

Бесконтактная микрохирургия и доставка веществ в стволовые клетки с помощью фемтосекундных лазерных импульсов

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

Исследованы эффективность микрохирургии клеточной мембраны мезенхимных стволовых клеток и последующая жизнеспособность клеток при локализованном и кратковременном воздействии фемтосекундных лазерных импульсов ИК диапазона с целью бесконтактной доставки в клетки заданных веществ.

Ключевые слова: фемтосекундные лазерные импульсы, лазерная микрохирургия, стволовые клетки, оптоинъекция, клеточная мембрана.

1. Введение

Заманчивые перспективы в области регенеративной медицины связывают со стволовыми клетками. Благодаря таким свойствам стволовых клеток, как способность к самоподдержанию и дифференцировке в зрелые специализированные клетки, открываются новые возможности в области генной и клеточной терапии кардиологических [1], онкологических [2], нейродегенеративных [3–4] и других социально значимых заболеваний [5–6]. Реализация данных возможностей зависит от того, насколько эффективными будут протоколы генетических манипуляций со стволовыми клетками [7], в частности лежащий в основе генной терапии перенос в клетки генетического материала (терапевтического гена). Терапевтический ген могут вводить как в клетки, предварительно выделенные из организма и культивированные вне его (терапия *ex vivo*), так и напрямую в заданную область организма (терапия *in vivo*). Успех лечения зависит не только от используемого терапевтического гена и генного носителя, но и от эффективности и безопасности доставки гена в клетки.

Решением проблемы эффективной доставки генов в клетки может стать применение современных лазерных технологий, в частности фемтосекундных лазерных импульсов (ФЛИ) для микрохирургии мембраны клеток с целью кратковременного изменения ее проницаемости. Методика лазерной доставки заданных внеклеточных веществ в клетки обладает несколькими преимуществами. Во-первых, она является бесконтактной, не требующей использования механических инструментов, и сохраняет стерильность процедуры. Во-вторых, возможность фокусировки лазерного излучения до субмикронных размеров обеспечивает высокую селективность воздействия, то есть становится возможной не только индивидуальная «обра-

ботка» выбранных клеток, но и «обработка» интересующего участка клетки. И наконец, применение лазерных импульсов ультракороткой длительности позволяет минимизировать риск повреждения клеток за счет нелинейных процессов и относительно малой энергии импульсов, необходимой для выполнения «хирургической» процедуры.

Возможности применения лазерного излучения для эффективной бесконтактной оптоинъекции веществ и трансфекции генов в клетки широко изучаются в настоящее время [8–20]. Первоначально важно было продемонстрировать принципиальную возможность трансфекции клеток *in vitro*, не делая количественные оценки эффективности метода, как, например, в работе [8], где с помощью излучения непрерывного аргонового лазера и добавления красителя феноловый красный осуществлялась доставка плазмидной конструкции в фибробласты. В дальнейшем авторы стремились получить количественные данные относительно эффективности оптоинъекции и трансфекции клеток. Если с помощью непрерывных [8, 9] и наносекундных лазеров [10, 11] достичь высокой эффективности трансфекции клеток, как правило, не удавалось (в основном эффективность не превышала 5%), то применение фемтосекундных лазеров позволило на порядок (до 50%–90%) улучшить данный показатель при трансфекции клеток *in vitro* [12–15] и стимулировало интерес ученых к дальнейшему изучению возможностей лазерной доставки веществ в клетки в режиме *in vivo* [16, 17].

Для выполнения фемтосекундной оптоинъекции и трансфекции в основном применяются титан-сапфировые лазерные системы [12–15], генерирующие ФЛИ на центральной длине волны 800 нм. Вероятно, это связано с тем, что данные лазерные системы одними из первых стали коммерчески доступными. Но ввиду конструктивных особенностей, из-за необходимости использования непрерывного лазера накачки, работающего на длине волны 532 нм, такие системы по-прежнему являются дорогостоящими. В связи с этим актуально применение альтернативных источников лазерного излучения фемтосекундной длительности, более дешевых и надежных в эксплуатации. Ранее [18] нами была продемонстрирована возможность успешного применения для оптоинъекции и трансфекции клеток лазерного скальпеля на основе иттербиевого фемтосекундного лазера (1048 ± 2 нм, 75 МГц,

И.В.Ильина, А.В.Овчинников, Д.С.Ситников, О.В.Чефонов, М.Б.Агранат. Объединенный институт высоких температур РАН, Россия, 125412 Москва, ул. Ижорская, 13, стр. 2; e-mail: ilyna_inna@mail.ru, ovtch2006@rambler.ru, sitnik.ds@gmail.com, oleg.chefonov@gmail.com, agranat2004@mail.ru

Поступила в редакцию 3 марта 2014 г., после доработки – 21 марта 2014 г.

~115 фс) со встроенным блоком диодной накачки, что значительно повышает стабильность всей системы и облегчает работу с лазером.

Для наглядного сопоставления результатов наши эксперименты были выполнены на клетках линии СНО (Chinese hamster ovary cells), часто выбираемых другими авторами [14, 15] в качестве модельных. Серия удачных экспериментов на клетках данной линии позволила продолжить изучение особенностей фемтосекундной лазерной доставки веществ непосредственно в стволовые клетки, так как именно при работе со стволовыми клетками, относящимися к категории трудно трансфицируемых («hard-to-transfect»), применение фемтосекундных лазеров может оказаться наиболее целесообразным [13, 19]. Несмотря на широкий интерес к технологиям лазерной доставки веществ в клетки, немногими авторами [13, 20] была продемонстрирована возможность успешной фемтосекундной лазерной трансфекции стволовых клеток. Положительные результаты (эффективность трансфекции ~25% [20] и 70% при использовании ФЛИ длительностью ~12 фс [13]), полученные авторами для отдельных категорий стволовых клеток, подтверждают актуальность дальнейших исследований в области лазерной трансфекции и оптоинъекции стволовых клеток различного происхождения.

В настоящей работе представлены результаты применения фемтосекундных лазерных импульсов ИК диапазона для воздействия на мембрану мезенхимных стволовых клеток и введения в них внеклеточных веществ. В клетки вводился флуоресцентный краситель иодистый пропидий, который одновременно служил индикатором успешной «перфорации» мембраны (т. е. создания микропоры в мембране клетки для транспорта внеклеточных веществ) с помощью ФЛИ и индикатором жизнеспособности клетки, подвергнутой лазерному воздействию. Экспериментальные исследования проводились на специализированном лазерном комплексе, включающем в себя два фемтосекундных лазера – иттербиевый лазер ТеМа (Авеста) и титан-сапфировый лазер TiF-20F (Авеста).

Возможность успешного применения излучения фемтосекундного иттербиевого лазера (1048 нм) для доставки в клетки линии СНО не только флуоресцентного красителя, но и плазмиды pEGFP-N1, кодирующей зеленый флуоресцирующий белок, была продемонстрирована нами ранее [18]. В настоящей работе излучение данного лазера применялось для микрохирургии клеточных мембран стволовых клеток, однако эффективность доставки внеклеточных веществ в стволовые клетки оказалась относительно невысокой. Основной причиной этого было снижение жизнеспособности подвергнутых лазерному воздействию клеток. Для повышения безопасности воздействия лазерных импульсов на стволовые клетки было решено использовать излучение фемтосекундного титан-сапфирового лазера (800 нм), генерирующего импульсы более короткой длительности (50 фс вместо 115 фс). Представленные ниже экспериментальные данные говорят о повышении эффективности оптоинъекции красителя в стволовые клетки и улучшении показателей жизнеспособности клеток при использовании такой лазерной системы.

2. Экспериментальная установка

Принципиальная схема экспериментальной установки представлена на рис.1. Первоначально лазерный ком-

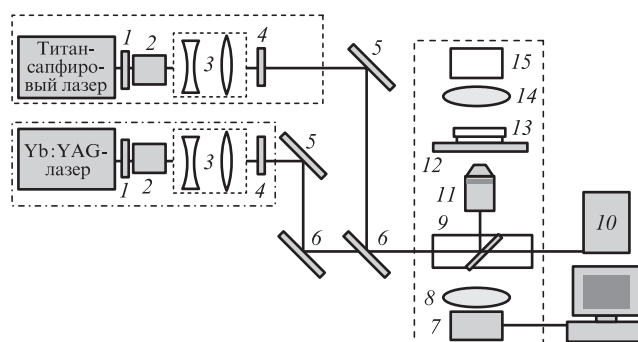


Рис.1. Схема экспериментальной установки на основе фемтосекундного лазера для введения в клетки внеклеточного материала: 1 – полуволновая пластинка; 2 – призма Глана; 3 – телескоп; 4 – механический затвор; 5, 6 – зеркала; 7 – ПЗС-камера; 8 – линза; 9 – турель на три сменные позиции с зеркалами для заведения излучения и наборами полосовых фильтров и светоделительных пластин для флуоресцентного анализа; 10 – металлогалогенная лампа; 11 – микрообъектив; 12 – моторизованный столик; 13 – чашка Петри; 14 – конденсор; 15 – лампа осветителя.

плекс, используемый для клеточной микрохирургии, был создан на базе фемтосекундного иттербиевого лазера ТеМа (1048 нм, ~115 фс, 75 МГц) с максимальной средней мощностью 3 Вт, что соответствует максимальной энергии импульсов 40 нДж. В дальнейшем лазерный комплекс был оснащен дополнительным модулем, включающим титан-сапфировый лазер TiF-20F (~50 фс в плоскости образца, 800 нм, 80 МГц, средняя мощность ~1 Вт). Ввод излучения как иттербиевого, так и титан-сапфирового лазеров в инвертированный микроскоп Axiovert40 (Carl Zeiss) реализуется через боковой порт, а с помощью диэлектрических зеркал, установленных в трехпозиционной турели микроскопа, излучение направляется в микрообъектив и фокусируется на образце.

Для получения монослоя клеток нужной концентрации исследуемые образцы (мезенхимные стволовые клетки) пересаживали из культуральных флаконов в чашку Петри (диаметр 35 мм, толщина стеклянного дна 170 мкм) за сутки до эксперимента и содержали в CO₂-инкубаторе (37 °С, 5% CO₂). Для лазерной обработки клеток чашку Петри фиксировали в держателе двухкоординатного моторизованного столика (Merzhäuser), перемещение которого по заданной траектории позволяло последовательно облучать выбранные клетки-мишени (скорость перемещения столика 10 мм/с, минимальный шаг 1 мкм). При этом сверху чашку накрывали портативным термостатом, поддерживающим температуру на уровне 36–37 °С. С помощью монохромной камеры AxioCam Icm1 (Carl Zeiss), установленной на месте одного из бинокляров, производилась видеорегистрация процесса облучения клеток. Для проведения флуоресцентного анализа облученных клеток в режиме реального времени микроскоп был оснащен флуоресцентным модулем. Излучение галогеновой лампы (120 Вт, X-Cite, EXPO) по волоконному световоду заводилось в задний порт микроскопа. Набор полосовых фильтров и светоделительную пластину, необходимые для флуоресцентного анализа, устанавливали в турель микроскопа.

Для регулировки энергии лазерных импульсов применялся поляризационный ослабитель, состоящий из полуволновой пластины и призмы Глана (выходную энергию лазерных импульсов изменяли вращением фазовой пластины). Для максимального заполнения входной апертуры

ры микрообъектива лазерным излучением и, следовательно, уменьшения размера пятна на объекте использовался телескоп, состоящий из рассеивающей и собирающей линз. Телескоп также позволял корректировать расходимость лазерного излучения для совмещения плоскости лазерного пучка минимального размера после фокусировки микрообъективом с плоскостью изображения. При переходе от одной клетки к другой при лазерной «обработке» требовалась небольшая подстройка фокуса, обусловленная различной толщиной клеток, а также тем, что поверхность стеклянной подложки, на которой находятся клетки, не является идеально плоской и имеет некоторый прогиб от центра к периферии. Длительность воздействия суга лазерных импульсов на образцы регулировалась с помощью расположенного за телескопом электромеханического затвора (Uniblitz (США), минимальное время экспозиции 6 мс).

3. Фемтосекундная лазерная микрохирургия мембран стволовых клеток для оптоинъекции флуоресцентного красителя

В исследовании мы использовали мультипотентные мезенхимные стромальные клетки основного вещества пупочного канатика человека (более 800 клеток). (Подробное описание характеристик культуры, особенностей выделения и культивирования можно найти в [21,22].) Флуоресцентный краситель иодистый пропидий (максимум линии поглощения красителя на длине волны 536 нм, максимум флуоресценции на длине волны 617 нм) использовался в качестве диагностического инструмента для определения оптимальных параметров лазерного излучения и режимов облучения, при которых осуществляется эффективная микрохирургия мембраны и сохраняется жизнеспособность клеток. Перед экспериментом клетки промывали и меняли культуральную среду на среду OptiMEM, содержащую иодистый пропидий (Sigma) в нужной концентрации (5 мкг/мл). Интенсивная флуоресценция иодистого пропидия в ядре клетки наблюдается в случае гибели или сильного повреждения клетки (рис.2, клетка 1), так как через мембрану живых клеток данный краситель не проникает. Поэтому перед началом эксперимента проводили флуоресцентный анализ клеток; отсутствие интенсивной флуоресценции ядер клеток подтверждало их жизнеспособность, после чего часть клеток подвергали воздействию ФЛИ. После открытия электромеханического затвора на заданный промежуток времени и облучения клетки-мишени чашку Петри перемещали на новую позицию и «обрабатывали» следующую клетку. Для точной идентификации обработанных клеток проводилась пред-

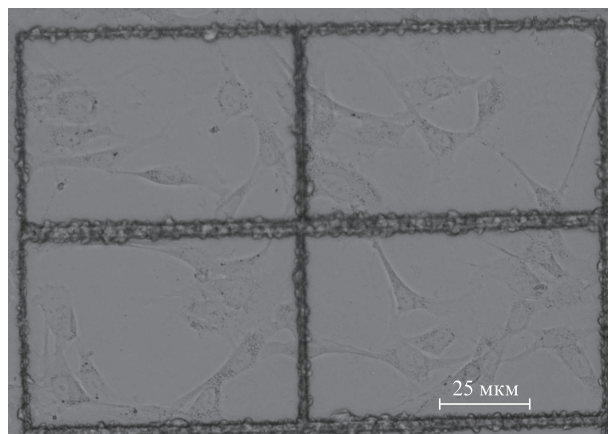


Рис.3. Поверхность стеклянного дна чашки Петри с монослоем мезенхимных стволовых клеток и нанесенной сеткой для идентификации клеток после лазерного воздействия.

варительная подготовка чашек Петри. С помощью наносекундного УФ лазера (355 нм, 2 нс, 100 Гц) на внутренней поверхности чашки Петри наносился массив из вертикальных и горизонтальных линий. Размер ячеек массива составлял 50–100 мкм. В каждой ячейке в среднем помещалось 5–15 клеток, что позволяло их идентифицировать в дальнейшем. Пример подготовленной к эксперименту чашки Петри с монослоем клеток показан на рис.3.

После эксперимента клетки промывали средней OptiMEM, помещали в культуральную среду, переносили на время в инкубатор, при этом через 5, 20 и 40 минут проводили регистрацию свечения флуорохрома внутри клеток. Показателем успешной микрохирургии клеточной мембраны и введения красителя в клетку служило наличие слабого свечения клетки (рис.2, клетка 2). Слабая по интенсивности флуоресценция клетки также свидетельствовала о ее жизнеспособности после воздействия лазерных импульсов.

3.1. Применение иттербиевого лазера для оптоинъекции красителя в стволовые клетки

Эксперименты, проведенные нами ранее на клетках линии СНО, более жизнеспособных, чем стволовые клетки, подтвердили возможность успешной трансфекции клеток и оптоинъекции в них внеклеточных веществ с помощью ФЛИ длительностью ~115 фс иттербиевым лазером ТеМа. Для фокусировки излучения на клетках использовался 60-кратный микрообъектив Olympus (UPlanFL, NA = 0.9), что позволяло сфокусировать лазерное излучение в пятно диаметром 1.8 мкм. Эффективность оптоинъекции при сохранении жизнеспособности клеток достигала 50% при

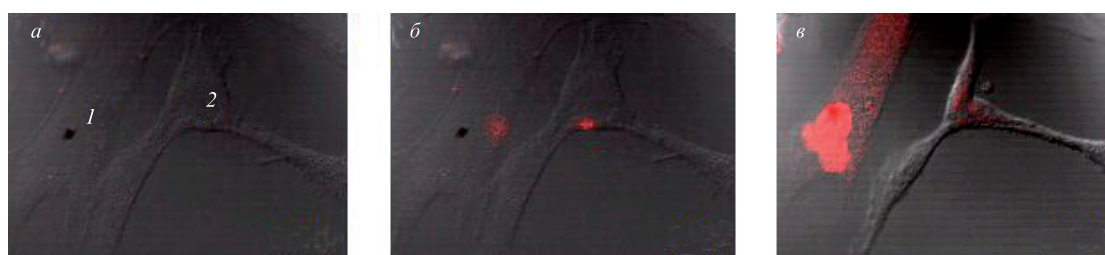


Рис.2. Динамика заполнения клеток флуоресцентным красителем иодистый пропидий в результате воздействия лазерного излучения через 0 (а), 5 с (б) и 5 мин (в) после воздействия (интенсивная флуоресценция красителя внутри клетки 1 свидетельствует о необратимом повреждении мембраны клетки, слабое свечение красителя внутри клетки 2 подтверждает её жизнеспособность).

Табл.1. Эффективность оптоинъекции флуоресцентного красителя в мезенхимные стволовые клетки при различных временах облучения клеток лазерными импульсами иттербиевого лазера.

Время экспозиции (мс)	Количество успешно «инъецированных» клеток (%)	Количество жизнеспособных клеток (%)	Итоговая эффективность оптоинъекции (%)
6	0	100	0
10	0	100	0
20	18	84	15.1
40	50	34	17
50	65	16	10.4
60	85	12	10.2
80	90	5	4.5
100	100	0	0

однократном облучении клеток линии СНО в течение 50 мс лазерными импульсами с энергией ~ 3 нДж (средняя мощность ~ 220 мВт), что соответствовало интенсивности на образце $\sim 10^{12}$ Вт/см².

При аналогичных параметрах лазерного излучения, принятых в качестве оптимальных, была проведена серия экспериментов на мезенхимных стволовых клетках. В большинстве случаев повышение проницаемости мембраны наблюдалось при возникновении в области воздействия ФЛИ кавитационных пузырьков. Формирование кавитационных пузырьков небольшого диаметра ($\sim 1-2$ мкм) приводило к локальному изменению проницаемости мембраны и транспорту внутрь клетки внеклеточных веществ. При этом увеличение времени экспозиции (как и увеличение энергии лазерных импульсов) приводит к возникновению кавитационных пузырьков диаметром $\sim 3-5$ мкм, которые вызывают необратимое повреждение клеточной мембраны и гибель клетки.

В табл.1 представлены данные по эффективности оптоинъекции и выживаемости клеток в зависимости от времени экспозиции. Видно, что увеличение времени облучения клеток приводит к повышению проницаемости мембраны и эффективности оптоинъекции, но в тоже время существенно снижает выживаемость клеток, поэтому целесообразно ввести критерий итоговой эффективности оптоинъекции $E_{inj} = (N_{inj}N_{via})/100\%$, равной произведению количества успешно «инъецированных» клеток N_{inj} на количество жизнеспособных клеток после облучения N_{via} . Максимальная итоговая эффективность оптоинъекции E_{inj} при использовании указанной лазерной системы составила 17% и соответствовала времени экспозиции клеток 40 мс. Для повышения E_{inj} было решено применить для обработки клеток лазерные импульсы меньшей длительности, что, как ожидалось, позволит снизить риск нежелательного повреждения клеток и тем самым улучшить показатели выживаемости клеток после облучения ФЛИ.

3.2. Применение титан-сапфирового лазера для оптоинъекции красителя в стволовые клетки

Облучение мезенхимных стволовых клеток лазерными импульсами с длиной волны 800 нм и длительностью 50 фс производилось последовательно («клетка за клеткой») путем однократного открытия электромеханического затвора на 6–100 мс. Для фокусировки излучения на объектах использовался тот же 60-кратный микрообъектив Olympus. Диаметр лазерного пучка в плоскости объекта (по уровню снижения интенсивности в $1/e$ раз) был равен 1.5 мкм. В

результате экспериментов обнаружено, что вероятность успешной инъекции красителя в клетку достигает 50% при воздействии на клетки лазерными импульсами с энергией не менее 1.4 нДж (т.е. при пиковой интенсивности не менее 1.5×10^{12} Вт/см² и средней мощности не менее 115 мВт) при длительности облучения клеток ~ 20 мс. С увеличением времени экспозиции клеток свыше 40 мс или энергии импульсов свыше 1.9 ± 0.1 нДж жизнеспособность клеток, несмотря на высокую эффективность оптоинъекции, резко ухудшается ввиду образования кавитационных пузырьков значительных размеров (более 3 мкм). Поэтому для сохранения жизнеспособности клеток длительность лазерного воздействия и энергии импульсов были ограничены на уровне 20 мс и 1.4–1.5 нДж.

Для наглядности на рис.4 представлены данные по эффективности доставки красителя в клетки и последующей выживаемости клеток при их облучении импульсами с энергией 1.5 нДж в зависимости от времени экспозиции. Как видно, успешная оптоинъекция наблюдалась в 65% случаев при времени облучения 20 мс, при этом 50% клеток сохраняли жизнеспособность (при меньших временах экспозиции итоговая эффективность оптоинъекции остается низкой ввиду малой вероятности успешной оптоинъекции, а при временах экспозиции, больших 20 мс, резко снижается жизнеспособность клеток). Таким образом, удавалось достичь $E_{inj} = 32.5\%$, что в 1.9 раза больше, чем при использовании ФЛИ иттербиевого лазера (115 фс, 1048 нм). Экспериментальные данные показывают, что увеличение итоговой эффективности оптоинъекции при использовании титан-сапфирового лазера связано с уменьшением энергии импульса и, следовательно, средней мощности воздействия на клетки в результате снижения длительности импульса, что положительно влияет на их жизнеспособность. Уменьшение средней мощности воздействия также происходит вследствие уменьшения в ~ 1.25 раза диаметра пятна фокусировки из-за более короткой длины волны излучения. Таким образом, для увеличения итоговой эффективности оптоинъекции целесообразно использовать источники фемтосекундного лазерного излучения с более короткими длинами волн и длительностями импульса.

При выполнении экспериментов была изучена возможность дальнейшего повышения итоговой эффективности оптоинъекции путем двукратного и трехкратного облучения клеток ФЛИ. Для этого электромеханический затвор открывался на 20 мс несколько раз для облучения

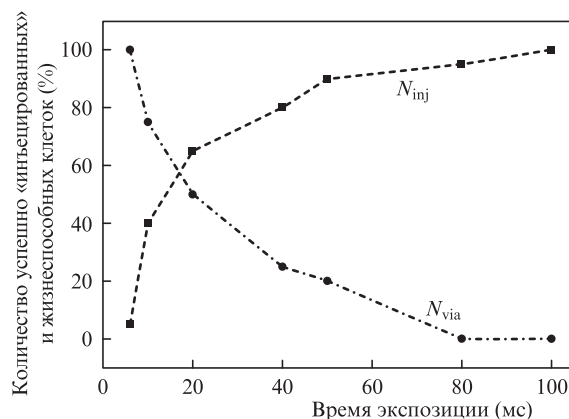


Рис.4. Зависимости количества успешно инъецированных мезенхимных стволовых клеток и количества жизнеспособных клеток при использовании лазерных импульсов титан-сапфирового лазера от времени экспозиции.

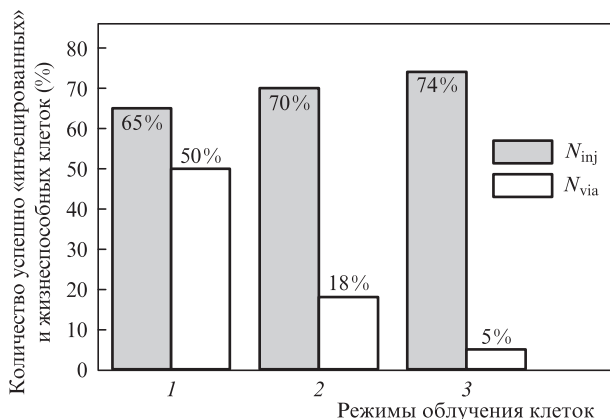


Рис.5. Эффективность оптоинъекции иодистого пропидия в мезенхимные стволовые клетки и последующая выживаемость клеток при их однократном (1), двукратном (2) и трехкратном (3) облучении в течение 20 мс фемтосекундными лазерными импульсами с энергией 1.5 нДж (800 нм, 50 фс).

одной и той же клетки. Перед повторным облучением клеток производили «подстройку» плоскости фокусировки излучения на поверхности мембраны. Полученные результаты показаны на гистограмме (рис.5). Как видно, эффективность оптоинъекции N_{inj} возрастает с 65% до 70% при двукратном облучении и до 74% при трехкратном. Это можно объяснить тем, что с первого раза не всегда удавалось точно сфокусировать лазерное излучение на клеточной мембране, а при повторном облучении проводилась дополнительная «подстройка» плоскости фокусировки излучения на поверхности мембраны, что увеличивало вероятность успешного исхода проводимых лазерных манипуляций. Но в тоже время значительного увеличения итоговой эффективности оптоинъекции при увеличении количества облучений достичь не удалось, что свидетельствует о том, что основная масса успешно инъцированных клеток получалась уже в результате однократного облучения. Последующее двукратное и трехкратное облучение клеток позволяло повысить эффективность оптоинъекции на 5%–9%, но привело к резкому снижению показателей выживаемости клеток (N_{via} уменьшалось до 18% и 5% соответственно), что отразилось на итоговой эффективности оптоинъекции (E_{inj} снизилось до 12.6% и 3.7% соответственно). Таким образом, можно заключить, что при заданных параметрах лазерного излучения (800 нм, 80 МГц, 50 фс, 1.5 нДж, 120 мВт) и времени воздействия на клетки 20 мс однократный режим облучения является оптимальным и позволяет достичь $E_{inj} = 32.5\%$.

4. Заключение

Продемонстрирована возможность успешного применения фемтосекундных лазерных импульсов ИК диапазона для бесконтактного введения внеклеточных веществ в стволовые клетки. Локализованное воздействие на клеточную мембрану стволовых клеток осуществлялось с помощью лазерного излучения иттербиевого и титан-сапфирового лазеров. Параметры лазерного излучения и режим облучения клеток были оптимизированы таким образом, чтобы не только повысить эффективность оптоинъекции, но и сохранить жизнеспособность клеток. В результате при использовании импульсов иттербиевого

лазера (1048 нм, 115 фс, ~3 нДж) и однократном облучении клеток в течение 40 мс итоговая эффективность оптоинъекции флуоресцентного красителя иодистый пропидий в мезенхимные стволовые клетки составила 17%. Повысить E_{inj} до 32.5% удалось при использовании импульсов титан-сапфирового лазера (800 нм, 50 фс, 1.5 нДж). При этом, как и в первом случае, оптимальным оказался режим не многократного, а однократного облучения клеток (в течение 20 мс). Проведенные эксперименты подтвердили эффективность применения фемтосекундных лазерных импульсов для выполнения высокоточных микрохирургических процедур на стволовых клетках и служат основанием для проведения дальнейших исследований по доставке в стволовые клетки нуклеиновых кислот (лазерная трансфекция) для направленной модификации их свойств и функций.

Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН № 13 «Экстремальные световые поля и их приложения» (проект № 4.10).

Авторы глубоко признательны Н.В.Кошелевой за предоставление клеточной линии ММСК для исследований.

- Bradshaw A.C., Baker A.H. *Vascular Pharmacology*, **58**, 174 (2013).
- Sagar J., Chaib B., Sales K., Winslet M., Seifalian A. *Cancer Cell International*, **7**, 9 (2007).
- Muller F.-J., Snyder E.Y., Loring J.F. *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 75 (2006).
- Ризванов А.Л., Исламов Р.Р., Гусева Д.С., Киясов А.П. *КТТИ*, **11**, 29 (2007).
- Colella P., Cotugno G., Auricchio A. *Trends Mol. Med.*, **15**, 23 (2009).
- Kaneda Y., Tamai K. *Arch. Dermatol. Res.*, **295**, S63 (2003).
- Lakshmi U., Pelacho B., Sudo K., Linehan J.L., Coucouvanis E., Kaufman D.S., Verfaillie C.M. *Stem Cells*, **22**, 531 (2004).
- Palumbo G., Caruso M., Crescenzi E., Tecce M.F., Roberti G., Colasanti A. *J. Photochem. Photobiol. B*, **36**, 41 (1996).
- Nikolskaya A.V., Nikolski V.P., Efimov I.R. *Cell Communication and Adhesion*, **13**, 217 (2006).
- Mohanty S.K., Sharma M., Gupta P.K. *Biotechnol. Lett.*, **25**, 895 (2003).
- Terakawa M., Sato S., Ashida H., Aizawa K., Uenoyama M., Masaki Y., Obara M. *J. Biomed. Opt.*, **11**, 014026 (2006).
- Baumgart J., Bintig W., Ngezahayo A., Willenbrock S., Escobar H.M., Ertmer W., Lubatschowski H., Heisterkamp A. *Opt. Express*, **16**, 3021 (2008).
- Uchugonova A., König K., Bueckle R., Isemann A., Tempea G. *Opt. Express*, **16**, 3957 (2008).
- Ma N., Gunn-Moore F., Dholakia K. *J. Biomed. Opt.*, **16**, 028002 (2011).
- Stevenson D., Agate B., Tsampoula X., Fischer P., Brown C.T., Sibbett W., Riches A., Gunn-Moore F., Dholakia K. *Opt. Express*, **14**, 7125 (2006).
- Zeira E., Manevitch A., Khatchatourians A., Pappo O., Hyam E., Darash-Yahana M., Tavor E., Honigman A., Lewis A., Galun E. *Molecular Therapy*, **8**, 342 (2003).
- Tsen S.-W.D., Wu C.-Y., Meneshian A., Pai S.I., Hung C.-F., Wu T.-C. *J. Biomed. Sci.*, **16**, 36 (2009).
- Ильина И.В., Овчинников А.В., Чефонов О.В., Ситников Д.С., Агранат М.Б., Микаелян А.С. *Квантовая электроника*, **43** (4), 365 (2013).
- König K., Raphael A.P., Line L., Grice J.E., Soyer H.P., Breunig H.G., Roberts M.S., Prow T.W. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **63**, 388 (2011).
- Mthunzi P., Dholakia K., Gunn-Moore F. *J. Biomed. Opt.*, **15**, 041507 (2010).
- Сабурин И.Н., Горкун А.А., Кошелева Н.В., Семенова М.Л., Пулин А.А., Репин В.С. *Вестник новых медицинских технологий*, **XVI** (4), 9 (2009).
- Prihod'ko A.V., Isaev A.A., Kisel'ov S.L., Lagar'kova M.A., Kosheleva N.V., Saburina I.N., Melikhova V.S. European patent EP 2277994 (A1). Date of publication 26.01.2011.