

© Коллектив авторов, 2016  
УДК 616-092

Иванов Ю.Д.<sup>1</sup>, Мальсагова К.А.<sup>1</sup>, Плешакова Т.О.<sup>1</sup>, Веснин С.Г.<sup>2</sup>, Татур В.Ю.<sup>3</sup>, Ярыгин К.Н.<sup>1</sup>

## Мониторинг яркостной температуры суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в СВЧ-диапазоне с помощью радиотермометрии

<sup>1</sup> — ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича», 119121, Москва, Погодинская ул. д. 10

<sup>2</sup> — ООО «Фирма РЭС», 105082, Москва, Большая Почтовая ул., д. 22

<sup>3</sup> — Фонд перспективных технологий и новаций, 115682, Москва, Шипиловская ул., д. 64, 1, 147

Цель исследования — мониторинг яркостной температуры в СВЧ-диапазоне суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в процессе некроза этих клеток. **Методика.** Объектом исследования служили клетки фолликулярной карциномы щитовидной железы, переведенной в суспензию с помощью раствора Версена и 0,25%-ного раствора трипсина. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в ростовой среде. Проводился мониторинг изменения соотношения величин яркостных температур  $T_{\text{СВЧ}}$  и  $T_{\text{ИК}}$  в процессе некроза клеток. Измерения яркостных температур проводились при помощи радиотермометра. СВЧ-диапазон составлял 3,4—4,2 ГГц, ИК-диапазон составлял 8—13 мкм. Температура суспензии поддерживалась на уровне 37,5°C. **Результаты.** Показано, что при некрозе в суспензии клеток происходит повышение яркостной температуры раствора в диапазоне 3,4—4,2 ГГц (СВЧ-диапазон), в то время как яркостная температура среды в ИК-диапазоне не меняется. **Заключение.** В процессе некроза происходит изменение неравновесного состояния клеточной среды, что выражается в изменении соотношения  $T_{\text{СВЧ}}$  и  $T_{\text{ИК}}$ . В процессе протекания некроза клеток яркостная температура  $T_{\text{СВЧ}}$  возрастает. При этом яркостная температура в ИК-диапазоне остается на одном уровне.

**Ключевые слова:** СВЧ-излучение; фолликулярная карцинома щитовидной железы; радиотермометрия.

**Для цитирования:** Иванов Ю.Д., Мальсагова К.А., Плешакова Т.О., Татур В.Ю., Ярыгин К.Н. Мониторинг яркостной температуры суспензии клеток фолликулярной карциномы щитовидной железы в СВЧ-диапазоне с помощью радиотермометрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2016; 60(4): 174—177.

**Для корреспонденции:** Иванов Юрий Дмитриевич, доктор биол. наук, проф., руководитель лаб. нанобиотехнологии ИБМХ, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

**Финансирование.** Работа была выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013—2020 годы.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.04.2016

Ivanov Yu.D.<sup>1</sup>, Malsagova K.A.<sup>1</sup>, Pleshakova T.O.<sup>1</sup>, Vesnin S.G.<sup>2</sup>, Tatur V.Yu.<sup>3</sup>, Yarygin K.N.<sup>1</sup>

## Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry

<sup>1</sup> — Institute of Biomedical Chemistry, 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia

<sup>2</sup> — RES Ltd., 22, ul. B. Pochtovaya, Moscow, 105082, Russia

<sup>3</sup> — Foundation of Perspective Technologies and Novations, 64 build. 1, ul. Shipilovskaya, Moscow, 115682, Russia

**The purpose** of this research consisted in monitoring of brightness temperature of the suspension of follicular thyroid carcinoma cells during the necrosis of these cells in superhigh frequency (SHF) range. **Methods.** The monitoring of the change in the ratio between brightness temperatures  $T_{\text{SHF}}$  and  $T_{\text{IR}}$  values during the necrosis of these cells. The object of study was follicular thyroid carcinoma cells suspension prepared with use of Versene solution and 0.25% trypsin solution. The cells were precipitated by centrifugation and re-suspended in culture medium. The measurements of brightness temperatures were carried out with use of radiothermoimeter. SHF range was 3.4—4.2 GHz, and infrared (IR) range was 8—13  $\mu\text{m}$ . The temperature of the suspension was maintained at 37.5°C. **Results.** It was found that upon the necrosis in the suspension of cells, an increase in brightness temperature in 3.4—4.2 GHz range (SHF range) occurs, while brightness temperature of the medium in the IR range does not change. **Conclusion.** The monitoring of necrosis of follicular thyroid carcinoma cells was carried out by SHF-radiothermometry. It was shown that during the necrosis the change of non-equilibrium state of cell medium occurs, that results in the change in the ratio between  $T_{\text{SHF}}$  and  $T_{\text{IR}}$ . During the necrosis, the brightness temperature in SHF range ( $T_{\text{SHF}}$ ) increases.

**Keywords:** SHF emission; follicular thyroid carcinoma; radiothermometry.

**For citation:** Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu. Monitoring of brightness temperature of suspension of follicular thyroid carcinoma cells in SHF range by radiothermometry. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya Terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2016; 60 (4): 174—177. (in Russ.)

**For correspondence:** Yuri D. Ivanov, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Biomedical Chemistry; 10, ul. Pogodinskaya, Moscow, 119121, Russia, e-mail: yurii.ivanov@rambler.ru

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The work was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013—2020.

#### Information about authors:

Ivanov Yu.D., <http://orcid.org/0000-0001-5041-1914>

Pleshakova T.O., <http://orcid.org/0000-0003-3217-9095>

Received 10.04.2016

## Введение

В последнее десятилетие наблюдается существенный рост количества онкологических заболеваний, около 5 млн чел. ежегодно умирает от злокачественных опухолей. Растет число новых случаев рака щитовидной железы, второй по встречаемости рак щитовидной железы — фолликулярная карцинома (~15%).

Важное значение в профилактике и лечении онкозаболеваний имеет разработка новых методов диагностики, включая методы мониторинга клеточных процессов. Спектральные методы клеточного мониторинга относятся к неинвазивным методам, и поэтому, находят широкое распространение в настоящее время. Среди оптических методов мониторинга клеточных процессов можно выделить методы, основанные на использовании Раман-спектроскопии [1]. Эти методы имеют высокий потенциал для исследования концентраций клеточных компонентов в процессе клеточного цикла по анализу колебательных мод. Эти моды находятся в диапазоне сотен-тысяч см<sup>-1</sup>.

В последнее время появились методы когерентной спектроскопии четырехфотонного рассеяния (ЧФР), позволяющие исследовать свойства биологических объектов. Регистрация оптических переходов в области  $\nu_1 - \nu_2 \sim 0,1—100$  см<sup>-1</sup> дает возможность регистрировать низкочастотную область спектра, за счет фазирования в макроскопическом объеме молекулярных движений с помощью двух лазерных волн с частотами  $\nu_1$  и  $\nu_2$ . Разность этих величин ( $\nu_1 - \nu_2$ ) сканируется в широкой области спектра от ближнего ИК- до микроволнового диапазона [2]. Диапазон частот 0,1—100 см<sup>-1</sup>, соответствующий вращательным переходам воды и находящийся в микроволновом диапазоне, был исследован для водных растворов белков и ДНК [2, 3].

Микроволновый диапазон частот биологических объектов может исследоваться также с помощью прямой микроволновой спектроскопии. Микроволновая спектроскопия начинает использоваться для исследования тканей человека [4]. Микроволновые радиометры находят свое применение в создании новых диагностических устройств, работающих в микроволновом диапазоне [<http://www.google.com/pa->

[tents/WO2010074608A3?hl=ru&cl=ru](https://doi.org/10.1007/978-3-642-10074-6_8)]. Недавно нами было обнаружено, что механическое возбуждение воды и белковых растворов приводит к генерации заряда [5] и к генерации СВЧ-излучения [6, 7]. Также было показано, что функционирование ферментов связано с флуктуациями белковой глобулы [8], что, в свою очередь, сопровождается микроволновым излучением в области 3,4—4,2 ГГц [9, 10].

**Цель исследования** — мониторинг некроза клеток с помощью микроволновой радиометрии. Было показано, что при вводе суспензии клеточной линии в измерительную ячейку при некрозе клеток яркостная температура  $T_{\text{СВЧ}}^{\text{cell}}$  повышается.

## Методика

### Клеточные культуры и приготовление образцов

Клеточная линия фолликулярной карциномы щитовидной железы человека (линия FTC-133) культивировалась по стандартной методике в культуральных флаконах 75 мл с фильтрами (Corning, США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажность). Технологические возможности были любезно предоставлены лабораторией проф. К.Н. Ярыгина (ИБМХ). Состав ростовой среды для линии: DMEM/F12 (GIBCO, США); 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) (GIBCO, США). Смену среды осуществляли 2 раза в неделю. При достижении 80%-ной конfluenceности клетки переводили в суспензию с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и 0,25%-ного раствора трипсина (ПанЭко, Россия) (1:1). Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в вышеупомянутой ростовой среде.

### Схема проведения измерений

Непосредственно до измерений 1 мл образца суспензии культуры клеток инкубировали в термостате. Затем образец суспензии культуры клеток помещали в термостатированную кювету на водяной бане, температура которой поддерживалась постоянной  $T = 37,5^\circ\text{C}$ . После этого, проводилась дополнительная инкубация в течение 5 мин для записи базовой линии инфракрасного

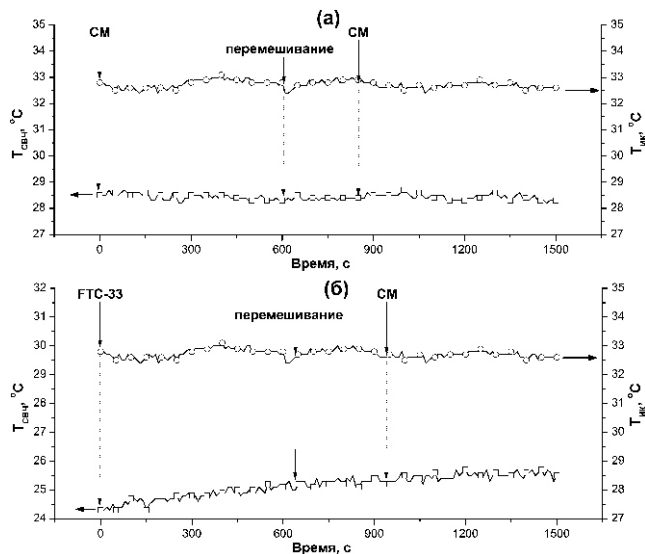
излучения, после чего измерялось инфракрасное излучение суспензии клеток для регистрации начальной яркостной температуры среды в инфракрасном диапазоне  $T_{ИК}$  в диапазоне 8—10 мкм. После этого проводился мониторинг яркостной температуры в суспензии культуры клеток в СВЧ-диапазоне  $T_{СВЧ}$  в диапазоне 3,4—4,2 ГГц в течение 1500 с (25 мин).

После окончания экспериментов осуществляли повторное измерение яркостной температуры  $T_{ИК}$  в этом диапазоне. Контрольные измерения  $T_{СВЧ}$  и  $T_{ИК}$  проводили со средой, не содержащей культуры клеток, по аналогичной схеме.

Подсчет клеток осуществляли с использованием камеры Горяева, в котором использовалось окрашивание мертвых клеток с помощью трипанового синего [11]. Метод основан на способности красителя проникать в клетки через поврежденные мембраны мертвых клеток. Процентное содержание доли погибших и живых клеток вычислялось из отношения количества этих клеток, подсчитанных в камере Горяева.

#### Измерение $T_{СВЧ}$ и $T_{ИК}$ излучения раствора

Используемый в нашей работе радиометр RTM-01 RES (Россия) измеряет электромагнитное излучение среды. Измерения в СВЧ-диапазоне ( $T_{СВЧ}$ ) проводились при частотах 3,4—4,2 ГГц. В случае измерения в инфракрасном диапазоне 8—13 мкм, регистрировалась яркостная температура  $T_{ИК}$ .



Зависимость яркостной температуры ( $T_{СВЧ}$ ) раствора в измерительной кювете от времени инкубации:

(а) контрольные измерения  $T_{СВЧ}$  в растворе, не содержащем клеток; (б) измерения  $T_{СВЧ}$  в суспензии клеток. Экспериментальные условия: суспензия клеточной линии FTC-133 в ростовой среде (СМ) — растворе DMEM/F12, содержащем 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS). Температура инкубации  $T = 37,5^{\circ}\text{C}$ . Стрелками указано перемешивание и добавление 10 мкл ростовой среды.

Для регистрации излучения в СВЧ-диапазоне использовалась штыревая антенна, соединенная с радиотермометром, которая погружалась в раствор образца, помещенный в измерительную кювету. Полученные данные измерений, представленные в единицах яркостной температуры  $T_{СВЧ}$  и  $T_{ИК}$ , в которых градуирован радиотермометр RTM-01 RES. Точность измерения составляла  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Данные измерения приводятся в виде зависимости  $T_{СВЧ}$  и  $T_{ИК}$  от времени.

Термодинамическая температура раствора измерялась термометром и поддерживалась на уровне  $37,5^{\circ}\text{C}$ .

### Результаты и обсуждение

#### Мониторинг измерения яркостной температуры в СВЧ-диапазоне

Вначале были проведены контрольные эксперименты для измерения яркостных температур  $T_{ИК}$  и  $T_{СВЧ}$  контрольных сред. В качестве таких контрольных сред были использованы питательные среды, на которых культивировались эти клетки. Полученные результаты представлены на рисунке. Как видно из рисунка,  $T_{ИК}$  и  $T_{СВЧ}$  растворов не менялись в период наблюдения. Причем, этот уровень не изменялся при перемешивании раствора или при отборе и добавлении 200 мкл этого раствора. Стабильность сигнала  $T_{СВЧ}$  и  $T_{ИК}$  находилась на уровне  $0,5^{\circ}\text{C}$ .  $T_{СВЧ}$  растворов составляла  $28,1—28,5^{\circ}\text{C}$ , а  $T_{ИК} = 32,5—33,0^{\circ}\text{C}$ .

Далее проводились эксперименты по измерению  $T_{ИК}$  и  $T_{СВЧ}$  суспензии клеток. Данные приведены на рис. 1, б. Было показано, что в начальный период времени наблюдается подъем  $T_{СВЧ}$  в течение 1500 с с  $24,3$  до  $25,7^{\circ}\text{C}$ , т.е.  $\Delta T_{СВЧ}$  составило  $1,4^{\circ}\text{C}$ . Такого подъема не наблюдалось в контрольных экспериментах. Уровень  $T_{ИК}$  клеточной среды в начале эксперимента составлял  $T_{ИК} = 32,7^{\circ}\text{C}$ , а после эксперимента практически не изменялся и составлял  $T_{ИК} = 32,3^{\circ}\text{C}$ , что находилось в пределах погрешности экспериментов. То есть, яркостная температура  $T_{ИК} = 32,5^{\circ}\text{C}$  существенно не изменилась в течение времени эксперимента.

Измерения количества некротических клеток, образовавшихся после 25 мин инкубации суспензии клеточной линии в условиях эксперимента, показали, что их количество возросло и составило  $\sim 50\%$ .

Таким образом, в процессе измерений зарегистрировано повышение яркостной температуры  $T_{СВЧ}$  в процессе некроза клеток при сохранении уровня  $T_{ИК}$ .

В суспензии, в отсутствие поддержания специальных условий (контроль pH, степень буферизации, концентрации кислорода) нормальное функционирование клетки может протекать в течение 20—30 мин, после чего может происходить некроз клеток [http://www.stormoff.ru/articles\_565\_76.html]. В представленной работе, были проведены измерения в течение 1500 с ( $\sim 25$  мин). При этом

наблюдалась пониженная яркостная температура суспензии этих клеток в СВЧ-диапазоне  $T_{\text{СВЧ}} = 24,3^{\circ}\text{C}$ , а яркостная инфракрасная температура была на уровне  $T_{\text{ИК}} \sim 32^{\circ}\text{C}$ . Пониженная температура  $T_{\text{СВЧ}}$  обусловлена, возможно, неоптимизированным согласованием измерительного тракта с СВЧ-антенной. Как было отмечено выше, без поддержания специальных условий осуществление жизнедеятельности клеток затруднительно, и должно приводить к их некрозу. Действительно, как показали измерения, в камере Горяева, наблюдался некроз клеток до 50% от общего количества через 20 мин после начала инкубации суспензии в измерительной ячейке. При этом, наблюдалось повышение  $T_{\text{СВЧ}}$  с 24,3 до 25,7 $^{\circ}\text{C}$ , на  $\Delta T_{\text{СВЧ}} = 1,4^{\circ}\text{C}$ . Таким образом, при некрозе клеток наблюдается повышение  $T_{\text{СВЧ}}$ -среды, в то время как ИК-среды существенно не менялось.

Как нами отмечалось ранее, при функционировании ферментов возникает неравновесное состояние среды и СВЧ-излучение белковых растворов [9, 10]. В данной работе показано, что при функционировании клетки протекают также процессы, приводящие к неравновесному состоянию среды, выражающемуся в изменении соотношений  $T_{\text{СВЧ}}$  к  $T_{\text{ИК}}$ . Этот эффект может быть связан с перестройкой клеток, ее водной структуры (как внутриклеточной, так и межклеточной). Разработанный подход мониторинга некроза клеток по контролю разности яркостных температур клеток в СВЧ и ИК-диапазонах может быть использован для контроля динамики патологических процессов, сопровождающихся некрозами.

Таким образом, при мониторинге некроза клеток линии карциномы цитовидной железы с помощью СВЧ-радиотермометрии, показано, что в процессе некроза происходит изменение неравновесного состояния клеточной среды, что выражается в изменении соотношения  $T_{\text{СВЧ}}$  и  $T_{\text{ИК}}$ . В процессе некротизирования клеток яркостная температура  $T_{\text{СВЧ}}$  возрастает. При этом яркостная температура в ИК-диапазоне остается на одном уровне.

#### Сведения об авторах:

Мальсагова Кристина Ахмедовна, мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии ИБМХ

Плешакова Татьяна Олеговна, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ

Веснин Сергей Георгиевич канд. техн. наук, доцент, генеральный директор ООО «Фирма РЭС»

Татур Вадим Юрьевич, исполнительный директор, Фонд перспективных технологий и новаций

Ярыгин Константин Никитич, член-корр. РАН ИБМХ

#### References

1. Huang Ch.-K., Ando M., Hamaguchi H.O., Shigeto S. Disentangling dynamic changes of multiple cellular components during the yeast cell cycle by in vivo multivariate Raman imaging. *Anal. Chem.* 2012; 84: 5661-8.
2. Bunkin A.F., Pershin S.M. Coherent laser spectroscopy of the processes of hydration of biomolecules and nanoparticles. *Trudy instituta obshchey fiziki im. A.M. Prokhorova.* 2013; 69: 58-69. (in Russian)
3. Bunkin A.F., Pershin S.M., Nurmatov A.A. Four-photon spectroscopy of ortho/para spin-isomer  $\text{H}_2\text{O}$  molecule in liquid water in sub-millimeter range. *Laser Phys. Lett.* 2006; 3(6): 275-7.
4. Betskii O.V., Kislov V.V., Lebedeva N.N. *Millimeter waves and living systems [Millimetrovye volny i zhivye sistemy]*. Moscow: Sains-Press; 2004. (in Russian)
5. Ivanov Y.D., Pleshakova T., Malsagova K., Kozlov A., Kaysheva A., Kopylov A., Izotov A., Andreeva E., Kanashenko S., Usanov S., Archakov A., Highly sensitive protein detection by combination of atomic force microscopy fishing with charge generation and mass spectrometry analysis. *FEBS J.* 2014; 281: 4705-17.
6. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Microwave emission from water in bioanalytical systems. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2015; 59(4): 78-81. (in Russian)
7. Ivanov Yu.D., Malsagova K.A., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Ziborov V.S. SHF radiation from albumin solution upon external excitation. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya.* 2016; Article in press. (in Russian)
8. Ivanov Y.D., Bukharina N.S., Pleshakova T.O., Frantsuzov P.A., Krokhin N.V., Ziborov V.S., Archakov A.I. Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes. *Biofizika.* 2011; 56: 939-44. (in Russian)
9. Ivanov Y.D., Malsagova K.A., Izotov A.A., Pleshakova T.O., Tatur V.Yu., Vesnin S.G., Ivanova N.D., Usanov S.A., Archakov A.I. Detection of microwave radiation of cytochrome CYP102 A1 solution during the enzyme reaction. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2016; 5: 285-9.
10. Ivanov Y.D., Kozlov A.F., Malsagova K.A., Pleshakova T.O., Vesnin S.G., Tatur V.Yu., Ivanova N.D., Ziborov V.S. Monitoring of microwave emission of HRP system during the enzyme functioning. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2016; 7: 20-5.
11. Louis K.S., Siegel A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol Biol.* 2011; 740: 7-12.