

Острогофокусированное лазерное излучение как инструмент для изучения процесса развития ооцитов млекопитающих

А.Д. Залесский^{1,2}, А.А. Осыченко¹, Г.А. Серобян¹, В.А. Надточенко¹

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

²Московский физико-технический институт (государственный университет)

В последнее время в современной фотобиологии и биофотонике широко распространены лазерные операции на клеточном и субклеточном уровне[1-3]. Острая фокусировка лазерного излучения при помощи объектива микроскопа позволяет достигать высоких значений плотности мощности и обеспечить эффективное воздействие на субклеточные структуры, органеллы или клетку в целом. Точная фокусировка лазера и строгий контроль положения лазерной перетяжки позволяют проводить прецизионные манипуляции на субмикронном уровне. Наиболее подходящим для такого сорта операций является ближний ИК диапазон электромагнитного излучения (700-1100 нм) поскольку в этих длинах волн находится так называемое окно прозрачности биологических объектов. Это позволяет минимизировать негативные эффекты лазерного воздействия. В случае использования сверхкоротких лазерных импульсов, наличие окна прозрачности позволяет проводить строго локализованное воздействие на объект изучения за счёт нелинейных оптических эффектов, в силу того, что линейное поглощение практически отсутствует.

Такой подход лежит в основе двух распространённых лазерных методик – лазерного «пинцета», в случае фокусировки непрерывного излучения, и лазерного «скальпеля» при использовании фемтосекундных лазерных импульсов[4-5]. В настоящей работе эти методики использовались для изучения процесса развития ооцитов мыши. Воздействию подвергалась органелла ооцита, получившая название «ядрышко-подобные тельца» (nucleolus-like bodies, NLBs, ЯПТ). Наличие этой органеллы характерно для предовуляторных (или germinal vesicle, GV) ооцитов всех изученных видов млекопитающих. Изображение ооцита мыши приведено на рис. 1. Лазерный «пинцет» создавался фокусировкой непрерывного лазерного излучения Ti:Sapphire осциллятора (фирма Avesta Project) на длине волны 790нм, средняя мощность в предметной плоскости составляла 230 мВт. Лазерный «скальпель» был реализован при помощи фемтосекундного титан-сапфирового лазера Mai Tai (Spectra Physics) с длиной волны генерации 800 нм, длительностью импульса 100 фс и частотой повторения 80 МГц. Основой установки является инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71, в экспериментах использовался объектив 60х, NA = 0.7. Было продемонстрировано локальное разрезание материала ЯПТ при помощи фемтосекундного лазерного «скальпеля» без

повреждения цитоплазматической мембраны и мембраны ядра. После воздействия ооциты культивировали в CO₂ инкубаторе и на следующий день осуществлялся контроль развития. Достижение ооцитом стадии развития МП использовалось как параметр жизнеспособности. Показано, что с ростом времени облучения и энергией фемтосекундного импульса вероятность развития ооцита до стадии МП падает и растёт вероятность остановки развития (ЯПТ не растворяется). При помощи методики лазерного «пинцета» было продемонстрировано, что ЯПТ ооцита упруго связано со своим положением в ядре.

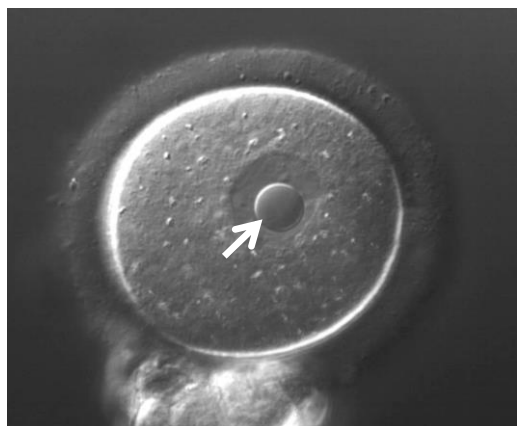


Рис. 1. GV ооцит мыши, ЯПТ указано стрелкой.

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

Литература

1. *Shaevitz J. [et al.]* Backtracking by single RNA polymerase molecules observed at near-base-pair resolution// *Nature* – 2003. – V. 426, N 1. – P. 684 – 687.
2. *Turetsky T. [et al.]* Laserassisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis.// *Hum Reprod.* – 2008. – V. 23, N 1. – P. 46 – 53.
3. *Sacconi L. [et al.]* Optical Micromanipulations inside Yeast Cells//*Applied Optics.* – 2005. – V. 44, N 11. – P. 2001.
4. *Shimada T., Watanabe W.* Intracellular disruption of mitochondria in a living HeLa cell with a 76-MHz femtosecond laser oscillator// *Optics Express.* – 2005. – V. 13, N 24. – P. 9869.
5. *Osychenko A.A. [et al.]* Fusion of blastomeres in mouse embryos under the action of femtosecond laser radiation. Efficiency of blastocyst formation and embryo development//*Quantum Electronics* – 2015. – V. 45, N 5. – P. 498 – 502.