

Влияние фемтосекундного лазерного излучения на клетки перевиваемой опухоли Кребс-2

Ю.П.Мешалкин, Н.А.Попова, В.П.Николин, В.И.Каледин, А.В.Кирпичников, Е.В.Пестряков

*Изучалось влияние фемтосекундного излучения титан-сапфирового лазера на клетки перевиваемой асцитной опухоли Кребс-2. После облучения *in vitro* импульсным излучением основной гармоники с длиной волны 800 нм, длительностью 30 фс, частотой следования 1 кГц, средней мощностью 100 и 300 мВт и экспозицией 3 мин, а также излучением второй гармоники (400 нм, 50 фс, 120 мВт) все клетки диффузно окрашивались прижизненным красителем трипановым синим, что может свидетельствовать о их гибели или о нарушении проницаемости мембран. Однако имплантация таких клеток экспериментальным животным приводила к образованию на месте трансплантации опухолей, кинетика роста которых незначительно отличалась от контрольной. В группе мышей, которым клетки прививали после облучения импульсами второй гармоникой титан-сапфирового лазера, обнаружено торможение роста опухоли, связанное с частичной гибелью клеток при облучении под действием УФ компонент спектра. Для объяснения механизма наблюдаемого феномена рассматривается возможность образования пор (фотопорация) в клеточной мембране, ранее описанная в работах по трансфекции клеток чужеродной ДНК.*

Ключевые слова: титан-сапфировый лазер, фемтосекундное излучение, клетки опухоли Кребс-2, трипановый синий, фотопорация, кинетика роста опухоли *in vivo*.

1. Введение

С момента появления лазеры всегда были привлекательным инструментом для воздействия на клеточные структуры. Еще в первых экспериментах М.Бернса по воздействию микросфокусированного (до 0.5 мкм) лазерного излучения на внутриклеточные структуры (1970 г.) было показано, что наиболее уязвимым для лазерного излучения является клеточное ядро, а не митохондрии, рибосомы или мембраны. Прямое воздействие на ядро излучения аргонного лазера (488 нм) или второй гармоники Nd:YAG-лазера (532 нм) вызывало многочисленные хромосомные aberrации [1].

В 1984 г. было предложено использовать сфокусированный лазерный пучок для введения в клетку чужеродной ДНК (transfection) [2]. В случае транзientной трансфекции достаточно ввести ДНК в клетку на непродолжительное время, необходимое для ее экспрессии. При этом трансфицированная ДНК обычно не включается в ядерный геном и не реплицируется, а теряется по мере размножения клеток. Таким образом, для процедуры транс-

фекции необходимо сделать клеточную мембрану проницаемой для ДНК, например за счет образования пор.

Для оптической трансфекции применялись различные лазеры, и эффективность воздействия излучения на мембраны также была различна [3]. В первой работе по оптической трансфекции использовалось импульсное излучение лазера наносекундной длительности с длиной волны 355 нм, сфокусированное в пятно диаметром до 0.5 мкм. Предполагалось, что основными механизмами повреждения являются локальный нагрев и термоэластичный шок клетки. Эффективность трансфекции при этом составляла 0.3% – 38% всех облученных клеток. Для трансфекции также использовались непрерывный аргонный лазер и вторая гармоника наносекундного Nd:YAG-лазера. Однако наибольшая эффективность трансфекции (свыше 90%) была получена только с помощью фемтосекундного излучения титан-сапфирового лазера.

Использовать для оптической трансфекции лазер ближнего ИК диапазона с фемтосекундной длительностью импульсов предложили в 2002 г. Тирлапур и Кёниг [4]. Кроме высокой эффективности трансфекции, для него характерен принципиально иной механизм повреждения клеточной мембраны, предположительно основанный на многофотонных эффектах и генерации плазмы низкой плотности [3].

Детальное исследование действия фемтосекундного лазерного излучения ближнего ИК диапазона на клетки показало, что при высокой пиковой мощности лазерного излучения происходят локальные повреждения мембраны – фотопорация (photoporation) [5]. При выборе оптимальной мощности лазерного излучения эти повреждения являются кратковременными, и в дальнейшем поры закрываются благодаря механизмам клеточной репарации. Считается, что обратимые локальные повреждения клеточной мембраны происходят при плотности энергии на клеточной мембране ~ 0.1 мкДж/м² [5].

Ю.П.Мешалкин. Новосибирский государственный технический университет, Россия, 630092 Новосибирск, просп. К.Маркса, 20; Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 13/3; e-mail: yurimesh@ngs.ru

Н.А.Попова. Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090 Новосибирск, ул. Пирогова, 2

В.П.Николин, В.И.Каледин. Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 10; **А.В.Кирпичников, Е.В.Пестряков.** Институт лазерной физики СО РАН, Россия, 630090 Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 13/3

В экспериментах по трансфекции клеток чаще всего используется титан-сапфировый лазер с длиной волны 800 нм, длительностью импульса около 120 фс и частотой следования 80 МГц. Излучение жестко фокусируется на монослой клеток, расположенный на координатном столе, объективом с высокой числовой апертурой ($NA \sim 0.85$) [2, 3]. Время экспозиции изменяется от 10 до 250 мс при средней мощности 50–100 мВт.

Для доказательства существования локальных повреждений клеточных мембран используются методы оптической микроскопии с применением окраски прижизненными красителями, такими как трипановый синий [5]. После обработки *in vitro* клеток яичника китайского хомячка излучением фемтосекундного лазера они окрашивались трипановым синим, но при этом в массиве клеток присутствовали как погибшие, так и живые клетки с локальными повреждениями мембран. Таким образом, точно дифференцировать погибшие и живые клетки не представлялось возможным. Инкубация клеток с чужеродной ДНК и дальнейшее определение ее в живых клетках требовали применения сложных методов молекулярной биологии; кроме того, при этом появлялось много дополнительных факторов, приводящих к увеличению погрешности измерения эффективности транзientной трансфекции.

В настоящей работе эффект фотопорации впервые наблюдался на клетках опухоли Krebs-2; контроль функциональной активности клеток после облучения осуществлялся путем измерения кинетики роста опухоли *in vivo* после их имплантации экспериментальным животным. При этом выявлено, что благодаря оптическому усилению фемтосекундных импульсов облучение клеток не требует жесткой фокусировки излучения, а следовательно, возможно одновременное облучение большого массива клеток.

Дальнейшее изучение фемтосекундной лазерной фотопорации мембран опухолевых клеток может стать основой для разработки эффективных способов введения в клетку химиотерапевтических препаратов.

2. Образцы и методы исследований

Перевиваемый штамм опухоли Krebs-2 поддерживался в Институте цитологии и генетики СО РАН в асцитной форме на мышах линии CC57BR/Mv. Непосредственно перед облучением клетки извлекали, помещали в пробирку и разбавляли физраствором до концентрации 1 млн. клеток на 1 мл раствора. Для облучения клетки переносили в стандартный 96-луночный планшет в объеме 200 мкл. Жизнеспособность клеток до облучения определяли с помощью окрашивания 0.1%-ным трипановым синим. Подсчет окрашенных клеток производился в камере Горяева. В контрольных пробах доля погибших клеток не превышала 3%.

Клетки облучались фемтосекундным титан-сапфировым лазером Femtopower compact Pro. Для облучения использовалось излучение основной гармоники лазера с длиной волны 800 нм, длительностью импульсов 30 фс, частотой следования 1 кГц и средней мощностью $P_{\omega} = 100$ и 300 мВт, а также излучение второй гармоники с длиной волны 400 нм, длительностью импульсов 50 фс, частотой следования 1 кГц, средней мощностью $P_{2\omega} = 120$ мВт и энергией в импульсе 0.12 мДж.

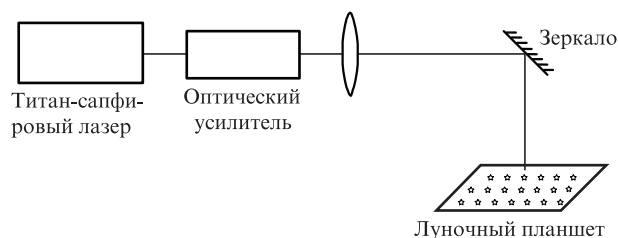


Рис.1. Схема экспериментальной установки для облучения клеток.

Оптическая схема установки приведена на рис.1. Лазерный пучок диаметром 16 мм с гауссовым распределением интенсивности сжимался длиннофокусной линзой до размера лунки с клетками, равного 6 мм. Параметры лазерного излучения (средняя мощность, длительность импульса, распределение интенсивности в пучке) измерялись непосредственно после поворотного зеркала.

Время облучения одной лунки с клетками составляло 3 мин. После облучения часть клеток окрашивали трипановым синим для определения процента «живых» клеток, а часть прививали экспериментальным животным – четырехмесячным самцам мышей линии CC57BR/Mv, полученным из Лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН. Опухоль перевивали в мышцы бедра дозой 100 тыс. клеток в объеме 100 мкл. Контрольной группе животных вводили опухолевые клетки, прошедшие ту же процедуру извлечения и разведения, включая помещение в лунку планшета, но без облучения. В дальнейшем, по мере роста опухоли, у животных прижизненно штангенциркулем измеряли три проекции диаметра бедра и рассчитывали эффективный объем опухоли. В каждой из четырех групп животных было по пять особей. Мышам первой (контрольной) группы имплантировали клетки без облучения, второй – клетки после облучения основной гармоникой со средней мощностью $P_{\omega} = 100$ мВт, третьей – после облучения основной гармоникой с $P_{\omega} = 300$ мВт и четвертой – после облучения второй гармоникой со средней мощностью $P_{2\omega} = 125$ мВт.

В целом время от извлечения клеток опухоли у мышидонора до имплантации после облучения не превышало трех часов.

3. Результаты и их обсуждение

Установлено, что в контрольной группе (без облучения) трипановым синим окрашивалось не более 3% клеток, а при облучении основной гармоникой титан-сапфирового лазера с $P_{\omega} = 300$ мВт и второй гармоникой с $P_{2\omega} = 125$ мВт все 100% клеток были диффузно окрашены. Однако, после того как эти «условно мертвые» клетки были имплантированы мышам, у всех животных наблюдался рост опухоли. На рис.2 приведены кривые роста опухоли для всех групп животных. Видно, что динамика роста опухоли в группе мышей, которым прививали клетки, облученные излучением основной гармоники при средних мощностях 100 и 300 мВт, и в контрольной группе практически одинакова. В общем случае кинетика роста опухоли без лечения описывается экспоненциальным законом [6]

$$F = F_0 e^{\rho t}, \quad (1)$$

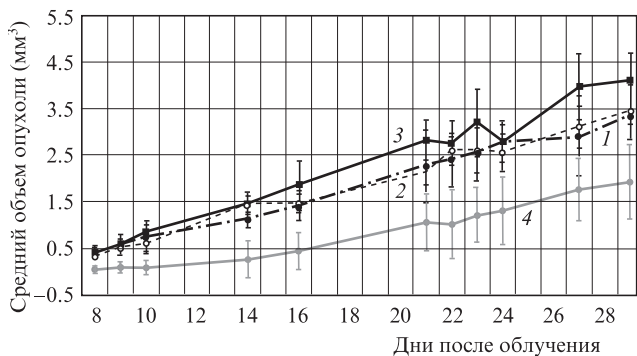


Рис.2. Кинетика роста опухоли после имплантации облученных клеток экспериментальным животным: 1 – клетки без облучения; 2 – после облучения излучением основной гармоники титан-сапфирового лазера (800 нм) со средней мощностью $P_{\omega} = 100$ мВт; 3 – после облучения основной гармоникой с $P_{\omega} = 300$ мВт; 4 – после облучения второй гармоникой (400 нм) со средней мощностью $P_{2\omega} = 125$ мВт.

где F – эффективный размер (объем) опухоли; φ – функция, характеризующая удельную скорость роста опухоли

Следует отметить, что опухоль Кребс-2 растет относительно медленно. Вследствие этого кинетические кривые построены для начального этапа роста, на котором экспоненциальная зависимость выражена не столь отчетливо.

Опухоли разного типа характеризуются разными удельными скоростями роста. Кроме того, удельные скорости роста даже одного типа клеток при их трансплантации разным линиям животных могут различаться. Так, например, по нашим данным опухоль лимфосаркомы у мышей гибридной линии СВАхС57В1 без лечения растет с удельной скоростью 0.21 ± 0.02 мм³/сутки (статистика – 5 животных), тогда как у мышей линии СВА – 0.46 ± 0.06 мм³/сутки (статистика – 36 животных). Чем выше удельная скорость роста, тем быстрее растет опухоль и тем меньше продолжительность жизни животного в отсутствие лечения.

Для количественной оценки лазерного воздействия на рост опухоли можно воспользоваться методом эквивалентных экспонент, предложенным Н.М.Эмануэлем [6] и примененным нами для оценки эффективности сочетанного химиотерапевтического и лазерного лечения опухолей [7].

Пусть средняя удельная скорость роста на временном интервале t_1, t_2 есть

$$\bar{\varphi}(t_1, t_2) = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \varphi(t) dt. \tag{2}$$

Поскольку

$$\varphi(t) = \frac{1}{F} \frac{dF}{dt} = \frac{d \ln F}{dt}, \tag{3}$$

то

$$\bar{\varphi}(t_1, t_2) = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} \frac{d \ln F}{dt} dt = \frac{\ln F(t_2) - \ln F(t_1)}{t_2 - t_1}. \tag{4}$$

Таким образом, удельная скорость роста, усредненная по всему интервалу t_1, t_2 , зависит только от значений F на концах этого интервала. Величина $\bar{\varphi}(t_1, t_2)$ равна показателю той «эквивалентной экспоненты», которая про-

ходит через концы кинетической кривой $F(t)$ на рассматриваемом интервале времени.

За меру эффективности воздействия (лечения) можно принять отношение средних удельных скоростей роста опухоли в контрольной и опытной группах:

$$\bar{\chi} = \frac{\bar{\varphi}_{\text{con}}(t_1, t_2)}{\bar{\varphi}_{\text{exp}}(t_1, t_2)} = \frac{t_{2\text{exp}} - t_{1\text{exp}} \ln F_{\text{con}}(t_{2\text{con}}) - \ln F_{\text{con}}(t_{1\text{con}})}{t_{2\text{con}} - t_{1\text{con}} \ln F_{\text{exp}}(t_{2\text{exp}}) - \ln F_{\text{exp}}(t_{1\text{exp}})}. \tag{5}$$

В общем случае величина $\bar{\chi}$ зависит от выбора обоих временных интервалов ($t_{1\text{con}}, t_{2\text{con}}$ и $t_{1\text{exp}}, t_{2\text{exp}}$). При выборе одинаковых интервалов их отношение в выражении (5) равно единице.

Так как при полном торможении роста опухоли $\varphi_{\text{exp}} = 0$ и эффективность воздействия (лечения) становится равной бесконечности, лучше использовать параметр

$$\chi^* = 1 - \frac{1}{\bar{\chi}}. \tag{6}$$

При $\chi^* = 0$ эффект отсутствует, при положительных значениях χ^* имеет место эффективное торможение роста опухоли, а при отрицательных – стимуляция ее роста.

При обработке наших экспериментальных результатов выбран временной интервал от 14 до 29 суток. Нижняя граница интервала взята из соображений достоверного появления опухоли у всех животных четвертой группы.

В результате обработки экспериментальных данных показано, что облучение фемтосекундным излучением со средней мощностью $P_{\omega} = 100$ мВт незначительно стимулирует рост опухоли ($\chi^* = -0.06$). Облучение основной гармоникой со средней мощностью с $P_{\omega} = 300$ мВт приводит к незначительному торможению роста опухоли ($\chi^* = -0.15$), а в случае облучения второй гармоникой торможение выражено сильнее ($\chi^* = 0.44$). Для сравнения отметим, что ранее при сочетанном воздействии циклофосфана и лазерного излучения мы получили параметр эффективности лечения $\chi^* = -1.34$ [7].

По всей видимости, торможение роста опухоли связано с гибелью части клеток в процессе облучения. При средней мощности излучения 300 мВт эти повреждения могут быть вызваны многофотонными процессами, а при облучении второй гармоникой лазера (центральная длина волны 400 нм и полуширина более 50 нм) в спектре присутствуют УФ компоненты, которые могут вызвать прямое тепловое разрушение белков и ферментов. Очевидно, что механизмы фотопорации и фотодеструкции клеток одни и те же, и они регулируются плотностью потока энергии через клеточные мембраны.

4. Выводы

По результатам настоящей работы можно сделать следующие выводы.

1. Фемтосекундное излучение титан-сапфирового лазера способно вызывать фотопорацию мембран клеток опухоли Кребс-2.

2. Следствием фотопорации мембраны является вхождение в клетки прижизненного красителя трипанового синего.

3. Облученные клетки остаются функционально активными и после их имплантации, вызывая рост опухоли у экспериментальных животных.

4. Анализ кинетических кривых обнаруживает, что после облучения клеток фемтосекундным излучением основной гармоники титан-сапфирового лазера с длиной волны 800 нм и средней мощностью 100 мВт наблюдается некоторая активизация роста опухоли, тогда как с увеличением средней мощности излучения основной гармоники либо при облучении излучением второй гармоники происходит значительное торможение ее роста, дающее лечебный эффект.

5. Опухолевые клетки, по нашему мнению, являются удобной моделью для изучения механизмов фотопорации клеток лазерным излучением.

6. Фотопорация клеток фемтосекундным лазерным излучением открывает перспективы для разработки способов введения в клетку различных лекарственных препаратов.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке АБЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» (проект 2.1.1/11430) и Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН №9.

1. Berns M.W., Rounds D.E. *Sci. Amer.*, **222**, 1010 (1970).
2. Tsukakoshi M., Kurata S., Nomiya Y., et al. *Appl. Phys. B*, **35**, 135 (1984).
3. Stevenson D.J., Gunn-Moore F.J., Campbell P., Dholakia K. *J. R. Soc. Interface*, **7**, 863 (2010).
4. Tirlapur U.K., König K. *Nature*, **418**, 290 (2002).
5. Stevenson D., Agate B., Tsampoula X., et al. *Opt.Express*, **14**, 7125 (2006).
6. Эмануэль Н.М. В кн. *Фундаментальные науки – медицине* (М.: Наука, 1981, с.73–84).
7. Мешалкин Ю.П., Халикова Т.А., Кулакова Е.В., Короленко Т.А. *Сибирский онкологический журнал*, **9**, 12 (2004).