

## ЛОКАЛЬНАЯ ТЕРМОАКТИВАЦИЯ ОДИНОЧНЫХ ЖИВЫХ КЛЕТОК И ИЗМЕРЕНИЕ ГРАДИЕНТОВ ТЕМПЕРАТУРЫ В МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ОБЪЕМАХ

© 2017 г. О.Ю. Антонова, О.Ю. Кочеткова, Л.И. Шабарчина, В.Э. Цеев

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики клетки РАН,  
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

*E-mail: zeebvad@gmail.com*

Поступила в редакцию 11.04.17 г.

Обзор посвящен новому, уникальному и перспективному методу создания прецизионного локального температурного градиента в микро- и нанобъеме, позволяющему нагреть одиночную клетку, а также исследовать экзогенные и эндогенные внутриклеточные процессы. Проведены ретроспективный анализ и систематизация передовых разработок в области исследования внутриклеточной температуры. Подробно описана система, состоящая из оптического наноагрегатора (с использованием разогрева инфракрасным лазерным лучом металлических частиц или воды), позволяющего устанавливать стационарный температурный градиент (вплоть до 70°C на расстоянии 20 мкм от источника тепла) и флуоресцентного микротермометра, измеряющего температуру в микрообъемах с миллисекундным разрешением. Особое внимание уделено физическому, в частности, термодинамическому описанию температуры (как параметра макро-, микро- и наносистемы) и описанию механизма индуцирования ультралокального температурного градиента. Собраны результаты по реализации локального нагрева клеток и по термоиндуцированным внутриклеточным процессам (среди которых наиболее впечатляющей – ускоренный (порядка 10 мкм/мин) рост нейритов (отростков нейронов) по тепловому градиенту), описаны абсолютно новые перспективы, открываемые «термическим управлением» клетки.

*Ключевые слова: локальный температурный градиент, микроагрегатор, флуоресцентный микротермометр, наноалмазы, квантовые точки, термогенез.*

Живая клетка представляет собой сложнейшую динамическую структуру. И, несмотря на интенсивные усилия цитологов, молекулярных биологов, генетиков, наши знания о ней и механизмах ее функционирования все еще весьма ограничены. Обусловлено это сложностью изучения чрезвычайно быстрых, локальных, неравновесных термодинамических и физико-химических процессов, протекающих в различных структурах клетки *in vivo*.

В живой клетке осуществляется множество процессов, которые по определению связаны с локальным превращением энергии. Эти процессы должны сопровождаться локальным выделением тепла из общих термодинамических принципов. К таким процессам относятся протекание электрических токов по градиентам электрохимических потенциалов через открытые одиночные ионные каналы, работа активных

трансмембранных ионных помп, циклическая закачка и выброс ионов  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных компартментов, потеря митохондриями с помощью особых белков (разобщающие белки) своего трансмембранного потенциала и превращение их в мощные мгновенные источники тепла и т.д. Локальное выделение тепла, несомненно, должно сопровождаться возникновением градиентов температуры внутри клетки. Могут ли быть они измеримыми при тех параметрах теплопроводности/теплоемкости внутриклеточной среды и потенциальной мощности эндогенных источников тепла внутри клетки? Современная неравновесная термодинамика говорит, что это возможно. Например, расчеты показывают, что внутри открытых ионных каналов температура, предположительно, может расти на десятки градусов Цельсия [1]. Если это так, то температура может превратиться в очень важную локальную переменную, вовлеченную во внутриклеточные сигнальные пути с невероятным практическим потенциалом в модулировании и инициации внутриклеточ-

Сокращения: Eu-TTA – теноилтрифторацетонат тригидрат европия (III), GFP – зеленый флуоресцентный белок, КТ – квантовые точки.

ных процессов в микро- и нанобъемах живой клетки.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРА – ТЕМПЕРАТУРЫ ДЛЯ МИКРО- И НАНОСИСТЕМ

До недавнего времени полагалось, что макроскопический равновесный параметр температура является внешней, медленно меняющейся переменной применительно к одиночной живой клетке (в сравнении с быстрыми внутриклеточными процессами). Это было связано большей частью с тем, что температура сложна в своем корректном определении в микро- и нанобъемах в отличие от других широко используемых внутриклеточных локальных переменных (таких как трансмембранный потенциал или внутриклеточная концентрация ионов кальция). Тем не менее современные представления неравновесной термодинамики и критический взгляд на необходимое условие макроскопичности системы и термодинамического равновесия (при котором температура может быть теоретически достоверно определена и измерена) приводят к заключению, что требование макроскопичности системы не имеет никакого отношения к ее физическим размерам. Это условие определяется лишь макроскопическим числом составляющих ее частиц и временем релаксации такой системы к локальному равновесию, после чего любой термодинамический равновесный параметр в ней вполне может быть определен [2,3]. Иными словами, микро- и нанобъемы водной внутриклеточной среды с термодинамической точки зрения являются полноценными макроскопическими системами, содержащими в себе огромное число молекул, и поэтому температура может быть в них определена и измерена. Например, 1 мкм<sup>3</sup> воды содержит в себе около 30 миллиардов молекул, что, несомненно, является вполне макроскопическим числом. Это позволяет измерять локальную температуру в таких невероятно малых объемах с временным разрешением вплоть до 10<sup>-5</sup> с, которое ограничено характерным временем релаксации к равновесию в системах столь малых объемов [3].

В связи с вышесказанным очень любопытно понять – почему же не было целенаправленных попыток измерения таких локальных внутриклеточных температурных эффектов до недавнего времени? Немногочисленные расчеты на основе равновесной термодинамики и с привлечением уравнения теплопроводности Фурье показывали, что мощность источников тепла в живой клетке недостаточна для появления локальных градиентов температуры в водной сре-

де, и это сводило на нет все попытки экспериментально проникнуть в микромир термодинамических явлений [4]. Однако в последнюю пару десятилетий исследования выделения тепла в наноструктурах компьютерных процессоров выявили фундаментальную неприменимость уравнения теплопроводности Фурье в сложноорганизованных неоднородных микро- и наноструктурах полупроводников, поскольку обнаруженные градиенты температуры были значительно выше расчетных. Это связано большей частью с тем, что в сложноорганизованных структурах в местах контактов материалов с разной теплопроводностью на первый план выходят явления, связанные с контактным тепловым сопротивлением (контактное тепловое сопротивление Капицы [5]) [6].

Важно отметить то, что на данный момент еще не создана универсальная теория, корректно описывающая процессы передачи тепла в сложноорганизованных микро/наноструктурах конденсированных сред (как полупроводников, так и водных растворов). Основным препятствием является тот факт, что если длина волны фононов, переносящих тепло, становится сопоставима с размерами системы (микро-/нанобъемы), в которой происходит теплопередача, то фононы большей частью предпочитают отражаться от границ раздела сред/материалов с разной теплопроводностью.

Интенсивные работы в направлении детекции и теоретического обоснования отклонения экспериментально определенных тепловых эффектов в наноструктурах (нанопленках и нановолокнах) от значений, полученных на основании уравнения теплопроводности Фурье, ведутся группой в Massachusetts Institute of Technology (под руководством Gang Chen) и МГТУ им. Н.Э. Баумана [7,8].

### ИНСТРУМЕНТЫ ДЛЯ ПРЕЦИЗИОННОЙ ДЕТЕКЦИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ВНУТРИ КЛЕТКИ

Использование современных физических методов исследований в приложении к одиночным живым клеткам, разработанным в последнее время, позволило поколебать не только некоторые устоявшиеся представления, но и раскрыть новый мир ультралокальных, сверхбыстрых термодинамических явлений на внутриклеточном уровне.

**Детекция температурных изменений в одиночных клетках. Анализ *in vitro*.** Изначально измерение температуры в малых объемах, таких как одиночные живые клетки, было достаточно трудной практической задачей. Один из пере-

ломных в этой области моментов – начало использования термочувствительных флуоресцентных зондов из теноилтрифторацетоната тригидрата европия (III) (Eu-TTA). Они показали выделение тепла и локальную генерацию температурного градиента при взаимодействии m1-мускариновых рецепторов с лигандами в одиночной клетке [9]. Однако этот подход имел существенные недостатки: чувствительность зонда к величине pH и ионной силы, неоднородное распределение зонда на мембране и интенсивное фотообесцвечивание, что ограничивало широкое использование этого метода. Для преодоления этих трудностей был предложен оригинальный авторский подход, заключающийся в использовании в качестве микро-термометра пэтч-пипетки с закрытым концом, заполненной флуоресцентным зондом Eu-TTA. Температурный флуоресцентный сигнал снимали с микроскопического кончика пипетки, а ее полная изолированность от внешней среды гарантировала то, что флуоресцентный сигнал «определял» только температуру, а не какое-либо другое воздействие среды на термосенсорную молекулу, поскольку эта молекула чувствительна и к другим параметрам среды, таким как pH, ионная сила раствора и т.д. [10].

**Разработка нанотермосенсоров.** Другой подход к внутриклеточной регистрации температуры с возможностью изолировать флуоресцентный термочувствительный зонд от влияния внешних факторов (pH и ионной силы раствора) заключается в загрузке зонда Eu-TTA в полимерные наночастицы на основе полиметилметакрилата и полиаллиламингидрохлората. Реализуя данный подход, авторам работы удалось создать «путешествующие нанотермометры», способные регистрировать температурные изменения и перемещение эндосом и лизосом с наноразмерным разрешением. Эти нанотермометры интернализуются в клетки посредством эндоцитоза и активно перемещаются по микротрубочкам и, кроме всего прочего, позволяют оценить функциональную активность моторных белков и изменение средней скорости перемещения органелл при нагревании [11].

**Органеллоспецифичные зонды.** Появление данных работ инициировало интенсивные исследования в области разработки молекулярных флуоресцентных микротермометров для детекции органеллоспецифичного теплообразования (термоимиджинга). Коллективом авторов (S. Arai и др.) был синтезирован специфичный для эндоплазматического ретикулума зонд ER thermo yellow. Данный зонд позволяет измерять

температуру и динамику распределения теплоты, генерируемой изменениями кальция в клетках HeLa в режиме реального времени на субклеточном уровне [12].

Следующим шагом в этом направлении стало создание зонда, специфично регистрирующего температурные изменения на митохондриях – основных «энергетических установках» клеток. Так, молекулярный термометр Mito thermo yellow, связывающийся с альдегиддегидрогеназой внутри митохондриального пространства, способен регистрировать внутриклеточные температурные градиенты, причем не только в первичных культурах клеток, но и в многоклеточных образцах [13].

Альтернативой для флуоресцентных органеллоспецифичных молекулярных термометров является разработка термосенсоров с использованием генетически кодируемого зеленого флуоресцентного белка (GFP – Green Fluorescent Protein). В основе этого подхода лежит способность термочувствительного внутриклеточного белка (в данном случае это белок TrpA сальмонеллы) передавать конформационные изменения в GFP посредством формирования биспиральных структур. Изменения конформации GFP в свою очередь вызывают изменения в флуоресцентном сигнале, позволяя, таким образом, визуализировать температурные сдвиги. Кроме того, есть возможность селективно нацеливать GFP к субклеточным органеллам для наблюдения термогенеза в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [14].

**Использование квантовых точек в качестве термосенсоров.** Квантовые точки (КТ) – это наноразмерные полупроводники, обладающие уникальными оптическими свойствами, а именно высоким квантовым выходом, яркой люминесценцией, широкими спектрами возбуждения и эмиссии. Измерение температуры КТ связано со снижением интенсивности люминесценции с увеличением температуры, которое, в свою очередь, сопровождается расширением спектра и сдвигом излучения эмиссии в длинноволновую (красную) область. КТ демонстрируют высокую чувствительность и линейный ответ в диапазоне 300–323 К [15]. Неудивительно, что КТ, обладая такими характеристиками, нашли широкое применение в исследовании внутриклеточных процессов. Так, R. Tanimoto с коллегами, используя коммерчески доступный препарат Qtracker 655 Cell Labeling Kit, впервые показали гетерогенность распределения температуры в объеме цитоплазмы нейронных клеток [16]. В другой работе авторам удалось зафиксировать внутриклеточный отклик КТ на изменение температуры, моделируемое нагреванием фемтосекунд-

ного лазера. В данной работе авторы применили технологию инкапсулирования синтезированных КТ (CdSeS/ZnS), тем самым повысив устойчивость КТ к рН и ионной силе [17].

Однако стоит заметить, что применение КТ для детекции внутриклеточной температуры сталкивается с рядом трудностей. Во-первых, чувствительность флуоресцентного ответа КТ на изменение температуры обратно пропорциональна их размеру. Эта их особенность сопряжена с трудностями при регистрации клеточного термогенеза, поскольку «маленькие» КТ дают низкий квантовый выход и эмиссионное излучение лежит в коротковолновой области спектра. Во-вторых, это плохая растворимость КТ, токсичность, склонность к агрегации, возможность необратимого окисления поверхности и самопроизвольное удаление лигандов [15,18].

**Специфичные для молекул наноалмазы.** Недавнее появление флуоресцентных наноалмазов открыло широкие возможности в визуализации и трекинге. Эти возможности реализуются за счет поразительной биосовместимости и уникальных оптических свойств наноалмазов. Впервые флуоресцентные наноалмазы в качестве нанотермометров в живых клетках были использованы в 2013 г., и с тех пор интерес научного сообщества к этому направлению только нарастает. Применение их для термометрии с наноразмерным разрешением основано на использовании сверхчувствительности электронного спина связанного с азотно-вакантными центрами в кристаллической решетке наноалмазов к температуре и магнитному полю. Данный подход позволяет зафиксировать температурные изменения в 1,8 мК с пространственным разрешением в 200 нм. При этом, что не менее важно, функционализация поверхности флуоресцентных наноалмазов позволяет обеспечить специфичное связывание с целевыми молекулами (белками, рецепторами) для их визуализации в нанопространстве [19–21].

**Регистрация *in vivo*. Микротермография.** Не только внутриклеточные изменения температуры, но и микротермография на уровне целого организма представляет собой привлекательную как с фундаментальной, так и с практической точки зрения (в частности, в медицине) задачу. Имеются впечатляющие результаты, полученные при использовании наночастиц, содержащих термосенсор (зонд Еu-трис(динафтоилметан)-бис-триоктилфосфиноксид). Данные нанотермосенсоры позволяют с высоким пространственным и температурным разрешением измерять продукцию тепла и процессы теплопереноса, вызванные мышечной активностью

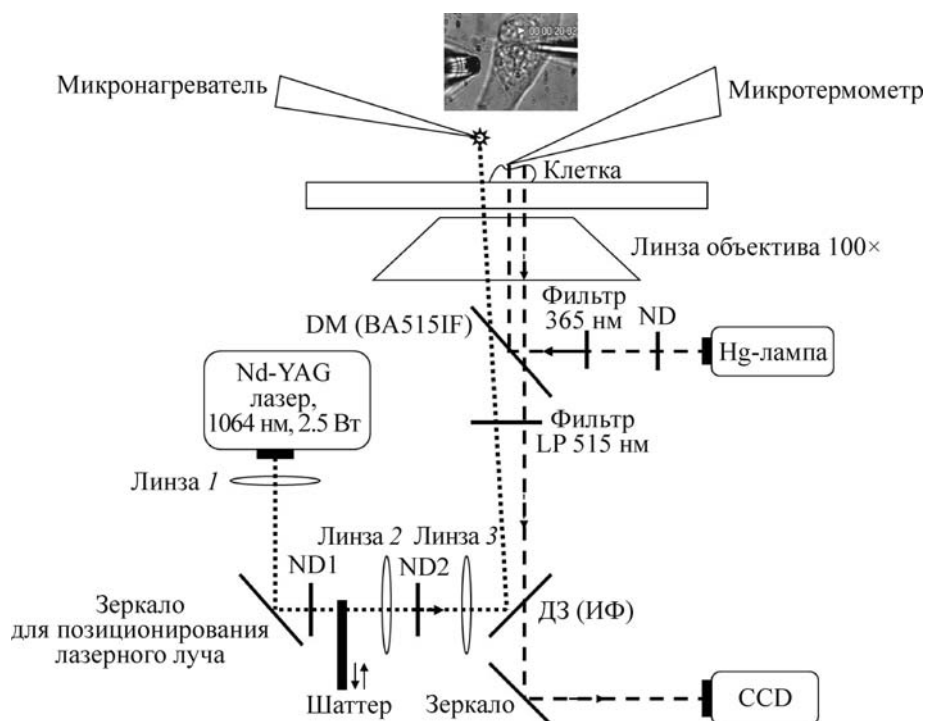
живого организма в режиме реального времени [22].

### СОЗДАНИЕ СТАЦИОНАРНОГО, ЛОКАЛЬНОГО ТЕМПЕРАТУРНОГО ГРАДИЕНТА В МИКРООБЪЕМЕ

Практический метод создания и измерения градиентов температуры вблизи/внутри одиночных живых клеток (с теоретическим обоснованием) был представлен совместным научным коллективом ИТЭБ РАН и Waseda University [23,24]. Для решения поставленной задачи была разработана уникальная система, состоящая из оптического наноагрегатора, позволяющего прецизионно создавать стационарный температурный градиент, и флуоресцентного микротермометра, измеряющего температуру в микрообъемах с миллисекундным разрешением. Создание локальных градиентов температуры в микроскопических объемах водного раствора осуществляли с помощью разогрева металлических наночастиц инфракрасным лазером в непосредственной близости от живой клетки. На рис. 1 представлена схема работы этой установки. Излучение инфракрасного лазера с длиной волны 1064 нм практически не поглощается водой и стеклом микропипетки. Поэтому, если такой лазерный луч будет сфокусирован на металлической наночастице в кончике микропипетки, помещенной в водную среду, то практически все тепло будет выделяться только на этой металлической наночастице и создавать градиент температуры в воде вокруг этого вероятно малого локального источника тепла [10].

Самым удивительным оказалось то, насколько быстро (в течение миллисекунд) устанавливается стационарный градиент температуры в воде в столь малых объемах и насколько высоким оказался такой градиент, обусловленный чрезвычайно низким коэффициентом теплопроводности воды. Управление градиентом температуры осуществляли посредством различных оптических нейтральных или затемняющих фильтров. В качестве микротермометра в этих экспериментах использовали запаянную микропипетку, заполненную чувствительным к температуре флуоресцентным соединением Eu-TTA, о разработке которого упоминалось выше.

Нагревание чистой воды лазерным лучом 1064 нм, сфокусированным на алюминиевой наночастице, выявило интересный эффект (рис. 2). Нагревание локальной точки до 100°C приводило к образованию на наночастице нагревателя пузырька насыщенного пара, харак-



**Рис. 1.** Экспериментальная установка для создания локального температурного градиента и детектирования температуры в микрообъеме. Точечной и пунктирной линиями показаны соответственно направления инфракрасного лазерного луча и флуоресцентные оптические пути. Луч от Nd-YAG-лазера (1064 нм), расширенный линзой 1, был отражен подвижным зеркалом, проходил через нейтральные фильтры (ND1 и ND2) и линзы (линза 2 и линза 3) и был сфокусирован объективной линзой 100× на микропипетку нагревателя. Возбуждающий свет 365 нм от лампы Hg для Eu-TTA проходил через фильтр 365 нм, отражался дихроическим зеркалом (ДЗ) и фокусировался на микропипетке термометра. Флуоресцентный сигнал, обусловленный эмиссией Eu-TTA, собирали линзой объектива и выводили к CCD-камере через LP-фильтр (long-pass фильтр, пропускающий излучение с длиной волны выше 515 нм).

теризирующего процесс кипения. На расстоянии всего в 20 мкм от точки кипения температура резко снижалась до 30°C, постепенно приближаясь к значениям комнатной температуры в 24°C. Таким образом, в воде можно легко организовать столь высокий стационарный температурный градиент (в 70°C) вблизи одиночной живой клетки (20 мкм), который легко может ее «вскипятить» (разрушить), в то время как соседняя клетка «почувствует» лишь небольшое увеличение температуры в несколько градусов [10].

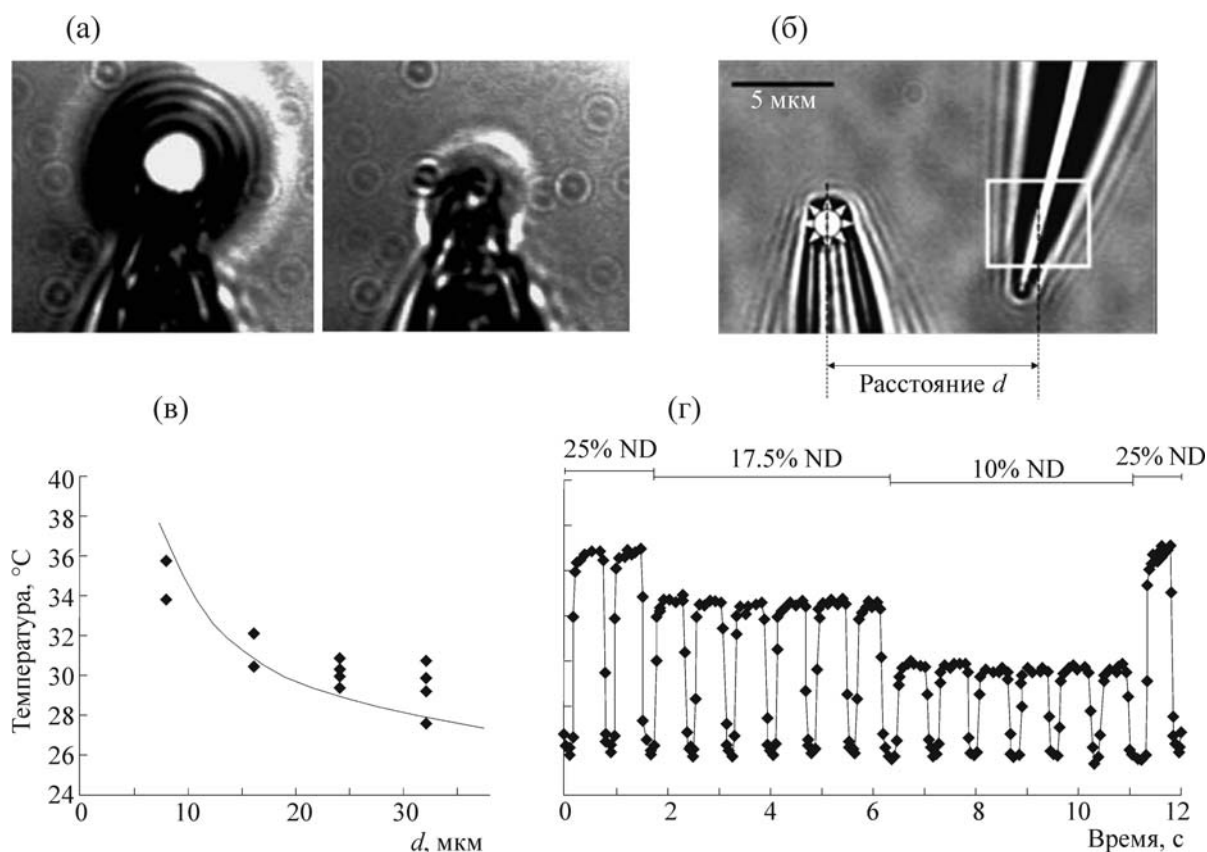
В случае если не требуется создание резкого температурного градиента, можно использовать инфракрасный лазер с длиной волны 1455 нм, излучение которого на два порядка лучше поглощается водой, чем излучение лазера с длиной волны 1064 нм.

Полученные данные позволили выявить временные и амплитудные характеристики релаксаций температурных градиентов в водной среде в столь малых объемах, ранее недоступных для термодинамических исследований, и получить удивительные результаты на одиночных

живых клетках. Совокупность этих начальных данных включает температуру в немногочисленный привилегированный ряд быстрых локальных переменных, посредством которых можно прецизионно управлять внутриклеточными процессами.

### ФИЗИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ НАВЕДЕНИЯ УЛЬТРАЛОКАЛЬНОГО ТЕМПЕРАТУРНОГО ГРАДИЕНТА

Вода является очень плохим проводником тепла, коэффициент теплопроводности которой близок к значениям хорошего термоизолятора – асбеста (таблица), а согласно закону теплопроводности Фурье градиент температуры возле стационарного локального источника тепла будет тем выше, чем меньше теплопроводность среды, в которую помещен такой источник тепла. Таким образом, низкая теплопроводность воды и обуславливает установление столь высокого температурного градиента, а высокая теплоемкость воды влияет лишь на время установления этого конечного стационарного гра-



**Рис. 2.** Мощное выделение тепла микронагревателем из-за сфокусированного инфракрасного (1064 нм) лазерного луча (а) и температурный градиент около микронагревателя (б,в). (а) – Интенсивность лазерного излучения составляла 100% (слева) и 25% (справа). (б) – Экспериментальная конфигурация. Левые и правые микропипетки – нагреватель и термометр соответственно. Звездочка показывает положение центра инфракрасного лазерного луча. Квадратом отмечена область, где измерялась интенсивность эмиссии Eu-TTA в пипетке.  $d$  – Расстояние между нагревателем и термометром обозначено. (в) – Температурный градиент, созданный около микронагревателя. Пунктирная линия соответствует зависимости  $T = \text{const}/d + T_0$  (25°C). (г) – Изменения температуры, индуцируемые лучом инфракрасного лазера при использовании различных нейтральных фильтров. Температуру  $T_0$  поддерживали на постоянном уровне (25°C).

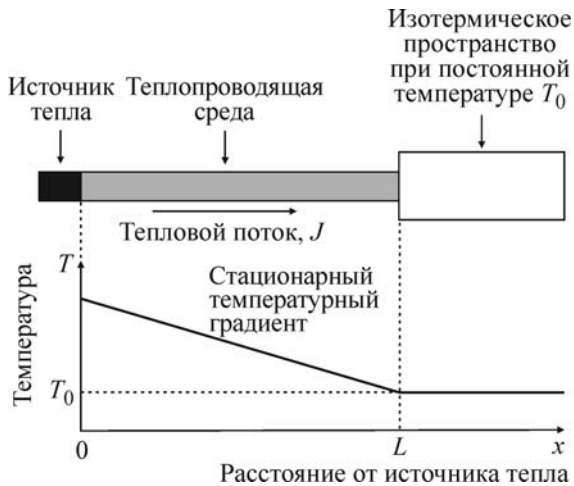
диента, которое, тем не менее, остается очень малым (миллисекундный диапазон).

Самые впечатляющие свойства теплопроводности присущи лучшему теплопроводящему соединению в мире – графену (в пять раз выше, чем у алмаза и в 10000 раз выше, чем у воды (см. таблицу)). В этой связи достаточно при-

вести пример того, как структурированность вещества в микро- и нанобъемах влияет на термодинамические параметры: теплопроводность углеродных нанотрубок вдоль их оси составляет 1750–5800 Вт/(м·К) [25], а теплопроводность композитных материалов, в которых оси нанотрубок перпендикулярны потоку тепла,

Теплопроводность различных соединений и материалов

Материалы с высокой теплопроводностью, Вт/(м·К)		Материалы со слабой теплопроводностью, Вт/(м·К)		Термоизоляторы, Вт/(м·К)	
<b>Графен</b>	<b>4400–5780</b>	Кварцевое стекло	1,36	Асбест	0,4–0,8
<b>Алмаз</b>	<b>1001–2600</b>	Бетон (цемент)	0,7–1,2	Пробковое дерево	0,05
Серебро	407	Стекло	0,7	Воздух	0,034
Золото	308	<b>Вода</b>	<b>0,58</b>	Вакуум	0,00
Алюминий	209				
Свинец	35				



**Рис. 3.** Линейный температурный градиент, установившийся в стационарном состоянии между источником тепла и изотермическим пространством через теплопроводную среду.

составляет 0,02–0,07 Вт/(м·К) [26], т.е. на пять порядков ниже! Исходя из этого, можно предположить, что и в живой клетке, структурированность которой явно не уступает объектам неживой природы, могут наблюдаться не менее поразительные тепловые явления.

Предлагаем для простоты рассмотреть одномерную ситуацию, где источник тепла связан через теплопроводный материал длины \$L\$ (рис. 3). Источник тепла производит постоянный тепловой поток \$J\$ (это одно из граничных условий). Другое граничное условие – температура \$T\_0\$ на расстоянии \$L\$ от источника тепла сохраняется постоянной. Этот поток инициирует увеличение температуры в соседних областях среды, пока система не достигает постоянного температурного распределения \$T(x)\$ с однородным тепловым потоком вдоль длины \$L\$. Стационарное условие означает, что нет никакого дальнейшего накопления тепла в среде и вся теплота, произведенная источником, рассеивается в изотермическом пространстве. Эта стабилизация – следствие закона Фурье.

Для наиболее простого случая имеем:

$$\rho C \frac{\partial T}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial x}, \tag{1}$$

где \$C\$ – теплоемкость среды, \$\rho\$ – плотность воды и \$t\$ – время;

$$J = -k \left( \frac{\partial T}{\partial x} \right), \tag{2}$$

где \$k\$ – теплопроводность среды.

Тогда уравнение диффузии приобретает следующий вид:

$$\rho C \frac{\partial T}{\partial t} = k \frac{\partial^2 T}{\partial x^2}. \tag{3}$$

В стационарных условиях  $\frac{\partial T}{\partial t} = 0$  и  $\frac{\partial^2 T}{\partial x^2} = 0$ , так как \$T\$ – это линейная функция \$x\$.

Поскольку величина \$J\$ постоянна в стационарных условиях, стационарный температурный градиент равен  $\left( \frac{\partial T}{\partial x} \right) = - \frac{J}{k}$ .

Температурный градиент, достигнутый в постоянном тепловом потоке \$J\$, обратно пропорционален коэффициенту теплопроводности \$k\$. Это означает, что один и тот же источник тепла даст больший температурный градиент в среде при более низком значении \$k\$. Когда теплопроводящая среда – вода, значение \$k\$, равное 0,597 Вт/(м·К), слабо отличается от диапазона значений термоизоляторов [27]. Большая теплоемкость \$C\$ воды только увеличивает время релаксации, необходимое для достижения стационарного температурного градиента, так как коэффициент термодиффузии равен \$k/(\rho \cdot C)\$. Таким образом, возможно искусственно создать резкие температурные градиенты около маленького источника тепла в водных растворах [3,10]. Для трехмерной ситуации устойчивое распределение температурного поля в воде, полученного сфокусированным лазерным лучом, было описано подробно в работе [28].

Кроме того, можно провести аналогию между температурным градиентом и привычным процессом электропроводности. Схема, раскрывающая физические основы этих процессов, показана на рис. 4. Чтобы понять, что происходит с градиентом температуры, если с одной стороны теплопроводящего материала включить источник тепла постоянной мощности (поток тепла \$F\$), достаточно вспомнить, что уравнение Фурье является полным аналогом закона Ома. Теплопроводность \$L\$ – это аналог электропроводности (величина, обратная сопротивлению \$R\$). Электрическая емкость – аналог теплоемкости, поток тепла \$F\$ – аналог электрического тока \$I\$. Так, если на электрическое сопротивление подать постоянный электрический ток \$I\$, то потенциал на этом сопротивлении будет расти и достигнет величины \$U\_1\$, определяемой законом Ома. Потенциал будет тем больше, чем больше электрическое сопротивление \$R\$. А время, за которое потенциал достигнет стационарной величины, определяется электрической емкостью сопротивления. В слу-

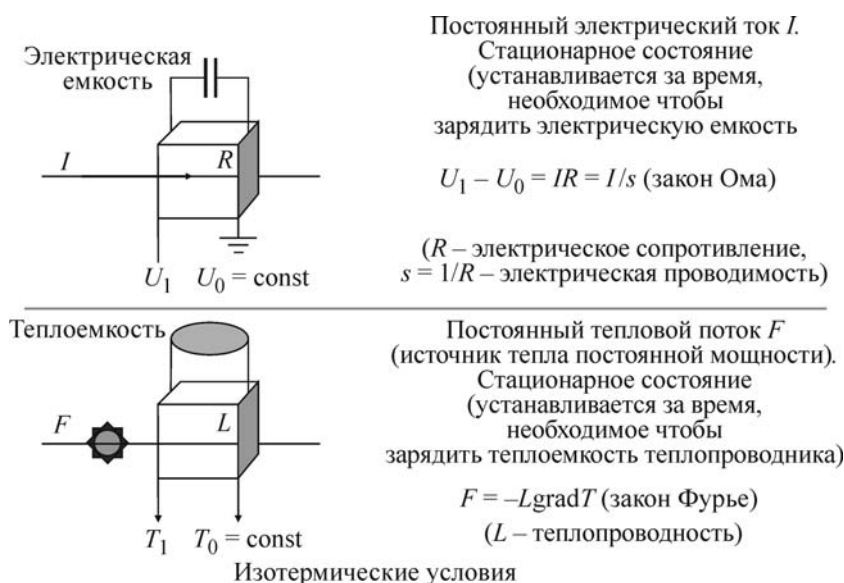


Рис. 4. Иллюстрация аналогии процессов теплопроводности и электропроводности.

чае с постоянным потоком тепла имеем аналогичную ситуацию: если с одной стороны теплопроводящего материала поместить источник тепла, генерирующий постоянный поток  $F$  (с условием, что весь поток тепла  $F$  пойдет в проводник), то температура с одной стороны проводника начнет повышаться и достигнет величины  $T_1$ , определяемой уравнением Фурье. При этом чем меньше теплопроводность проводника, тем выше установится стационарная температура  $T_1$ , время же установления ее определяется лишь теплоемкостью проводника.

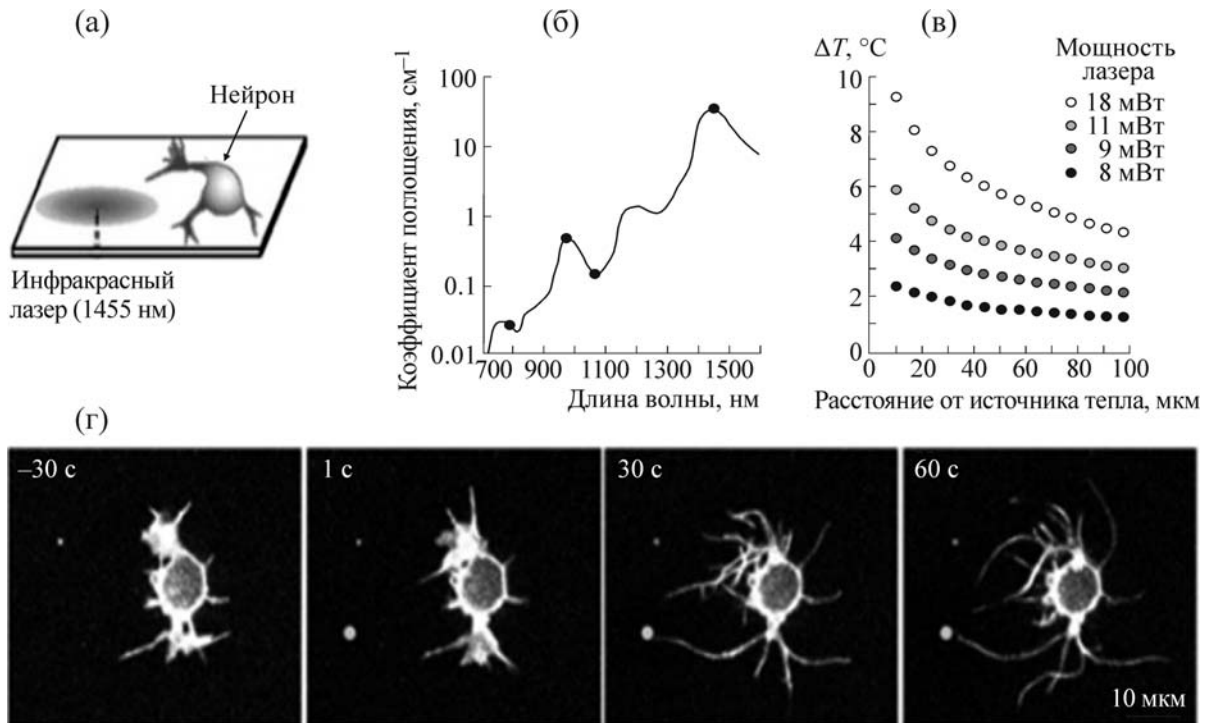
Таким образом, особенности теплопроводящих свойств материалов и обуславливают удивительные термодинамические эффекты в микромире, не говоря о ситуациях в микро- и наноструктурах с множественными усложняющими эффектами, обусловленными контактным тепловым сопротивлением Капицы.

Важно отметить, что разность электрических потенциалов на плазматической мембране живой клетки составляет приблизительно 100 мВ, что в пересчете на ее толщину (7–8 нм) дает в  $10^7$  В/м, что аналогично порядку величины напряженности электрического поля в наноструктурах микропроцессоров, при которой тепловые эффекты уже невозможно игнорировать по технологическим причинам. Поскольку мембранные внутриклеточные структуры, особенно, такие как эндо- и саркоплазматический ретикулум, по плотности упаковки множества мембранных слоев (интерфейсов) не уступают полупроводниковым структурам микропроцессоров, изучение процессов теплопередачи в живой клетке является чрезвычайно актуальным.

#### ИНДУЦИРОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЛОКАЛЬНОГО ТЕМПЕРАТУРНОГО ГРАДИЕНТА

**Изменение температуры «управляет» динамикой  $\text{Ca}^{2+}$ .** Первые же эксперименты, проведенные на живых объектах с помощью установки, созданной совместно Waseda University и ИТЭБ РАН, дали впечатляющие результаты. Наведение локального температурного градиента и визуализация при этом индуцированных температурой эффектов (введением в цитоплазму клеток HeLa кальций-чувствительных флуоресцентных красителей) впервые позволило показать связь между изменением температуры и динамикой ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Градиент температур в зависимости от расположения клеток от точки разогрева достигал 0,2–6°C. Примечательным являлся факт, что в момент выключения лазерного луча градиент температур исчезал (миллисекундная, практически мгновенная фаза охлаждения), и в этот момент был обнаружен мощный выброс ионов кальция из эндоплазматического ретикулума клетки в цитоплазму. При этом после каждого импульса выброс становился все меньше в связи с тем, что вырабатывался внутренний кальциевый ресурс клетки. Это можно рассматривать как эффективный способ управления уровнем свободного кальция, что само по себе может открыть новые перспективы при изучении  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых внутриклеточных процессов. Ранее такие эффекты не могли быть зарегистрированы, поскольку при обычном нагревании чашки Петри





**Рис. 5.** Инициация роста нейритов с помощью оптического микронагревателя. (а) – Схема экспериментальной системы. Сфокусированный лазерный луч быстро увеличивает локальную температуру от 36 до 41°C, стабилизируясь за 2 с. (б) – Отношение между коэффициентом поглощения воды и длиной волны лазерного излучения. (в) – Типовые распределения температуры генерируемой при разной мощности лазера. Источник тепла указывает положение, где был сфокусирован инфракрасный луч лазера.  $T_0 = 36^\circ\text{C}$ . (г) – Индуцированный микронагреванием рост нейритов. На конфокальных флуоресцентных изображениях клетки показан рост нейрита по направлению к источнику тепла (белый круг). Длина волны лазерного излучения – 1455 нм, мощность лазера – 12 мВт, нагревание началось в момент времени  $t = 0$  с,  $T_0 = 36^\circ\text{C}$ .

с прикрепленными на стекле клетками HeLa исследуемый объект просто «уплывал» из фокуса микроскопа из-за температурного расширения материалов, не говоря уже о том, что не было возможности достичь миллисекундных скоростей охлаждения препарата. Также следует отметить, что новый метод является абсолютно интактным, что представляет собой огромное преимущество. Хотелось бы привести еще один важный факт: при приближении к температуре тела нужен все меньший скачок температуры, чтобы произвести кальциевый выброс [29,30].

**Температура «управляет» морфологией клетки.** Также были получены данные, демонстрирующие воздействие на нейроны постоянного ультралокального градиента температуры. На рис. 5 показано, что при тепловом воздействии на нейрон его отростки начинают расти в сторону источника тепла с невероятной скоростью – порядка 10 мкм в минуту. Такой быстрый рост указывает на то, что быстрое увеличение температуры является ключевым фактором для запуска ускоренного направленного роста нейритов (нейронных отростков). Обна-

руженное явление направленного anomalно быстрого роста нейритов и доказанная вовлеченность в этот процесс фундаментальных внутриклеточных физиологических механизмов, обеспечивающих быстрый, направленный процесс структурирования компонентов цитоскелета клетки по градиенту температуры, открывает огромные потенциальные возможности в тех случаях, когда необходима экстренная регенерация поврежденных нервных волокон с заранее предустановленными конечными целями иннервации [23].

Тот же эффект был зарегистрирован и для клеток HeLa (необратимое выпячивание по градиенту температуры), причем доказано, что в обоих случаях рост происходит за счет направленного формирования цитоскелетных структур [31].

Помимо использования инфракрасных лазеров для создания локального температурного градиента в последнее время активно применяется комбинация лазеров ближнего инфракрасного излучения и «конвертеров» – преобразователей энергии светового излучения в тепло-

вую энергию. В работе [32] сообщалось об эффективной индукции независимого от кальция сокращения мышечных трубочек при удаленном «беспроводном» умеренном нагревании (повышение внутриклеточной температуры на 5°C) ближним инфракрасным излучением наноструктур на основе золотых наноболочек. Исследование механизма этого процесса показало, что контролируемая тепловая стимуляция индуцирует сокращение, инициируя актин-миозиновое взаимодействие без участия ионов  $Ca^{2+}$ . Кроме того, такая стимуляция увеличивает mRNA-транскрипцию генов, кодирующих белки теплового шока (HSP) и сиртуин 1 (SIRT1). Управляемая тепловая активация поперечнополосатых мышечных клеток может найти широкое применение в тканевой инженерии, бионике и регенеративной медицине [32]. Схожие результаты были получены при воздействии тепловых импульсов (индуцированных излучением лазера 1455 нм) на кардиомиоциты. Создание вблизи клеток температурного градиента инициировало  $Ca^{2+}$ -независимое сокращение кардиомиоцитов непосредственно активируя взаимодействие актомиозина [33].

**Термостимулируемый «включатель» генов.** Возможность удаленной, внешней манипуляции генной экспрессией в специфических клетках или тканях целого организма открывает широкие перспективы. Такого рода система управления экспрессией генов основана на использовании технологии индуцированного инфракрасным лазером нагревания клетки с последующей экспрессией целевого гена-оператора (infrared laser-evoked gene operator (IR-LEGO)). Вызванное излучением лазера (1480 нм) нагревание приводит к реализации реакции теплового шока и экспрессии трансгена, контролируемого промотором теплового шока. Эволюция метода IR-LEGO берет свое начало после публикации работы Y. Kamei с соавт. [34]. Для усиления клеточной специфичности генной экспрессии и пространственного разрешения метода (определенные ткани и органы при исследовании на уровне целого организма), работы ведутся в нескольких направлениях, а именно: вариации характеристик лазерного излучения (использование импульсного излучения) и применение ближнего инфракрасного излучения и наночастиц (золото, углеродный «нанорог», углеродные нанотрубки и ап-конверсионные наночастицы (неорганические кристаллы, допированные редкоземельными металлами)) для целенаправленного нагревания [35]. Контролируемая экспрессия генов на базе технологии IR-LEGO обладает такими преимуществами, как неинвазивность и отсутствие фотохимического

повреждения, что делает его мощным инструментом для исследователей в различных биологических областях, включая анализ клеточной сигнализации, в том числе и на уровне целого организма, изучение генетических механизмов и развития уникальных методов клеточной терапии и тканевой инженерии [36].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе подробно освещены теоретические и практические подходы для реализации нового, перспективного метода наведения прецизионного локального температурного градиента в микро- и нанобъемах, позволяющего нагреть одиночную клетку, а также исследовать термодинамические аспекты экзогенных и эндогенных внутриклеточных процессов. Использование разработанных в последнее время термодинамических подходов, позволило поколебать многие устоявшиеся представления о внутриклеточных термодинамических явлениях и ввести температуру в разряд привилегированных ультралокальных внутриклеточных переменных, модулирующих как быстрые (электрофизиологические процессы), так и медленные, влияющие на рост (3D-морфологию) клетки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. P. Chen, R. S. Eisenberg, J. W. Jerome, et al., *Biophys. J.* **69** (6), 2304 (1995).
2. И. Пригожин и Д. Кондепуди, *Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур* (Мир, М., 2002).
3. Л. Д. Ландау и Е.М. Лифшиц, *Статистическая физика. Курс теоретической физики* (Наука, М., 1964), т. 5.
4. G. Baffou, H. Rigneault, D. Marguet, L. Jullien, et al., *Nat Methods* **11** (9), 899 (2014).
5. П. Л. Капица, *журн. эксперим. и теорет. физики* **11** (1), 1 (1941).
6. A. Shakouri, *Proc. IEEE* **94** (8) 1613 (2006).
7. Y. Hu, L. Zeng, A. J. Minnich, et al., *Nat. Nanotechnol.* **10** (8), 701 (2015).
8. А. А. Баринов, Ж. Цао, В. И. Хвезюк и др., *Наука и образование: научное издание МГТУ им. Н.Э. Баумана* **5**, 140 (2016).
9. O. Zohar, M. Ikeda, H. Shinagawa, et al., *Biophys. J.* **74** (1), 82 (1998).
10. V. Zeeb, M. Suzuki, and S. Ishiwata, *J. Neurosci. Meth.* **139** (1), 69 (2004).
11. K. Oyama, M. Takabayashi, Y. Takei, et al., *Lab. Chip.* **12** (9), 1591 (2012).
12. S. Arai, S.-C. Lee, D. Zhai, et al., *Sci. Rep.* **4**, 6701 (2014).
13. S. Arai, M. Suzuki, S.J. Park, et al., *Chem. Commun. (Camb.)* **51** (38), 8044 (2015).

14. S. Kiyonaka, T. Kajimoto, R. Sakaguchi, et al., *Nat. Methods* **10** (12), 1232 (2013).
15. X. Wang, O. S. Wolfbeis, and R. J. Meier, *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7834 (2013).
16. R. Tanimoto, T. Hiraiwa, Y. Nakai, et al., *Sci. Rep.* **6**, 22071 (2016).
17. H. Liu, Y. Fan, J. Wang, et al., *Sci. Rep.* **5**, 14879 (2015).
18. T. Frecker, D. Bailey, X. Arzeta-Ferrer, et al., *ECS J. Solid State Sci. Technol.* **5** (1), R3019 (2016).
19. W. W. Hsiao, Y. Y. Hui, P. C. Tsai, et al., *Acc Chem Res.* **49** (3), 400 (2016).
20. G. Kucsko, P. C. Maurer, N. Y. Yao, et al., *Nature* **500** (7460), 54 (2013).
21. S. Sotoma, J. Iimura, R. Igarashi, et al., *Nanomaterials.* **6** (4), 56 (2016).
22. Ferdinandus, S. Arai, S. Takeoka, et al., *ACS Sens.* **1** (10), 1222 (2016).
23. K. Oyama, V. Zeeb, Y. Kawamura, et al., *Nature Sci. Rep.* **5**, 16611 (2015).
24. M. Suzuki, V. Zeeb, S. Arai, et al., *Nature Methods* **10**, 802 (2015).
25. J. Hone, M. Whitney, C. Piskoti, et al., *Phys. Rev. B* **59**, R2514 (1999).
26. W. J. Evans and P. Koblinski, *Nanotechnology* **21** (47), 475704 (2010).
27. *Handbook of chemistry and physics*, Ed. by R. C. Weast, M. J. Astle, and W. H. Beyer, 67<sup>th</sup> ed. (CRC Press, Boca Raton, FL., 1986).
28. Y. Liu, D. K. Cheng, G. J. Sonek, et al., *Biophys. J.* **68**, 2137 (1995).
29. M. Suzuki, V. Zeeb, K. Oyama, et al., *Biophys. J.* **92**, L46(2007).
30. V. Zeeb, M. Suzuki, K. Oyama, et al., *HFSP J.* **3**, 117 (2009).
31. K. Oyama, T. Arai, A. Isaka, et al., *Biophys. J.* **109** (2), 355 (2015).
32. A. Marino, S. Arai, Y. Hou, et al., *ACS Nano* [Epub ahead of print] (2017).
33. K. Oyama, A. Mizuno, S. A. Shintani, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417** (1), 607 (2012).
34. Y. Kamei, M. Suzuki, K. Watanabe, et al., *Nat. Methods* **6** (1), 79 (2009).
35. S. Sundaramoorthy, A. Garcia Badaracco, S. M. Hirsch, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **9** (9), 7929 (2017).
36. E. Miyako, T. Deguchi, Y. Nakajima, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (19), 7523 (2012).

## Local Thermoactivation of Individual Living Cells and Measurement of Temperature Gradients in Microscopic Volumes

**O.Yu. Antonova, O.Yu. Kochetkova, L.I. Shabarchina, and V.E. Tseeb**

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

This review is devoted to a new, unique and perspective method of creating high-precision local temperature gradient in micro- and nanovolume, which can be used to heat an individual living cell, and also to investigate exogenous and endogenous intracellular processes. The retrospective analysis and systematization of the advanced developments related to intracellular temperature are carried out. The system consisting of the optical nanoheater (with the use of warming up the metallic nanoparticles or water by infrared laser beam) that allows setting a stationary temperature gradient (up to 70°C at a distance of 20 μm from heat source) and the fluorescent microthermometer that measures temperature in microvolumes with millisecond resolution is described in detail. A special attention has been focused on a physical, in particular, thermodynamic description of temperature (as a parameter of macro, micro and nanosystems) and on the description of the mechanism of induction of ultralocal temperature gradient. This review presents the results describing the effect of local heating of the living cells, the findings on thermo-induced intracellular processes (among which the most impressive (about 10 μm per minute) growth of neurons' neuritis on a thermal gradient) and absolutely new prospects based on "thermal manipulation" of a living cell are highlighted.

*Keywords: local temperature gradient, microheater, fluorescent microthermometer, nanodiamonds, quantum dots, thermogenesis*