

Бесконтактная микрохирургия клеточных мембран с помощью фемтосекундных лазерных импульсов для оптоинъекции в клетки заданных веществ

И.В.Ильина, А.В.Овчинников, О.В.Чефонов, Д.С.Ситников, М.Б.Агранат, А.С.Микаелян

Фемтосекундные лазерные импульсы излучения ИК диапазона применялись для микрохирургии клеточной мембраны с целью локального и кратковременного изменения ее проницаемости и введения в клетки заданных внеклеточных субстанций. Продемонстрирована возможность бесконтактной лазерной доставки в клетки линии CHO флуоресцентного красителя иодистого пропидия, а также плазмиды pEGFP-N1, кодирующей GFP-белок, при сохранении жизнеспособности клеток.

Ключевые слова: фемтосекундные лазерные импульсы, лазерная микрохирургия, оптическая трансфекция, клеточная мембрана, оптопороция, оптоинъекция.

1. Введение

В настоящее время лазеры широко применяются для выполнения хирургических операций не только на тканевом [1], но также на клеточном и субклеточном уровнях [2]. Лазерные источники излучения успешно используются для модификации мельчайших структурных элементов клетки [3–5], что позволяет изучить процессы, протекающие в клетках, и установить взаимосвязь между их структурой и функциями. Одной из актуальных задач современной биологии и медицины, для решения которой применяются лазерные технологии, является доставка в клетки различных внеклеточных соединений [6], естественный транспорт которых в клетки изначально затруднен. При этом использование фемтосекундных лазеров представляется наиболее перспективным, т. к. с их помощью удается проводить хирургические процедуры с субмикронным разрешением и минимизировать риск повреждения «обрабатываемых» клеток и прилегающих к ним тканей в результате нелинейных процессов, поскольку энергия фемтосекундного импульса значительно меньше энергии наносекундного. Зачастую используется лазерное излучение ИК диапазона [7–9], которое слабо поглощается биологическими объектами, однако при превышении пороговой интенсивности возникает нелинейное взаимодействие лазерного излучения с веществом, в результате чего поглощение значительно увеличивается. Вследствие нелинейного механизма взаимодействия лазерное излучение воздействует только на малую область вблизи фокального пятна, не оказывая влияния на прилегающие области.

Для названия лазерной методики доставки в клетки различных соединений, таких как флуорохромы, белки,

ионы и даже наночастицы, в иностранной литературе, как правило, используется общий термин «оптоинъекция» [10]. При этом термином «оптическая трансфекция» [11] называется категория лазерных методик, применяющихся для введения в клетки нуклеиновых кислот (РНК, ДНК). Процедура трансфекции является мощным инструментом для исследования функций генов и белков. С ее помощью становится возможным усиление или подавление экспрессии определенных генов, что может быть востребовано при генной терапии, когда для лечения заболеваний в клетки направленно вводятся заданные гены.

Среди существующих биологических, химических и физических методов трансфекции [12] лазерный метод обладает несколькими значительными преимуществами. Во-первых, он является бесконтактным, не требующим использования дополнительных механических инструментов или химических реагентов. Во-вторых, данный метод может применяться для эффективной трансфекции клеток разного типа, в том числе стволовых [9]. В-третьих, он обеспечивает высокую селективность трансфекции клеток, что в некоторых задачах является одним из ключевых требований, определяющих выбор метода. Так, например, при изучении экспрессии генов или при работе с нейронами [13], у которых каждый клеточный домен выполняет определенную функцию, предпочтительнее именно избирательная, а не массовая трансфекция. Поэтому метод лазерной трансфекции, позволяющий не только проводить индивидуальную обработку клеток-мишеней, но и локально воздействовать на выбранный участок клетки, наиболее перспективен.

Возможности успешной оптоинъекции различных субстанций в клетки продемонстрированы в работах [7–11]. При этом в большинстве случаев для оптоинъекции применялись титан-сапфировые лазерные системы, генерирующие фемтосекундные лазерные импульсы излучения на центральной длине волны 800 нм. Возможно, это объясняется тем, что данные системы одними из первых стали коммерчески доступными. Тем не менее они остаются по-прежнему дорогостоящими из-за необходимости использования лазера накачки, работающего в режиме непрерывной генерации на длине волны излучения 532 нм.

И.В.Ильина, А.В.Овчинников, О.В.Чефонов, Д.С.Ситников, М.Б.Агранат. Объединенный институт высоких температур РАН, Россия, 125412 Москва, ул. Ижорская, 13, стр.2; e-mail: ilyina_inna@mail.ru
А.С.Микаелян. Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26; e-mail: arsmikael@gmail.com

Поступила в редакцию 24 декабря 2012 г.

В соответствии с этим исследование возможности применения для клеточной оптоинъекции альтернативных источников лазерного излучения фемтосекундной длительности, более дешевых и надежных в эксплуатации, представляет актуальную задачу. В настоящей работе для введения в клетки заданных внеклеточных соединений используется лазерный скальпель на основе иттербиевого фемтосекундного лазера (1048 ± 2 нм, 75 МГц, ~ 115 фс) со встроенным блоком диодной накачки, что значительно повышает стабильность всей системы и облегчает работу с лазером. Насколько нам известно, это первое упоминание о применении фемтосекундного лазерного излучения на данной длине волны для оптоинъекции в клетки внеклеточных соединений. Поэтому в работе экспериментально определяются оптимальные параметры лазерного излучения и режим облучения, необходимые для микрохирургии мембраны и локального кратковременного увеличения ее проницаемости. Воздействие лазерных импульсов приводит к образованию «самозатягивающихся» пор в мембране, эффективность формирования которых оценивается путем введения в клетки флуоресцентного красителя иодистый пропидий и последующего флуоресцентного анализа. Жизнеспособность клеток, подвергнутых воздействию лазерного излучения, оценивается по дополнительному их окрашиванию витальным красителем кальцеин АМ. Возможность фемтосекундной лазерной трансфекции клеток демонстрируется на примере введения в клетки линии СНО (chinese hamster ovary cells – клетки яичников китайского хомячка) плазмидной ДНК рEGFP-N1, кодирующей зеленый флуоресцирующий белок (green fluorescent protein, GFP).

2. Методика эксперимента и объекты исследования

2.1. Экспериментальная установка

Схема экспериментальной установки представлена на рис.1. Фемтосекундная лазерная система 1 на основе активной среды с ионами иттербия позволяет получить импульсы излучения на длине волны 1048 нм с длительностью ~ 115 фс и частотой следования 75 МГц («Авеста», Россия). Лазерное излучение с помощью диэлектрических зеркал 2 и 7, эффективно отражающих излучение на длине волны 1048 нм, вводилось в оптическую схему микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия). В шестипозиционную турель 10 помещалось зеркало, посредством которого лазерное излучение направлялось в микрообъектив 12 и фокусировалось на образец 14. При проведении экспериментов исследуемые образцы (клетки линии СНО) находились в чашках Петри диаметром 35 мм со стеклянным дном толщиной 170 мкм. Чашка Петри закреплялась в держателе двухкоординатного моторизованного столика 13, перемещение которого по заданной траектории позволяло последовательно облучать выбранные клетки-мишени (скорость перемещения столика 10 мм/с, минимальный шаг 1 мкм).

Для фокусировки лазерного излучения на объектах использовались 40-кратный микрообъектив LD Plan-Neo Fluor (Carl Zeiss) с числовой апертурой $NA = 0.6$ и 100-кратный микрообъектив EC Plan-NeoFluar с высокой числовой апертурой $NA = 1.3$. Максимальная мощность излучения на выходе лазерной системы достигала 3 Вт, что соответствовало максимальной энергии импульсов 40

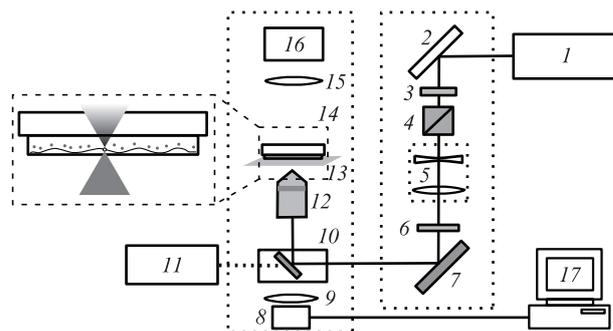


Рис.1. Схема экспериментальной установки на основе фемтосекундного лазера для введения в клетки внеклеточного материала: 1 – фемтосекундный иттербиевый лазер; 2, 7 – зеркала; 3 – полуволновая пластинка; 4 – призма Глана; 5 – телескоп; 6 – механический затвор; 8 – ПЗС-камера; 9 – линза; 10 – турель на шесть сменных позиций с зеркалом для заведения излучения и наборами полосовых фильтров и светоделительных пластин; 11 – металлогалогенная лампа; 12 – микрообъектив; 13 – моторизованный столик; 14 – чашка Петри; 15 – конденсор; 16 – лампа осветителя; 17 – персональный компьютер.

нДж при частоте их следования 75 МГц. Для регулировки энергии лазерных импульсов применялся поляризационный ослабитель, состоящий из полуволновой пластинки 3 и призмы Глана 4. Вращение фазовой пластинки позволяло изменять выходную энергию лазерного импульса. Телескоп 5, состоящий из рассеивающей ($f_1 = -100$ мм) и собирающей ($f_2 = 400$ мм) линз, использовался для увеличения диаметра лазерного пучка с целью оптимального заполнения входной апертуры микрообъектива и, следовательно, уменьшения диаметра лазерного пятна на объекте. Кроме того, телескоп позволял корректировать расходимость лазерного излучения для совмещения плоскости с минимальным размером лазерного пучка после фокусировки микрообъективом с плоскостью изображения. При переходе от одной клетки к другой требовалась небольшая подстройка фокуса, т. к. поверхность стеклянной подложки, на которой находятся клетки, не является идеально плоской и имеет некоторый прогиб от центра к периферии. Необходимость подстройки фокуса могла быть также обусловлена различной толщиной клеток.

Длительность воздействия цуга лазерных импульсов на образцы регулировалась с помощью электромеханического затвора 6 (Uniblitz, США; минимальное время экспозиции 6 мс), расположенного за телескопом. Помимо зеркала в шестипозиционную турель помещались наборы полосовых фильтров и светоделительных пластин, которые применялись для флуоресцентного анализа образцов, подвергнутых лазерному воздействию. Смена фильтров осуществлялась вращением турели. Для возбуждения флуоресценции использовалась металлогалогенная лампа 11 (120 Вт, X-Cite, EXFO). Процесс облучения клеток регистрировался в режиме реального времени с помощью ПЗС-камеры 8 (AxioCam, Carl Zeiss), прикрепленной к выходному порту микроскопа и передающей сигналы на персональный компьютер 17.

2.2. Клеточная культура

В экспериментах использовалась клеточная линия СНО-К1. Данные, представленные в работе, были получены для выборки из 1000 клеток. Клетки СНО-К1 культивировались в среде DMEM/F12 с 10%-ной фетальной

бычьей сывороткой (Invitrogen, США) в культуральных флаконах с зоной роста 25 см^2 (Greiner, Германия) в CO_2 -инкубаторе (37°C , $5\% \text{ CO}_2$). За сутки до эксперимента клетки пересаживали в чашки Петри размером $35 \times 10\text{ мм}$ со стеклянным дном и помещали в инкубатор на 24 ч. Полученный монослой клеток промывали и инкубировали в среде OptiMEM (Invitrogen, США), в которую в зависимости от выполняемой процедуры добавляли флуоресцентные красители – иодистый пропидий или кальцеин AM – и плазмидный вектор pEGFP-N1 (Clontech, USA), кодирующий зеленый флуоресцирующий белок. После окончания эксперимента клетки промывали средой OptiMEM, помещали в культуральную среду DMEM/F12 с 10%-ной фетальной бычьей сывороткой и перенесли в инкубатор. Для подтверждения оптоинъекции иодистого пропидия в клетки в течение 40–50 мин после лазерного воздействия проводили регистрацию свечения флуорохрома внутри клеток. Аналогичным образом (с помощью флуоресцентного анализа) диагностировали жизнеспособность облученных клеток, но в этом случае в среду OptiMEM вместо иодистого пропидия добавляли витальный краситель кальцеин AM. Эффективность трансфекции векторной ДНК определяли по флуоресценции GFP-белка в клетках через 24–48 ч после лазерного воздействия.

3. Оптоинъекция флуоресцентного красителя и трансфекция клеток с помощью фемтосекундных лазерных импульсов

Введенные в клетки флуоресцентные красители могут использоваться для эффективной визуализации различных клеточных структур и изучения их функций [14]. В настоящей работе флуоресцентные красители, не пропускаемые мембраной живых клеток, применялись в качестве диагностического инструмента для оптимизации параметров лазерного излучения и режимов облучения и повышения эффективности оптоинъекции. Для определения оптимальных условий эффективной порации мембраны и увеличения ее пропускаемости использовался краситель иодистый пропидий (Sigma). Максимальное возбуждение красителя происходит на длине волны 536 нм, а максимальная эмиссия – на длине волны 617 нм. Данный краситель не проникает через мембрану живых клеток.

Если мембрана клетки необратимо повреждена, краситель проникает в клетку и связывается с нуклеиновыми кислотами. Если же целостность мембраны клетки была нарушена локально в течение короткого промежутка времени, обнаружить яркую флуоресценцию ядра не удастся. Однако в результате такого нарушения может наблюдаться слабое свечение всей клетки. Это подтверждает факт успешной пермеабилзации (временного изменения проницаемости) мембраны клетки и сохранения ее жизнеспособности после воздействия лазерных импульсов.

В экспериментах по оптоинъекции флуоресцентного красителя клетки инкубировали в среде OptiMEM с иодистым пропидием (5 мкг/мл). Через 10 мин клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axio-Observer (Carl Zeiss). Отсутствие флуоресценции клеток подтверждало их жизнеспособность. Далее часть клеток подвергали воздействию фемтосекундных лазерных импульсов. После однократного открытия электромеханического затвора на заданный промежуток времени и облучения клетки-мишени чашку Петри перемещали на новую позицию и «обрабатывали» следующую клетку. Температуру во время экспериментов поддерживали равной $36\text{--}37^\circ\text{C}$ с помощью портативного термостата.

Было замечено, что при превышении пороговых значений интенсивности лазерного излучения в моменты воздействия лазерных импульсов на поверхности мембран клеток образуются кавитационные пузырьки. Последующий флуоресцентный анализ подтверждал факт проникновения в клетку красителя. Таким образом, наличие кавитационных пузырьков может служить своеобразным индикатором успешной оптоинъекции в клетки иодистого пропидия. Эффект возникновения кавитационных пузырьков в зависимости от интенсивности лазерного излучения был исследован при диаметрах лазерного пучка (по уровню $1/e$ от максимальной интенсивности) на поверхности клеточной мембраны 2.0 и 0.75 мкм. В первом случае для фокусировки излучения на мембрану клетки использовался 40-кратный микрообъектив с числовой апертурой $\text{NA} = 0.6$, во втором случае – 100-кратный микрообъектив с высокой числовой апертурой $\text{NA} = 1.3$. В качестве примера на рис.2 показано образование кавитационного пузырька при облучении мембраны клетки фемтосекундными лазерными импульсами. В табл.1 приведены экспериментально измеренные пороговые значения интенсивности лазерного излучения (для

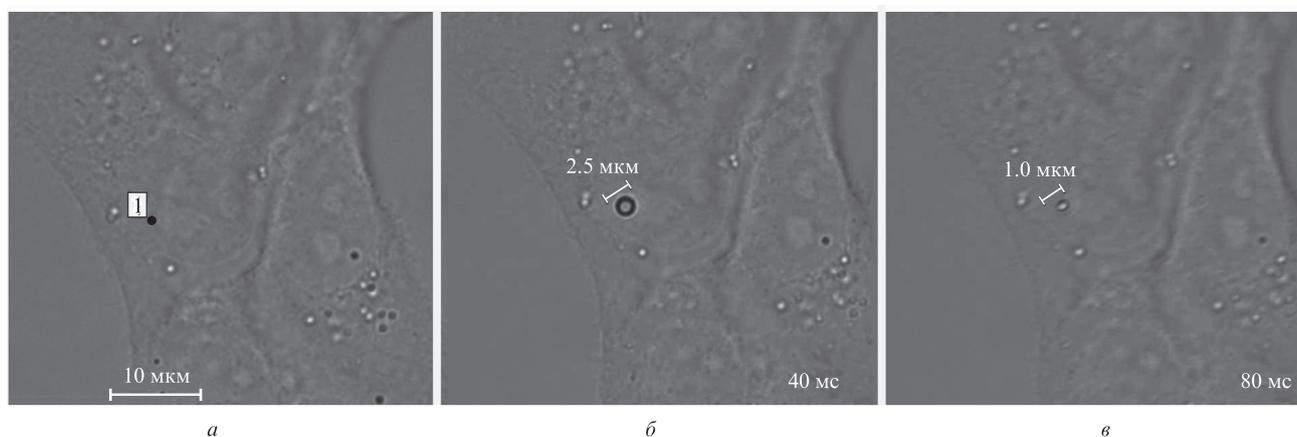


Рис.2. Возникновение кавитационного пузырька при воздействии фемтосекундных лазерных импульсов на клеточную мембрану: клетка до воздействия пучка лазерных импульсов (область воздействия отмечена черной точкой с номером 1) (а), образование кавитационного пузырька в момент воздействия лазерных импульсов (б) и исчезновение кавитационного пузырька (в).

Табл. 1. Основные параметры лазерного излучения, вызывающего образование кавитационных пузырьков.

Диаметр пучка (мкм)	Длительность импульсов (фс)	Средняя мощность (мВт)	Энергия импульса (нДж)	Интенсивность (10^{12} Вт/см ²)
2.0	100	215	2.8	0.9 ± 0.05
2.0	115	320	4.2	1.1 ± 0.1
0.75	115	37	0.5	1.0 ± 0.1

различных диаметров сфокусированного лазерного пучка и длительностей импульсов), при которых образование кавитационных пузырьков наступает с вероятностью 50%. Погрешность определения интенсивности лазерных импульсов складывалась из погрешностей измерения диаметра пучка и мощности излучения. Данные результаты были получены при облучении исследуемых образцов в течение 50 мс. При меньших временах экспозиции зарегистрировать образование кавитационного пузырька удавалось крайне редко (возможно, из-за слишком малого его размера), и последующий флуоресцентный анализ не подтверждал факта проникновения флуоресцентного красителя в клетку.

Увеличение времени экспозиции, наоборот, приводило к формированию кавитационных пузырьков относительно большого размера (не менее 3–5 мкм), что вызывало значительное повреждение клеток. Таким образом, время экспозиции 50 мс было выбрано в качестве оптимального, т. к. при флуоресцентном анализе, который проводился через 40–50 мин после лазерного воздействия, клетки оставались жизнеспособными.

Следует также отметить, что, несмотря на возможность успешного введения в клетки флуоресцентного красителя и в первом и во втором случае, применение для фокусировки излучения объектива с высокой числовой апертурой является предпочтительным. Это связано не только с меньшей энергией импульсов, необходимой для успешной пермеабиллизации мембраны, но и с размером образуемых кавитационных пузырьков. При использовании микрообъектива с числовой апертурой 0.6 было обнаружено, что размеры формируемых пузырьков могут значительно варьироваться и в некоторых случаях достигать 5–10 мкм в диаметре. Образование кавитационных пузырьков таких размеров неизбежно приводит к необратимому повреждению мембраны и последующей гибели клетки. Применение микрообъектива с высокой числовой апертурой позволяло контролировать размер формируемых кавитационных пузырьков (типичный размер пузырька в данном случае составлял ~1 мкм) и безопасно проводить процедуру оптоинъекции флуоресцентного красителя.

На рис.3 представлен результат успешной оптоинъекции в клетки 1 и 2 линии СНО флуоресцентного красителя иодистый пропидий, полученный при облучении клеток лазерными импульсами с длительностью 115 фс и энергией ~0.5 нДж в течение 50 мс. Показана также клетка 3, облучение которой проводилось в течение 100 мс. Из рис.3,*а* видно, что клетка 3 отличается по своей морфологии от клеток 1 и 2, а также от окружающих клеток, не подвергавшихся воздействию лазерных импульсов. Низкая интенсивность флуоресценции клеток 1 и 2 (рис.3,*б*) подтверждает факт успешной оптоинъекции красителя и жизнеспособности клеток, в то время как ядро поврежденной клетки 3 флуоресцирует интенсивно.

Для получения достоверной информации о жизнеспособности клеток после лазерного воздействия, осуществлялось окрашивание клеток красителем кальцеин АМ

(максимальное возбуждение происходит на длине волны 496 нм, а максимальная эмиссия – на длине волны 517 нм). После эксперимента по оптоинъекции иодистого пропидия клетки промывали средой OptiMEM и помещали в культуральную среду в инкубатор на 30–40 мин. Затем культуральную среду заменяли средой OptiMEM, содержащей витальный краситель кальцеин АМ. Флуоресцентный анализ окрашенных клеток проводился через 20 мин. Кальцеин АМ беспрепятственно проходит сквозь мембрану клеток. При этом наблюдается интенсивное свечение живых клеток, в то время как поврежденные и мерт-

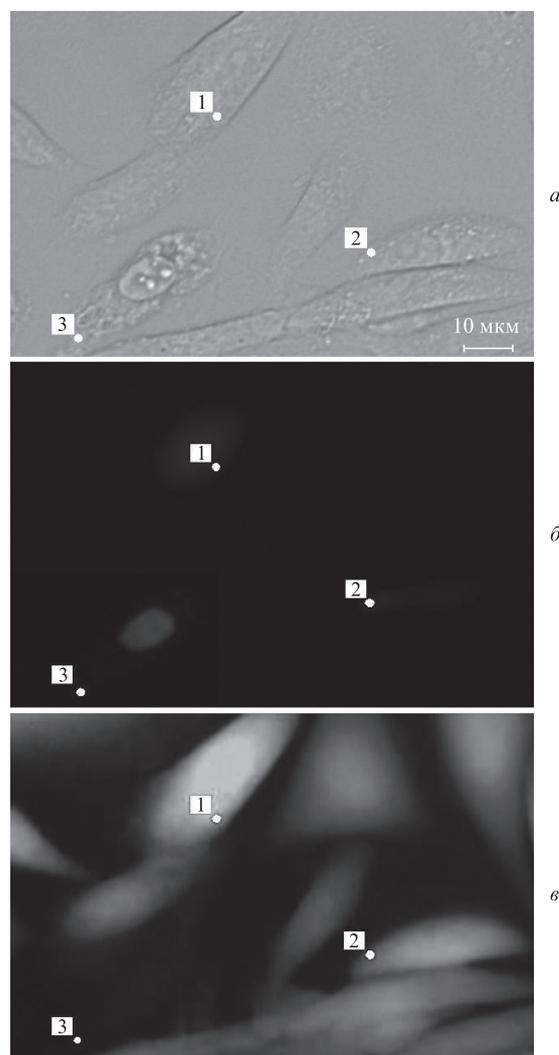


Рис.3. Оптоинъекция в клетки линии СНО флуоресцентного красителя иодистый пропидий с помощью фемтосекундных лазерных импульсов: клетки 1, 2, 3 после воздействия фемтосекундных лазерных импульсов (*а*), флуоресценция иодистого пропидия в клетках (низкая интенсивность флуоресценции клеток 1 и 2 подтверждает факт успешной оптоинъекции красителя, а интенсивная флуоресценция ядра клетки 3 – факт необратимого повреждения клетки) (*б*) и окрашивание клеток красителем кальцеин АМ для оценки их жизнеспособности (клетки 1 и 2 являются живыми, клетка 3 сильно повреждена и не флуоресцирует) (*в*).

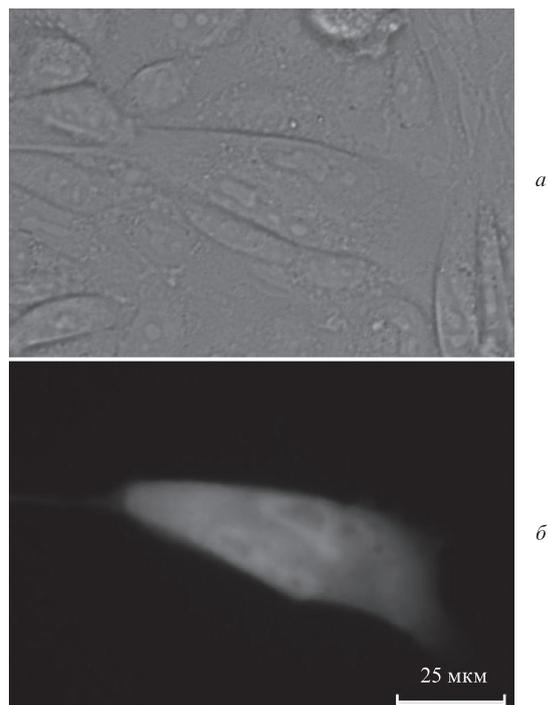


Рис.4. Фемтосекундная лазерная трансфекция в клетку плазмиды pEGFP-N1, кодирующей зеленый флуоресцирующий белок: клетки линии СНО на следующий день после эксперимента по лазерной трансфекции (а) и интенсивная флуоресценция клетки, подтверждающая внедрение плазмиды и последующую экспрессию GFP-белка в клетке (б).

вые клетки не флуоресцируют. Из рис.3,б видно, что интенсивность флуоресценции клеток 1 и 2, подвергнутых лазерному воздействию, сравнима с интенсивностью необлученных клеток. Клетка 3, поврежденная в результате лазерного воздействия, не флуоресцирует. Таким образом, с помощью двойного окрашивания клеток флуоресцентным красителем кальцеин АМ была подтверждена жизнеспособность облученных клеток. Это позволяет сделать вывод о том, что при выбранных параметрах лазерного излучения и режиме облучения клеток возможна доставка в клетки молекулярных соединений, не пропускаемых мембраной, и сохранение жизнеспособности клеток-мишеней.

Для лазерной трансфекции клеток использовались режим облучения и параметры лазерного излучения, аналогичные оптимальным режиму и параметрам, установленным в эксперименте по оптоинъекции красителя. Перед проведением эксперимента культуральная среда заменялась раствором, содержащим среду OptiMEM и плазмиду, кодирующую зеленый флуоресцирующий белок (20–50 мкг/мл). Клетки-мишени подвергались воздействию фемтосекундных лазерных импульсов, после чего среда

заменялась культуральной средой и клетки помещались в инкубатор. Флуоресцентный анализ проводился через 24 или 48 ч. В качестве примера на рис.4 представлен результат успешной трансфекции клеток линии СНО. Видна интенсивная флуоресценция клетки, подвергнутой лазерному воздействию, что подтверждает внедрение плазмиды и последующую экспрессию GFP-белка в клетке.

4. Заключение

В работе представлены результаты применения фемтосекундных лазерных импульсов ИК излучения для обеспечения эффективного внедрения в клетки ДНК-вектора. Определены оптимальные параметры лазерного излучения и режим облучения клеток линии СНО, выбранных в качестве модельных, при которых реализуется оптоинъекция в клетки плазмиды, кодирующей GFP-белок. Было показано, что выживаемость клеток после оптоинъекции с помощью лазерных импульсов с интенсивностью, незначительно превышающей пороговые значения, не снижается. В дальнейшем разработанная методика будет апробирована на других клеточных линиях с целью получения статистических данных по эффективности трансфекции и показателям выживаемости этих типов клеток.

Настоящая работа выполнена при поддержке программы Президиума РАН №13 «Экстремальные световые поля и их приложения» (проект №4.10).

1. Гапонцев В.П., Минаев В.П., Савин В.И., Самарцев И.Э. *Квантовая электроника*, **32**, 1003 (2002).
2. Berns M.W., Write W.H., Steubing R.W. *Int. Rev. Cytol.*, **129**, 1 (1991).
3. Shen N., Datta D., Schaffer C.B., LeDuc P., Ingber D.E., Mazur E., *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 17 (2005).
4. Watanabe W., Arakawa N., Matsunaga S., Higashi T., Fukui K., Isobe K., Itoh K. *Opt. Express*, **12**, 4203 (2004).
5. Kohli V., Elezzabi A.Y., Acker J.P. *Laser Surg. Med.*, **37**, 227 (2005).
6. Rhodes K., Clark I., Zatzoff M., Eustaquio T., Hoyte K.L., Koller M.R. *Method. Cell. Biol.*, **82**, 309 (2007).
7. Stevenson D., Agate B., Tsampoula X., Fischer P., Brown C.T.A., Sibbett W., Riches A., Gunn-Moore F., Dholakia K. *Opt. Express*, **14**, 7125 (2006).
8. Baumgart J., Bintig W., Ngezahayo A., Willenbrock S., Escobar H.M., Ertmer W., Lubatschowski H., Heisterkamp A. *Opt. Express*, **16**, 3021 (2008).
9. Uchugonova A., König K., Bueckle R., Isemann A., Tempea G. *Opt. Express*, **16**, 3957 (2008).
10. Clark I.B., Hanania E.G., Stevens J., Gallina M., Fieck A., Brandes R., Palsson B.O., Koller M.R. *J. Biomed. Opt.*, **11**, 014034 (2006).
11. Stevenson D.J., Gunn-Moore F.J., Campbell P., Dholakia K. *J. R. Soc. Interface*, **7**, 863 (2010).
12. Kim T.K., Eberwine J.H. *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**, 3173 (2010).
13. Barrett L.E., Sul J.-Y., Takano H., Van Bockstaele E.J., Haydon P.G., Eberwine J. H. *Nat. Methods*, **3**, 455 (2006).
14. Плом И.С. В сб.: *Световая микроскопия в биологии: Методы* (М.: Мир, 1992, с.122).