

Исследование фототоксичности фемтосекундного лазера: влияние дозы лазерного воздействия на жизнеспособность и развитие эмбрионов мыши.

А.А. Осыченко¹, А.Д. Залесский^{1,2}, А.В. Рябова³, Е.В. Малахова¹, В.А. Надточенко^{1,2}.

¹Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

Нанохирургия с использованием фемтосекундных лазеров – высокоточный метод, который находит применение в работах с объектами самого разного калибра: от тонких внутриклеточных структур, таких как митохондрии или хромосомы, до живых тканей [1]. Практическое применение фемтосекундного излучения в качестве скальпеля продемонстрировано в ряде работ [2-6], в которых показано, что жизнеспособность после различных воздействий фемтосекундным лазером остается относительно высока. Лазерное излучение в ближнем ИК диапазоне попадает в окно прозрачности биологической ткани, а поглощение возникает вследствие высокой интенсивности и нелинейно-оптических эффектов [7]. В результате нелинейного поглощения происходит образование плазмы и оптический пробой, эти явления напрямую или опосредованно могут вызывать явление фототоксичности - уменьшения жизнеспособности в ответ на воздействие света.

В настоящей работе производилась оценка фототоксического действия фемтосекундного лазерного излучения на двухклеточные эмбрионы мыши. В работе использовали инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71, объектив 60', NA = 0.7 и фемтосекундный титан-сапфировый лазер Mai Tai (Spectra Physics) с длиной волны генерации 800 нм и диаметром перетяжки пучка в фокус объектива микроскопа 1.36 мкм. Энергию импульса и длительность пакета импульсов варьировали (рис. 1, А). После воздействия лазером на двухбластомерный эмбрион наблюдались четыре возможных исхода: а) бластомеры сливались, б) слияния не происходило, в) один из бластомеров разрушался, г) оба бластомера разрушались (рис. 1, Б). Группой интереса являлись эмбрионы, у которых слияния не произошло (морфологически выглядели так же, как до воздействия). Развитие оперированных эмбрионов до стадии бластоцисты и количество клеток в бластоцисте использовались в качестве критериев жизнеспособности.

Было выявлено, что вероятность полного разрушения эмбриона возрастает вместе с ростом энергии импульса и длительности пакета импульсов, а способность эмбриона развиваться до стадии бластоцисты снижается. Количество клеток в бластоцистах так же

оказалось зависимо от дозы воздействия и снижается с ростом дозы. Оказалось, что лазерное воздействие с высокой энергией и длительностью пакета импульсов оказывается токсичным для эмбрионального развития, даже если эмбрион не был разрушен немедленно. Однако режимы работы на низких энергиях оказались относительно безопасными. По-видимому, фототоксические эффекты, вызванные действием лазера, имеют нелинейную природу.

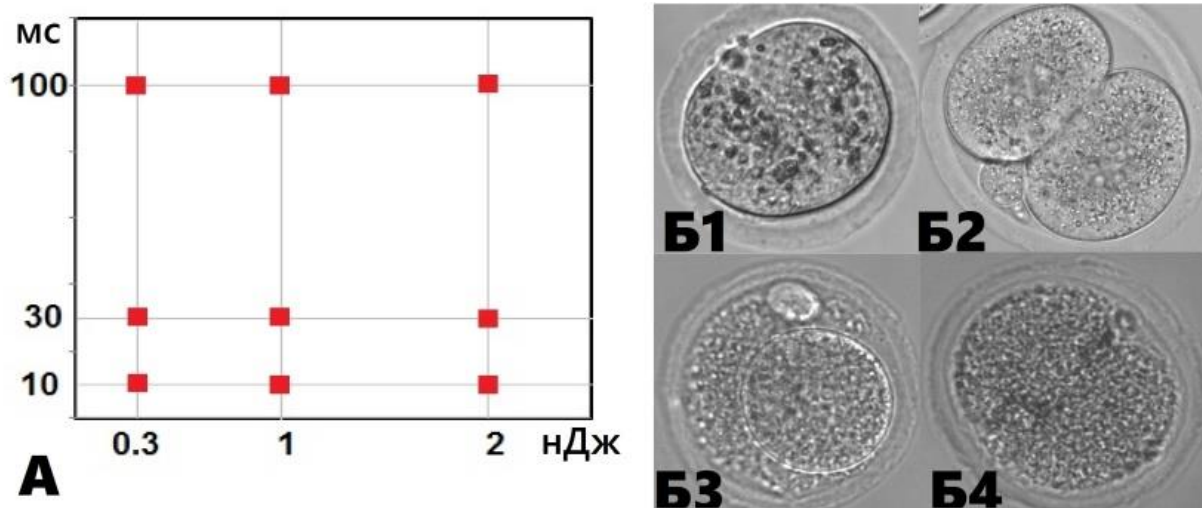


Рисунок 1. А – таблица параметров, используемых в эксперименте; Б1 – эмбрион после слияния, Б2 – эмбрион без слияния и разрушения, Б3 – эмбрион, у которого разрушен один из двух бластомеров, Б4 – полностью разрушенный эмбрион.

Работа была поддержана грантом Министерства Образования и Науки РФ No. 14.604.21.0058 (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0058)

Литература.

1. Kohli V., Elezzabi A.Y. Prospects and developments in cell and embryo laser nanosurgery. - Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomed. and Nanobiotech. - 2009. - 1(1) - p. 11-25.
2. Шахбазян А. К., Свиридова-Чайляхан Т.А., Карменян А. В., Кривохарченко А. С., Чои А., Чайляхан Л. М. - Использование лазера для получения реципиентных цитопластов при пересадке ядер у млекопитающих. Докл. Акад. Наук. - 2009. - Т. 428. - № 3. - С. 1-4.
3. Шахбазян А. К., Карменян А. В., Свиридова-Чайляхан Т.А., Кривохарченко А. С., Чои А. - Возможности оптико-лазерных технологий в клеточной инженерии. - Докл. Акад. Наук. - 2009. - Т. 429. - № 4. - С. 1-4.
4. Krivokharchenko A., Karmenyan O., Sarkisov O., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. - Laser Fusion of Mouse Embryonic Cells and Intra-Embryonic Fusion of Blastomeres without Affecting the Embryo Integrity. - PLOS One. - 2012. - Т. 7. - № 12. e50029.

5. *Kuete Meyer K., Lucas-Hahn A., Petersen B., Niemann H., Heisterkamp A.* Femtosecond laser-induced fusion of nonadherent cells and two-cell porcine embryos – *J. Biomed. Optics.* 2011. - V. 16. - № 8. 088001.
6. *Осыченко А.А., Залесский А.Д., Кривохарченко А.С., Шахбазян А.К, Рябова А.В., Надточенко В.А.* - Слияние бластомеров эмбрионов мыши под действием фемтосекундного лазерного излучения. Эффективность образования бластоцист и развития эмбрионов. - *Квантовая электроника.* - 2015. - Т. 45. - № 5
7. *König K., Riemann I., Fischer P., Halbhuber K.H.* - Intracellular nanosurgery with near infrared femtosecond laser pulses. – *Cell. and Mol. Biol.* - 1999. V. 45. - № 2. - P. 195-201.