуру клеток B16F10 ($2 \cdot 10^4$ клеток) высевали на чашки Петри диаметром 35 мм (Ibidi GmbH, Германия) за 24 ч до начала эксперимента. Далее клеткам добавляли микрочастицы и инкубировали во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C в течение еще 24 ч. Окрашивание клеток проводили по стандартной методике с применением витального красителя кальцеина-AM. Этот краситель может транспортироваться через клеточную мембрану в живые клетки, где подвергается действию внутриклеточных эстераз, отщепляющих ацетометокси группу. После этого кальцеин начинает флуоресцировать в зеленом спектре. Конфокальный микроскоп Leica TCS SP8 X (описанный выше) использовали

для фотоконверсии микрочастиц внутри клеток, а также для получения флуоресцентных изображений клеток до и после фотоконверсии. Также перед фотоконверсией микрочастицы внутри клетки с помощью КЛСМ проводили 3D-визуализацию выбранной клетки с целью подтверждения локализации микрочастицы внутри клеточной цитоплазмы. Параметры съемки клеток с микрочастицами были аналогичны описанным выше для фотоконверсии.

1.7. МТТ-тест

Клеточная культура высаживалась на 96-луночный планшет в количестве $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировалась в течение ночи во влажной атмосфере 5% CO_2 при 37°C . Затем в лунки добавляли по 1, 5 и 10 термообработанных полимерных микрочастиц на клетку и инкубировали в течение 24 ч. После этого культуральную среду заменяли на 100 мкл свежей с добавлением 10% раствора МТТ (12 мМ) и инкубировали планшет в течение 3 ч при 37°C . Культуру клеток без добавления микрочастиц использовали в качестве положительного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали питательную среду с раствором МТТ без клеток. После инкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора SDS-HCl и инкубировали ещё 4 ч для растворения кристаллов формазана. Наконец, оптическая плотность каждой лунки измерялась с помощью многомодового микропланшетного считывателя Synergy H1 (BioTek, США) при возбуждении 570 нм.

1.8. Исследование интернализации термообработанных полимерных микрочастиц

Клеточную линию высевали на 96-луночный планшет в количестве $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировали в идентичных условиях. После инкубации к клеткам добавляли разработанные термообработанные микрочастицы в количестве 1, 5 и 10 частиц на клетку и инкубировали в течение 24 ч для обеспечения их интернализации. Затем культуральную среду забирали, клетки 3 раза промывали фосфатным буфером для удаления незахваченных частиц и добавляли 100 мл свежей среды. Для окрашивания клеток в каждую лунку добавляли по 1 мкл разведенного в 20000 раз исходного раствора кальцеина и инкубировали в течение 30 мин. После инкубации питательную среду удаляли, клетки промывали фосфатным буфером и снима-



ли с планшета с использованием 0.05% раствора трипсина с ЭДТА. Затем клетки переносили в фосфатный буфер и исследовали с применением проточного цитометра с визуализацией ImageStream X Mark II Imaging (Luminex, США). Измерение проводили с использованием программного обеспечения INSPIRE со следующими настройками оборудования: увеличение 40×; низкий расход/высокая чувствительность; лазер 488 нм; мощность лазера 50 мВт. Исследования интернализации проводили в трех повторностях для каждой концентрации добавленных микро-частиц (1, 5 и 10 частиц на клетку). В каждой повторности анализировали 1000 объектов. Количество интернализированных частиц определяли с помощью функции Spot Count программного обеспечения IDEAS (Luminex, США).

2. Результаты и их обсуждение

Известно, что во время фотокаталитической реакции RhB может претерпевать гипсохромный сдвиг полосы излучения посредством реакции деалкилирования, приводящий к сдвигу на 10–15 нм за одну стадию деалкилирования [29, 30]. Также сообщалось, что такая реакция может фотокатализироваться тонкой пленкой TiO₂ [30, 31] или наночастицами TiO₂ [32]. Кроме того, недавно было показано, что углеродные наноструктуры (УНС) проявляют значительную фотокаталитическую активность [33–35]. Поэтому наш подход заключался в том, чтобы объединить RhB и УНС и исследовать, может ли процесс фотоконверсии RhB катализироваться УНС.

На первом этапе работы проводилось изучение изменения спектральных свойств RhB под действием УФ-излучения. Для этого водный раствор красителя без и в присутствии УНС, полученных из DS, облучали УФ лампой. УНС на основе DS были выбраны благодаря их высокой фотокаталитической активности [36]. Перед началом процесса УФ облучения растворы выдерживали в темноте в течение 30 мин для установления равновесия процессов адсорбции и десорбции на поверхности образцов.

В результате УФ облучения изменений в спектрах возбуждения для чистого раствора красителя не наблюдалось (рис. 1, I, а), в то время как для раствора красителя с УНС наблюдался гипсохромный эффект в спектрах возбуждения (рис. 1, I, б). Сдвиг максимума возбуждения через 60 мин УФ облучения составил 48 нм, а через 120 мин 54 нм. Аналогичная тенденция наблюдается в спектрах испускания: никаких изменений

в растворе чистого красителя на протяжении 120 мин эксперимента (рис. 1, II, а, б), в то время как в присутствии УНС гипсохромный эффект в спектрах испускания родамина через 120 мин УФ воздействия составил 52 нм (рис. 1, II, в, г). Также следует отметить, что изменение интенсивности испускания при длине возбуждения 520 нм для чистого родамина Б через 120 мин составило не более 10% (рис. 1, III, а), в то время как для красителя с УНС интенсивность испускания уже через 30 мин УФ облучения уменьшилась в 10 раз, а после 120 мин и вовсе стала незначительной (рис. 1, III, б).

Полученные результаты стабильности флуоресцентного красителя RhB под действием УФ-облучения согласуются с литературными данными [37], притом УНС на основе натриевой соли декстрана сульфата демонстрировали высокую фотокаталитическую активность [36]. Поэтому на следующем этапе создавались композитные термообработанные полимерные микро-частицы, модифицированные RhB, которые впоследствии будут выступать в качестве микро-реакторов для фотоконверсии красителя под действием лазерного излучения.

Общая цель синтеза заключалась в том, чтобы сблизить УНС и RhB, одновременно удерживая их в наноразмерных порах полиэлектролитной матрицы (рис. 2, а). Композитные микро-частицы были получены методом гидротермального синтеза *in situ* [38]. Для этого на первоначально сферические микро-частицы CaCO₃ методом последовательной абсорбции наносились четыре бислоя противоположно заряженных полиэлектролитов (PAH/PSS) [39]. Затем частицы CaCO₃ растворяли, а полимерные оболочки выдерживались в водном растворе DS, который использовался в качестве дополнительного источника сульфогрупп для лучшей адсорбции катионного RhB, а также в качестве источника углерода для синтеза УНС. Далее микро-капсулы центрифугировали и диспергировали в водном растворе RhB. После этого суспензию микро-капсул подвергали гидротермальной обработке при 180°C в течение 3 ч [40]. Затем термообработанные микро-частицы промывали в ДВ для удаления избытка RhB. В результате синтеза были получены термообработанные микро-частицы с инкапсулированным красителем RhB.

За счет термообработки размер частиц уменьшился с исходных 6.5 ± 1.2 мкм (рис. 2, б) до 2.4 ± 0.5 мкм (рис. 2, в, г), инкапсуляция RhB произошла в результате сжатия многослойного

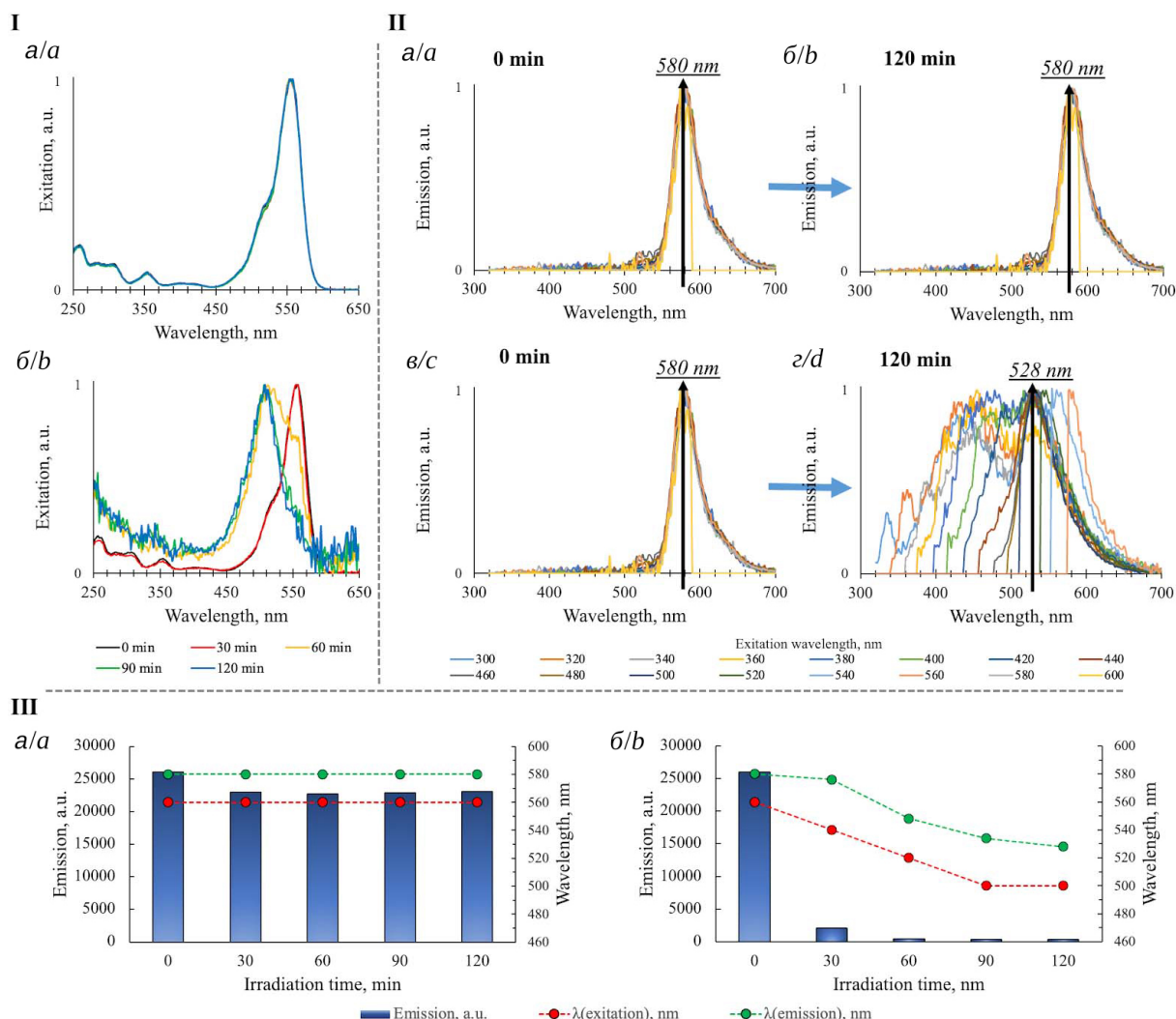


Рис. 1. I – спектры возбуждения чистого раствора флуоресцентного красителя RhB (а) и раствора красителя с УНС (б). II – спектры испускания чистого раствора флуоресцентного красителя RhB (а, б) и раствора красителя с УНС (в, г) в начальную точку УФ-обработки и после 120 мин соответственно. III – гистограмма распределения интенсивности испускания ($\lambda(\text{возбуждение})=520$ нм) во времени и изменение положения максимумов возбуждения и испускания чистого раствора флуоресцентного красителя RhB (а) и раствора красителя с УНС (б) (цвет онлайн)

Fig. 1. I – excitation spectra of fluorescent dye RhB pure solution (a) and dye solution with carbon nanostructures (b). II – emission spectra of fluorescent dye RhB pure solution (a, b) and dye solution with carbon nanostructures (c, d) before and after 120 min UV-irradiation, respectively. III – histogram of emission intensity time distribution ($\lambda(\text{excitation})=520$ nm) and changes in excitation and emission maxima position of fluorescent dye RhB pure solution (a) and dye solution with carbon nanostructures (b) (color online)

полиэлектролита. Также изменилась и морфология частиц: исходные микрокапсулы приобрели четкую сферическую форму после гидротермального синтеза (рис. 2, б–г). Полученные микрочастицы обладали яркой флуоресценцией в диапазоне 560–650 нм (рис. 2, д), что было подтверждено с помощью КЛСМ. После локального воздействия лазера с длиной волны 554 нм и плотностью мощности лазерного излучения 73 кВт/см² (рис. 2, д, выделенные квадраты) выбранные микрочастицы приобрели флуоресценцию в диапазоне 500–545 нм

(рис. 2, е, выделенные квадраты). Данное изменение флуоресценции было также подтверждено λ -сканами, полученными при длине волны возбуждения $\lambda_{ex} = 488$ нм (рис. 2, ж). Гипсохромный сдвиг максимума эмиссии указывает на эффективность процесса фотоконверсии, что обуславливает перспективность применения полученных флуоресцентных микрочастиц для оптической маркировки индивидуальных клеток.

На следующем этапе исследования была проведена подробная оценка возможности при-

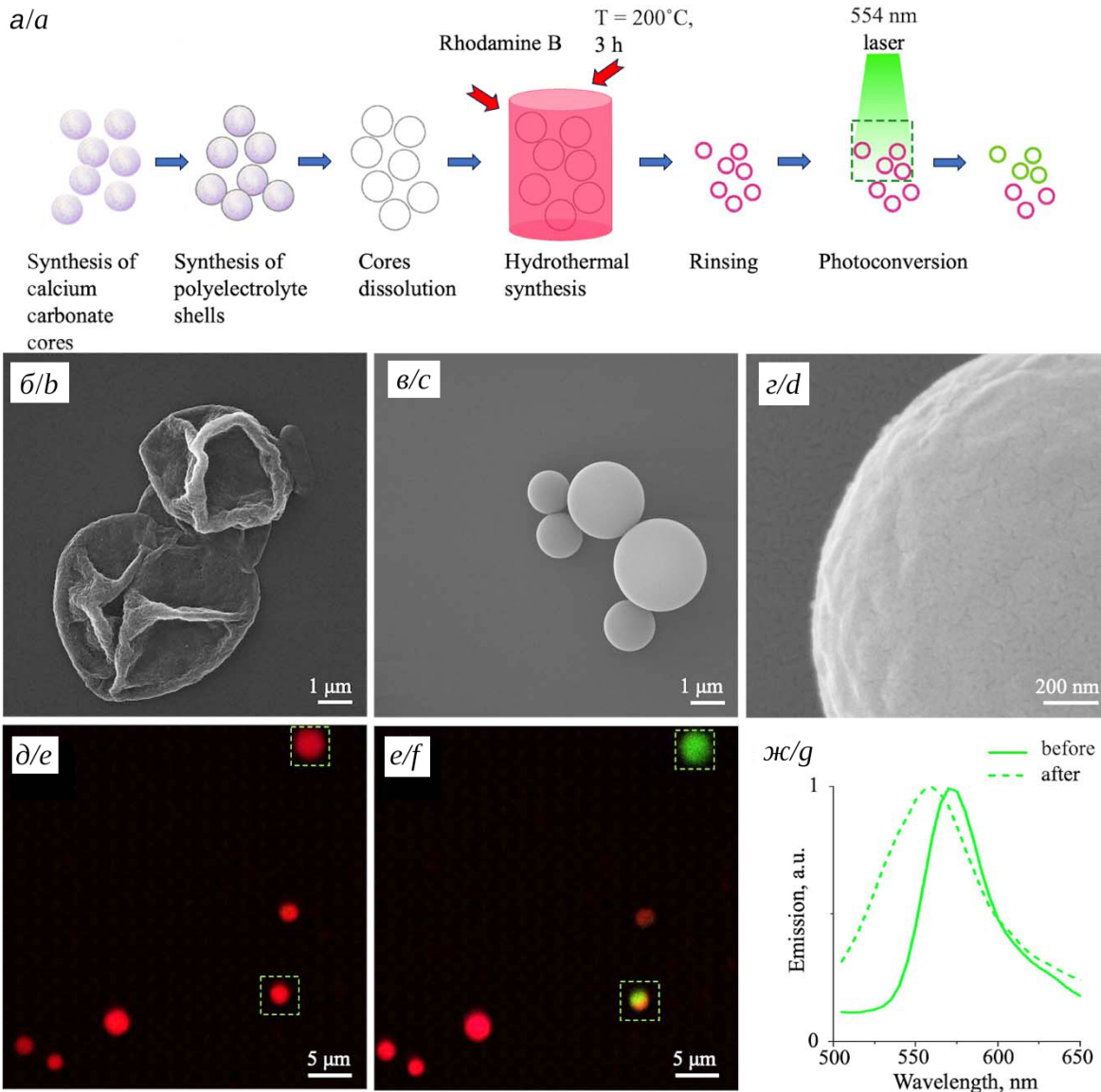


Рис. 2. Схема получения полимерных термообработанных микрочастиц (а). СЭМ изображение исходной полимерной микрокапсулы (б). СЭМ изображения полимерных термообработанных микрочастиц при различных увеличениях (в, г). КЛСМ изображения полимерных термообработанных микрочастиц до и после фотоконверсии с помощью 554 нм лазерного излучения (красный цвет соответствует $\lambda_{ex} = 554$ нм и $\lambda_{em} = 560-650$ нм, зеленый цвет соответствует $\lambda_{ex} = 488$ нм и $\lambda_{em} = 500-545$ нм) (д, е). Спектры испускания ($\lambda_{ex} = 488$ нм) полимерных термообработанных микрочастиц до и после фотоконверсии с помощью 554 нм лазерного излучения (ж) (цвет онлайн)

Fig. 2. Polymer thermal treated microparticles preparation scheme (a). SEM-image of initial polymer microcapsules (b). SEM-images of polymer thermal treated microparticles under different magnification (c, d). CLSM-images of polymer thermal treated microparticles before and after photoconversion procedure under 554 nm laser irradiation, respectively (red colour corresponds to $\lambda_{ex} = 554$ nm and $\lambda_{em} = 560-650$ nm, green colour corresponds to $\lambda_{ex} = 488$ nm and $\lambda_{em} = 500-545$ nm) (e, f). Emission spectra ($\lambda_{ex} = 488$ nm) of polymer thermal treated microparticles before and after photoconversion procedure under 554 nm laser irradiation (g) (color online)

менения разработанных фотопереключаемых микрочастиц в качестве меток при маркировке клеток меланомы мыши В16F10. Для успешной и эффективной маркировки клеток необходимо подобрать оптимальное соотношение частиц к клеткам, чтобы обеспечить желаемую степень

интернализации, не оказывая при этом негативного воздействия на отдельные клетки и всю клеточную популяцию.

В связи с этим первоначально было оценено влияние количества микрочастиц (0, 1, 5, и 10 частиц на клетку) на жизнеспособность кле-



точной культуры V16F10 по анализу параметров метаболической активности. Было обнаружено, что лишь соотношение 10 частиц на клетку приводило к значимому снижению метаболической активности (рис. 3, а). Полученные данные согласуются с данными других авторов, которые описывают, что полимерные частицы на основе PAA/PSS обладали минимальной токсичностью при низком соотношении концентраций (1–10 частиц на клетку). Выживаемость клеток оставалась в пределах нормы даже при добавлении микрочастиц, содержащих RhB [40, 41].

Известно, что интернализация микрочастиц обычно длится около часа после закрепления частицы на клеточной мембране [42]. Однако скорость и эффективность поглощения полимерных частиц может существенно различаться для разных типов клеток и зависеть как от подвижности клеток, так и от их склонности к фагоцитозу [42]. Физико-химические свойства микрочастиц и их соотношение к клеткам также оказывают существенное влияние на этот процесс [43]. Основываясь на приведенных данных, далее детально исследовалось влияние количества разра-

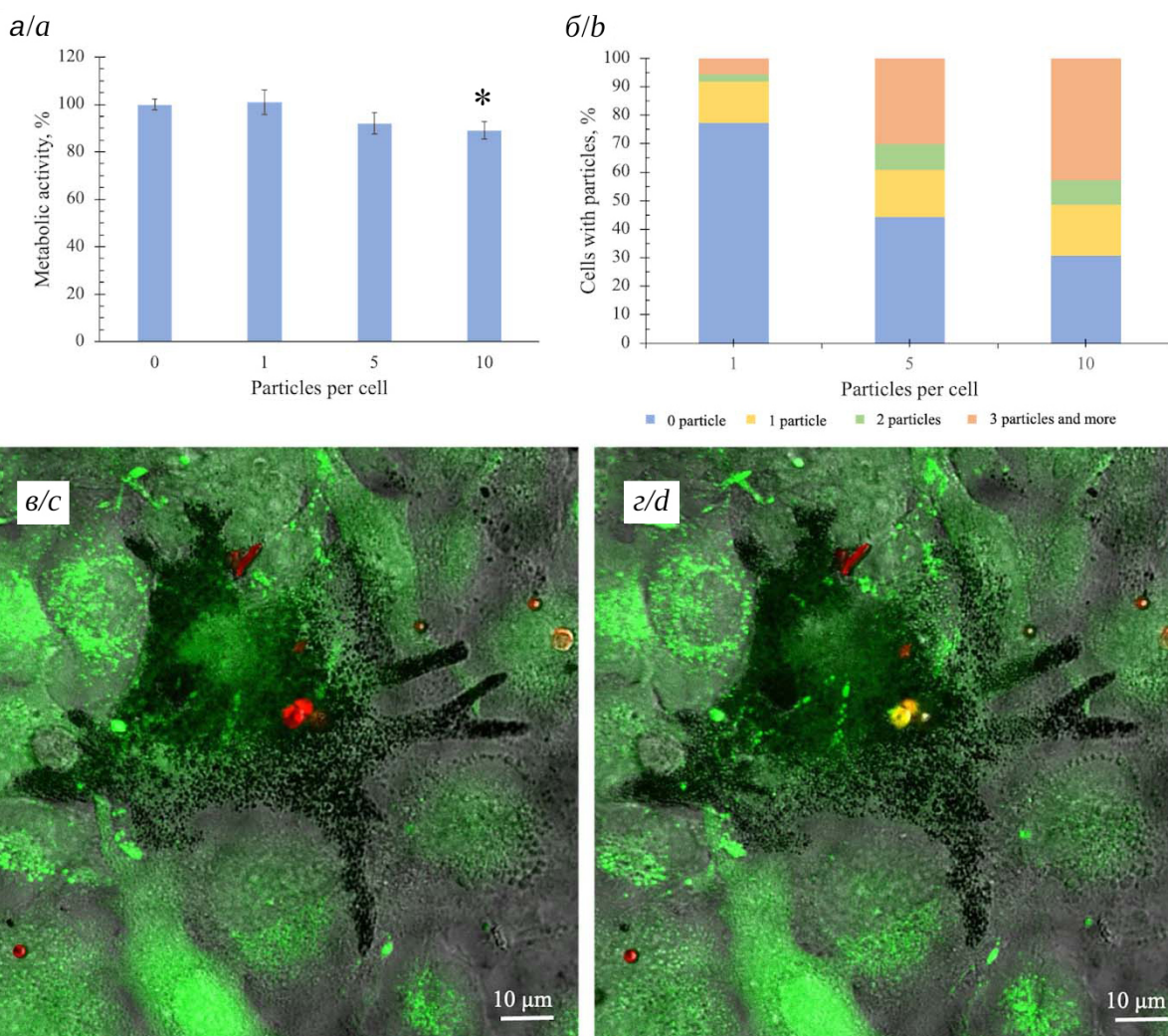


Рис. 3. Зависимость метаболической активности клеток от количества добавленных частиц. Звездочка (*) указывает на значительные отличия от контрольной группы клеток (0 частиц на клетку). Статистический анализ проводился методом ANOVA с последующим тестом Тьюки ($p < 0.05$) (а). Зависимость количества клеток, интернализировавших частицы, от концентрации добавленных частиц (б). Клетка V16F10 до и 6 ч после фотопереключения интернализированных микрочастиц соответственно (в, г) (цвет онлайн)

Fig. 3. Cell metabolic activity dependence of cells on the number of added microparticles. The asterisk (*) indicates significant differences from the control cell group (0 capsules per cell). Statistical analysis was performed by ANOVA followed by the Tukey test ($p < 0.05$) (a). Dependence of the number of cells that internalized the particles on the concentration of the added microparticles (b). V16F10 cell before and 6 h after photoconversion procedure of internalized microparticles, respectively (c, d) (color online)



батываемых фотопереключаемых частиц на эффективность их интернализации. Было показано, что количество интернализированных микрочастиц находилось в прямой зависимости от общего соотношения частиц к клеткам (рис. 3, б). Эффективность интернализации для соотношения 5 и 10 частиц на клетку достигала 55 и 70% соответственно.

На последнем этапе исследования была оценена возможность маркировки клеток линии V6F10 с помощью индуцированной лазером фотоконверсии захваченных флуоресцентных микрочастиц. Интернализированные капсулы до фотопереключения четко идентифицировались в цитоплазме клеток, окрашенных кальцеином (рис. 3, в). Отметим также, что клетки имели типичную морфологию. Выбранное количество капсул было фотоконвертировано с помощью лазерного излучения (рис. 3, г). Фотоконверсия оставалась стабильной, а переключенные капсулы были хорошо видны даже спустя 6 ч. Сохранение яркого флуоресцентного сигнала от цитоплазмы клеток (от кальцеина) свидетельствовало о том, что клетка оставалась живой как сразу после фотоконвертации, так и спустя 6 ч. Этот результат является особенно значимым, так как лазерное воздействие само по себе может вызвать гибель клетки меланомы из-за наличия в ней эндогенного меланина, способного поглощать световую энергию в широком диапазоне и конвертировать её в тепло [44]. Поэтому параметры и условия лазерного воздействия должны быть тщательно подобраны. В данном случае гибель клеток не наблюдалась благодаря точной фокусировке лазера в конфокальном микроскопе непосредственно на микрочастице. Лишь минимальный участок цитоплазмы и мембраны подвергался лазерному воздействию, что, вероятно, было недостаточно для критического повышения температуры внутри клетки. Стоит также отметить, что инкубация микрочастиц с клетками, равно как и фотоконверсия, не приводила к нарушению синтеза меланина в клетках линии V16F10, что наглядно продемонстрировано на рис. 3, в, г.

Выводы

Термообработанные полиэлектролитные микрочастицы с родамином Б обладают высокой стабильностью и ярким флуоресцентным сигналом, что делает их перспективным маркером для отслеживания клеток. Возможность фотоконверсии, индуцированной лазерным

излучением, открывает дополнительные возможности для маркировки отдельных клеток. Процесс фотоконверсии микрочастиц связан со способностью родамина Б к гипсохромному сдвигу полосы излучения. Углеродные структуры, образующиеся в оболочках микрочастиц во время гидротермального синтеза, способны выступать в качестве катализатора, ускоряя процесс деалкилирования родамина Б. Помимо этого, гидротермальный синтез приводит к существенному уменьшению размера микрочастиц и изменению формы, что в целом может являться преимуществом для их дальнейшего применения в клеточных экспериментах.

Клетки линии мышинной меланомы V16F10 активно захватывают флуоресцентные фотоконвертируемые микрочастицы, обеспечивая высокую степень маркировки. При этом минимальный токсический эффект (снижение метаболической активности до 85%) проявляется только при соотношении 10 микрочастиц на клетку, что тем не менее не является критичным для проведения клеточных экспериментов, но должно быть учтено при планировании исследований. Также не было выявлено изменения морфологического состояния клеток меланомы или нарушения синтеза меланина под действием интернализированных частиц. Показано, что термообработанные микрочастицы могут быть фотоконвертированы внутри клеток V16F10 под действием лазерного излучения, не вызывая при этом гибели маркированных клеток.

В целом все представленные данные свидетельствуют о том, что термообработанные полиэлектролитные микрочастицы, содержащие родамин Б, могут стать перспективным подходом для изучения процессов миграции клеток меланомы, что открывает широкие перспективы их применения в качестве маркера для исследования процессов метастазирования.

Список литературы/References

1. Konen J., Summerbell E., Dwivedi B., Galior K., Hou Y., Rusnak L., Chen A., Saltz J., Zhou W., Boise L. H., Vertino P., Cooper L., Salaita K., Kowalski J., Marcus A. I. Image-guided genomics of phenotypically heterogeneous populations reveals vascular signalling during symbiotic collective cancer invasion. *Nat. Commun.*, 2017, vol. 8, article no. 15078. <https://doi.org/10.1038/ncomms15078>
2. Caires H. R., Gomez-Lazaro M., Oliveira C. M., Gomes D., Mateus D. D., Oliveira C., Barrias C. C., Barbosa M. A., Almeida C. R. Finding and tracing human



- MSC in 3D microenvironments with the photoconvertible protein Dendra2. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, article no. 10079. <https://doi.org/10.1038/srep10079>
3. Adam V., Berardozi R., Byrdin M., Bourgeois D. Phototransformable Fluorescent Proteins: Future Challenges. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, vol. 20, pp. 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.016>
 4. Pletnev S., Shcherbakova D. M., Subach O. M., Pletneva N. V., Malashkevich V. N., Almo S. C., Dauter Z., Verkhusha V. V. Orange Fluorescent Proteins: Structural Studies of LSSmOrange, PSmOrange and PSmOrange2. *PLoS ONE*, 2014, vol. 9, article no. e99136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099136>
 5. Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zaraisky A., Tan P., Kajava A. V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P. “Fluorescent Timer”: Protein That Changes Color with Time. *Science*, 2000, vol. 290, article no. 1585. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1585>
 6. Wachter R. M., Watkins J. L., Kim H. Mechanistic Diversity of Red Fluorescence Acquisition by GFP-like Proteins. *Biochemistry*, 2010, vol. 49, iss. 35, pp. 7417–7427. <https://doi.org/10.1021/bi100901h>
 7. Pellois J.-P., Hahn M. E., Muir T. W. Simultaneous Triggering of Protein Activity and Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126, pp. 7170–7171. <https://doi.org/10.1038/srep10079>
 8. Johansson M. K., Cook R. M. Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes. *Chem A Eur. J.*, 2003, vol. 9, iss. 15, pp. 3466–3471. <https://doi.org/10.1002/chem.200304941>
 9. Carlson A. L., Fujisaki J., Wu J., Runnels J. M., Turcotte R., Celso C. Lo, Scadden D. T., Strom T. B., Lin C. P. Tracking Single Cells in Live Animals Using a Photoconvertible Near-Infrared Cell Membrane Label. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, article no. e69257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069257>
 10. Basel M. T. Lipophilic Near-Infrared Dyes for In Vivo Fluorescent Cell Tracking. In: Basel M., Bossmann S., eds. *Cell Tracking. Methods in Molecular Biology*, 2020, vol. 2126. Humana, New York, NY, 2020, pp. 33–43. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0364-2_4
 11. Yeo D., Wiraja C., Chuah Y. J., Gao Y., Xu C. A Nanoparticle-based Sensor Platform for Cell Tracking and Status/Function Assessment. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, article no. 14768. <https://doi.org/10.1038/srep14768>
 12. Lassailly F., Griessinger E., Bonnet D. “Microenvironmental contaminations” induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive *in vitro* and *in vivo* cell tracking. *Blood*, 2010, vol. 115, iss. 26, pp. 5347–5354. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-224030>
 13. Shcherbakova D. M., Sengupta P., Lippincott-Schwartz J., Verkhusha V. V. Photocontrollable Fluorescent Proteins for Superresolution Imaging. *Annu. Rev. Biophys.*, 2014, vol. 43, pp. 303–329. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022836>
 14. Sattarzadeh A., Saberianfar R., Zipfel W. R., Menassa R., Hanson M. R. Green to red photoconversion of GFP for protein tracking *in vivo*. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, article no. 11771. <https://doi.org/10.1038/srep11771>
 15. Gai M., Frueh J., Kudryavtseva V. L., Yashchenok A. M., Sukhorukov G. B. Poly(lactic Acid Sealed Polyelectrolyte Multilayer Microchambers for Entrapment of Salts and Small Hydrophilic Molecules Precipitates. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, vol. 9, iss. 19, pp. 16536–16545. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b03451>
 16. Shemiakina I. I., Ermakova G. V., Cranfill P. J., Baird M. A., Evans R. A., Souslova E. A., Staroverov D. B., Gorokhovatsky A. Y., Putintseva E. V., Gorodnicheva T. V., Chepurnykh T. V., Strukova L., Lukyanov S., Zaraisky A. G., Davidson M. W., Chudakov D. M., Shcherbo D. A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity. *Nat. Commun.*, 2012, vol. 3, article no. 1204. <https://doi.org/10.1038/ncomms2208>
 17. Zhang L., Gurskaya N. G., Merzlyak E. M., Staroverov D. B., Mudrik N. N., Samarkina O. N., Vinokurov L. M., Lukyanov S., Lukyanov K. A. Method for real-time monitoring of protein degradation at the single cell level. *Biotechniques*, 2007, vol. 42, iss. 4, pp. 446–450. <https://doi.org/10.2144/000112453>
 18. Miyawaki A. Proteins on the move: Insights gained from fluorescent protein technologies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, vol. 12, pp. 656–668. <https://doi.org/10.1038/nrm3199>
 19. Bajpai V. K., Swigut T., Mohammed J., Naqvi S., Arreola M., Tycko J., Kim T. C., Pritchard J. K., Bassik M. C., Wysocka J. A genome-wide genetic screen uncovers determinants of human pigmentation. *Science*, 2023, vol. 381, article no. aede6658. <https://doi.org/10.1126/science.aede6289>
 20. Kopach O., Zheng K., Dong L., Sapelkin A., Voitenko N., Sukhorukov G. B., Rusakov D. A. Nano-engineered microcapsules boost the treatment of persistent pain. *Drug Deliv.*, 2018, vol. 25, pp. 435–447. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1431981>
 21. Sapach A. Y., Sindeeva O. A., Nesterchuk M. V., Tsitirina A. A., Mayorova O. A., Prikhozhenko E. S., Verkhovskii R. A., Mikaelyan A. S., Kotelevtsev Y. V., Sukhorukov G. B. Macrophage In Vitro and In Vivo Tracking via Anchored Microcapsules. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, vol. 14, iss. 46, pp. 51579–51592. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c12004>
 22. Sukhorukov G. B., Rogach A. L., Zebli B., Liedl T., Skirtach A. G., Köhler K., Antipov A. A., Gaponik N., Susha A. S., Winterhalter M., Parak W. J. Nano-engineered Polymer Capsules: Tools for Detection, Controlled Delivery, and Site-Specific Manipulation. *Small*, 2005, vol. 1, iss. 2, pp. 194–200. <https://doi.org/10.1002/sml.200400075>
 23. Timin A. S., Gould D. J., Sukhorukov G. B. Multi-layer microcapsules: Fresh insights and new applications. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2017, vol. 14, iss. 5, pp. 583–587. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1285279>
 24. Harrington W. N., Novoselova M. V., Bratashov D. N., Khlebtsov B. N., Gorin D. A., Galanzha E. I., Zharov V. P. Photoswitchable Spasers with a Plasmonic Core and Photoswitchable Fluorescent Proteins. *Sci.*



- Rep., 2019, vol. 9, article no. 12439. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48335-6>
25. Riehl M., Harms M., Göttel B., Kubas H., Schiroky D., Mäder K. Acid-induced degradation of widely used NIR dye DiR causes hypsochromic shift in fluorescence properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2019, vol. 132, pp. 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.031>
26. Li J., Ji A., Lei M., Xuan L., Song R., Feng X., Lin H., Chen H. Hypsochromic Shift Donor–Acceptor NIR-II Dye for High-Efficiency Tumor Imaging. *J. Med. Chem.*, 2023, vol. 66, iss. 12, pp. 7880–7893. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00253>
27. Takemura K., Imato K., Ooyama Y. Mechanofluorochromism of (D– π) 2 A-type azine-based fluorescent dyes. *RSC Adv.*, 2022, vol. 12, pp. 13797–13809. <https://doi.org/10.1039/D2RA02431D>
28. Volodkin D. V., Petrov A. I., Prevot M., Sukhorukov G. B. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation. *Langmuir*, 2004, vol. 20, iss. 8, pp. 3398–3406. <https://doi.org/10.1021/la036177z>
29. Evans N. A. Photofading of Rhodamine Dyes: III. The Effect of Wavelength on the Fading of Rhodamine B. *Text. Res. J.*, 1973, vol. 43, iss. 12, pp. 697–700. <https://doi.org/10.1177/004051757304301201>
30. Butkevich A. N., Bossi M. L., Lukinavicius G., Hell S. W. Triarylmethane Fluorophores Resistant to Oxidative Photobleaching. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, vol. 141, iss. 2, pp. 981–989. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11036>
31. Cassidy J. P., Tan J. A., Wustholz K. L. Probing the Aggregation and Photodegradation of Rhodamine Dyes on TiO₂. *J. Phys. Chem. C*, 2017, vol. 121, iss. 29, pp. 15610–15618. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b04604>
32. Lee S. Y., Kang D., Jeong S., Do H. T., Kim J. H. Photocatalytic Degradation of Rhodamine B Dye by TiO₂ and Gold Nanoparticles Supported on a Floating Porous Polydimethylsiloxane Sponge under Ultraviolet and Visible Light Irradiation. *ACS Omega*, 2020, vol. 5, iss. 8, pp. 4233–4241. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04127>
33. Zhou Y., Zahran E. M., Quiroga B. A., Perez J., Mintz K. J., Peng Z., Liyanage P. Y., Pandey R. R., Chusuei C. C., Leblanc R. M. Size-dependent photocatalytic activity of carbon dots with surface-state determined photoluminescence. *Appl. Catal. B Environ.*, 2019, vol. 248, pp. 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.02.019>
34. Xu N., Huang H., Ouyang H., Wang H. Preparation of the heterojunction catalyst N-doping carbon quantum dots/P25 and its visible light photocatalytic activity. *Sci. Rep.*, 2019, vol. 9, article no. 9971. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46277-7>
35. Phang S. J., Tan L.-L. Recent advances in carbon quantum dot (CQD)-based two dimensional materials for photocatalytic applications. *Catal. Sci. Technol.*, 2019, vol. 9, pp. 5882–5905. <https://doi.org/10.1039/C9CY01452G>
36. Stepukhovich M. S., Abramova A. M., Bakal A. A., Goryacheva I. Yu. Novel degradable photocatalysts for wastewater treatment. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2023, vol. 23, iss. 2, pp. 148–158 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2023-23-2-148-158>
37. Chen F., Liu W., Li H., Deng T., Xing B., Liu F. Rhodamine Fluorophores for STED Super-Resolution Biological Imaging. *Anal. Sens.*, 2022, vol. 2, iss. 3, article no. e202100066. <https://doi.org/10.1002/anse.202100066>
38. Demina P. A., Sindeeva O. A., Abramova A. M., Prikhozhenko E. S., Verkhovskii R. A., Lengert E. V., Sapelkin A. V., Goryacheva I. Y., Sukhorukov G. B. Fluorescent Convertible Capsule Coding Systems for Individual Cell Labeling and Tracking. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, vol. 13, iss. 17, pp. 19701–19709. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c02767>
39. Sukhorukov G. B., Donath E., Davis S., Lichtenfeld H., Caruso F., Popov V. I., Möhwald H. Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: A novel approach to colloid design. *Polym. Adv. Technol.*, 1998, vol. 9, iss. 10–11, pp. 759–767. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199810\)9:10/11<759::AID-PAT846>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199810)9:10/11<759::AID-PAT846>3.0.CO;2-Q)
40. An Z., Kavanoor K., Choy M. L., Kaufman L. J. Polyelectrolyte microcapsule interactions with cells in two- and three-dimensional culture. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2009, vol. 70, iss. 1, pp. 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.12.022>
41. Gao H., Goriacheva O. A., Tarakina N. V., Sukhorukov G. B. Intracellularly Biodegradable Polyelectrolyte/Silica Composite Microcapsules as Carriers for Small Molecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, vol. 8, iss. 15, pp. 9651–9661. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b01921>
42. Chen Y., Sukhorukov G. B., Novak P. Visualising nanoscale restructuring of a cellular membrane triggered by polyelectrolyte microcapsules. *Nanoscale*, 2018, vol. 10, pp. 16902–16910. <https://doi.org/10.1039/C8NR03870H>
43. Brueckner M., Jankuhn S., Jülke E.-M., Reibetanz U. Cellular interaction of a layer-by-layer based drug delivery system depending on material properties and cell types. *Int. J. Nanomedicine*, 2018, vol. 13, pp. 2079–2091. <https://doi.org/10.2147/IJN.S153701>
44. Madkhali N., Alqahtani H. R., Al-Terary S., Laref A., Hassib A. Control of optical absorption and fluorescence spectroscopies of natural melanin at different solution concentrations. *Opt. Quantum Electron.*, 2019, vol. 51, article no. 227. <https://doi.org/10.1007/s11082-019-1936-3>

Поступила в редакцию 30.11.2023; одобрена после рецензирования 15.12.2023; принята к публикации 20.12.2023
The article was submitted 30.11.2023; approved after reviewing 15.12.2023; accepted for publication 20.12.2023