

Новый метод комбинированной электропорации и сонопорации со сниженным стресс-индуцирующим действием на клетки

Мещерский М.Е.¹, Кааба С.И.², Соколовская А.А.²,
Московцев А.А.², Блохин Д.Ю.¹, Андриянов Ю.В.¹, Кубатиев А.А.²

¹ Государственное унитарное предприятие Троицкий институт термоядерных исследований

² ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАМН

Одним из распространенных подходов, решающих задачу трансмембранного переноса в клетки биологически активных соединений, комплексов макромолекул и других микро- и нанообъектов, является обратимая пермеабилитация — образование пор в плазматической мембране, в частности при действии внешнего электрического поля (электропорация). Метод электропорации имеет ряд недостатков, самым существенным из которых является значительное снижение жизнеспособности клеток после воздействия. В нашей работе мы впервые применили комбинированный режим воздействия на клетки импульсными электрическими полями и акустическими ударными волнами, реализованный в разработанной в ГНЦ РФ ТРИНИТИ лабораторной установке для электропорации и сонопорации клеточных культур. Проведенные нами анализ цитотоксичности воздействия и эффективности трансмембранного переноса флуоресцентных зондов (кальцеин и пропилий йодид) показали, что комбинированный режим электропорации и сонопорации эффективнее электропорации в 1,25 раза и обладает меньшей цитотоксичностью по сравнению с сопоставимой по эффективности электропермеабилитацией. Оптимизированные режимы комбинированной соноэлектропорации могут найти практическое применение для доставки в высокочувствительные клетки различных химических соединений и макромолекул, в частности, могут использоваться для трансфекции стволовых клеток.

Ключевые слова: пермеабилитация, электропорация, сонопорация

Введение

Одной из важнейших функций плазматической мембраны является барьерная. Эволюционно сформировался ряд «путей доступа» в цитоплазму клеток — в частности, это каналы, переносчики; эндо- и пиноцитоз. Подобные механизмы не всегда эффективны при их использовании в биомедицинских исследованиях и направленных модификациях клеток и клеточных структур. Поиск новых экономически целесообразных способов переноса биологически активных соединений, комплексов макромолекул и других микро- и нанообъектов через мембрану без существенного нарушения функционирования клеток *in vivo* и *in vitro* является, на наш взгляд, актуальной задачей.

Одним из распространенных подходов, решающих задачу трансмембранного переноса, является обратимая пермеабилитация — образование пор в плазматической мембране под действием различных физических и химических факторов. Обратимый «пробой» плазматической мембраны во внешнем электрическом поле с образованием короткоживущих пор — электропорация, или электропермеабилитация — уже достаточно давно используется для инициирования слияния клеток (электрослияние мембран), а также для доставки в клетки различных биологически активных соединений, генных конструкций (электротрансфекция), наночастиц.

Феномен резкого возрастания проводимости бислоевых липидных мембран в условиях интенсивного внешнего электрического поля известен с 40-х годов XX века [19–21]. Проницаемость клеточных мембран и искусст-

венных плоских бислоев существенно меняется при росте трансмембранной разности потенциалов с 0,2 В до 1 В [22]. Ионный и молекулярный транспорт при этом возрастает в несколько раз, нарушается барьерная функция мембраны. Этот процесс может иметь как обратимый, так и необратимый характер [22].

Изменения свойств мембран под действием электрического поля обусловлены особенностями поведения локальных дефектов типа сквозной поры в липидном бислое [8, 14]. При этом предполагается следующая последовательность событий: первичные конформационные изменения липидов бислоя (нарушения ориентации диполей), увеличение имеющихся и возникновение новых гидрофобных пор [23], развитие последних в более стабильные вторичные гидрофильные поры. Размеры гидрофильных пор изменяются во времени в зависимости от продолжительности и силы электрического воздействия, что определяет дальнейшую судьбу мембраны и клетки, в целом, — либо «затягивание» пор и восстановление низкой проницаемости мембраны, либо необратимые изменения вплоть до гибели клетки.

Метод электропорации, будучи сравнительно эффективным и дешевым способом внутриклеточной доставки, тем не менее, имеет ряд недостатков, самым существенным из которых является значительное снижение жизнеспособности клеток после воздействия.

В последние годы значительно возрос интерес к изучению механизмов образования пор в плазматической мембране клеток в результате сонопорации — инициирования ударной волной кавитации в жидкой среде [1]. Ключе-

чевым событием этого процесса является образование заполненных паром и газом кавитационных каверн (полостей, или пузырьков) при локальном понижении давления в жидкости до давления насыщенных паров [10, 13]. В фазе разрежения акустической волны в жидкости образуется разрыв в виде полости, которая заполняется насыщенным паром данной жидкости. Через стены полости в нее диффундирует растворенный в жидкости газ, который затем подвергается сильному адиабатическому сжатию — под действием повышенного давления и сил поверхностного натяжения полость схлопывается, а пар конденсируется на границе раздела фаз. В момент схлопывания, давление и температура газа достигают значительных величин. После схлопывания полости в окружающей жидкости распространяется сферическая ударная волна, быстро затухающая в пространстве. Процесс возникновения кавитационных пузырьков является цепной реакцией [12].

Несмотря на растущее число исследований, механизмы генерации пор в мембранах при сонопорации клеток изучены недостаточно. Потенциальными факторами пермеабилитации при сонопорации могут быть сдвиговые течения вблизи клеток; микроструи, «инъецирующие» клетку, нагретый газ в пузырьках, находящиеся в контакте с клеточной мембраной. Вероятно, также, что различные субмикроскопические структуры внутри клетки могут играть роль центров зарождения кавитационного процесса [1].

Целью нашей работы было исследование на клеточных линиях *in vitro* различных режимов отдельной и комбинированной электро- и сонопермеабилитации, включая оценку эффективности трансмембранного переноса флуоресцентных зондов и анализ цитотоксичности. Для создания комбинации электрического и акустического полей нами была впервые применена созданная в ГНЦ РФ ТРИНИТИ лабораторная установка для электропорации и ударно-волновой сонопорации клеточных культур. Установка обеспечивает широкие возможности воздействия на клетки импульсными электрическими полями различной длительности и амплитуды, акустическими ударными волнами и комбинированное воздействие.

Материалы и методы исследования

Лабораторная установка для электропорации и ударно-волновой сонопорации клеточных культур

Установка имеет блочный принцип построения и состоит из трех функционально независимых устройств:

- 1) ударно-волновой сонопоратор;
- 2) электропоратор миллисекундного диапазона;
- 3) высоковольтный электропоратор субмикросекундного диапазона.

Каждое из этих устройств может использоваться независимо или совместно с другими под управлением синхронизирующего генератора импульсов. В состав базовой модели лабораторной установки входят (рис. 1):

- 1) ударно-волновая ванна;
- 2) многопучковый излучатель акустических ударных волн;
- 3) кювета для суспензий клеточных культур;
- 4) генератор мощных импульсов тока многопучкового излучателя;
- 5) генераторы импульсов напряжения электропоратора;
- 6) зарядный блок генератора мощных импульсов тока;

- 7) зарядный блок генератора импульсов напряжения;
- 8) блок позиционирования кюветы в зоне фокуса многопучкового излучателя акустических ударных волн;
- 9) система управления, контроля и измерения рабочих параметров.

При работе генератора на катушку каждого из излучателей через общий управляемый разрядник разряжался конденсатор емкостью 1 мкФ. Импульсы тока, проходящие через катушки излучателей, возбуждают в мембранах вихревые токи, взаимодействие которых с токами катушек приводит к ударному ускорению мембран и прилегающих к ним слоев жидкости толщиной $\approx c/\omega$, где c — скорость звука в жидкости, ω — угловая частота разряда. Ускорение присоединенных масс жидкости приводит к формированию в ней ударно-акустических импульсов, которые проходят через акустические фокусирующие линзы и распространяются независимо вплоть до зоны пересечения пучков, являющейся фокальной областью генератора. Вблизи фокуса линзы импульсы давления распространяются в виде плоской волны. В фокус акустической линзы в ударно-волновую ванну помещается стандартная кювета для электропорации.

Линии клеток

Исследования проводились *in vitro* на линиях клеток, полученных из Российской Коллекции Культур Клеток позвоночных (Институт цитологии РАН): линии Jurkat лимфобластоподобной морфологии Т-лимфоцитарной лейкемии человека, линии эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa.

Культивирование клеток

Адгезивные клетки HeLa культивировали на среде DMEM (Gibco, Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO₂, суспензионные Jurkat — RPMI1640 (Gibco, Invitrogen Corporation) с 10% FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO₂. Пересев клеток HeLa производился снятием с матрасов смесью трипсин 0,25%: версен 0,02% (1:3), кратность посева составляла 1:3, оптимальная плотность $4,0 \times 10^4$ клеток/см². Пересев клеток Jurkat производился с плотностью $5,0 \times 10^5$ клеток/мл. Подсчет клеток производили на автоматическом счетчике клеток фирмы Invitrogen Countess.

Электропорация, воздействие импульсным электрическим полем

Клетки Jurkat снимали с матрасов и после однократной отмывки в PBS при 4°C готовили стандартную клеточную суспензию в PBS для линии Jurkat с плотностью $4,0 \times 10^6$ кл/мл. Аликвоты клеточных суспензий помещали в охлажденную кювету для электропорации типа Biorad с расстоянием между электродами 4 мм.

Исследованы эффекты электрического поля напряженностью от 750 В/см до 2,25 кВ/см при длительности импульса 700 мкс до 3700 мкс.

Воздействие ударно-волновым акустическим полем

Исследованы эффекты ударно-волнового акустического поля при максимально достижимой мощности импульсов при зарядном напряжении на емкости 19 и 23 кВ и числе импульсов от 10 до 100.

*Сочетанное воздействие
электрическим и ударно-волновым акустическим полем*

Исследованы эффекты сочетанного электрического поля напряженностью от 1 до 7 кВ/см, (импульс длительностью 6 мкс) и ударно-волнового акустического поля с максимально достижимой мощностью (амплитуда ударной волны 100 МПа).

Определение цитотоксичности

Цитотоксичность импульсов определяли с помощью МТТ-теста. Для этого после электропорации кювету инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего отбирали в стерильных условиях суспензию из кюветы и переносили на 96-луночный микропланшет так, что конечный объем суспензии в лунке составил 100 мкл. Планшет после предварительной инкубации разной продолжительности (до 24 ч) выдерживали 4 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе, по окончании инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий) (2,5 мг/мл в PBS (150 мМ

натрий-фосфатный буфер, pH 7,2, 150 мМ NaCl), стерилизованного через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм). После инкубации в течение 4 ч при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в лунки вносили по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и, вращая планшеты на орбитальном шейкере при комнатной температуре в течение 60 мин, растворяли образовавшиеся кристаллы формазана. Развитие окраски регистрировали путем измерения оптической плотности при длине волны 540 нм с помощью фотометра Hidex Chameleon.

*Определение эффективности
трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов:
кальцеин и пропидий иодид*

В кювету для электропорации после внесения аликвот клеточных суспензий добавляли равный объем PBS с растворенными кальцеином и пропидий йодидом так, что конечная концентрация кальцеина составляла 10⁻⁴ М/л, пропидий йодида — 0,1 мг/мл. После электропорирования кювету инкубировали 30 мин при комнатной темпе-

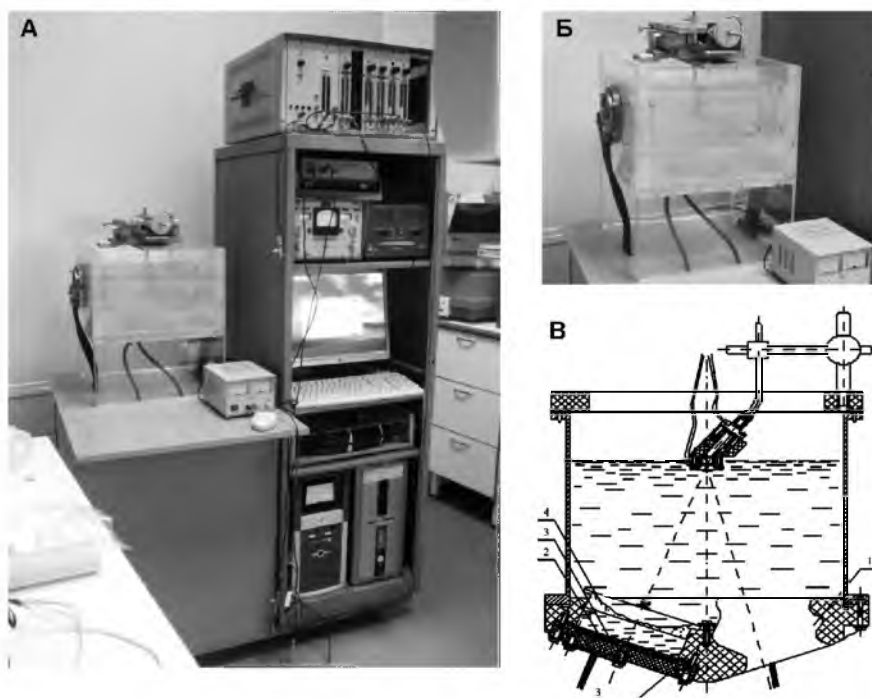


Рис. 1.

А — общий вид базовой модели лабораторной установки для электропорации и ударно-волновой сонопорации клеточных культур: слева на столе размещена ударно-волновая ванна с тремя излучателями акустических ударных волн, два из которых размещены на боковых стенках ванны и один на дне ванны. Сверху ванны размещен блок позиционирования кюветы с клеточной культурой в зоне фокуса многопучкового излучателя акустических ударных волн. Рядом с ванной находится блок питания шаговых двигателей и контролеров. Внизу стойки размещены генератор миллисекундных импульсов напряжения и системный блок компьютера. Над ними размещается кабельный генератор высоковольтных импульсов субмикросекундного диапазона. Над монитором — зарядные блоки генераторов и блок осциллографа, наверху стойки — многоканальный генератор запускающих импульсов. Б — ударно-волновая ванна с излучателями акустических ударных волн: два электромагнитных излучателя акустических фокусированных ударных волн размещены на боковых стенках ванны. Они создают две встречные волны, которые одновременно приходят в кювету с клеточной культурой. Один излучатель укреплен на дне ванны, ударная волна от него приходит в кювету через 300 — 400 мкс после прихода боковых волн и предназначена для индуцированного схлопывания микропузырьков, образовавшихся после прохождения первых двух ударно-волновых импульсов. В — конструкция макета трехпучкового генератора ударных волн: 1 — общая база; 2 — планарная спиральная катушка; 3 — металлическая мембрана; 4 — акустическая линза. Источники излучения ударных волн симметрично установлены на общей базе 1 так, чтобы оси источников излучения пересекались в их общем фокусе. Углы пересечения α между осями источников излучения и осью симметрии генератора составляют $\alpha=20^\circ$. Каждый источник излучения состоит из планарной спиральной катушки 2, металлической мембраны 3 и акустической линзы 4, которая изготовлена из органического стекла. Выходной диаметр линз составляет 100 мм, фокусное расстояние $f=170$ мм. Расстояние от точки пересечения осей источников излучения до плоскости базы (эффективное фокусное расстояние трехпучкового генератора) составляет $F=140$ мм. Измерения области давления каждого источника излучения показали, что диаметр фокусного пятна у каждого из источников излучения составил $2f_0=8$ мм, а продольная длина фокусной области (расстояние между точками на оси источника излучения, в которых амплитуда давления равняется половине максимальной величины в фокусе) равна 70 мм. При суммировании трех пучков продольная длина фокусной зоны в эксперименте составила 10—15 мм.

ратуре, суспензию клеток отмывали трехкратно в PBS при 500 об./мин и анализировали на проточном цитометре. Флуоресценцию зондов регистрировали также с помощью флуоресцентной микроскопии. В качестве контроля использовали стандартные клеточные суспензии, смешанные с равными объемами PBS с растворенными флуоресцентными зондами до идентичных конечных концентраций.

Анализ

трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов с помощью проточной цитометрии

Анализ клеточных суспензий осуществлялся на проточном цитометре Partec Pas. Клетки Jurkat отмывали после электропорации, до момента анализа хранили при 4°C (не более часа). Анализировались только свежие суспензии клеток.

Возбуждение флуоресценции осуществлялось лазером с длиной волны 488 нм, эмиссия регистрировалась с помощью узкополосных светофильтров и фотоумножителей каналов FL1 (530/30 нм), FL2 (585/42 нм). Накопление событий визуализировали на 1-параметрической гистограмме. Контрольные клетки без воздействия формировали пик аутофлуоресценции, от конца которого до максимального значения трехдекадной логарифмической шкалы выставляли гейтинг. После индукции пор в плазматической мембране флуоресцентные зонды кальцеин и пропидий йодид преодолевают плазматическую мембрану клеток. Клетки с порами приобретают большую интенсивность флуоресценции благодаря диффузии кальцеина в цитоплазму клеток, поэтому события, регистрируемые при их прохождении через проточную кювету, располагаются на шкале интенсивности правее пика аутофлуоресценции. При условии эффективной диффузии пропидий йодида через ядерную мембрану (благодаря образованию пор в ядерной мембране) зонд интеркалирует в ДНК, что сопровождается резким возрастанием квантового выхода флуоресценции в красной области. Это дает возможность регистрировать события флуоресценции в красной области на проточном цитометре.

Флуоресцентная микроскопия и цитраферная съемка

Детектирование флуоресценции зондов проводили на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE 2000, оснащенном контрастом Хоффмана и конфокальным модулем C1 с лазерами 488 и 543 нм. Использовался фильтр возбуждения (450—490 нм) и эмиссии (>515 нм) флуоресценции.

Для цифровой обработки изображений использовалось программное обеспечение Adobe Photoshop, Image Pro Plus (Media Cybernetics), EZ-C1 v2.30 (Nikon).

Статистическая обработка результатов исследований

Производилась с помощью программного обеспечения Statistica ver.6.0 (StatSoft Inc, U.S.A.), а также Microsoft Excel. Использовались однофакторный дисперсионный анализ и критерий Крускала—Уоллиса. Различия считались достоверными при $p < 0,05$

Результаты

Цитотоксичность электропорации

Для определения общей цитотоксичности нами был использован МТТ-тест, основанный на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в окрашенный формазан, который кристаллизуется внутри клетки. Растворение формазана с помощью диметилсульфоксида (ДМСО) позволяет осуществить фотометрию и фиксировать изменение оптической плотности раствора, пропорциональной числу жизнеспособных клеток. Характер зависимости оптической плотности от количества клеток в 1 мл суспензии для использованных линий клеток близок к линейному в рабочем диапазоне концентраций клеточных суспензий (данные не приведены).

МТТ-тест проводили с клетками Jurkat спустя 24 ч инкубации после электропорации.

Из графиков (рис. 2А) видно, что цитотоксичность электропорации увеличивается с ростом напряженности электрического поля почти линейно, исключение составляет лишь напряжение 750 В/см, где наблюдается увеличение оптического поглощения.

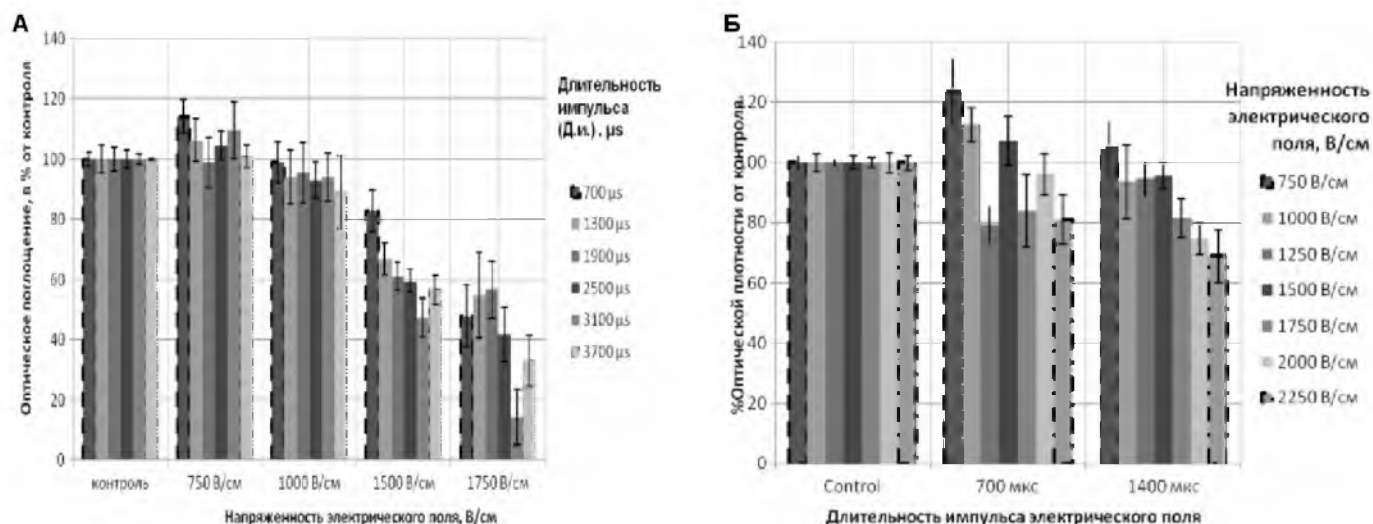


Рис. 2. Цитотоксичность при различных режимах электропорации, линия клеток Jurkat: А – при различной длительности импульсов и напряженности электрического поля; Б – подробное разделение по напряженности электрического поля для длительностей импульсов 700 и 1400 мкс, 24 ч после электропорации

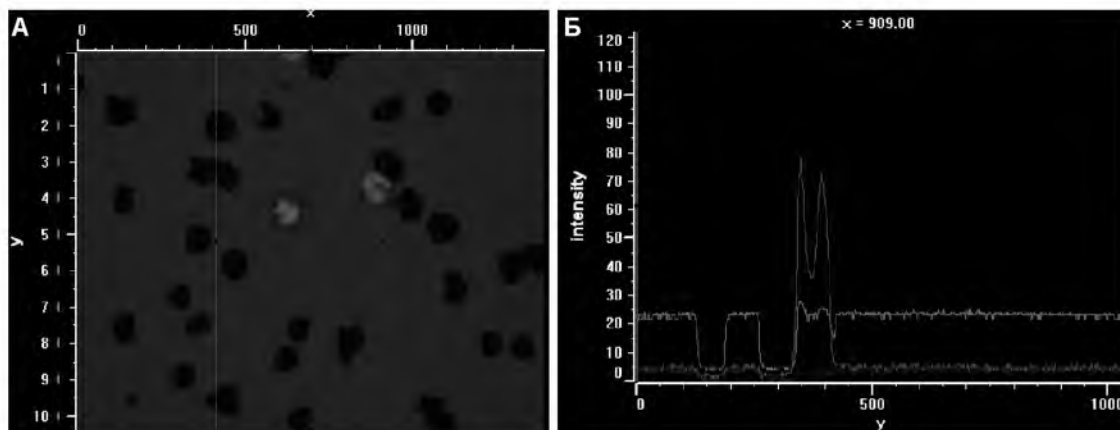


Рис. 3. Микрофотография (А) и гистограмма яркости вдоль оси $x=909$ (Б) клеток Jurkat, подвергнутых электропорации (1300 мкс, 1500 В/см) в присутствии избытка флуоресцентных зондов кальцеин и пропидий йодид

Эффективность трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов при электропорации

Нами была применена комбинация флуоресцентных зондов — кальцеина и пропидий йодида для определения изменений в проницаемости цитоплазматической и ядерной мембран при электропорации. Зонды добавлялись во внеклеточную среду в высоких концентрациях на сравнительно короткий промежуток времени, включающий в себя воздействие и последующую 30-минутную инкубацию вплоть до отмывки. Избыток зондов создавал значительный трансмембранный концентрационный градиент, так как проницаемость нативных клеток для кальцеина и пропидий йодида мала (рис. 5А,Б). Порация обуславливала быстрое выравнивание концентраций и, соответственно, обеспечивала достаточные для детектирования внутриклеточные количества зондов.

Данные проточной цитометрии (рис. 4) свидетельствуют об увеличении эффективности проникновения кальцеина с

ростом продолжительности импульса с максимумом около 3700 мкс при амплитуде импульса 1500 В/см, при этом процент клеток с флуоресценцией больше порогового значения по каналу F11 превышает 40%. По каналу F12, соответствующему эмиссии интеркалирующего зонда пропидий йодид, также наблюдается статистически значимый рост числа клеток в гейте, однако относительная величина прироста мала. Для высокоамплитудных импульсов средняя интенсивность флуоресценции клеток выше (рис. 4В,Г).

Визуализация электропермеабилитизированных клеток линии HeLa с помощью цейтраферной флуоресцентной микроскопии

Нами были проведены исследования мембранного транспорта флуоресцентных зондов при электропорации на адгезивной линии клеток HeLa с использованием специального погружного кольцевого электрода с применением цейтраферной съемки на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. Был использован режим, вы-

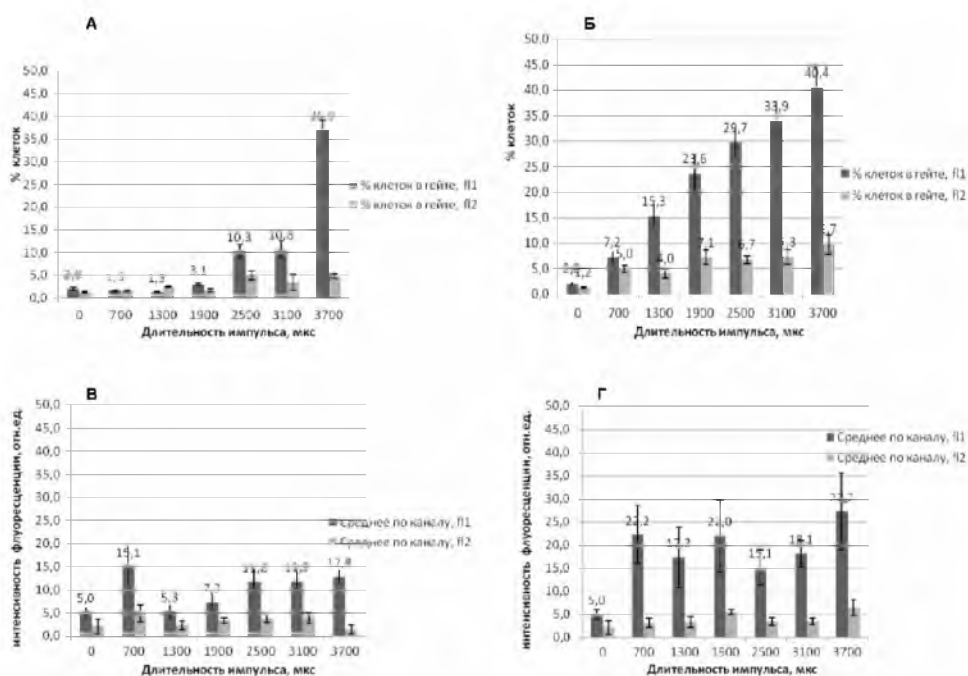


Рис. 4. Эффективность трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов кальцеина и пропидий йодида при электропорации с помощью проточной цитометрии:

А, В — при напряженности электрического поля 750 В/см; Б, Г — при напряженности электрического поля 1500 В/см

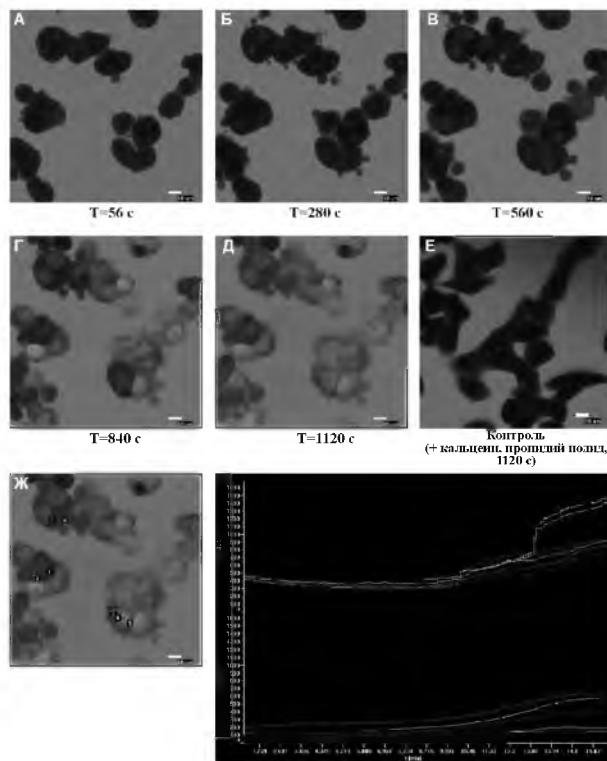


Рис. 5. А–Е: цейтраферная съемка электропермеабилитации клеток HeLa (>1750 В/см, 5 мс) в присутствии кальцеина и пропидий йодида; Ж – кривые накопления флуоресцентных зондов во внутриклеточных регионах различных клеток

зывающий необратимую пермеабилитацию. На представленных микрофотографиях начало заметного роста флуоресценции приходится на время около 10 мин от импульсного воздействия электрическим полем. Этому процессу предшествует характерный блеббинг мембраны, начинающийся уже до временной точки $T=840$ с. Накопление пропидий йодида носит плавный характер, в отличие от кальцеина, демонстрировавшего через 10 мин короткий период быстрого роста, что хорошо видно на кривых интегральной интенсивности флуоресценции регионов, установленных в цитоплазматической и ядерной зонах нескольких клеток.

Сопоставление эффективностей трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов и цитотоксичности при сонопорации и комбинированной электропорации и сонопорации

Сонопорация при максимально достижимой в режимах установки интенсивности акустического поля в 20 единиц вызвала пермеабилитацию около 40% клеток. Комбинированная электро- и сонопорация с интенсивностью и длительностью электрического поля (1000 В/см и Д.И. 2500 мкс) при цитотоксичности, не превышающей значения, наблюдавшегося при соответствующем режиме электропорации, приводила к пермеабилитации в сред-

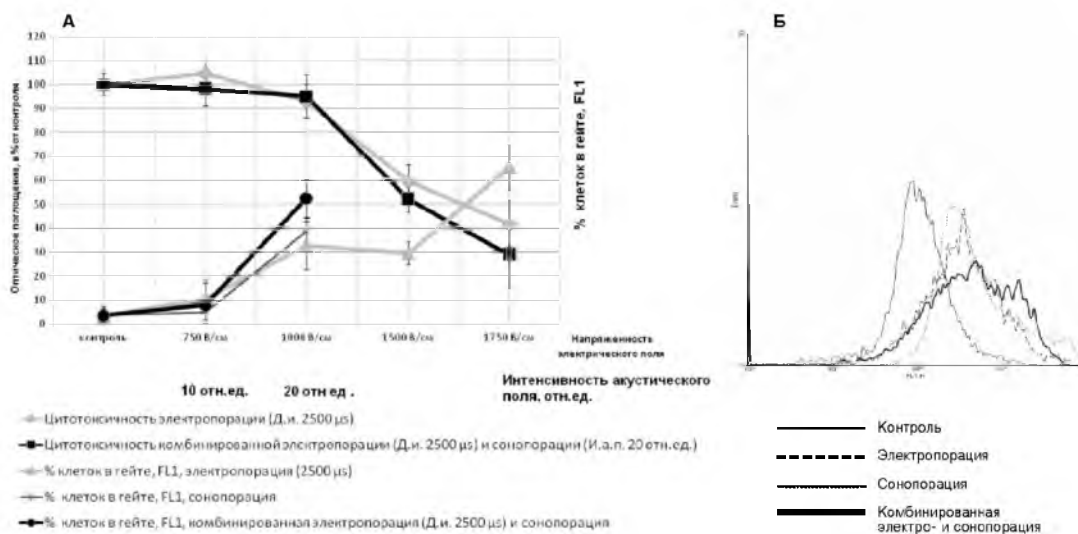


Рис. 6. Эффективность трансмембранного транспорта флуоресцентных зондов и цитотоксичность при электропорации, сонопорации и комбинированной электропорации-сонопорации:

А – сводный график; Б – гистограммы проточной цитометрии, канал fl1

нем около 53% клеток. Эффективность комбинированной электросонопорации выше электропермеабилитации в 1,25 раза при сохранении того же уровня токсичности.

Обсуждение

Сонопермеабилитация клеточных мембран при использовании лабораторной установки для комбинированной электропорации и сонопорации обусловлена эффектами акустической кавитации, индуцируемой при прохождении акустических колебаний через воду в ударно-волновой ванне (рис. 1А).

Прохождение ударной волны в зоне фокуса акустической линзы сопровождается комплексом гидромеханических процессов, основную роль в которых играет явление кавитации, обусловленное имеющимися в водной среде центрами зарождения кавитации в виде газовых или паровых микропузырьков.

К физическим факторам, действующим непосредственно на клетки, находящиеся в зоне кавитационного следа, можно отнести, по-видимому, сдвиговые течения вблизи клеток, микроструи, нагретый газ в пузырьках, находящихся в контакте с клеточной мембраной. Вероятно, также, что различные субмикроскопические структуры внутри клетки могут играть роль центров зарождения кавитационного процесса [1].

Наложение электрического поля на среду, в которой распространяется ударная волна, может привести к изменению динамики кавитационного процесса из-за поляризации пузырьков, из-за наличия на их поверхностях адсорбированных заряженных частиц, электрофоретического движения пузырьков в электрическом поле. Образование кавитационного следа изменяет напряженность электрического поля в среде. Сложная и нерегулярная динамика процесса затрудняет выделение и количественную оценку всех факторов при комбинированном воздействии, которые могут влиять на пермеабилитацию клеток в кавитационном следе за ударной волной в среде, находящейся в электрическом поле.

Примененный нами подход, основанный на использовании внеклеточных флуоресцентных зондов, позволяет количественно оценить эффективность пермеабилитации клеточной суспензии. Интенсивность внутриклеточной флуоресценции зондов после пермеабилитации является параметром, характеризующим эффективность индукции пор в мембране. Проникновение флуоресцентных зондов: кальцеина (calcein) и пропидий йодида — через плазматическую мембрану жизнеспособной клетки без повреждения мембраны затруднено. Диффузия зондов в цитоплазму становится возможной благодаря индукции временных пор в мембране под действием кратковременного электрического поля. При нелетальном воздействии поры в течение интервала времени (вплоть до нескольких минут) закрываются, и трансмембранный потенциал восстанавливается.

Для анализа трансмембранного транспорта при сонопорации рядом исследователей использовались также различные по размерам молекул фракции флуоресцентно меченого декстрана — в частности, продемонстрировано, что эффективность трансмембранного транспорта в бактериях зависит как от амплитуды, так и от продолжительности и скважности импульсов [25].

В проведенном нами исследовании показано, что увеличение напряженности электрического поля и длительности импульса электропорации приводило к росту трансмембранного транспорта кальцеина. Однако в использованном диапазоне режимов работы установки мы не наблюдали существенной зависимости интенсивности внутриклеточной флуоресценции пропидий йодида от параметров электропермеабилитации. Возможно, это обусловлено затрудненной диффузией пропидий йодида через ядерную мембрану и связано с высоким порогом пермеабилитации ядерного конверта. Интеркаляция в ДНК зонда регистрировалась в случае необратимой пермеабилитации спустя ~15 мин от импульса, что может быть вызвано уже вторичными изменениями, ассоциированными с некротическими изменениями в клетках. На диаграммах проточной цитометрии при обратимой электропермеабилитации этому временному интервалу соответствует сравнительно небольшое увеличение среднего значения интенсивности флуоресценции по каналу fl1 . Достижение плато процессом мембранного транспорта на фоне роста интенсивности электрического поля наблюдались также в ряде работ [16—18].

Обращает на себя внимание факт значительной неоднородности клеток по эффективности трансмембранного транспорта кальцеина, отмеченный также во многих работах, посвященных исследованию электропорации [16—18] и действия ультразвука [24]. Нами показано, что повышение интенсивности акустического поля приводит к росту эффективности транспорта кальцеина, обусловленного, по-видимому, увеличением числа и размеров пор. Следует отметить, что в работе [1] как результат действия акустической кавитации визуализировались крупные, около 1 мкм диаметром долгоживущие поры в мембранах адгезивных клеток HeLa.

Нами показано, что комбинация электро- и сонопорации, в целом, эффективнее, чем каждый метод в отдельности. Действие сонопорации в комбинированном режиме можно рассматривать как фактор, способствующий дополнительному снижению порога индукции пор в мембранах клеток.

Цитотоксичность искусственных систем и способов трансмембранного переноса является одним из основных лимитирующих факторов — баланс между эффективностью и цитотоксичностью важен для методов, основанных на пермеабилитации мембраны. При выборе метода оценки цитотоксичности соно- и электропорации мы исходили из предположения, что действие на клетку может быть обусловлено не только прямым мембранотропным эффектом, но и иметь отсроченный эффект.

Рядом исследователей [22] показан рост цитотоксичности при увеличении амплитуды действующего поля — после порогового значения напряженности электрического поля пермеабилитация становится необратимой, что приводит к существенному росту цитотоксичности.

Мы показали, что цитотоксичность прямо зависела от амплитуды воздействий электрическим полем. Интересен пик, соответствующий повышению оптической плотности для клеток Jurkat в широком диапазоне длительностей импульсов при амплитуде 750 В/см — это может свидетельствовать о стимулирующем действии сравнительно низковольтных импульсов на клетки Jurkat.

Сочетание электропорации и сонопорации, впервые примененное нами, обладает меньшим стресс-индуциру-

ющим воздействием на клетки по сравнению с близкими по мощности раздельными режимами.

Применение комбинированного режима работы установки перспективно для переноса в клетку широкого спектра нанообъектов, проникновение которых через мембрану затруднено в отсутствие генерируемых установкой пор. Сочетание соно- и электропорации имеет потенциал для использования и в условиях *in vivo* — метод позволяет на несколько порядков увеличить внутриклеточные концентрации, в частности, терапевтических препаратов, чем обеспечивает эффективное их действие на клетки.

Список литературы

1. Barros M.P., Bechara E.J. // *Free Radical in Biol. Med.* — 1998. — Vol. 24. — P. 767–777.
2. Claus-Dieter Ohl et al., Sonoporation from Jetting Cavitation Bubbles // *Biophysical Journal*. — 2006. — Vol. 91. — Dec. — P. 4285–4295.
3. Davis B.R., Yannariello-Brown J., Prokopishyn N.L., Luo Z., Smith M.R., Wang J., Carsrud N.D., Brown D.B. Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells // *Blood*. — 2000. — 95. — P. 437–444.
4. Diacumakos E.G. Methods for micromanipulation of human somatic cells in culture // *Methods Cell Biol.* — 1973. — 7. — P. 287–311.
5. Fournier R.E., Ruddle F.H. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1977. — 74. — P. 319–323.
6. Haddock S.H.D., Rivers T.J., Robison B.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — Vol. 98, №20. — P. 11148–11151.
7. Hwa Kim S., Hoon Jeong J., Joe C.O., Gwan Park T. Folate receptor mediated intracellular protein delivery using PLL-PEG-FOL conjugate // *J. Control Release*. — 2005. — Vol. 103. — P. 625–634.
8. Labas Y.A., Matz M.V., Zakhartchenko V.A. On the origin of bioluminescent systems // *Proc. of the 11 Intern. Sympos. on Bioluminescence and Chemiluminescence / J.F. Case, P.J. Herring, B.F. Robinson et al.* — World Scientific. Singapore, 2000. — P. 91–94.
9. Neppiras E.A. Acoustic cavitation // *Phys. Repts.* — 1980. — Vol. 61, №3. — P. 159–251.
10. Rees J.F., De Wergifosse B., Noiset O. et al. // *J. Exp. Biol.* — 1998. — Vol. 201, №8. — P. 1211–1221.
11. Soucek B. // *J. Theoretical Biology*. — 1987. — Vol. 125. — P. 93–103.
12. Talvenheimo J.A. The Purification of ion channels from excitable cells // *Membrane Biol.* — 2005. — 87 p.
13. Tisi L.C., Murray J.A.H. On the Evolution and Synthesis of Beetle Luciferin: Clues from the Similarity of Bacterial Siderophores to Beetle Luciferin // *Abstr. received 12th Intern. Symp. on Bioluminescence and Chemiluminescence*, 2002.
14. Watanabe H., Nagoshi T., Inaba H. // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1993. — Vol. 1141, №2–3. — P. 297–302.
15. Yizhi Song Ultrasound-mediated DNA transfer for bacteria // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — 35 (19). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2095817>
16. Агранат Б.А., Дубровин М.Н., Хавский Н.Н. и др. // *Основы физики и техники ультразвука: Учеб. пособие для вузов.* — М.: Высш. шк., 1987. — 352 с.
17. Акуличев В.А. Кавитация в криогенных и кипящих жидкостях. — М.: Наука, 1978. — 220 с.
18. Акуличев В.А. Пульсации кавитационных полостей // *Мощные ультразвуковые поля / Под ред. Л.Д. Розенберга.* — М.: Наука, 1968. — Ч. 4. — С. 129–166.
19. Антонов В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран // *Соросовский Образовательный Журнал.* — 1998. — №10. — С. 10–17.
20. Белов А.Д. Радиобиология. — М.: Колос, 1999. (С. 208–209).
21. Левковский Ю.Л. Структура кавитационных течений. — Л.: Судостроение, 1977. — 248 с.
22. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Т. 2 / Пер. с англ. — М.: Мир, 1993. — С. 138–142.
23. Новицкий Б.Г. Применение акустических колебаний в химико-технологических процессах. — М.: Химия, 1983. — 192 с.
24. Пирсол И. Кавитация. — М.: Мир, 1975. — 95 с.
25. Розенберг Л.Д. Кавитационная область // *Мощные ультразвуковые поля / Под ред. Л.Д. Розенберга.* — М.: Наука, 1968. — Ч. 6. — С. 221–266.
26. Рубин А.Б. Биофизика. Т. 2. Биофизика мембранных процессов. — М.: Мир, 1999, 6; 7; 29–41; 45–46 с.
27. Свиридова Т.А., Чайлахян Л.М., Никитин В.А., Вепринцев Б.Н. Метод локального электрослияния пронуклеусов с энуклеированной зиготой // *ДАН СССР.* — 1987. — 295 (1). — С. 241–244.
28. Сингер М., Берг И. Гены и геномы. Т. 1. — М.: Мир, 1998 (С. 110–112). А.Д. Фокин Сельскохозяйственная радиология. — М.: Дрофа, 2005 (С. 44–46).
29. Сиротюк М.Г. Экспериментальные исследования ультразвуковой кавитации // *Мощные ультразвуковые поля / Под ред. Л.Д. Розенберга.* — М.: Наука, 1968. — Ч. 5. — 168 – 220 с.
30. Титомиров А.В., Зеленин А.В. Новые методы трансфекции клеток млекопитающих // *Молекуляр. биология.* — 1988. — Т. 2, №6. — С. 1445–1450.
31. Флинн Г. Физика акустической кавитации в жидкостях // *Физическая акустика / Под ред. У. Мезона.* — М.: Мир, 1967. — Т. 1, Ч. Б. 7. — 138 с.
32. Черномордик Л.В. Электрический пробой биологических мембран // *Успехи соврем. биологии.* — 1985. — Т. 99. — С. 67–80.
33. Чизмаджев Ю.А. Перенос нуклеиновых кислот в ткани и клетки // *Соросовский образовательный журнал.* — 2004. — Т. 8, №2. — С. 24–29.
34. Шутитов В.А. Основы физики ультразвука: Учеб. пособие. — Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1980. — 280 с.
35. Ярмошенко С.П. Радиобиология человека и животных. — М.: Высшая школа, 1988. (С. 126–128).
36. Gift E.A., Weaver J.C. Observation of Extremely Heterogeneous Electroporative Molecular Uptake by *Saccharomyces Cerevisiae* which Changes with Electric Field Pulse Amplitude // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1234. — P. 52–62.
37. Bartoletti D.C., Harrison G.I., Weaver J.C. The Number of Molecules Taken up by Electroporated Cells: Quantitative Determination // *FEBS Letters.* — 1989. — Vol. 256. — P. 4–10.
38. Prausnitz M.R., Lau B.S., Milano C.D., Conner S., Langer R., Weaver J.C. A Quantitative Study of Electroporation Showing a Plateau in Net Molecular Transport // *Biophys. J.* — 1993. — Vol. 65. — P. 414–422.
39. [1] Tien H.T. *Bilayer Lipid Membranes (BLM): Theory and Practice.* — Marcel Dekker, Inc., New York, 1974. — 655 p.
40. [2] Cole K.S. *Membranes, Ions and Impulses.* — University of California Press, Berkeley, 1972. — 569 p.
41. [5] Goldman D.E. Potential impedance and rectification in membranes // *J. Gen. Physiol.* — 1943. — 27. — P. 37–50.
42. [100] Weaver J.C. Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation.* — 2003. — Oct. — Vol. 10, №5.
43. [101] Tian Y. Tsong Electroporation of cell membranes // *Biophys. J. c Biophysical Society.* — 1991. — Aug. — Vol. 60. — P. 297–306.
44. Sundaram J., Mellein B.R., Mitragotri S. An Experimental and Theoretical Analysis of Ultrasound-Induced Permeabilization of Cell Membranes // *Biophysical Journal.* — 2003. — May. — Vol. 84. — P. 3087–3101.
45. Han Y.W., Ikegami A., Chung P., Zhang L., Deng C.X. Sonoporation is an efficient tool for intracellular fluorescent dextran delivery and one-step double-crossover mutant construction in *Fusobacterium nucleatum*.

A new method for the combined electroporation and sonoporation with reduced stress-inducing effects on cells

**Mesherskiy M.E., Kaba S.I., Sokolovskaya A.A., Moscovtsev A.A.,
Blokhin D.Yu., Andrianov Ju.V., Kubatiev A.A.**

One of the common approaches that solve the problem of the intracellular delivery of biologically active compounds, macromolecular complexes, and other micro- and nano-objects is a reversible permeabilization – the formation of pores in the plasma membrane, in particular in the external electric field (electroporation). Electroporation has drawbacks, the most significant of which is a decrease in cell viability after exposure. We first investigated the effects on cells of mixture of pulsed electric fields and acoustic shock waves using a laboratory setup for the combined electroporation and sonoporation cell cultures developed in the SRC RF Troitsk «TRINITI». Our analysis of the cytotoxicity of the impact and effectiveness of intracellular delivery of fluorescent probes (calcein and propidium iodide) showed that the combined regimen efficient electroporation of 1.25 times and has less cytotoxicity. Optimized modes combined sono-electroporation can be used for delivery to the highly sensitive cells of various chemical compounds and macromolecules, in particular, for stem cells transfection.

Key words: permeabilization, electroporation, sonoporation