

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ ИМ. Н.Н. СЕМЕНОВА  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИХФ РАН)

*На правах рукописи*

**Осыченко Алина Анатольевна**

**ВОЗДЕЙСТВИЕ ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ  
НА РАЗВИТИЕ ЭМБРИОНОВ И ООЦИТОВ**

03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории № 0113 био- и нанофотоники в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук (ИХФ РАН)

Научный руководитель: **Надточенко Виктор Андреевич**  
доктор химических наук (02.04.15 – химическая кинетика и катализ), профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Свиридов Александр Петрович**  
доктор физико-математических наук (05.27.03 – квантовая электроника), ведущий научный сотрудник Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук

**Тихонов Александр Николаевич**  
доктор физико-математических наук (03.00.02 – биофизика), профессор, профессор Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

**Павлова Галина Валериевна** – доктор биологических наук (03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология), профессор РАН, заведующая лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится «26» апреля 2018 г. в 16-00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 24, аудитория «Новая».

E-mail: marista@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: [https://istina.msu.ru/dissertation\\_councils/councils/32241428/](https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/32241428/)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

М.Г. Страховская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

**Актуальность темы исследования.** Изучение структуры и жизненных процессов клеток, взаимосвязи их частей, динамики внутриклеточных процессов является фундаментальной биологической задачей. Для исследований в этой области необходимы новые физико-химические методы, среди которых перспективным направлением является фемтосекундная лазерная микрохирургия. Этот высокоточный метод предоставляет возможность манипулировать отдельными клетками, проводить прицельные внутриклеточные операции без повреждения окружающего материала клетки. Исследования и разработки в области микрохирургии ооцитов и доимплантационных эмбрионов с использованием остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона (ИК) позволяют получать новые фундаментальные знания о структуре и жизненных процессах клетки, а так же могут найти практическое применение в сферах терапевтического клонирования и репродуктивных технологиях, в том числе и человека.

В данной работе использовался фемтосекундный лазер с длиной волны генерации около 800 нм. Излучение ближнего инфракрасного диапазона (650-1350 нм) попадает в так называемое «окно прозрачности» биологических объектов. При фокусировке объективом микроскопа с числовой апертурой NA лазерное излучение длиной волны  $\lambda$  образует перетяжку с полушириной  $w_0 = 0,61\lambda/NA$  и параметром Релея  $z_0 = kw_0^2/2$  ( $k = 2\pi/\lambda_0$  — волновое число). В области перетяжки достигается высокая плотность мощности лазерного излучения, что обеспечивает высокую эффективность нелинейно-оптического взаимодействия излучения с веществом, формируя эффект лазерного «скальпеля». Таким образом, воздействие лазера локализуется вблизи перетяжки и может не нарушать целостность клетки, сохраняя компоненты клетки и плазматическую мембрану интактными. Эта особенность формирует главное достоинство фемтосекундного лазерного «скальпеля»: возможность работать с отдельными клетками в культуре или многоклеточной структуре, а так же с отдельными фрагментами (органеллы, филаменты цитоскелета и др.) внутри клетки в строго заданной точке. Кроме того, лазерный «скальпель» позволяет проводить прицельное слияние клеток, действуя на область контакта двух прилежащих друг к другу плазматических мембран.

Актуальной задачей является количественная оценка жизнеспособности (в том числе и долгосрочной – в течение нескольких суток) оперированных объектов и исследования внутриклеточных процессов после фемтосекундного лазерного воздействия.

**Цели и задачи исследования.** Диссертационная работа направлена на изучение механизмов взаимодействия фемтосекундного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона на состояние и жизнеспособность ооцитов и эмбрионов. Для достижения данной цели в работе были решены следующие задачи:

1. Установить границы неинвазивного воздействия фемтосекундного лазера на доимплантационные эмбрионы и ооциты млекопитающих на основе результатов исследования механизма взаимодействия фемтосекундного лазерного излучения с материалом клетки и наблюдения за их развитием.
2. Изучить динамику парогазовых пузырей при фемтосекундном лазерном воздействии на различные области живых клеток. Установить параметры порога образования пузырей в ядре, ядрышке, цитоплазме и области контакта цитоплазматических мембран клеток.
3. Установить механизм тетраплоидизации при лазерном слиянии. Изучить биофизические процессы обмена цитоплазматическим материалом клеток при фемтосекундном лазерном слиянии.

**Научная новизна.** Предложен новый механизм образования парогазовых пузырей в клетке при воздействии цугом фемтосекундных лазерных импульсов ближнего ИК диапазона. Показано, что в начальной стадии цуга фемтосекундных импульсов образуются светопоглощающие центры, которые можно рассматривать как углеродные точки (C-Dots). Их появление обуславливает переход из нелинейного в линейный режим поглощения лазерного излучения.

Обнаружена люминесценция светопоглощающих центров, которая активируется за счет однофотонного и двухфотонного возбуждения. Разработана новая методика применения светопоглощающих центров в качестве трекинг-частиц для изучения внутриклеточных процессов, происходящих при слиянии и делении клеток.

Установлен порог образования парогазовых пузырей в различных областях клетки. Обнаружено, что максимальный размер и время существования парогазового пузыря могут характеризовать вязкоупругие свойства среды, в которой они образуются. Дана количественная оценка влияния дозы лазерного излучения на жизнеспособность объектов.

Показано, что необходимым условием для слияния клеток является парогазовый пузырь. Фемтосекундное лазерное воздействие на область контакта двухклеточных эмбрионов не влияет на эмбриональные «часы»: все группы оперированных эмбрионов (не слитые, слитые и эмбрионы, у которых был разрушен один бластомер) достигают стадии морулы, морулы с кавитацией, бластоцисты с одинаковой скоростью.

При помощи методики фемтосекундной лазерной микрохирургии было обнаружено, что тетраплоидность после слияния возникает по механизму «проскальзывания» митоза, а не путем слияния ядер или образования общей метафазной пластинки, как это утверждается в литературе.

На модели зеленого флуоресцентного белка было показано, что гиалоплазма перераспределяется между сливающимися клетками по законам диффузии. С использованием методики получения светопоглощающих центров установлено, что при слиянии и последующем делении клеток не происходит равномерного перемешивания цитоплазмы.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Методика фемтосекундной лазерной микрохирургии ооцитов и доимплантационных эмбрионов востребована как для фундаментальных исследований структуры клеток, так и для вспомогательных репродуктивных технологий человека, а также для терапевтического и репродуктивного клонирования. Светопоглощающие центры, описанные в данной работе, представляют собой альтернативу существующим флуоресцентным красителям. Данные о механизме образования парогазовых пузырей вносят новые фундаментальные знания о взаимодействии лазерного излучения с веществом клетки. Лазерное слияние может применяться для получения тетраплоидных животных и гибридов, а так же для проведения процедуры переноса ядра соматической клетки (somatic cell nucleus transfer, SCNT), которая является ключевым этапом клонирования.

**Методы исследования.** Для выделения и культивирования объектов использовали классические методы работы с лабораторными животными, ооцитами и эмбрионами. Для воздействия на ооциты и эмбрионы мыши в работе использовали лазерное излучение ближнего инфракрасного диапазона (800 нм) в фемтосекундном и в непрерывном режимах. Фемтосекундный режим применяли в виде одиночных импульсов и в виде цугов импульсов. Для наблюдения за объектами применяли микроскопию в проходящем свете, флуоресцентную, конфокальную микроскопию и рамановскую спектроскопию. Полученные результаты исследовали на предмет достоверного различия, используя статистические тесты: обобщенную линейную модель, точный критерий Фишера, критерий Манна-Уитни и дисперсионный анализ ANOVA.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Выявлен пороговый характер образования парогазовых пузырей при действии в различные области живой клетки цугом фемтосекундных импульсов с длительностью 100 фс, длиной волны 800 нм и частотой следования 80 МГц. Определены параметры порога образования парогазовых пузырей. Показано, что образование парогазового пузыря является необходимым, но недостаточным условием для слияния.

2. Установлены предельные параметры воздействия на доимплантационные эмбрионы и ооциты млекопитающих (энергия импульса и длительность цуга фемтосекундных импульсов), при которых ооциты и эмбрионы остаются жизнеспособными и способны развиваться.

3. Обнаружено, что при действии цугом фемтосекундных импульсов на материал клеток формируются светопоглощающие центры. Показано, что образование светопоглощающих центров сопутствует образованию парогазовых пузырей в клетке за счет перехода поглощения фемтосекундного лазерного излучения биоматериалом из нелинейного режима поглощения в линейный режим.

4. Показано, что светопоглощающие центры люминесцируют и могут быть использованы в качестве трекинг-частиц. Предложена методика использования этих центров для регистрации перемещения цитоплазмы двух бластомеров после их лазерного слияния.

5. Установлен механизм тетраплоидизации при фемтосекундном лазерном слиянии бластомеров эмбриона мыши. Показано, что тетраплоидность возникает по механизму «проскальзывания» митоза.

**Степень достоверности полученных результатов.** Достоверность результатов, представленных в данной работе, подтверждаются корректным статистическим анализом данных. Результаты экспериментов демонстрировали высокую повторяемость в опытах разных серий. Эксперименты по оценке жизнеспособности проявляли хорошую воспроизводимость, несмотря на заведомо гетерогенные свойства объектов.

**Апробация результатов.** Основные результаты, изложенные в данной работе, докладывались и обсуждались на международных и российских конференциях: VI Троицкая конференция «Медицинская Физика и Инновации в Медицине» (ТКМФ-6), (Троицк, 2014); VII Съезд Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 2014); 57-я научная конференция МФТИ с международным участием, посвященной 120-летию со дня рождения П. Л. Капицы (Москва-Долгопрудный, 2014); 58-я научная конференция МФТИ с международным участием (Москва-Долгопрудный, 2015); V International Symposium «TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS» (Нижний Новгород, 2015); 59-я научная конференция МФТИ с международным участием (Москва-Долгопрудный, 2016); 20-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2016); XXIII Международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2016); PHOENIX 2017 – International medical student`s conference (Mangalore, India, 2017); 21-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА» (Пушино, 2017), VIII Съезд Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, 15-20 сентября 2017 года.

**Публикации.** По результатам, содержащихся в диссертации, опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus. Также по результатам диссертации был получен 1 патент.

**Личный вклад автора.** Все эксперименты, представленные в данной диссертационной работе, выполнены лично автором либо при его непосредственном участии. Вся часть работы, связанная с выделением, культивированием образцов, обработкой изображений и статистическими исследованиями выполнялись лично автором. Эксперименты на лазерных установках выполнялись при непосредственном участии автора.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, формулировки основных результатов, заключения и выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 101 странице, содержит 8 таблиц, 35 рисунков, 6 приложений и библиографию из 100 наименований.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

**Во введении** приводится обоснование актуальности работы, формулируются основные цели и задачи работы, дается описание научной новизны и практического применения результатов работы.

**В первой главе** содержится обзор литературы по теме диссертации. Описаны возможности лазерной методики для клеточной хирургии. Проводится сравнение лазеров, работающих в различных диапазонах: УФ, видимый и ИК в применении к биологическим объектам. Подробно описываются возможности применения фемтосекундных лазеров с длительностью импульса порядка нано-, пико- и фемтосекунд для проведения различных манипуляций внутри клеток (клеточными органеллами) или с клетками целиком.

Фемтосекундное лазерное излучение при помощи объектива с высокой числовой апертурой можно сфокусировать в эллипс объемом порядка нескольких фемтолитров ( $10^{-15}$  л). При действии на клетку фемтосекундным лазерным излучением с длиной волны 800 нм линейное поглощение оказывается пренебрежимо мало, а поглощение по нелинейному механизму происходит исключительно в фокальной области без повреждения окружающего материала образца. Именно эта особенность позволяет проводить в клетке операции субмикронного масштаба: удалять единичные митохондрии, точно разрезать

ДНК или фрагменты цитоскелета, поэтому данная методика называется лазерной нанохирургией.

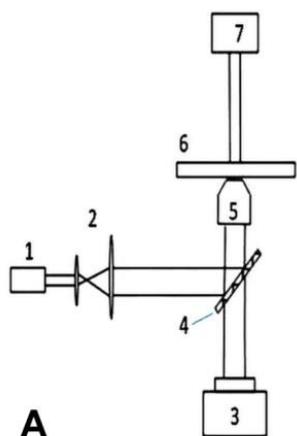
Лазерная нанохирургия рассматривается как альтернативная методика для слияния клеток, в том числе и эмбриональных клеток. В обзоре литературы приведены данные по другим методам слияния и дана их сравнительная характеристика. Отмечается, что способ лазерной нанохирургии, в отличие от других методик – слияния при помощи вируса Сендай, химического слияния, электрослияния – позволяет сливать определенные клетки внутри многоклеточной структуры. Так же для лазерного слияния характерна наименьшая инвазивность: воздействие происходит строго локализовано и не затрагивает клетки в полном их объеме.

Рассмотрены физико-химические механизмы взаимодействия фемтосекундного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона с материалом клетки. Обсуждается вклад многофотонной, лавинной и туннельной ионизации в процесс фотоионизации биологического материала. Рассмотрены события, возникающие в результате ионизации и несущие потенциальный травматический эффект для клетки: образование активных форм кислорода, формирования парогазовых и кавитационных пузырей. Описаны точечные абсорберы как возможные вспомогательные агенты для фемтосекундной лазерной нанохирургии.

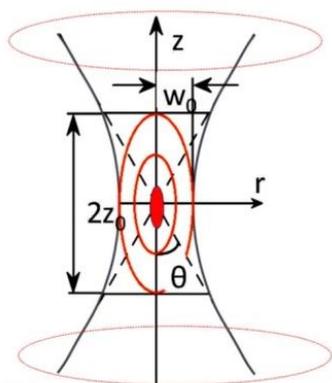
**Вторая глава** содержит описание экспериментальных методик, материалов, статистической обработки.

Основу экспериментальной установки составляет инвертированный оптический микроскоп (Olympus IX71), в который подается лазерное излучение. В качестве источника лазерного излучения в установке используется фемтосекундный лазер Mai Tai (Spectra Physics), 690-1000 нм, 3 Вт. Параметры излучения фемтосекундного лазера: длительность 100 фс, длина волны 800 нм, частота следования импульсов 80 МГц. Для работы с биологическими объектами использовали объектив Olympus 60x, NA = 0,7. Параметры пятна, в которое фокусируется лазер: перетяжка лазерного пучка  $w_0 = 0,61 \cdot \lambda / NA = 0,68$  мкм, параметр Релея  $z_0 = 1,86$  мкм (Рисунок 1). Плотность мощности в перетяжке пучка составляет  $\approx 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup>. Длительность цуга импульсов задавалась управляемым

прерывателем и составляла в различных экспериментах 15-60 мс. Энергию в импульсе варьировали в пределах 0,5 – 2 нДж. Видеосъемку экспериментов выполняли при помощи камеры Thorlabs DCC1545M.



**А**



**Б**

Рисунок 1. А – схема установки:

1 - источник фемтосекундного лазерного излучения; 2 - расширитель лазерного пучка (телескоп); 3 - источник

освещения (светодиодная лампа); 4 - дихроическое зеркало; 5 - объектив микроскопа; 6 - предметный

столик микроскопа; 7 – видеокамера. Б – схема перетяжки лазерного пучка:  $z_0$  –

параметр Рэля (1,8 мкм),  $w_0$  - радиус перетяжки (0,7 мкм);  $\theta$  – половинный

угол схождения лазерного пучка, для  $NA = 0,7$  этот угол соответствует  $44,4^\circ$ .

$NA = 0,7$  этот угол соответствует  $44,4^\circ$ .

В качестве модельных объектов для исследования вопросов повреждающей способности фемтосекундного лазерного излучения, механизма поглощения, механики клеточного слияния использовали двухклеточные эмбрионы и ооциты мыши, которые получали с применением методики суперовуляции. Нанохирургические операции проводили, перенося объекты на покрывное стекло в капле среды и помещая их на предметный столик микроскопа. После проведенных манипуляций эмбрионы и ооциты тщательно отмывали и культивировали в  $CO_2$ -инкубаторе с 5% концентрацией углекислого газа при температуре  $37^\circ$ .

Для визуализации ядер и метафазной пластинки клеток использовали флуоресцентный краситель Hoechst 33342. Локализацию флуоресценции образцов фиксировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) и с помощью микроскопа «Биомед 4 ПР ЛЮМ» («Биомед», Россия).

В опытах по исследованию механики и динамики перетекания содержимого клеток при действии лазерным импульсом на область контакта использовали ооциты, содержащие зеленый флуоресцентный белок (green fluorescence protein, GFP), которые получали из трансгенных мышей линии C57BL/6-Tgn(АСТЬEGFP)10sbJ. С применением лектина – агента, обеспечивающего слипание клеток - создавали пары из GFP-ооцитов и обычных ооцитов, в область контакта которых действовали фемтосекундным лазерным импульсом. Возбуждение люминесценции GFP, перетекающего из одной клетки в другую, производили методом однофотонного возбуждения лазерным диодом (Nichia NDB7675) с  $\lambda = 462$  нм (мощность 6 мВт, интенсивность – 1 Вт/см<sup>2</sup> в фокальной плоскости). Флуоресцентное изображение клеток регистрировали при помощи камеры XIMEA xiQ MQ013MG.

Для изучения кариотипа диплоидных и тетраплоидных эмбрионов использовали методику приготовления суховоздушных препаратов (по Тарковскому) с использованием препарата колхицина для остановки клеточного деления на стадии метафазы.

Статистический анализ данных проводили при помощи различных методов: дисперсионного анализа (ANOVA), точного теста Фишера, обобщенной линейной модели, методики Манна-Уитни и оценки корреляции (коэффициент Спирмена) – в зависимости от характера анализируемых данных. Во всех случаях, где с контрольной группой сравнивалось две и более опытных группы, применяли поправку Бонферрони для множественных сравнений.

**Третья глава** посвящена исследованию механизма поглощения фемтосекундного лазерного излучения биологическим материалом. На примере преовуляторных ооцитов мыши показано, что при действии на образец цугом фемтосекундных импульсов происходит переключение с нелинейного в линейный режим поглощения фемтосекундного лазерного излучения благодаря образованию светопоглощающих центров.

Показано, что светопоглощающие центры обладают люминесцентными свойствами и способны возбуждаться как однофотонно (лазерным диодом на длине волны 462 нм, ширина спектра – 2 нм), так и двухфотонно – на длине волны 790 нм (с шириной спектра фемтосекундного импульса, равным 20). Максимум

люминесценции соответствует длине волны 520 нм. Размер люминесцентных центров можно варьировать, меняя параметры фемтосекундного лазерного воздействия. Минимальный размер люминесцентных центров, который удалось достигнуть, соответствует 500 нм.

Люминесценция светопоглощающих центров выглядит контрастной по сравнению с автолюминесценцией образца, которая практически незаметна на полученных снимках. Люминесценция светопоглощающих центров в различных областях ооцита показана на Рисунке 2.

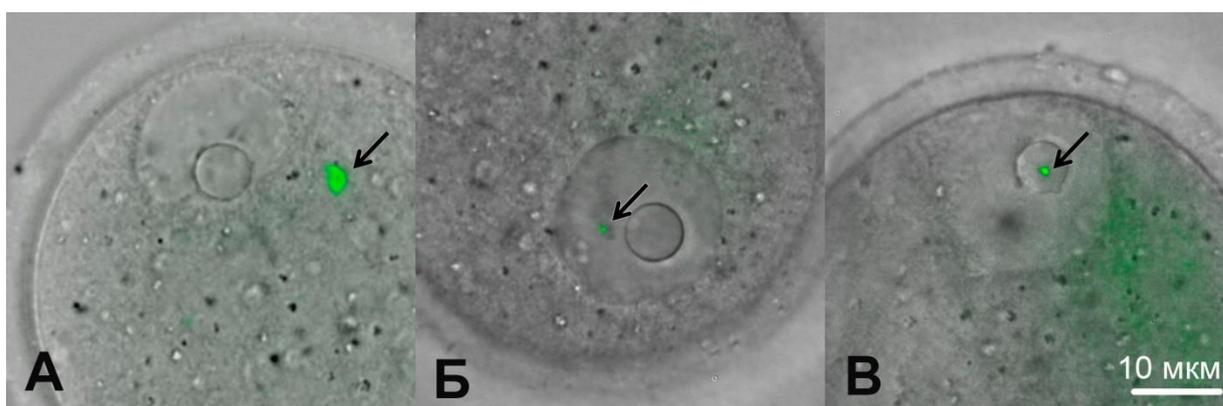


Рисунок 2. Люминесценция светопоглощающих центров (показаны стрелками) в цитоплазме (А), ядре (Б) и ядрышке (В) преовуляторных ооцитов мыши на стадии зародышевого пузырька.

Состав светопоглощающих центров изучали при помощи рамановской спектроскопии (Рисунок 3). В спектре комбинационного рассеяния были выявлены D- и G- полосы, соответствующие  $1355$  и  $1590\text{ см}^{-1}$  и характерные для графеноподобных структур, что позволяет предположительно классифицировать светопоглощающие центры как углеродные точки (C-Dots).

Характерными свойствами люминесцентных центров оказались их высокая стабильность и низкая токсичность для живых образцов. Было показано, что люминесцентные центры способны сохраняться в живой клетке на протяжении суток и не влияют на жизнеспособность клеток. Ооциты, содержащие люминесцентные точки, способны развиваться до стадии метафазы II (МII) в среде для *in vitro* созревания так же, как и контрольные.

Отсутствие явного токсического воздействия, способность сохраняться в клетке продолжительное время, сохраняя свою форму (не распределяться

равномерно в материале клетки), и – самое главное – возможность формирования *in vivo* и *in situ* позволяют применять светопоглощающие центры для наблюдения за различными внутриклеточными процессами, не нарушая целостности и гомеостаза клетки.

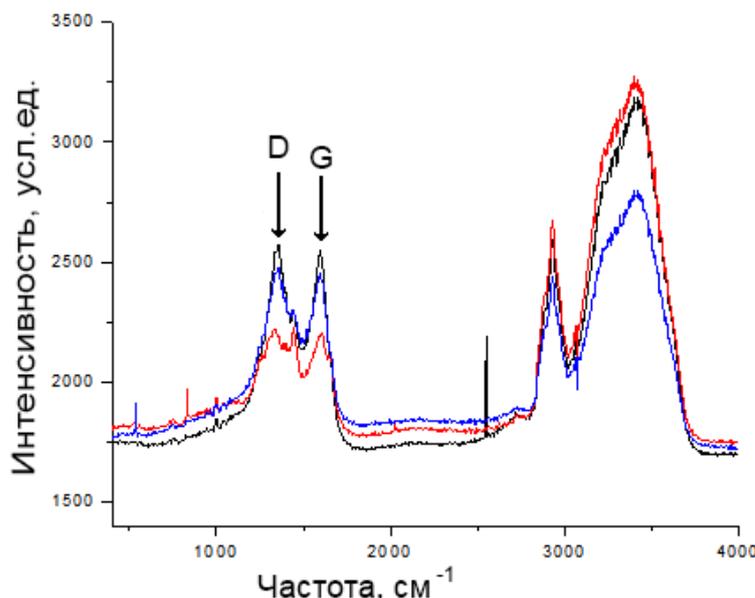


Рисунок 3. Спектр комбинационного рассеяния светопоглощающих центров. На рисунке отмечены D- и G-полосы, соответствующие 1355 и 1590 см<sup>-1</sup>.

**В четвертой главе** рассматривается влияние фемтосекундного лазерного излучения на жизнеспособность и развитие двухклеточных эмбрионов и преовуляторных ооцитов, находящихся на стадии зародышевого пузырька, а так же особенности взаимодействия фемтосекундного лазерного излучения с материалом различных областей клетки. Фемтосекундное лазерное излучение фокусировали в ядро, цитоплазму и ядрышко (в ооците) и в область контакта бластомеров (контакт двух плазматических мембран). Воздействие повторяли пятикратно. Общее количество энергии, направленной в образец, варьировали, используя разные значения энергии импульса: 0,5 нДж, 1 нДж и 2 нДж и длительности цуга импульсов: 15 мс, 30 мс и 60 мс. Таким образом, получалось 9 опытных групп и одна контрольная. В каждой группе было не менее 20 образцов. При таких параметрах воздействия, длительности импульса 100 фс и частоте 80 МГц, плотность мощности составляла от  $2 \cdot 10^{11}$  до  $13 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup>.

При действии цугом фемтосекундных импульсов на биологический материал с некоторой вероятностью образуются парогазовые пузыри (Рисунок 4). Был исследован характер образования парогазовых пузырей при действии фемтосекундным лазерным излучением на разные области клетки. Показано, что

формирование парогазовых пузырей имеет пороговый характер. Порог был определен как вероятность образования парогазового пузыря, превышающая 50%. При действии цугом фемтосекундных импульсов в цитоплазму и ядрышко ооцита, а так же в контакт бластомеров, порог достигался при энергии импульса 1 нДж. Порога образования пузыря в ядре не удалось достигнуть при исследуемых параметрах воздействия. В ядрышке парогазовые пузыри возникали уже при 0,5 нДж, однако порог образования так же составлял 1 нДж.

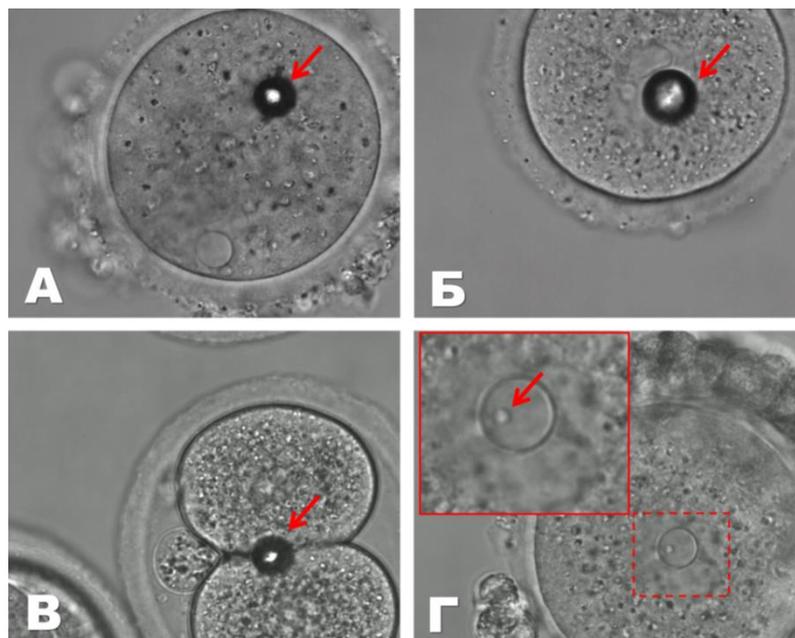


Рисунок 4. Парогазовый пузырь, возникающий в результате воздействия цугом фемтосекундных импульсов в различные области клетки: в цитоплазме (А) и в ядре (Б) ооцита мыши, В – в области контакта бластомеров двухклеточного эмбриона, Г – в ядрышке ооцита (пунктиром выделена область ядра, которая показана с дополнительным увеличением в красной рамке). Стрелки указывают на парогазовый пузырь.

#### *Развитие ооцитов после фемтосекундного лазерного воздействия.*

Было изучено влияние фемтосекундного лазерного излучения на жизнеспособность и развитие преовуляторных ооцитов мыши, находящихся на стадии зародышевого пузырька, после воздействия в разные области клетки: в цитоплазму, ядро и ядрышко. После воздействия ооциты культивировали в среде для *in vitro* созревания в течение суток в CO<sub>2</sub> инкубаторе, и на следующий день наблюдали четыре возможных исхода: 1) ооцит достигал стадии метафазы II (МII);

2) ооцит останавливался на стадии разрушения зародышевого пузырька (germinal vesicle break down, GVBD), 3) ооцит оставался на стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV); 4) ооцит разрушался.

Успешным считался исход, когда ооцит достигал стадии метафазы II, которую определяли по отделению полярного тельца и формированию метафазной пластинки, наблюдаемых при помощи окраски витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Рисунок 5). Для статистического анализа использовали обобщенную линейную модель и точный тест Фишера с поправкой Бонферрони. Значимое влияние на достижение ооцитами стадии метафазы II оказало только место приложение лазера; энергия в импульсе и длительность цуга не оказали влияния на выживаемость. Выживаемость значимо снижалась у эмбрионов, облученных в ядрышко ( $p = 0,00001$ ), облучение в цитоплазму ( $p = 0,54$ ) не снижало жизнеспособность, облучение в ядро носит пограничную зависимость на жизнеспособность ( $p=0,025$ ).

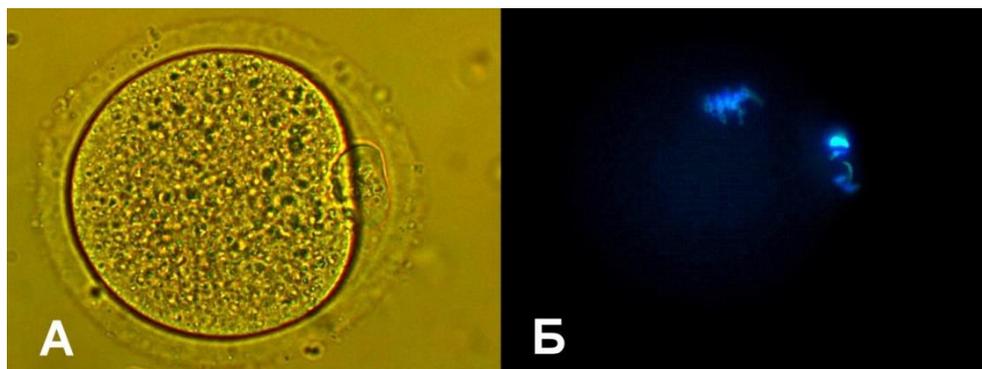


Рисунок 5. Ооцит мыши на стадии метафазы II. А – изображение в проходящем свете, видны ооцит и первое полярное тельце. Б – флуоресцентное изображение, окраска витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Показана флуоресценция метафазной пластинки (сверху) и полярного тельца (справа).

#### *Развитие двухклеточных эмбрионов после лазерного воздействия.*

В каждой опытной группе, а так же в контрольной группе, было по 20 образцов. В результате действия фемтосекундного лазерного излучения, направленного в область контакта двух бластомеров, в течение часа после воздействия наблюдали четыре возможных исхода: 1 - бластомеры двухклеточного эмбриона сливались (Рисунок 6, а); 2 - ни слияния, ни разрушения не происходило

(Рисунок 6, б); 3 - разрушался один из двух бластомеров (Рисунок 6, в); 4 - эмбрион разрушался целиком (Рисунок 6, г).

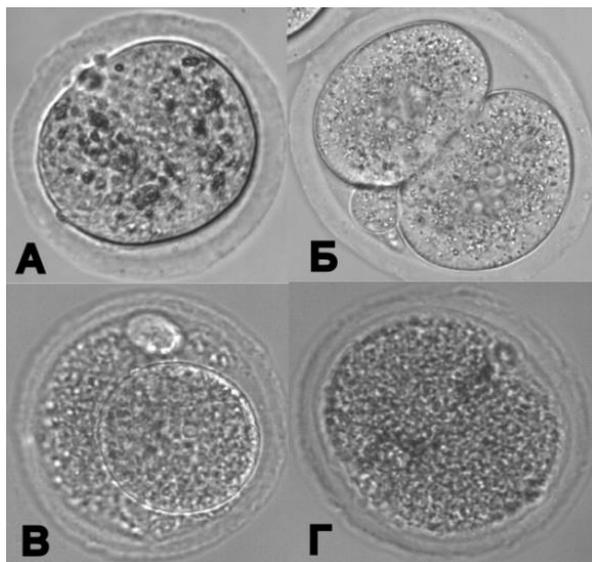


Рисунок 6. Эмбрионы после воздействия лазером.

А – слитый эмбрион;

Б – не слитый эмбрион;

В – эмбрион, у которого разрушен один бластомер;

Г – эмбрион, разрушенный целиком.

Выявлены общие закономерности слияния и разрушения двухклеточных эмбрионов после фемтосекундного лазерного воздействия. При низких значениях энергии (0,5 нДж) с эмбрионами не происходило никаких морфологических изменений. При повышении энергии импульса возрастала вероятность слияния бластомеров, но так же и возрастала вероятность их разрушения.

Рассматривалось развитие оперированных эмбрионов после лазерного воздействия. Группой интереса в данном случае являлись только не слитые эмбрионы, поскольку наблюдение за развитием слитых эмбрионов не позволяет отделить собственно эффект лазерного воздействия от эффекта слияния. Изучение деталей развития не слитых эмбрионов (морфологически совпадающих с контролем) позволяет понять, как само по себе лазерное воздействие влияет на жизнеспособность и качество эмбрионов.

Оперированные эмбрионы культивировали в среде M16 до стадии бластоцисты, которая наступала на пятый день после оплодотворения (или на четвертый день с момента получения эмбрионов). На пятый день подсчитывали количество бластоцист (Таблица 1), и количество клеток в бластоцистах (Рисунок 7). Достоверного различия в способности к образованию бластоцисты и в количестве бластоцист между контрольной и опытными группами не было обнаружено.

Таблица 1. Развитие не слитых эмбрионов до стадии бластоцисты после лазерного воздействия. Количество не слитых эмбрионов / количество бластоцист из не слитых эмбрионов (% развития до стадии бластоцисты).

Длительность цуга импульсов	Энергия импульса		
	0,5 нДж	1 нДж	2 нДж
15 мс	20/20 (100%)	12/19 (63%)	9/10 (90%)
30 мс	20/20 (100%)	7/11 (63%)	2/2 (100%)
60 мс	14/20 (70%)	18/18 (100%)	1/2 (50%)
Контрольная группа	24/25 (96%)		

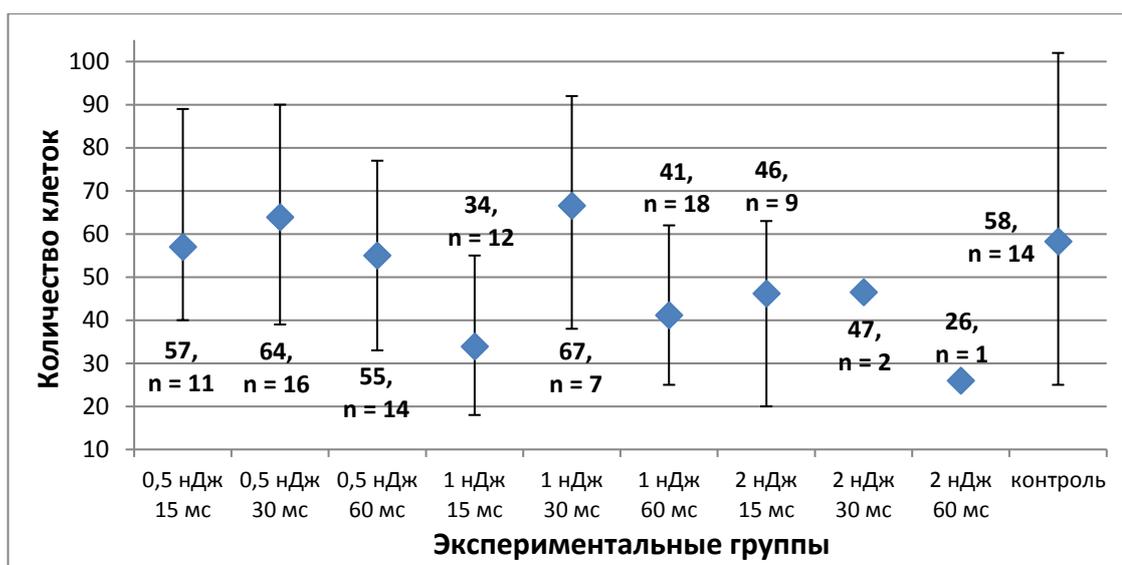


Рисунок 7. Количество клеток в бластоцистах при различных параметрах лазерного воздействия. На графике показаны средние значения количества клеток в каждой группе, число образцов в данной выборке. Скобками показаны максимальные и минимальные значения.

**В пятой главе** подробно рассмотрено, как эффект фемтосекундного лазерного слияния влияет на состояние и поведение такой биологической системы, как двухклеточный эмбрион мыши. Слияние индуцировали фемтосекундным лазерным излучением с энергией импульса 1 нДж и временем экспозиции 30 мс. Лазерное излучение направляли в область контакта бластомеров и повторяли до образования парогазового пузыря. Для параметров 1 нДж 30 мс слияние происходило в 29% случаев (97/330), не слитых эмбрионов было 39% (129/330), 1 бластомер разрушался у 13% эмбрионов (41/330), и полностью разрушались 19% эмбрионов (64/330).

Показано, что слитые, не слитые, контрольные и эмбрионы с одним разрушенным бластомером запускают процесс образования бластоцели (кавитацию) в одно и то же время (считая от времени второго укола для суперовуляции). Таким образом, ни лазерное воздействие по себе, не слияние бластомеров или разрушение одного из них, не влияет на эмбриональные «часы».

Все эмбрионы, за исключением полностью разрушенных, были способны к формированию бластоцист на пятый день развития при культивировании *in vitro*. Слитые достигали стадии бластоцисты в 49% случаев (47/97), не слитые - 59% (76/129), эмбрионы с одним разрушенным бластомером - 39% (16/41), и контрольные - 84% (131/156). Точный тест Фишера с поправкой Бонферрони для множественных сравнений обнаружил достоверное различие между опытными и контрольной группой в способности достигать стадии бластоцисты (для каждого сравнения р-значение оказалось меньше, чем  $0,05/3 = 0,0016$ ). На пятый и на шестой день выполнялся подсчет количества клеток в бластоцистах оперированных и контрольных эмбрионов. И на пятый, и на шестой день в контрольных бластоцистах оказалось клеток достоверно больше, чем во всех опытных группах. Дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бонферрони для множественных сравнений показал, что р-значение для каждого сравнения опытной и контрольной группы оказалось меньше, чем  $0,05/3 = 0,0016$ . Кроме того, дисперсионный анализ (ANOVA) выявил достоверное увеличение количества клеток в бластоцистах с пятого на шестой день только в контрольной группе ( $p = 0,009$ ). В других группах достоверного увеличения количества клеток с пятого на шестой день не было выявлено, что говорит о замедлении развития на шестой день после лазерного воздействия.

Так же в пятой главе подробно рассмотрены процессы, которые происходят с ядрами и цитоплазмой сливающихся клеток. Используя препарат колхицин, останавливающий деление клетки на стадии метафазы, и окраску витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342, было показано, что ядра бластомеров не сливаются и не образуют общей метафазной пластинки (Рисунок 8), вопреки данным, представленным в литературе.

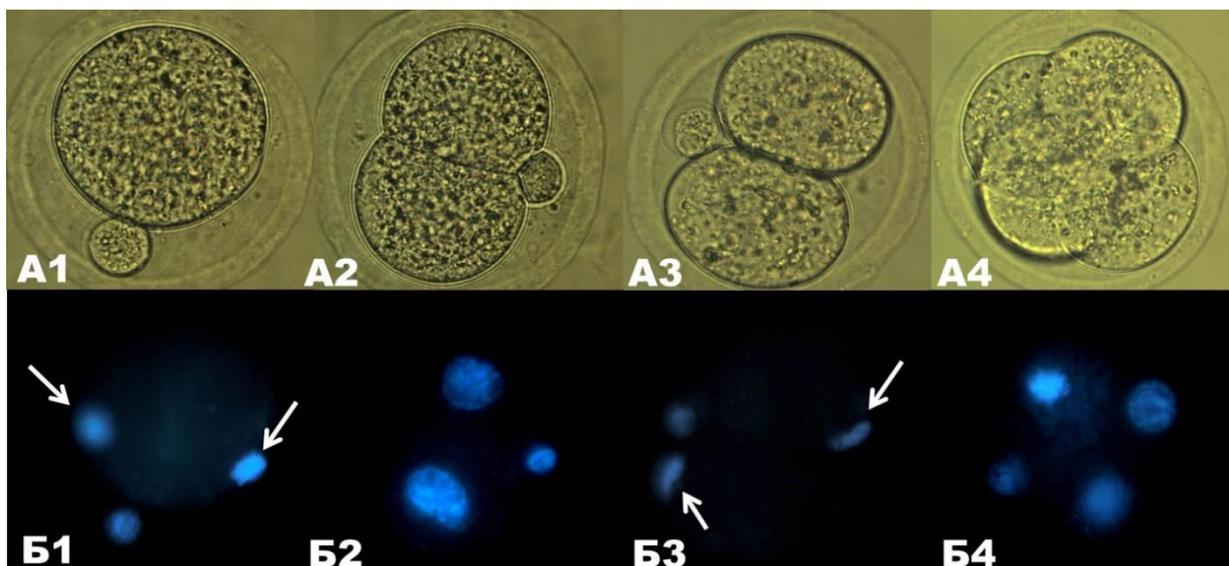


Рисунок 8. А - изображения эмбрионов в проходящем свете; Б – флуоресцентные изображения, полученные путем окраски эмбрионов витальным флуоресцентным красителем Ноеchst 33342. 1 – слитый эмбрион, предварительно обработанный колхицином; 2 – слитый эмбрион без дополнительного воздействия; 3 – контрольный эмбрион, предварительно обработанный колхицином; 4 – контрольный эмбрион без дополнительного воздействия. Возраст эмбрионов составляет 58-60 часов после укола ХГЧ.

При помощи методики приготовления суховоздушных препаратов по Тарковскому было установлено, что бластоцисты, сформированные из слитых фемтосекундным лазером эмбрионов, действительно имеют тетраплоидный кариотип (Рисунок 9). Это означает, что тетраплоидность при лазерном слиянии возникает по механизму «проскальзывания» митоза, а не путем слияния ядер или формирования общей метафазной пластинки. Клетка, готовясь к митозу, удваивает количество ДНК в процессе естественной репликации, однако акт слияния нарушает нормальный ход деления клетки и препятствует уменьшению генетического материала.

Был исследован вопрос обмена цитоплазматическим материалом между сливающимися клетками. Для изучения перетекания гиалоплазмы (жидкая фракция цитоплазмы, включает в себя растворенные в воде вещества, некрупные белки, но не включает цитоскелет) была создана модельная система, состоящая из двух клеток: ооцита, содержащего GFP, и ооцита без GFP. Ооциты приводились в контакт и склеивались посредством лектина. В область контакта действовали фемтосекундным лазерным импульсом. Из 11 образцов в трех случаях перетекания

GFP между клетками не происходило, в этих же случаях не происходило и слияния. В 8 из 11 случаев GFP перетекал из одной клетки в другую, равномерно распределяясь по ее объему. За время порядка 10 минут уровень свечения в обеих клетках выравнивался (Рисунок 10). Слияние наступало приблизительно через 30 минут после лазерного воздействия.

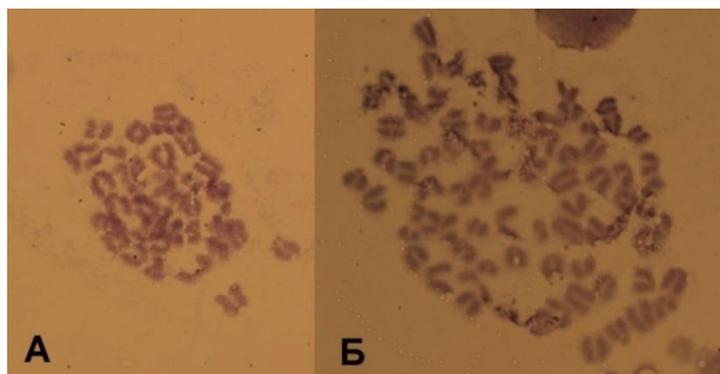


Рисунок 9. Кариотип диплоидного (А) и тетраплоидного (Б) эмбриона. Препараты получены при помощи техники суховоздушного приготовления по Тарковскому и окрашены красителем Гимза.

Из 8 образцов, в которых происходило перетекание, слились только 4 пары клеток. Это означает, что парогазовый пузырь, возникающий в месте воздействия, создает пору между цитоплазматическими мембранами, размер или время жизни которой достаточны для обмена гиалоплазмой, но недостаточны для объединения мембран и формирования общей цитоплазмы.

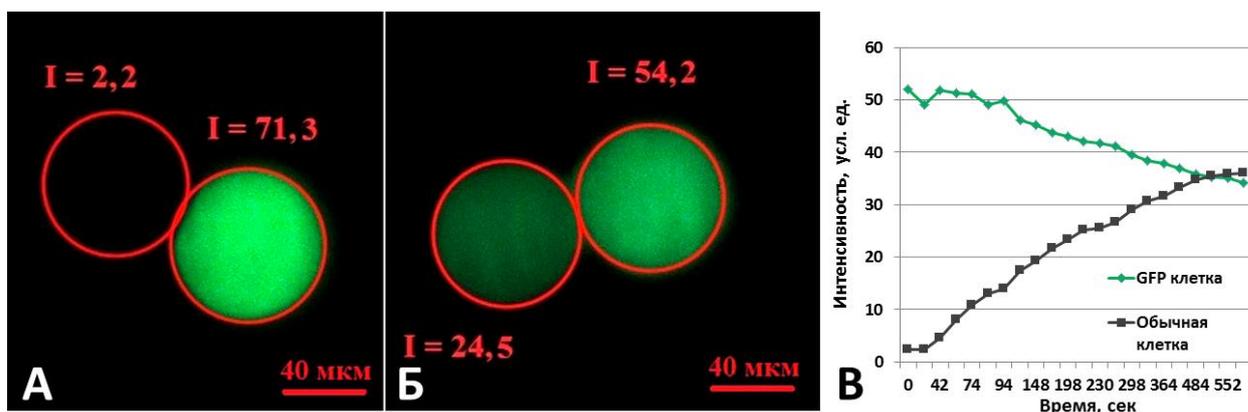


Рисунок 10. Обмен зеленого флуоресцентным белком между двумя клетками. А – нет обмена; Б – есть обмен. Интенсивность (I) обозначена в условных единицах. В - Динамика изменения интенсивности люминесценции зеленого флуоресцентного белка в GFP-клетке и обычной клетке.

Для изучения перемешивания цитоплазмы была предложена модель, в которой использовали двухклеточные эмбрионы мыши и методику создания светопоглощающих центров, разработанную в этой работе. В одной из двух клеток создавали 6 люминесцентных точек, расположенных вокруг ядра (Рисунок 11). В область контакта направляли цуг фемтосекундных импульсов, который индуцировал процесс слияния (и создавал еще один светопоглощающий центр). Из 50 образцов 20 претерпели слияние, и из 20 слившихся 13 поделились и снова сформировали две клетки. В слившихся и поделившихся эмбрионах удалось найти созданные ранее светопоглощающие центры, их количество было посчитано. Обнаружено, что люминесцентные точки, которые исходно были сгенерированы в одной плоскости, способны перемещаться как внутри бластомера, так и в соседний бластомер. Из 13 образцов было 3 образца, где точки обнаруживали только в одном из бластомеров (соотношение 7/0), 2 образца – где во втором бластомере обнаруживали одну точку (соотношение 6/1 и 5/1), 6 образцов с соотношением точек 5/2, и по одному образцу с количеством точек 4/3 и 3/3. За исходный полюс принималась та сторона, на которой точек было обнаружено больше. Все найденные в 13 эмбрионах точки были нанесены на изображение эмбриона. Таким образом, была получена карта, суммирующая расположение светопоглощающих центров в бластомерах до слияния и после слияния и деления (Рисунок 12).

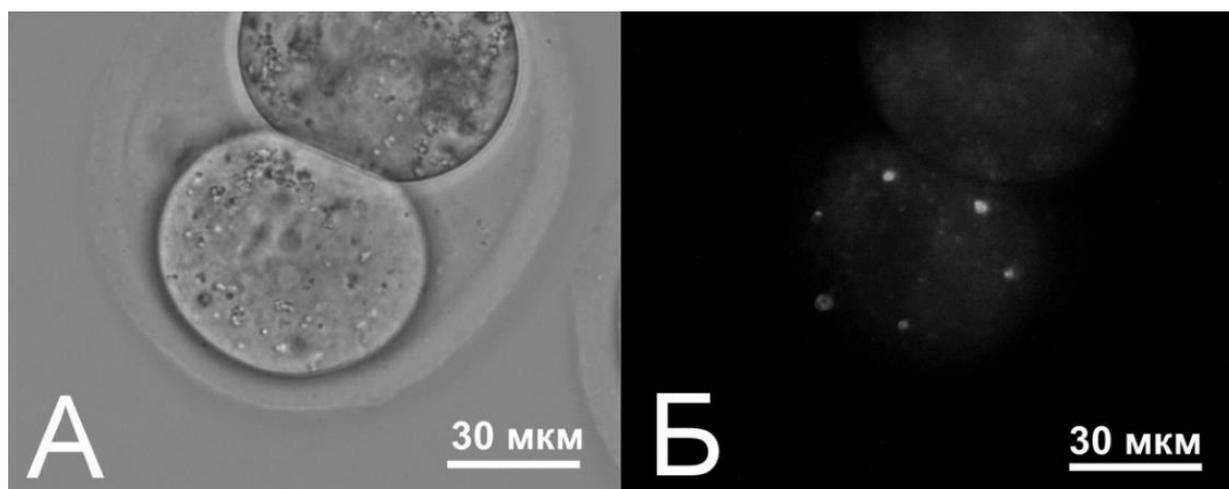


Рисунок 11. Светопоглощающие центры в двухклеточном эмбрионе мыши. А – изображение в проходящем свете; Б – люминесцентное изображение.

Применение светопоглощающих центров для этой задачи позволяет количественно оценить способность цитоплазмы к перемешиванию. В нашем случае из 89 точек, которые были обнаружены в 13 эмбрионах, поделившихся после слияния, на исходном полюсе осталось 69 точек, и 20 переместились на противоположный полюс. Полученные данные указывают на то, что крупные компоненты цитоплазмы при слиянии клеток и последующем делении способны перемещаться, но это перемещение не носит характера диффузии, как это происходит в случае с GFP. Кроме того, данный результат демонстрирует возможность применения светопоглощающих центров как внутриклеточных трекинг-частиц, применяемых для отслеживания внутриклеточных процессов.

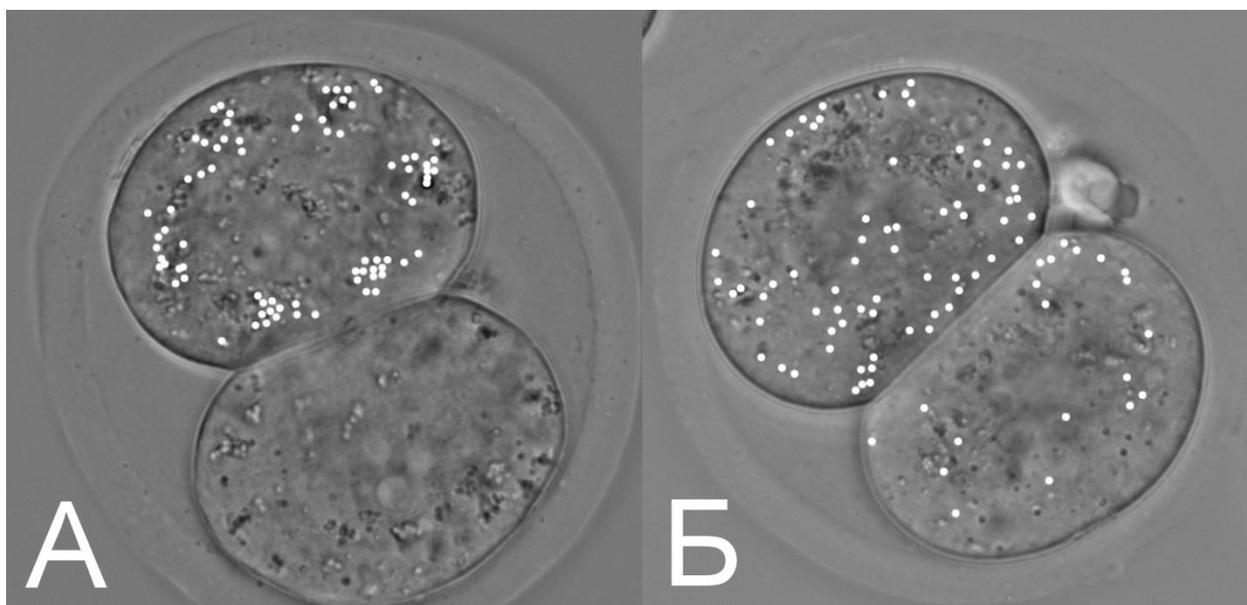


Рисунок 12. Карта расположения светопоглощающих центров, созданных в двухклеточных эмбрионах мыши. А – до слияния бластомеров; Б – после слияния и деления бластомеров.

## Основные результаты и выводы.

1. В работе продемонстрировано, что наряду с общепринятым нелинейно-оптическим механизмом лазерного поглощения и образования парогазовых пузырьков в биоматериале за счет образования плазмы возможно также протекание альтернативного механизма. Так, при воздействии на биоматериал клетки цугом фемтосекундных лазерных импульсов при плотности мощности достаточной для формирования плазмы низкой плотности образуются центры окраски с полосой поглощения в ближнем ИК диапазоне на длине волны лазерного излучения. Центры окраски выступают в качестве точечных абсорберов энергии лазерного импульса и сопутствуют образованию парогазового пузырька за счет линейного поглощения энергии лазерного импульса.

2. Показано, что центры окраски, образующиеся из органического материала клетки, можно классифицировать как углеродные точки (C-Dots). C-Dots, формируемые в зоне плазмы низкой плотности, можно использовать в качестве трекинг-частиц. Их люминесценция с максимумом около 530 нм возбуждается как однофотонно (светом с длиной волны менее 450 нм), так и двухфотонно (импульсами фемтосекундного лазера с длиной волны от 720 до 900 нм). Предложен метод прицельного формирования C-Dots внутри клетки без повреждения цитоплазматической мембраны и их использования в качестве люминесцентной метки для изучения внутриклеточных процессов.

3. Показан пороговый характер образования парогазовых пузырей при фемтосекундном лазерном воздействии на различные области живых клеток (цитоплазматическая мембрана, цитоплазма, ядро, ядрышко) и определены параметры порога воздействия. Установлено, что при воздействии лазерным импульсом с превышением порогового значения не более чем вдвое, воздействие фемтосекундного лазера на доимплантационные эмбрионы и ооциты млекопитающих можно рассматривать как не инвазивное.

4. Изучена зависимость между вероятностью образования парогазового пузырька и слиянием клеток эмбриона мыши на стадии двух бластомеров. Показано, что образование парогазового пузыря является необходимым, но недостаточным условием для слияния клеток. Помимо слияния, в результате лазерного воздействия реализуются исходы: две клетки не сливаются, одна из

клеток разрушается, а вторая сохраняется, и обе клетки разрушаются. В дальнейшем две слившиеся клетки, две не слившиеся клетки и эмбрион с одним разрушенным бластомером способны развиваться до стадии бластоцисты. Образование полости бластоцисты во всех случаях происходит одновременно, что доказывает, что «клеточные часы» эмбриона не нарушаются даже после слияния или разрушения одного бластомера.

5. С использованием клеток, экспрессирующих GFP, показано, что образование пароголового пузырька в области контакта двух клеток приводит к обмену и гомогенизации гиалоплазмы как в случае образования одной слитой клетки, так и в случае, когда слияние не произошло. С помощью методики создания люминесцентных меток C-Dots показано, что при образовании единой клетки (обе мембраны двух клеток слились в единую мембрану) цитоплазма, происходящая из разных клеток, полностью не перемешивается.

6. Установлен механизм тетраплоидизации при лазерном слиянии. Показано, что тетраплоидность возникает по механизму «проскальзывания» митоза.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Фемтосекундное лазерное слияние бластомеров эмбрионов мыши: эффективность образования бластоцист и развития эмбрионов. А.А. Осыченко, А.Д.Залесский, А.С.Кривохарченко, А.К. Шахбазян, А.В. Рябова, В.А.Надточенко. 2015, «Квантовая электроника», т. 45, № 5, с. 498-502.

2. Образование светопоглощающих центров в цитоплазме эмбрионов мыши под воздействием фемтосекундных импульсов ближнего инфракрасного диапазона. А.А. Астафьев, А.Д. Залесский, А.М. Шахов, А.А. Осыченко, В.А. Надточенко. «Химия высоких энергий», 2016, т. 50, № 5, с. 1–3.

3. Воздействие остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения на ядрышкоподобное тельце GV ооцитов и способность ооцитов мыши к созреванию. А. А. Астафьев, А. Д. Залесский, О. В. Зацепина, А. Н. Костров, А. С. Кривохарченко, А. А. Осыченко, Г. А. Серобян, В. А. Надточенко. «Доклады Академии Наук», 2016, том 467, №5, с. 1-5.

4. Воздействие фемтосекундного лазерного излучения на ооциты млекопитающих. А. М. Шахов, А. А. Астафьев, А. А. Осыченко, В. А. Надточенко. «Химическая физика», 2016, т. 35, № 10, с. 1-4.

5. Определение диапазона неинвазивного воздействия фемтосекундными лазерными импульсами ближнего инфракрасного спектра для нанохирургии ооцитов млекопитающих. А.А. Осыченко, У.А. Точило, А.А. Астафьев, А.Д. Залесский, А.М. Шахов, А.С. Кривохарченко, В.А. Надточенко. Современные технологии в медицине, 2017, т. 9, №1, стр. 21-27.

6. Alina A. Osychenko, Alexandr D. Zalessky, Andrey N. Kostrov, Anastasia V. Ryabova, Alexander S. Krivokharchenko, Viktor A. Nadtochenko, "Femtosecond laser surgery of two-cell mouse embryos: effect on viability, development, and tetraploidization," J. Biomed. Opt. 22 (12), 125006 (2017).

7. Патент «Способ получения химерных животных и чистых линий животных», регистрационный номер заявки 2015151410 от 01.12.2015. Федеральный институт промышленной собственности.