

УДК 535.8.

Исследование процессов, происходящих при фемтосекундном оптоперфорировании биологических мембран

М.М. Корнилов^{1,2}, В.А. Надточенко², А.Н. Костров², А.Д. Залесский², А.В. Айбуи²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Институт химической физики РАН

Аннотация

В данной работе проведено теоретическое обоснование методов воздействия лазерного излучения на биологические объекты. Указаны области, где доминирующее воздействие оказывает тот или иной механизм. Проведено фемтосекундное оптоперфорирование стенок мембран эмбрионов мыши, состоящих из двух бластомеров. Определен режим облучения и соответствующий ему доминирующий механизм воздействия лазерного излучения на биологический образец. Анализ полученных данных показал корректность определенного режима – фоторазрушения. В работе приведены кадры, отображающие воздействие ударной волны на стенку мембраны. Произведено исследование эволюции диаметра и давления кавитационного пузыря во времени и приведены соответствующие рассуждения, связанные со скоростью «схлопывания пузыря» и характера зависимостей. Определена функциональная зависимость, связывающая время жизни кавитационного пузыря и его максимальный радиус. Полученная зависимость имеет вид $t_L = A \times D^k$, где $k = 1.7$, t_L – время жизни кавитационного пузыря, а D – максимальный диаметр.

Введение

На сегодняшний день существует множество различных способов перфорирования клеточных мембран. Особо интересными являются, так называемые, нон-инвазивные методы, или методы, исключающие прямое вторжение в биологический образец. Это, прежде всего, оптоперфорирование. Исследование процессов, происходящих при фемтосекундном оптоперфорировании, позволит проводить более чистую микрохирургию биологических мембран.

Можно выделить пять основных механизмов воздействия лазерного излучения на биологические ткани: фотохимическое воздействие, термальное воздействие, фотоабляция, фоторазрушение, образование плазмы [1]. Эти пять типов воздействия лазерного излучения на ткань были обобщены Ниемзом и представлены на двойном логарифмическом графике (см. рис. 1). По оси абсцисс отложена длительность облучения, а ордината отображает используемую плотность мощности или интенсивность. Данная зависимость носит эмпирический характер, изображенные границы условны.

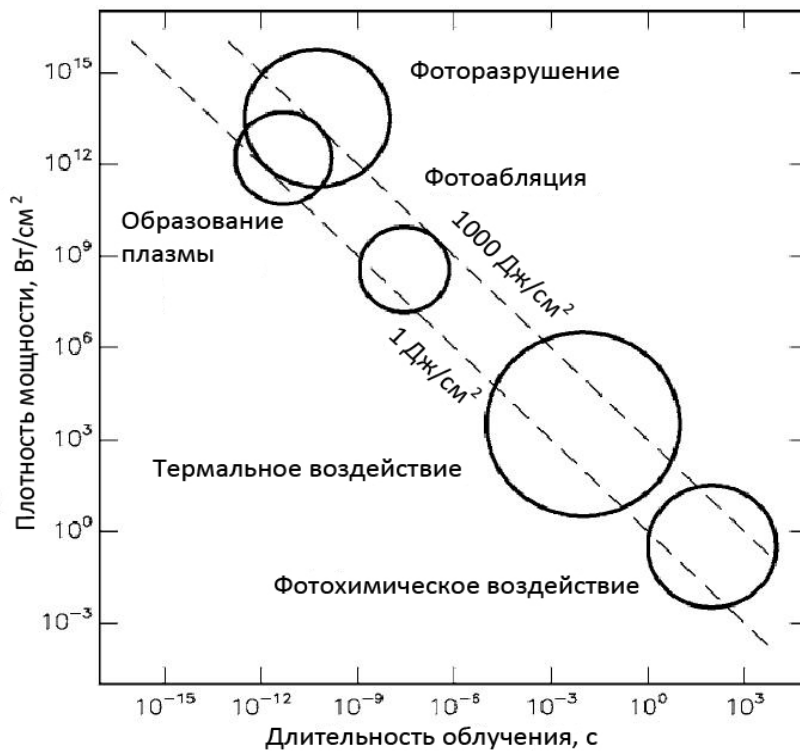


Рис. 1. Механизмы воздействия света на вещество при различных параметрах длительности излучения и плотности мощности лазера. Пунктирной линией обозначены линии постоянных значений плотности энергии – 1 Дж/см² и 1000 Дж/см² соответственно

Фотохимическое воздействие связано с инициацией светом различных химических эффектов и реакций в биологических макромолекулах и тканях. В данном механизме фотоны возбуждают молекулы или атомы, что делает их более подверженными химическим реакциям с другими молекулами. Данному механизму свойственны низкая плотность мощности (порядка 1 Вт/см²) и большое время экспозиции (от нескольких секунд до непрерывного излучения).

В фототермическом воздействии фотоны поглощаются хромофорами и преобразуются в тепловую энергию, которая, в свою очередь, может вызвать ряд различных эффектов. В зависимости от типа облучения, структуры ткани и величины повышения температуры, можно выделить следующие эффекты: коагуляция, испарение, карбонизация, плавление [1]. Этим эффектам соответствуют определенные диапазоны температур.

Фотоабляция — это один из методов удаления вещества лазерным излучением. Фотоны непосредственно разрывают молекулярные связи на поверхности ткани, что приводит к диссоциации молекул. Для данного механизма воздействия требуется высокая плотность энергии, которая обычно достигается с помощью импульсного или УФ-лазера.

Феноменологически, процесс образования плазмы заключается в ускорении свободного электрона сильным электрическим полем излучения в непосредственной близости фокусу лазерного луча. При столкновении с другими молекулами, он выбивает электрон и т.д. В результате получается смесь электронов и ионов, т.е. плазма.

Под фоторазрушением подразумевается совокупность механических эффектов, которые обычно сопровождают процесс образования плазмы при более высоких плотностях мощности, таких как образование пузырей и генерация ударной волны. Если пробой происходит внутри мягкой ткани или жидкости, то имеют место дополнительные кавитации и струи, которые могут играть основополагающую роль в перфорировании мембраны. Они достигаются если длительность лазерного импульса меньше характерного времени распространения волн напряжения за пределы фокального объёма. Для числовых апертур 0.8 – 1.3 и длин волн лазера 337 – 1064 нм диапазон значений длительности лазерного импульса составляет 100 – 550 пс [2]. Процесс образования плазмы и фоторазрушения происходят в результате нелинейного оптического пробоя, т.е. только при очень высокой интенсивности, превышающей 10^{11} Вт/см². Такая интенсивность может быть достигнута с помощью короткоимпульсных лазеров.

Экспериментальная часть

Для осуществления микрохирургического эффекта, в данной работе использовалась следующая установка, схема которой представлена на рис. 2. Основу установки составляет инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71, в который заводится лазерное излучение. В микроскопе происходит фокусировка излучения с помощью объектива с высокой числовой апертурой (Olympus 100x UPLSAPO с числовой апертурой 1.4 или Olympus 60x LUCPLFLN с числовой апертурой 0.7). В данной установке используется фемтосекундный лазер Mai – Tai фирмы Newport\Spectra Physics (длительность 100 фс, частота повторения 80 МГц, спектральный диапазон 690 – 1000 нм). Сфокусированное излучение попадает в предметную плоскость, где находится исследуемый образец. Визуальный контроль осуществляется с помощью камеры SonyExwaveHAD. Перемещение образца, находящегося на предметном столике, может осуществляться «вручную» или с помощью позиционных двигателей, которые обеспечивают точность перемещения порядка десятка нанометров. К другому плечу микроскопа по оптическому волокну подключен диодный лазер (не показано на схеме; длина волны 1.48 мкм, пиковая мощность 300 мВт), излучение которого впоследствии попадает на предметный столик.

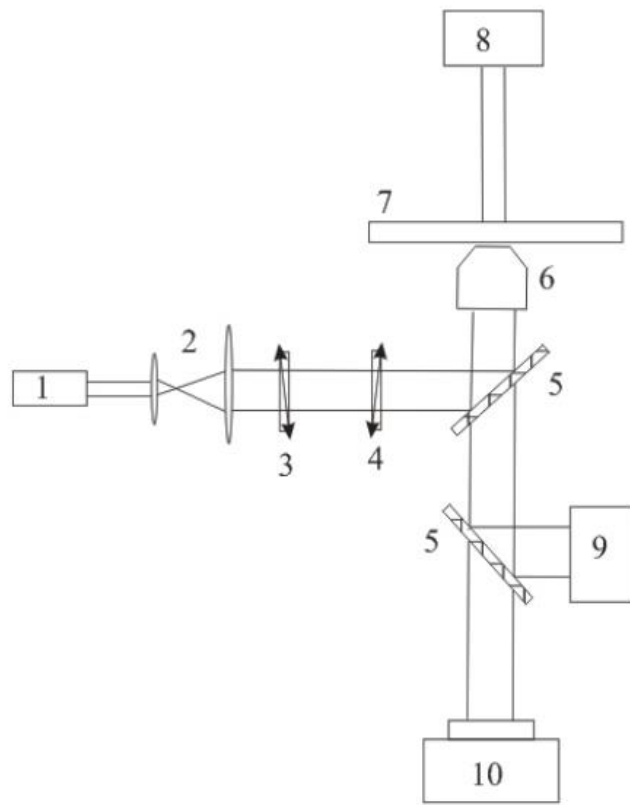


Рис. 2. Схема установки. 1 – лазер; 2 – линзы, расширяющие пучок; 3 – поляризатор; 4 – анализатор; 5 – дихроическое зеркало; 6 – объектив; 7 – предметный столик; 8 – освещение; 9 – спектрометр/счетчик фотонов; 10 – камера.

Описание эксперимента

В работе проводилось фемтосекундное оптоперфорирование стенок мембран эмбрионов мыши, состоящих из двух бластомеров. Данный выбор объекта исследований основывается на том, что эмбриональная стволовая клетка мыши является основным модельным объектом в исследовании эмбриональных стволовых клеток человека. Слияние выполнялось при помощи фемтосекундного «скальпеля», путём воздействия в область плотного контакта клеток. На рис. 3 приведены выборочные кадры эксперимента, полученные с помощью камеры оптического микроскопа. После воздействия, эмбрионы помещались в CO_2 инкубатор для дальнейшего культивирования. При успешном проведении процедуры наблюдалось полное слияние клеток эмбриона и образование одной большой клетки.

В работе использовались следующие параметры фемтосекундного лазера: длина волны – 800 нм, длительность импульса – 100 фс, частота повторений – 80 МГц, мощность в предметной плоскости – 150 мВт, длительность облучения – 30 мс. Тогда соответствующая плотность мощности составляет $0,5 \cdot 10^{13}$ Вт/см², что соответствует процессу фоторазрушения – процессу, сопровождающему образование плазмы. На кадре 2 на рис. 3 отчетливо виден кавитационный пузырь, который является критерием верности определенного выше процесса. Во многих работах полагается, что именно образование

долгоживущего (~1 с) кавитационного пузыря является признаком успешно проведенного слияния при фемтосекундной перфорации.

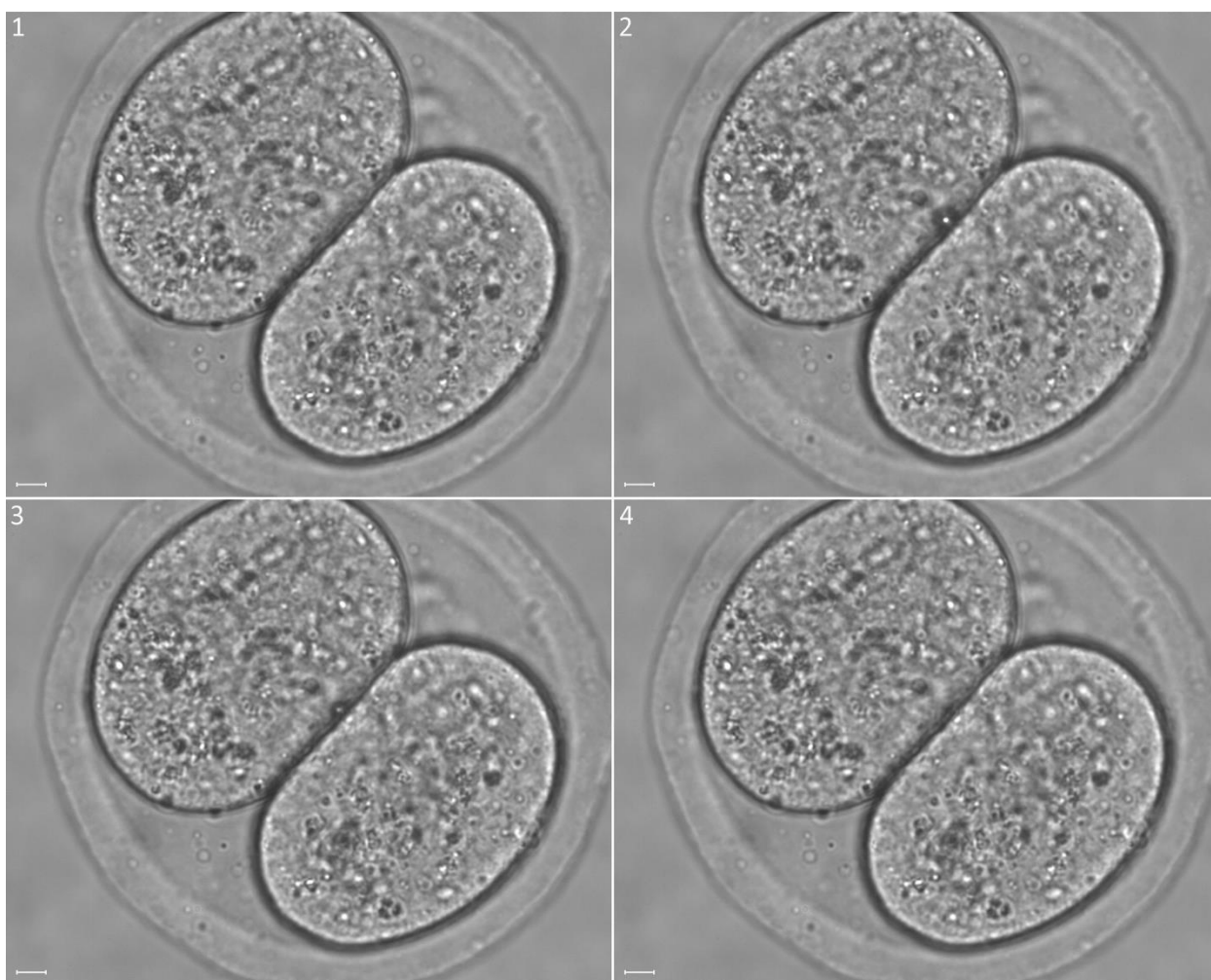
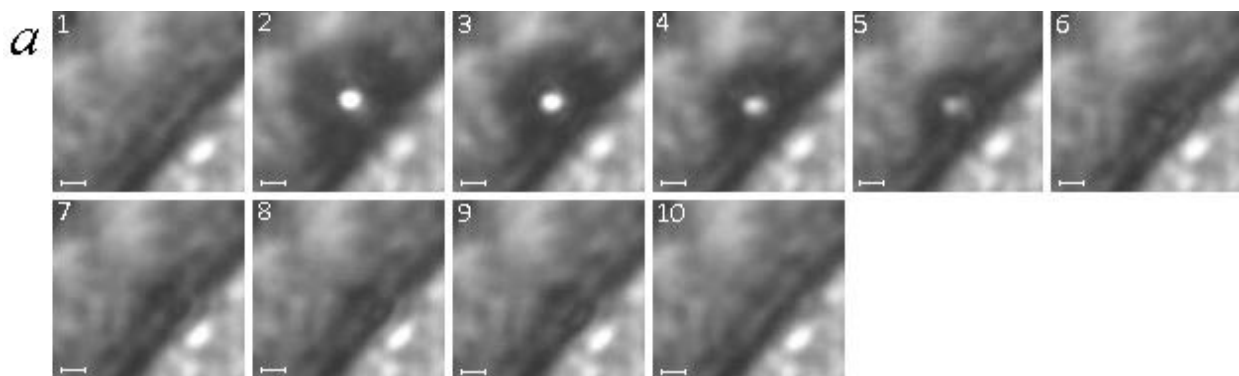


Рис. 3. Выборочные кадры перфорации бластомера мыши. Расстояние между кадрами составляет 0,27 с. Характерный масштаб, изображенный на рисунке, составляет 5 мкм.

Результаты

Динамика поведения кавитационного пузыря

В данной работе проведено исследование динамики поведения кавитационного пузыря во времени. В качестве объекта исследования были отобраны кавитационные пузыри с диаметрами около 5 мкм. На рис. 4*a–г* представлены детальные картины эволюции данных кавитационных пузырей.



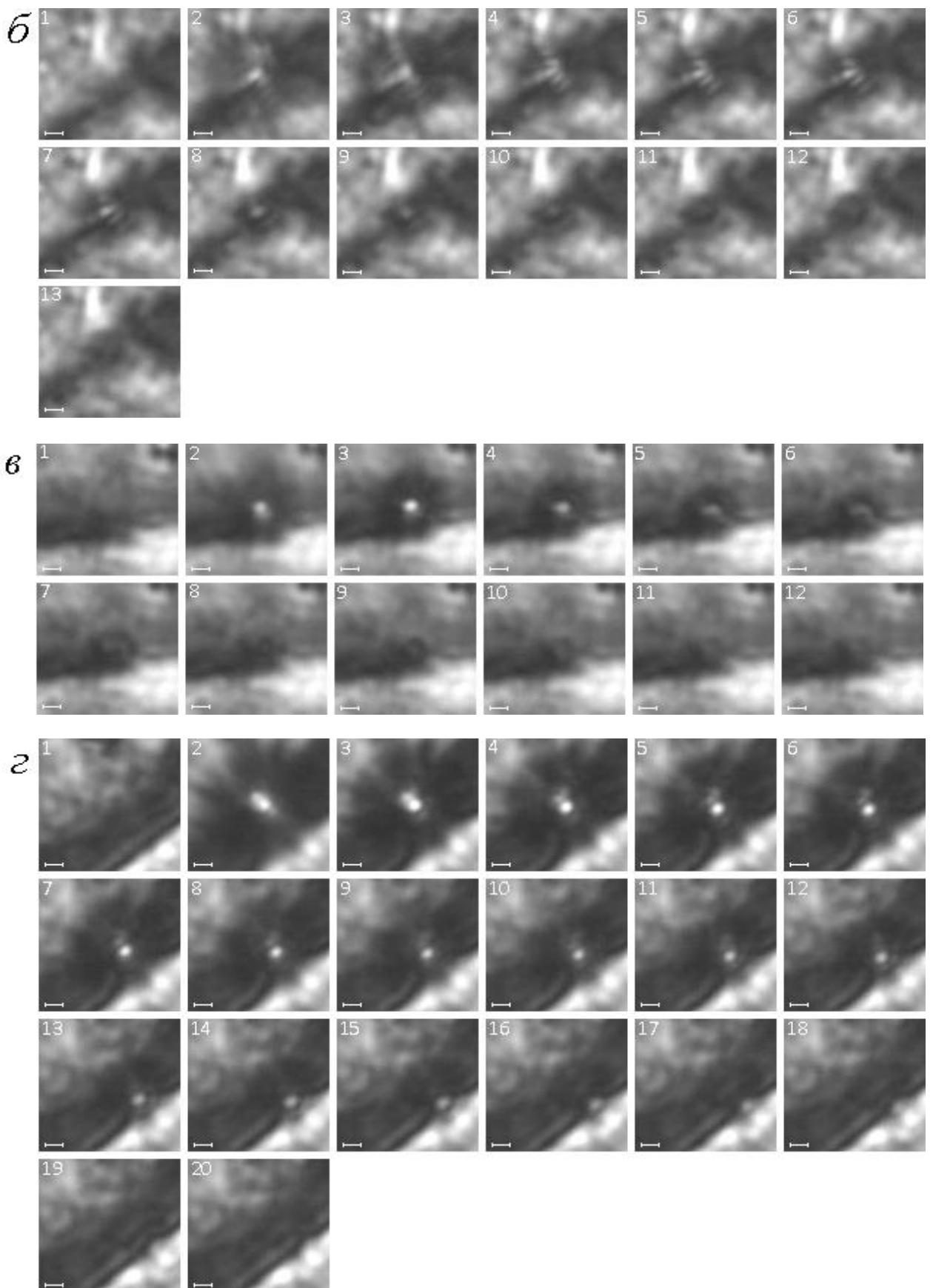
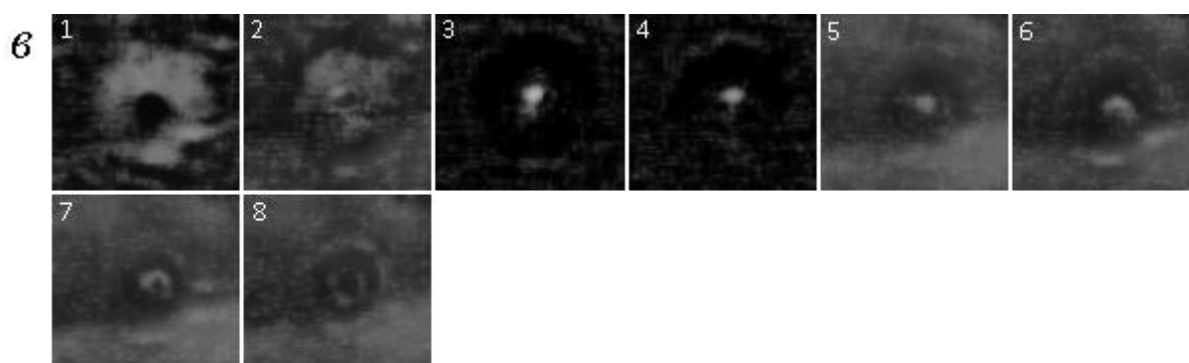
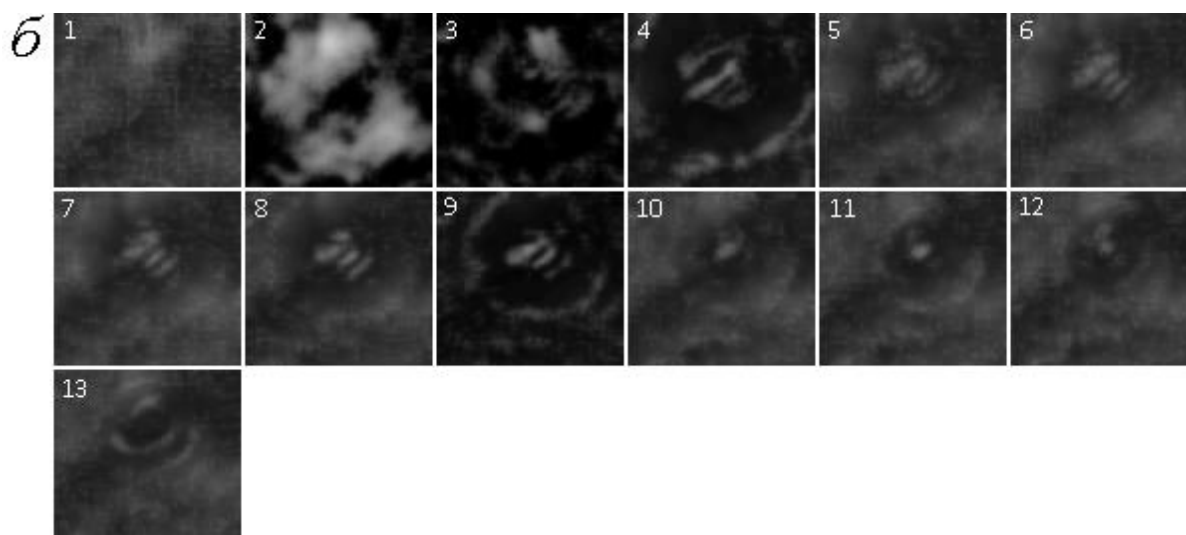
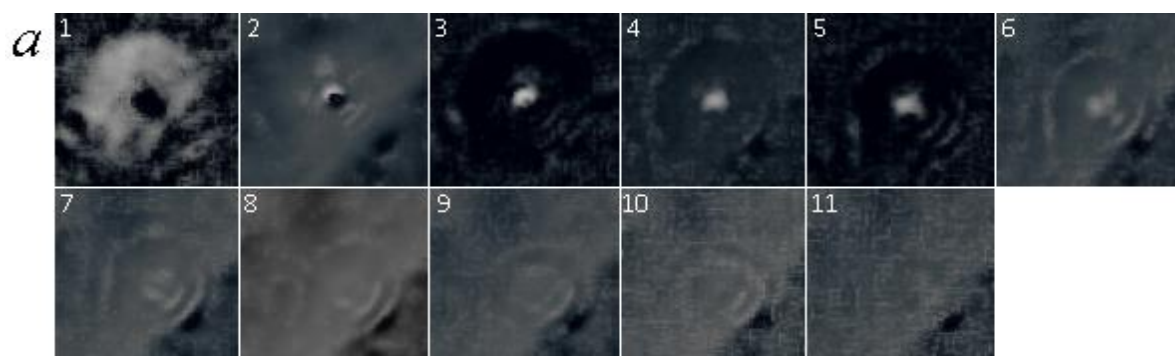


Рис. 4а –з. Эволюция кавитационных пузырей во времени. Расстояние между кадрами 0.09 с. На кадре 2 каждого рисунка а –з изображен кавитационный пузырь максимальных размеров. Его диаметр – 5.08 мкм, 5.28 мкм, 5.09 мкм, 7.82 мкм соответственно. Времена – 0.62 с, 0.89 с, 0.62 с, 1.42 с соответственно. Характерный масштаб, указанный на рисунках, составляет 1 мкм.

Моменты «схлопывания» кавитационных пузырей на рис. 4*a–г* определяются появлением расходящейся волны напряжения в месте их непосредственной гибели. Она отчетливо видна на рис. 4*в* на кадрах 9–12 в виде расходящейся темной сферы.

Для определения механизма перфорирования мембранной стенки кавитационным пузырем, на рис. 5*a–г* приведены разностные изображения эволюции пузырей изображенных на рис. 4*a–г*, путем последовательного вычитания из предыдущего кадра последующий.



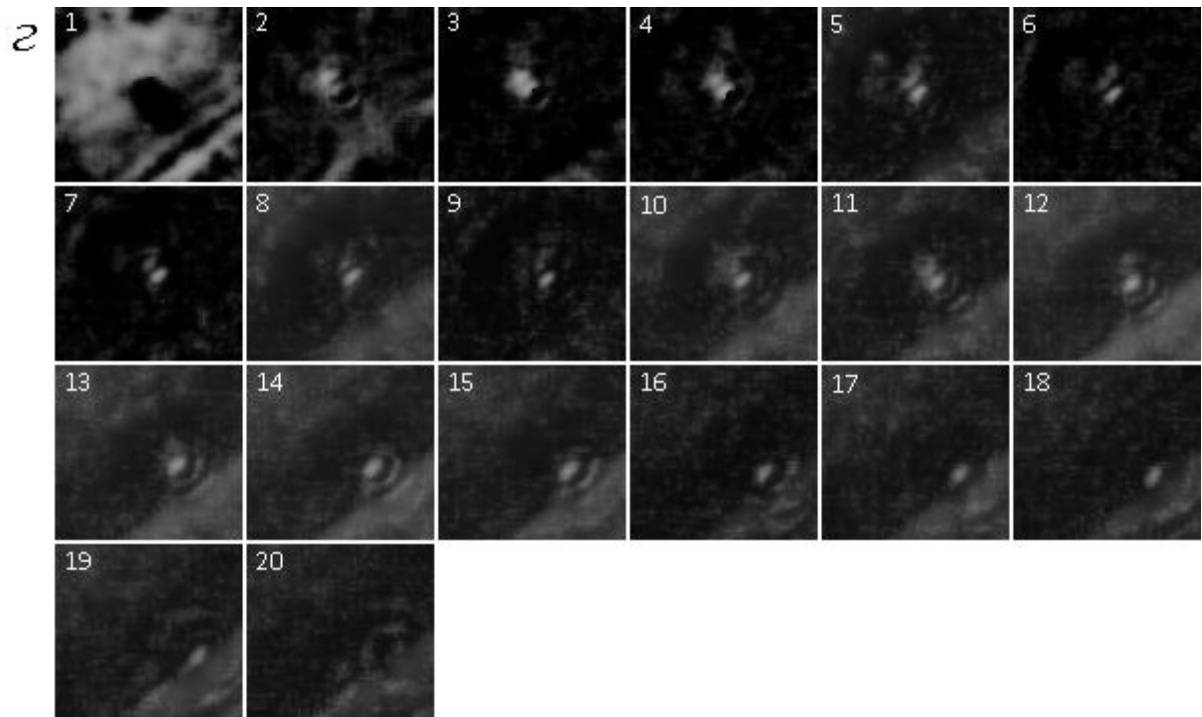
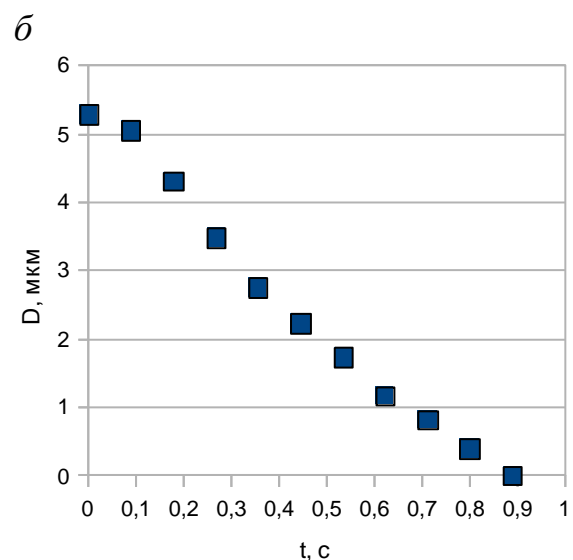
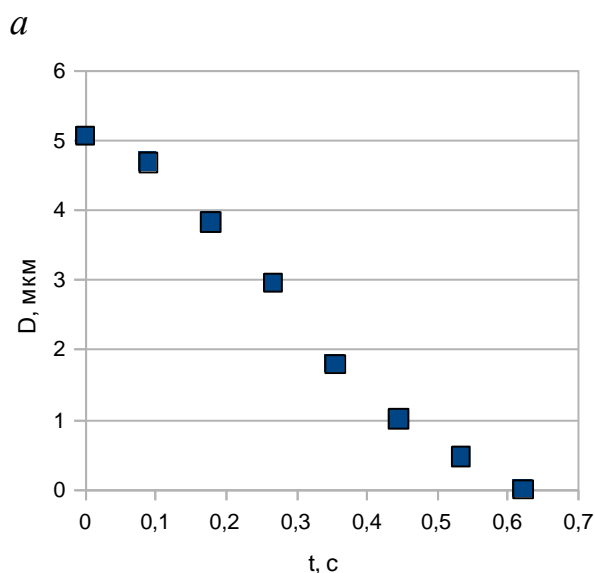


Рис. 5а–z. Разностные изображения эволюции кавитационного пузыря при последовательном вычитании из предыдущего последующий кадры, взятые из рис. 4.

Пространственные и временные масштабы совпадают.

Анализ данных изображений показывает, что процесс «схлопывания» кавитационного пузыря сопровождается волна напряжения, фронт которой направлен в сторону стенки мембраны, возле которой пузырь был рожден. Нами введено предположение, что данная волна производит перфорирование мембраны. Она отчетливо видна на рис. 5а изображениях 3–9, рис. 5б изображениях 5–9. На рис. 5z изображениях 10–16 виден процесс взаимодействия волны напряжения со стенкой мембраны (правый нижний угол, имеющий серый цвет).

Для данных пузырей проведено исследование эволюции диаметра и давления от времени (начало отсчета – момент рождения соответствующего пузыря – кадр 2 на рис. 4а–z). На рис. 6–7 приведены результаты расчетов.



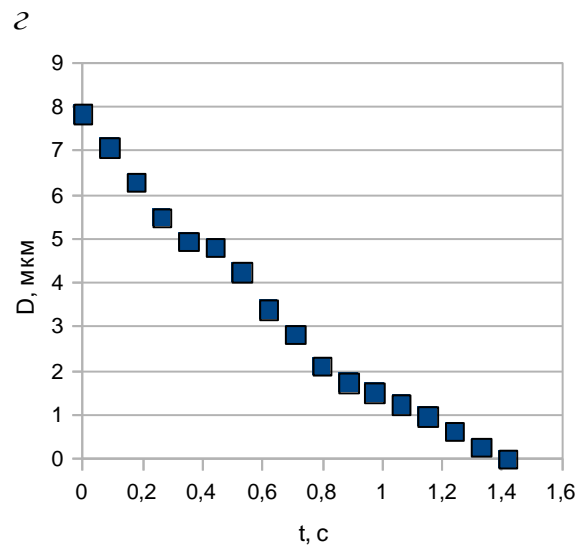
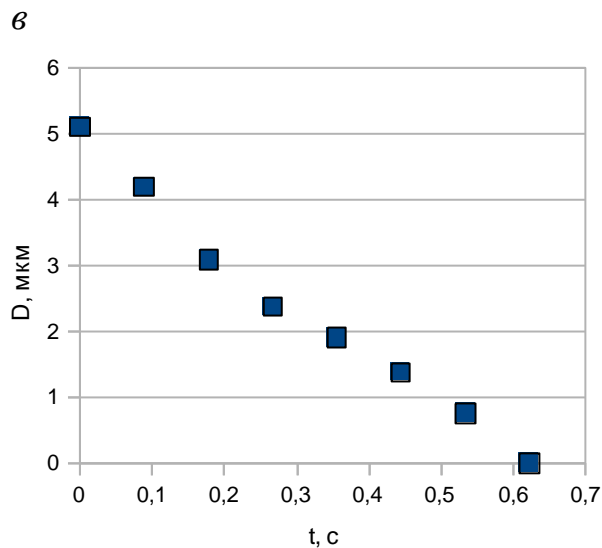
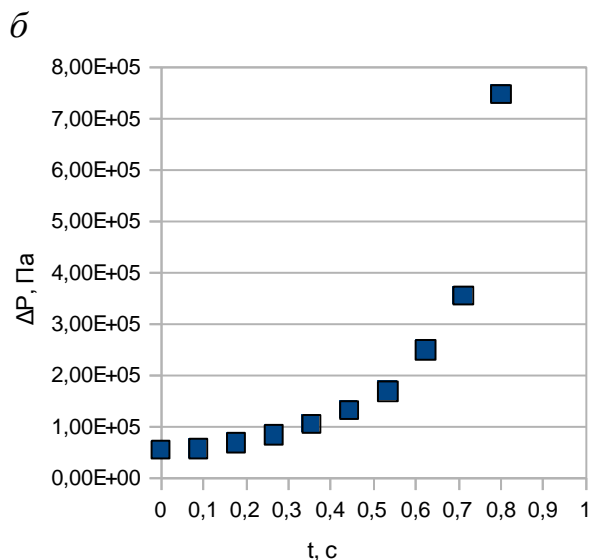
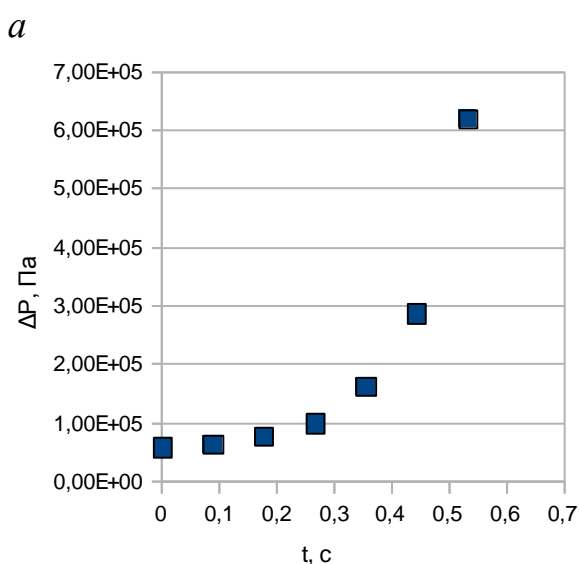


Рис. 6*а–з*. Зависимость диаметра от времени для кавитационных пузырей, динамика которых изображена на рис. 4*а–г* соответственно. За начало отсчета взят момент рождения пузыря.

Можно заключить, что для пузырей с диаметром на момент рождения 5 мкм проявляется схожее поведение диаметра со временем. Наблюдается медленное «схлопывание» в диапазоне $\sim 0\text{--}2$ мкм, и относительно быстрое «схлопывание» в диапазоне $\sim 2\text{--}4$ мкм. Конкретное значение скорости «схлопывания» варьируется от пузыря к пузырю. Грубо можно привести следующие значения: диапазоне $\sim 0\text{--}2$ мкм скорость «схлопывания» составляет (7 ± 3) мкм/с, а в диапазоне $\sim 2\text{--}4$ мкм – (10 ± 4) мкм/с.



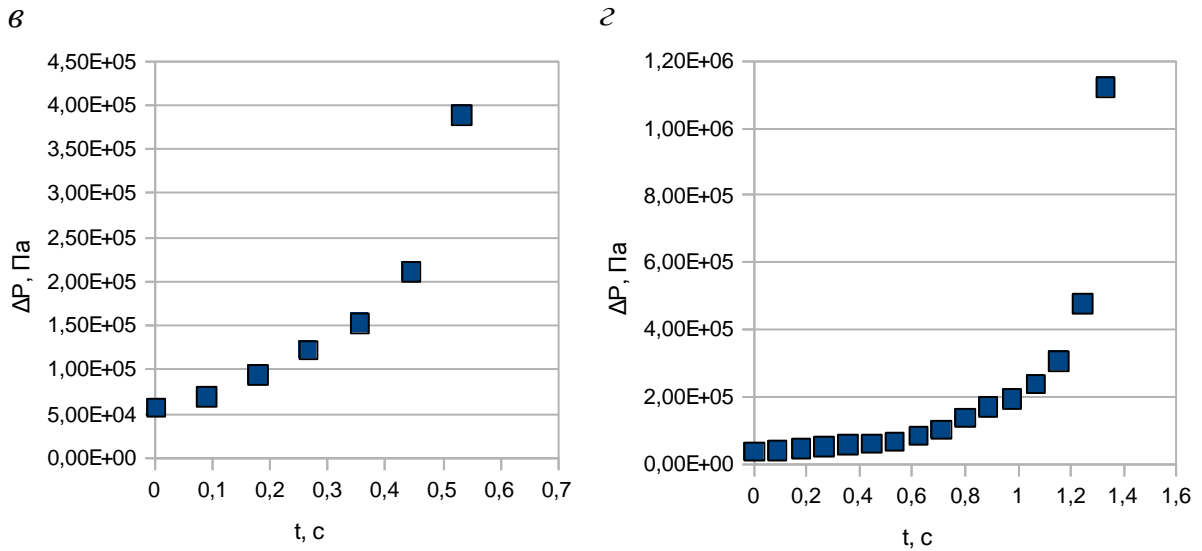


Рис. 7а–г. Зависимость давления от времени для кавитационных пузырей, динамика которых изображена на рис. 4а–г соответственно. За начало отсчета взят момент рождения пузыря.

Полученные зависимости добавочного давления кавитационного пузыря от времени схожи и носят экспоненциальный характер. Наличие двух режимов с разными скоростями «схлопывания» можно объяснить ростом давления внутри пузыря и, как следствие, ростом работы, необходимой для совершения данного процесса.

Определение зависимости времени «схлопывания» от максимального диаметра кавитационного пузыря

В результате исследований была получена функциональная зависимость времени жизни кавитационного пузыря t_L от его максимального диаметра D_{max} . Полученная зависимость лучше всего описывается следующим выражением: $t_L = A \times D_{max}^k$, где $k = 1.7$, $A = 0.04 \text{ с/мкм}^{1.7}$. Полученный результат совпадает с опубликованным ранее [3]. Рис. 8 отображает полученную зависимость.

В предыдущих исследованиях было показано, что за динамику поведения кавитационного пузыря отвечает теория кинематики жидкости, в то время как за его образование – термальные эффекты. Данные теории отвечают линейной и квадратичной зависимости времени жизни пузыря от его максимального радиуса соответственно [4]. Полученный результат показывает, что тепловые эффекты играют существенную роль в динамике кавитационного пузыря, что находится в согласии с теоретическими соображениями Фогеля и др. [5].

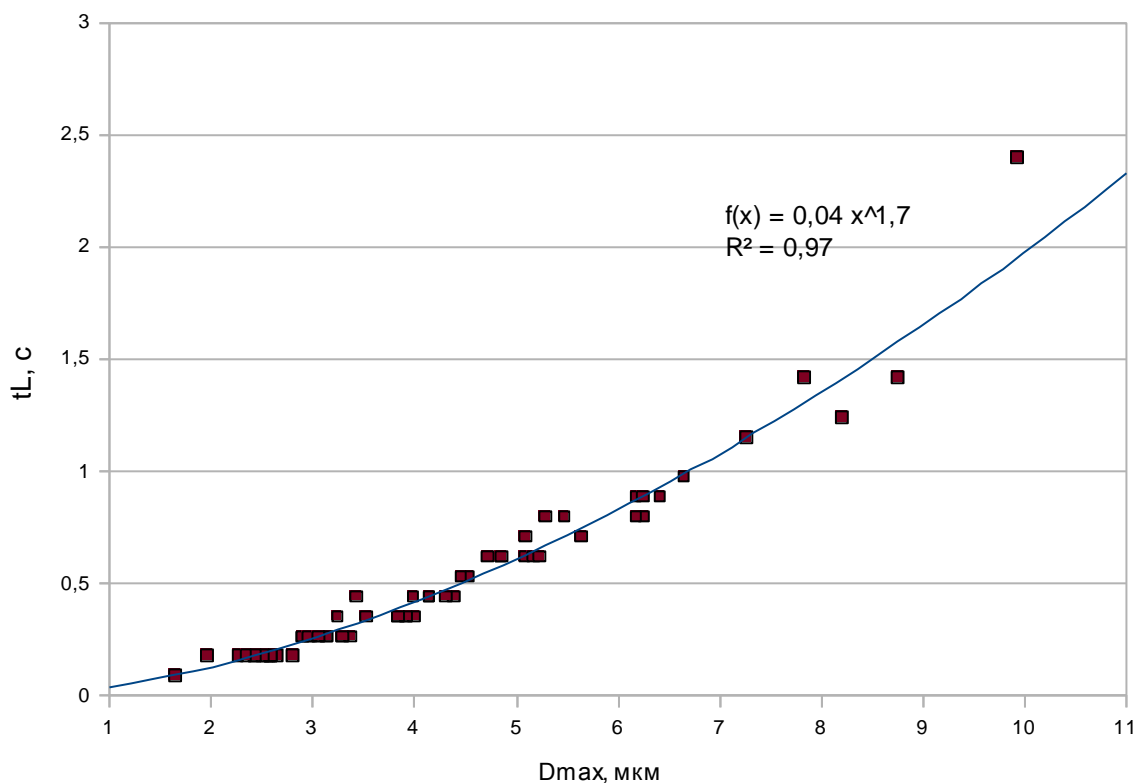


Рис. 8. Зависимость времени жизни кавитационного пузыря t_L от его максимального диаметра D_{max} .

Выводы

Исходя из анализа литературы, проведена дифференцировка и теоретическое обоснование механизмов воздействия лазерного излучения на биологические объекты.

Выполнен эксперимент по фемтосекундному оптоперфорированию двухклеточных эмбрионов мыши. Теоретически определен механизм воздействия лазерного излучения на эмбрионы. Исходя из анализа экспериментальных данных, показана корректность определенного теоретически механизма воздействия.

Проведено исследование динамики поведения кавитационного пузыря во времени. Выдвинуты предположения относительно процесса, совершающего перфорацию стенки мембраны эмбриона мыши. Исследована эволюция диаметра кавитационного пузыря и добавочного давления в нем во времени. Обсуждены полученные зависимости и выполнена оценка скорости «схлопывания» кавитационного пузыря с начальным диаметром 5 мкм. Получена зависимость вида $t_L = A \times D^k$, связывающая время жизни кавитационного пузыря t_L и его диаметр на момент рождения D – основные факторы успешно совершенной фемтосекундной оптоперфорации мембраны.

Литература

1. *Niemz M.* Laser-tissue interactions: Fundamentals and Applications. – Verlag:Springer – 2003.
2. *Quinto-Su P., Venugopalan V.* Mechanisms of Laser Cellular Microsurgery. Methods in Cell Biology. Vol. 82 – 2007.
3. *Kuetemeyer K., Lucas-Hahn L., Petersen B., Niemann H., Heisterkamp A.* Femtosecond laser-induced fusion of nonadherent cells and two-cell porcine embryos. – J. Biomed. Opt. 16(8), 088001 – 2011.
4. *Florschuetz L. Chao B.* On mechanics of vapor bubble collapse. – J. Heat Transfer 87– 1965 – 209-220.
5. *Vogel A., Noack J., Huttman G., Paltauf G.* Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. – Appl. Phys.B 81(8)–2007 – 1015-1047.