

УДК 577.354.2

## ВОЗДЕЙСТВИЕ ОСТРОСФОКУСИРОВАННОГО ФЕМТОСЕКУНДНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЯДРЫШКОПОДОБНОЕ ТЕЛЬЦЕ GV ООЦИТОВ И СПОСОБНОСТЬ ООЦИТОВ МЫШИ К СОЗРЕВАНИЮ

© 2016 г. А. А. Астафьев<sup>1</sup>, А. Д. Залесский<sup>1</sup>, О. В. Зацепина<sup>1,2</sup>, А. Н. Костров<sup>1</sup>,  
А. С. Кривохарченко<sup>1</sup>, А. А. Осыченко<sup>1</sup>, Г. А. Серобян<sup>1</sup>, В. А. Надточенко<sup>1,3,4</sup>

Представлено академиком РАН В.А. Шуваловым 21.10.2015 г.

Поступило 21.10.2015 г.

С помощью фемтосекундного лазерного излучения провели локальное разрезание материала ядрышкоподобного тельца (ЯПТ) ооцита мыши без повреждения блестящей оболочки, цитоплазматической мембраны, мембраны ядра и окружающей ЯПТ нуклеоплазмы. Установлено, что при разрезе материала ЯПТ ооцита объемом  $2.7 \cdot 10^{-11}$  см<sup>3</sup>, что составляет 5.2% от объема ЯПТ с диаметром около 10 мкм, вероятность развития преовуляторных ооцитов на стадии зародышевого пузырька до стадии метафазы II мейоза понижается в 3–7 раз по сравнению с контролем, что указывает на существенную роль организации материала ЯПТ в процессе созревания ооцитов мыши.

DOI: 10.7868/S0869565216110268

Для зародышевого пузырька (germinal vesicle, GV) ооцитов всех млекопитающих характерно наличие крупных (до 10 мкм в диаметре) органелл, называемых “ядрышкоподобными тельцами” (ЯПТ) или “постядрышками” [1–5, 14]. В менее зрелых GV ооцитах ЯПТ способны к транскрипции рибосомных генов (рДНК) [6]. Однако перед овуляцией синтез рРНК в ЯПТ прекращается, и ЯПТ приобретают однородную фибриллярную структуру и достигают размера, близкого к 10 мкм [7]. Методами иммуноцитохимии в составе ЯПТ выявлены факторы транскрипции рДНК (РНК полимеразы I, UBF) и процессинга рРНК (фибриллин, NPM1/нуклеофозмин, нуклеолин) [2, 7–9]. Сообщается, что материал ЯПТ играет важную роль в развитии эмбриона после оплодотворения яйцеклетки [6]. Однако имеющиеся к настоящему времени данные о роли ЯПТ в биологии развития ооцитов пока не позволяют однозначно детализировать их участие в оогенезе млекопитающих [8].

В настоящей работе для ответа на вопрос о роли ЯПТ в созревании GV ооцитов мы впервые применили фемтосекундную лазерную нанохирургию. Уникальным преимуществом этой техники является возможность воздействия на ЯПТ без повреждения блестящей оболочки (zona pellucida), цитоплазматической мембраны, ядерной оболочки и содержимого ядра ооцита.

Для получения ооцитов использовали самок мышей-гибридов (СВА × С57BL/6)F1 (питомник лабораторных животных “Пушино”, ФИБХ РАН) в возрасте от 1.5 до 2.5 мес. Протокол выделения ооцитов описан в работе [9]. Очищенные от кумулюсных клеток ооциты помещали в 50 мкл среды М2 на покровное стекло. Ооциты контрольной группы (без лазерного воздействия) помещали рядом в том же объеме среды. Время манипуляций с образцом при облучении лазером не превышало одной минуты.

**Процедура облучения.** Излучение фемтосекундного лазера (длительность 100 фс, длина волны 800 нм, частота следования импульсов 80 МГц) с модой Гаусса фокусируется объективом 60х, NA = 0.7 в пятно, размеры которого характеризуются следующими параметрами: перетяжка лазерного пучка  $w_0 = 0.61 \lambda$ , NA = 0.68 мкм, параметр Рэлея  $z_0 = kw_0^2/2 = 1.86$  мкм ( $k = 2\pi/\lambda_0$ , волновое число, рис. 1). Излучение фемтосекундного лазера фокусировали в центральную область ЯПТ в виде пакета импульсов с частотой следования внутри пакета, равной 80 МГц. Длительность пакета импульсов регулировалась электромеханическим затвором Thorlabs SH05 и составила 15–60 мс. Ла-

<sup>1</sup>Институт химической физики  
им. Н.Н. Семенова  
Российской Академии наук, Москва  
E-mail: nadtochenko@gmail.com

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии наук, Москва

<sup>3</sup>Институт проблем химической физики  
Российской Академии наук,  
Черноголовка Московской обл.

<sup>4</sup>Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

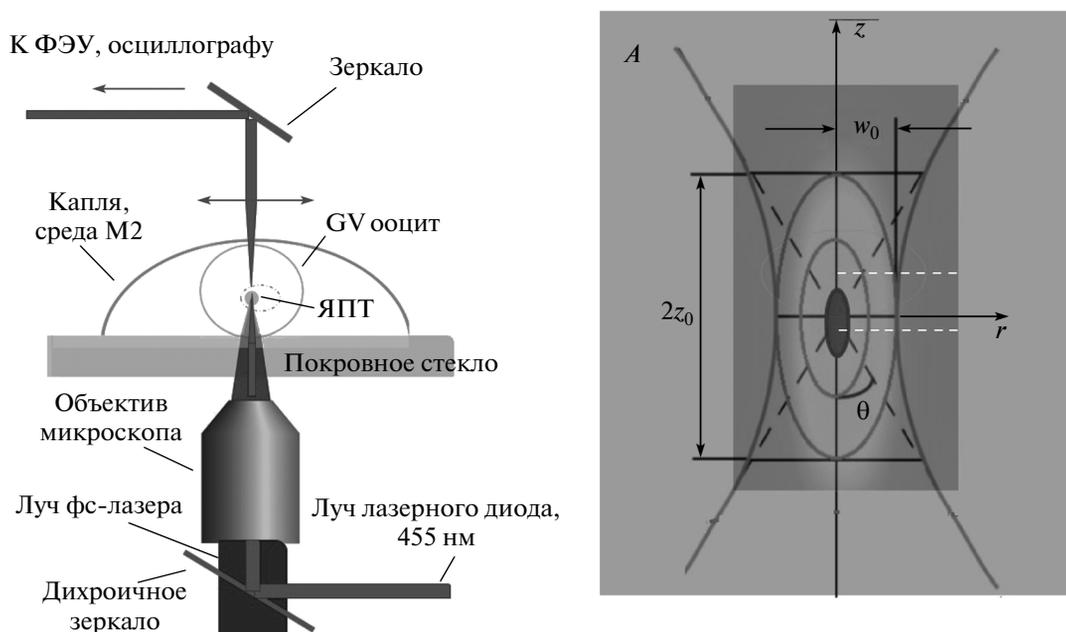


Рис. 1. Принципиальная оптическая схема. Распределение интенсивности лазерного пучка с модой Гаусса, сфокусированного объективом.

зерное воздействие на ЯПТ повторяли пятикратно. Изменение морфологии объекта после лазерного воздействия регистрировали в виде видео-файла с помощью камеры Thorlabs DCC1545M ("Thorlabs Inc.", США). Быстрые временные изменения размера области возмущения, создаваемые фемтосекундным лазером, измеряли по интенсивности рассеяния света лазерного диода (445 нм, 100 мкВт), сфокусированного в область перетяжки фемтосекундного лазера с помощью фотоумножителя и цифрового осциллографа WaveSurfer MSO 64MXs-B ("Teledyne LeCroy", США). Подробно схема установки описана ранее [11].

После облучения ооциты культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) [10]. Оценку влияния облучения на развитие ооцитов проводили на следующий день. Отделение полярных телец, свидетельствующих о завершении созревания ооцита, наблюдали методами дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии, методами светлого поля и флуоресцентной микроскопии после окраски красителем на хроматин Hoechst 33342 ("Carl Zeiss Axiom Vision", Германия, объектив ×20, числовая апертура NA = 0.4). Всего проанализировали 209 ооцитов (табл. 1).

Изображение ЯПТ до и после воздействия лазерного излучения представлено на рис. 2. На разностном изображении (разница двух изображений в численном виде после и до лазерного воздействия) разрез ткани ЯПТ проявляется как светлое пятнышко, локализованное в фокусе объектива. Черное поле в разностном изображении означает, что разность изображений до и по-

сле воздействия близка к нулю, т.е. изменения в морфологии нуклеоплазмы при используемых режимах облучения практически отсутствуют.

Анализ изображений всего ооцита показывает сохранность мембран и блестящей оболочки. Локализация лазерного воздействия обусловлена тем, что длина волны 780 нм попадает в область прозрачности биологической ткани и линейное поглощение света пренебрежимо мало. При энергиях фемтосекундного импульса от 0.5 до 2 нДж интенсивность лазерного света варьируется от  $3.4 \cdot 10^{11}$  до  $13.6 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup> соответственно. При такой интенсивности прозрачный при длине волны 780 нм ооцит поглощает  $n$  квантов света с вероятностью  $P_n = \sigma_n I^n$ , где  $n \geq 2$ ,  $\sigma_n$  – сечение поглощения для  $n$ -фотонного процесса. Поглощение энергии лазерного импульса, наибольшее в области максимальной интенсивности, т.е. вблизи фокуса объектива, а также  $n$ -фотонное поглощение излучения лазера ЯПТ приводят к многофотонной фотодиссоциации и/или фотоионизации и разрушению материала ЯПТ. Фотоионизация означает образование плазмы низкой плотности [12]. Образование плазмы подтверждается наблюдением из зоны перетяжки лазерного импульса в ЯПТ широкополосного бесструктурного спектра люминесценции с максимумом около 500–600 нм. Разрез материала ЯПТ происходил при интенсивности света от  $3.4 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup> и выше. Порог пробоя воды фемтосекундным импульсом лежит в диапазоне от  $6.6$  до  $9.0 \cdot 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup> [13]. Разрушение материала ЯПТ при относительно низкой интенсивности лазерного излучения, по-видимому,

**Таблица 1.** Зависимость развития ооцита от параметров фемтосекундного лазерного воздействия на ЯПТ

№	Энергия импульса; длительность пакета импульсов	Экспозиция – энергия падающего на ЯПТ лазерного излучения	Количество ооцитов в группе	ЯПТ сохранилось	ЯПТ растворилось, полярное тельце не наблюдается	Отделение полярного тельца	Деградация ооцита
1	0.5 нДж, 15 мс	0.6 мДж	20	5/20 (25%) $P = 0.023$	8/20 (40%) $P = 0.31$	7/20 (35%) $P = 0.009$	0
2	0.5 нДж, 30 мс	1.2 мДж	22	5/22 (23%) $P = 0.049$	13/22 (59%) $P = 0.013$	4/22 (18%) $P = 0.0001$	0
3	0.5 нДж; 60 мс	2.4 мДж	22	5/22 (23%) $P = 0.049$	14/22 (64%) $P = 0.006$	3/22 (13%) $P = 2.9 \cdot 10^{-5}$	0
4	1 нДж, 15 мс	1.2 мДж	22	6/22 (27%) $P = 0.021$	10/22 (45%) $P = 0.11$	5/22 (23%) $P = 0.0005$	1/22 (5%) $P = 1$
5	1 нДж, 30 мс	2.4 мДж	22	6/22 (27%) $P = 0.021$	11/22 (50%) $P = 0.057$	5/22 (23%) $P = 0.0005$	0
6	1 нДж, 60 мс	4.8 мДж	20	5/20 (25%) $P = 0.023$	7/20 (35%) $P = 0.48$	6/20 (30%) $P = 0.003$	2/20 (10%) $P = 0.48$
7	2 нДж, 15 мс	2.4 мДж	20	6/20 (30%) $P = 0.028$	9/20 (45%) $P = 0.17$	5/20 (25%) $P = 0.001$	0
8	2 нДж, 30 мс	4.8 мДж	22	10/22 (45%) $P = 0.0005$	3/22 (14%) $P = 0.69$	5/22 (23%) $P = 0.0005$	4/22 (18%) $P = 0.11$
9	2 нДж, 60 мс	9.6 мДж	19	7/19 (37%) $P = 0.003$	9/19 (47%) $P = 0.009$	2/19 (11%) $P = 1.7 \cdot 10^{-5}$	1/19 (5%) $P = 0.48$
	Контроль		20	0/20 (0%)	4/20 (20%)	16/20 (80%)	0/20 (0%)

связано с низлежащими уровнями энергии молекул белка и РНК (край полос поглощения близок к 300 нм). Поглощение света этими молекулами белка и РНК возможно за счет фотонного процесса уже при  $n = 3$ , тогда как пробой воды происходит при  $n = 5$ .

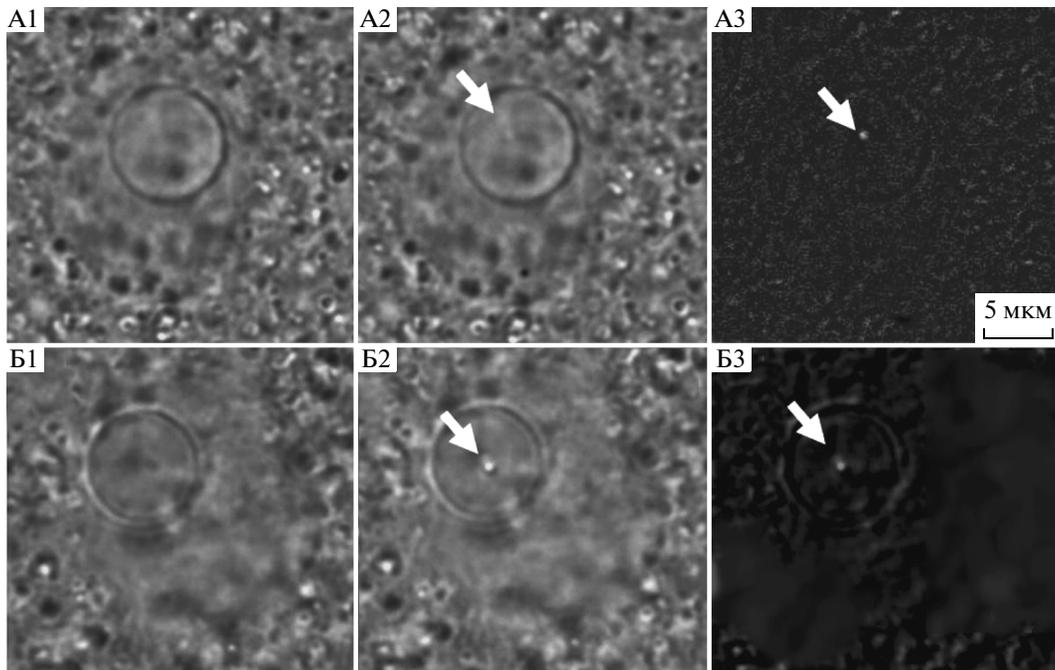
Диаметр локального разреза ЯПТ зависит от энергии импульса и от длительности пакета импульсов (рис. 3). Интенсивность пропорциональна энергии отдельного импульса, а доза энергии, падающей на ЯПТ, пропорциональна произведению энергии отдельного импульса на длительность пакета. Диаметр зоны повреждения на рис. 3 не превышает 1 мкм, поэтому диаметр перетяжки  $2w_0$  и параметр  $Z_R$  можно использовать для оценки верхней величины объема разреза ЯПТ, который равен  $2.7 \cdot 10^{-11} \text{ см}^3$ . При диаметре ЯПТ, равном 10 мкм, объем ЯПТ равен  $5.24 \cdot 10^{-10} \text{ см}^3$ . Доля поврежденного материала ЯПТ не превышает 5.2% по объему.

После воздействия лазерного импульса размер разреза ЯПТ меняется во времени. В видеоизображениях регистрируется уменьшение размера области повреждения ЯПТ после лазерного облучения по сравнению с остаточным равновесным размером. Характеристическое время процесса близко к 2 с. О динамике изменения размера лазерного разреза материала ЯПТ с наносекундным временным разрешением можно судить по вре-

менной зависимости интенсивности пробного света с длиной волны 445 нм, рассеивающегося в области фокусировки фемтосекундного лазера после одиночного импульса (рис. 4). Оптическая неоднородность, порождаемая лазерным импульсом в материале ЯПТ, модулирует интенсивность рассеянного света 445 нм. Как видно из рис. 4, уровень рассеяния пробного света характеризуется ростом в течение менее 100 нс и спадом сигнала рассеяния после 500 нс, сигнал падает до нуля ко времени задержки 2 мкс. На кинетической кривой сигнала пробного импульса наблюдаются затухающие к 1.5 мкс осцилляции. Анализ Фурье осцилляционной компоненты на рис. 4 выявляет набор частот в диапазоне от 15 до 100 МГц. Этот диапазон по порядку величины близок частоте акустических осцилляций шарика воды диаметром  $d = 10 \text{ мкм}$ , которая по значению равна  $v/d = 150 \text{ МГц}$ , где  $v$  – скорость звука в воде  $\sim 1.5 \cdot 10^5 \text{ см/с}$ .

Таким образом, под действием фемтосекундного лазерного импульса в ЯПТ при образовании разреза возникают волны механических напряжений, которые проявляются в виде затухающих акустических осцилляций.

Данные о развитии ооцита после лазерного воздействия представлены в табл. 1 в виде функции интенсивности импульса и длительности пакета импульсов. По окончании культивирования

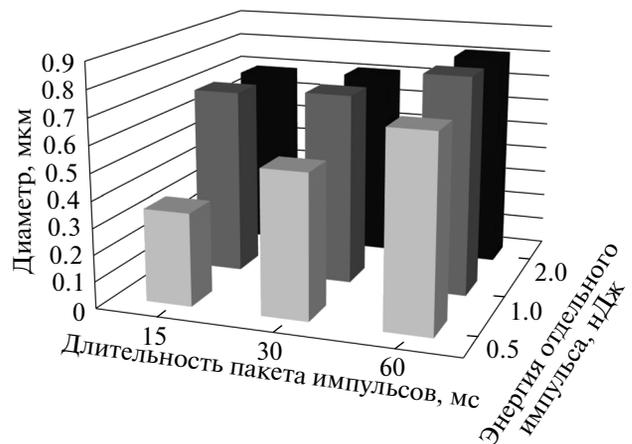


**Рис. 2.** Изображения ЯПТ до (A1 и B1) и после воздействия излучением фемтосекундного лазера (A2 и B2) при энергии импульса, равной 0.5 нДж (А) и 2 нДж (Б). Длительность пакета импульсов – 60 мс. Изображения A2 и B2 получены через 15 с после облучения. Разностное изображение A3 и B3 получено путем численного вычитания из изображения ЯПТ после воздействия (A2, B2) изображения до воздействия (A1, B1) соответственно.

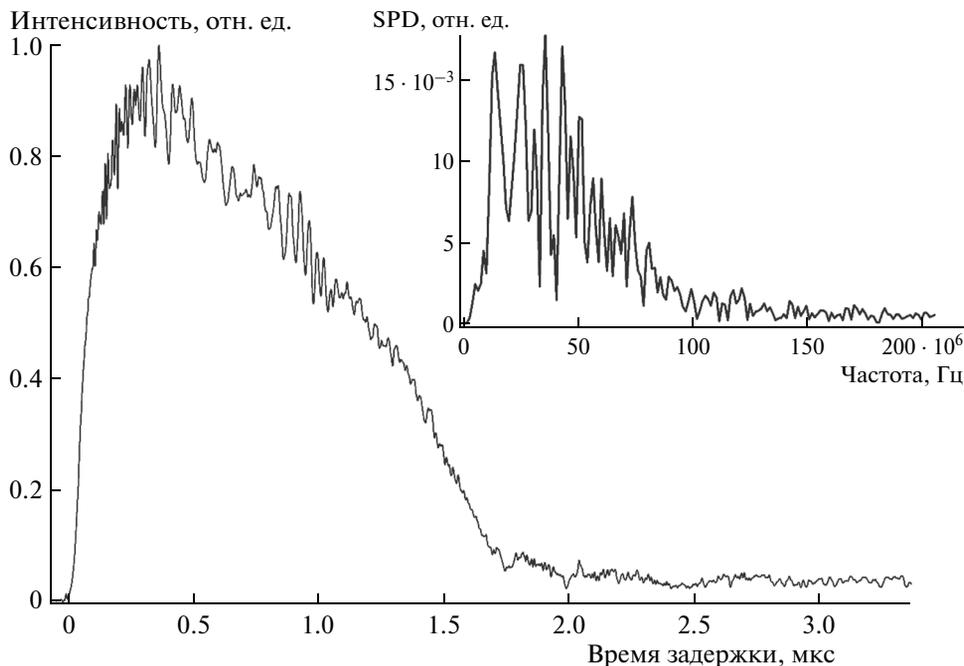
наблюдаются четыре возможных исхода: ЯПТ сохранились; ЯПТ растворилось, но полярное тельце не отделилось; отделяется полярное тельце и достигается стадия МП; ооцит деградирует. Данные табл. 1 показывают, что существенно падает вероятность развития ооцита до стадии МП и растет вероятность остановки развития (ЯПТ не растворяется), если ЯПТ подвергалось лазерному облучению. Достоверность различия опытных групп по сравнению с контрольной группой в реализации разных исходов оценивали точным методом Фишера. Этот способ проверки достоверности различия между группами наилучшим образом подходит для небольших выборок. Величина  $P$  характеризует достоверный интервал отклонения от нулевой гипотезы, для оценки биологических эффектов достоверное различие принимается при уровне значимости  $p \leq 0.05$ . Вероятность развития облученных ооцитов до стадии МП достоверно понижается по сравнению с контрольными клетками от 3 до 7 раз при уровне лазерного повреждения не более 5.2% от объема ЯПТ. Этот факт указывает на существенную роль в оогенезе мыши ЯПТ ооцитов, достигших полного размера, при низкой или отсутствующей в них транскрипционной активности.

Подводя итог проведенным исследованиям, можно сделать следующие выводы. Локальный разрез материала ЯПТ происходит за счет нелинейного оптического поглощения лазерного из-

лучения, сопровождаемого многофотонной диссоциацией и ионизацией молекул ЯПТ в области фокусировки фемтосекундного излучения с длиной волны 780 нм. Фемтосекундный лазерный импульс при разрезании материала ЯПТ инициирует акустические затухающие колебания в ЯПТ. Разрез в ЯПТ понижает вероятность развития GV ооцитов до стадии МП, что указывает на существенную роль организацию материала ЯПТ в оо-



**Рис. 3.** Зависимость диаметра разреза в ЯПТ от энергии импульса и длительности пуля.



**Fig. 4.** Зависимость от времени сигнала рассеяния пробного луча света, проходящего через ЯПТ в зоне действия фемтосекундного лазерного импульса. На вставке показана плотность спектра мощности (SPD) фурье-преобразования осциллирующей компоненты.

генезе млекопитающих, несмотря на низкую транскрипционную активность ЯПТ в ооцитах перед овуляцией.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00856).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боголюбов Д.С. // Цитология. 2000. Т. 42. С. 136–145.
2. Почукалина Г.Н., Парфенов В.Н. // Цитология. 2008. Т. 50. С. 671–680.
3. Antoine N., Lepoint A., Baeckeland E., et al. // *Histochemistry*. 1988. V. 89. P. 221–226.
4. Kopecky V., Biggiogera M., Laurincik J., et al. // *Chromosoma*. 1996. V. 104. P. 561–574.
5. Parfenov V.N., Pochukalina G., Dudina L., et al. // *Gamete Res.* 1989. V. 22. P. 219–231.
6. Ogushi S., Palmieri C., Fulka H., Saitou M., Miyano T., Fulka J., Jr // *Science*. 2008. V. 319. № 1. P. 613–616.
7. Romanova L.G., Anger M., Zatssepina O.V., et al. // *Biol. Reprod.* 2006. V. 75. P. 690–696.
8. Shishova K.V., Lavrentyeva E.A., Dobrucki J.W., Zatssepina O.V. // *Develop. Biol.* 2015. V. 397 P. 267–281.
9. Шишова К.В., Ходарович Ю.М., Лаврентьева Е.А., Зацепина О.В. // *Онтогенез*. 2014. Т. 46. С. 162–173.
10. Shishova K.V., Khodarovich Y.M., Lavrentyeva E.A., Zatssepina O.V. // *Exp. Cell. Res.* 2015. V. 337. P. 208–218.
11. Осыченко А.А., Залесский А.Д., Кривохарченко А.С., Шахбазян А.К., Рябова А.В., Надточенко В.А. // *Квантовая электроника*. 2015. Т. 45. № 5. С. 498–502.
12. Vogel A., Noack J., Hüttman G., Paltauf G. // *Appl. Phys.* 2005. V. B 81. 1015.
13. Sarpe C., Köhler J., Winkler T., Wollenhaupt T. // *New J. Phys.* 2012. V. 14. 075021.
14. Chouinard L.A. // *J. Cell Sci.* 1971. V. 9. P. 637–663.