

PACS 42.62.Be; 42.65.Re; 87.16.-b; 87.17.-d

Слияние бластомеров эмбрионов мыши под действием фемтосекундного лазерного излучения. Эффективность образования бластоцист и развития эмбрионов

А.А.Осыченко, А.Д.Залесский, А.С.Кривохарченко, А.К.Шахбазян, А.В.Рябова, В.А.Надточенко

Методом фемтосекундной лазерной хирургии изучено слияние двухклеточных эмбрионов мыши под действием острофокусированного излучения фемтосекундного лазера с вероятностью слияния, достигающей 60%. Дан подробный статистический анализ вероятности слияния бластомеров и развития эмбриона до стадии бластоцисты после воздействия фемтосекундным импульсом на эмбрионы, полученные от разных мышей. Показано, что эффективность образования бластоцист существенно зависит от биологических характеристик эмбриона – линии и возраста мышши-донора. Продемонстрирована возможность получения гексаплоидных эмбриональных клеток методами фемтосекундной лазерной хирургии.

Ключевые слова: лазерная микрохирургия, доимплантационное развитие.

1. Введение

Нанохирургия – операции на клетках и эмбрионах с использованием пико- и фемтосекундных лазеров – является актуальным направлением современной биофотоники. Большая плотность мощности света в ближнем ИК диапазоне в области прозрачности биоткани при низкой энергии фемтосекундного импульса способна обеспечить эффективное нелинейно-оптическое взаимодействие света с веществом клетки. Высокая локализация воздействия фемтосекундного импульса в фемтолитровом объеме в области перетяжки лазерного пучка позволяет проводить операции внутри клетки/эмбриона на отдельных органеллах, не затрагивая окружающую среду клетки и не повреждая внешнюю мембрану, а низкая энергия импульса не приводит к значительному тепловому стрессу. Точная фокусировка лазерного пятна обеспечивает строго контролируруемую перфорацию мембран, что важно для проведения операций по оптотрансфекции или слиянию клеток. Фемтосекундные лазерные технологии позволяют с высокой эффективностью осуществлять операции по выборочному слиянию нескольких бластомеров эмбриона, что трудно достигается традиционными методами химического слияния или электрослияния. Слияние клеток позволяет решать важные задачи биотехнологии, в частности получать полиплоидные клетки и разрабатывать новые методики клонирования [1–10].

А.А.Осыченко, А.Д.Залесский, А.С.Кривохарченко, А.К.Шахбазян. Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4; e-mail: alina.chemphys@gmail.com
А.В.Рябова. Институт общей физики им. А.М.Прохорова РАН, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38; e-mail: Nastya_R_V@rambler.ru
В.А.Надточенко. Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Косыгина, 4; Институт проблем химической физики РАН, Россия, Московская обл., 142432 Черноголовка, просп. Акад. Семенова, 1; Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы; e-mail: nadtochenko@gmail.com

Поступила в редакцию 29 января 2015 г., после доработки – 6 февраля 2015 г.

К настоящему времени опубликованы работы, посвященные лазерному слиянию соматических клеток, предложены протоколы для работы с разными линиями клеток [8, 11–14]. Сообщается об успешных слияниях двух, трех и даже четырех (по две пары) бластомеров внутри четырехклеточного эмбриона [7]. Для двухбластомерных эмбрионов мыши успешное слияние достигало 61.5%, развитие до стадии бластоцисты происходило в 78.1% слитых эмбрионов. Аналогичная операция на партеногенетических двухклеточных эмбрионах свиньи была успешной в 54% случаев, а до бластоцисты развились около 95% прооперированных эмбрионов [8]. В России проводятся также исследования в области фемтосекундной лазерной микро- и нанохирургии. О высокой эффективности фемтосекундного лазерного слияния двухклеточных бластомеров эмбрионов мыши сообщалось, в частности, в работах [15–18]. Эти достижения свидетельствуют о перспективности метода лазерного слияния клеток и эмбрионов. Однако, как показывает наш практический опыт, вероятность слияния отдельных выборок эмбрионов от партии к партии биологического материала может варьироваться. Остается неясным, какие факторы, помимо точно контролируемых параметров лазерной установки, влияют на вероятность слияния эмбриональных клеток (бластомеров) и на развитие оперированных зародышей.

Настоящая работа посвящена изучению влияния на успех слияния клеток внутри эмбриона таких факторов, как линия и возраст мышши, время от момента проведения гормональной стимуляции самки мыши до начала операции лазерного слияния. Помимо анализа вероятности слияния бластомеров, мы анализируем такой биологический индикатор состояния эмбриона, как вероятность его развития до стадии бластоцисты и вероятность реализации следующей стадии развития – вылупления бластоцисты из блестящей оболочки.

Слияние двух клеток при воздействии лазерного импульса имеет случайный характер. Возможны четыре исхода: образование одной слитой клетки; отсутствие слияния; гибель одной из клеток и сохранение целостности второй; разрушение обеих клеток. Целью нашей работы

является исследование вероятности слияния двух больших клеток-бластомеров в эмбрионе и оценка вероятности дальнейшего развития эмбриона в случае реализации первых трех исходов.

2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы и методы

В экспериментах использовались самки мышей разного возраста чистой (C57BL/6) и гибридной (CBA/C57BL/6) линий. Спаривание осуществлялось с самцами линии CBA. С целью получения достаточного количества эмбрионов самок гормонально стимулировали гонадотропином сыворотки жеребых кобыл (A036A02, Intervet) и хорионическим гонадотропином человека (ХГЧ) (A038A01, Intervet). Сухие гормоны разбавляли физиологическим 0.9%-ным раствором хлорида натрия до концентрации 10 единиц на 100 мкл. Гормоны вводили внутривбрюшинно с интервалом в 48 ч в количестве 10 единиц. Эмбрионы выделяли на второй день развития путем промывания яйцеводов средой PBS (P3813, Sigma). Для манипуляций с эмбрионами на воздухе использовали среду M2 (M7167, Sigma). Эмбрионы культивировали в CO₂-инкубаторе с 5%-ной концентрацией углекислого газа при температуре 37°C в среде M16 (M7292, Sigma) в четырехлуночных чашках (179830, Nunc). Развитие эмбрионов наблюдали от стадии выделения (второй день развития, стадия двух бластомеров) до стадии бластоцисты (пятый день развития), также фиксировали выход эмбриона из блестящей оболочки (шестой день развития).

2.2. Схема установки

В работе использовали инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71, объектив 60^x, NA = 0.7.

Оптоперфорацию мембраны эмбриона проводили с помощью фемтосекундного титан-сапфирового лазера Mai Tai (Spectra Physics) с длиной волны генерации 780 нм. Диаметр перетяжки пучка оценивался по формуле $2w_0 = 1.22\lambda/NA = 1.36$ мкм. В предметной плоскости микроскопа длительность импульса составляла 100 фс, энергия импульса – 1 нДж, частота следования импульсов – 80 МГц. По оценке плотность мощности в перетяжке пучка равнялась 6.9×10^{11} Вт/см². Длительность пакета импульсов, задаваемая управляемым прерывателем, составляла 30 мс. Как длительность пакета импульсов, так и энергия импульса лазера были подобраны экспериментально так, чтобы они были близки к порогу образования парогазового кавитационного пузырька. Визуальный контроль осуществлялся камерой Sony ExwaveHAD. Подробно схема установки описана в [19].

Для проведения лазерных микроманипуляций эмбрионы переносили на покровные стекла размером 24×24 мм в каплю эмбриональной среды M2 объемом 50 мкл. Для слияния двух бластомеров импульс направлялся в зону максимально плотного контакта между ними. Успешным считалось воздействие, которое приводило к образованию парогазового кавитационного пузырька (рис.1,*а*). При одинаковых параметрах лазерного импульса размер пузырька у разных эмбрионов варьировался случайным образом от 1 до 4 мкм. Полное слияние двух клеток-бластомеров происходило в течение 1 ч. На пятый день развития подсчитывалось количество экспандированных бластоцист (рис.1,*б*), и на шестой день происходил выход эмбрионов из блестящей оболочки (рис.1,*в*).

3. Результаты и их обсуждение

Двухклеточные эмбрионы после воздействия лазерного импульса показаны на рис.2. На рис.2,*а* представлена одна большая клетка, образовавшаяся из двух слитых

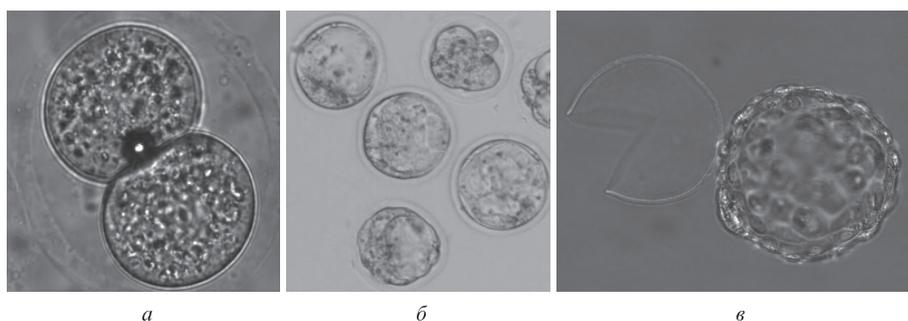


Рис.1. Двухклеточный эмбрион мыши в блестящей оболочке в момент образования парогазового кавитационного пузырька при воздействии пакета фемтосекундных лазерных импульсов (*а*), экспандированные бластоцисты внутри блестящей оболочки (*б*) и бластоцисты, выпупившиеся из блестящей оболочки (*в*).

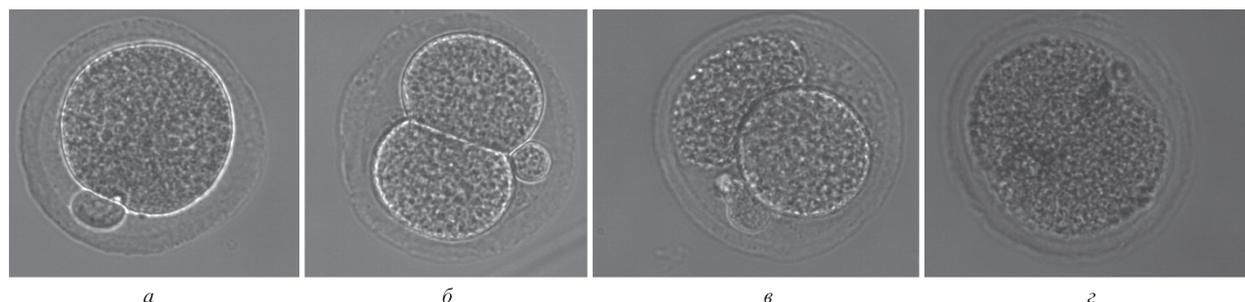


Рис.2. Эмбрионы после воздействия лазерного излучения: слитый эмбрион (*а*), не слитый эмбрион (*б*), эмбрион с одним разрушенным бластомером (*в*) и полностью разрушенный эмбрион (*г*).

Табл.1. Эффективность слияния под действием излучения фемтосекундного лазера и развитие слитых эмбрионов у чистой и гибридной линий мышей.

Номер опыта	Линия	Время после введения ХГЧ (ч)	Общее количество эмбрионов	Количество слитых эмбрионов	Количество не слитых эмбрионов	Количество эмбрионов с одним разрушенным blastомером	Количество полностью разрушенных эмбрионов	Слитые эмбрионы, достигшие стадии blastоцисты (%)	Бластоцисты из прооперированных эмбрионов (%)
1	C57BL/6	43.5	30	3 (10%)	18 (60%)	7 (23.3%)	2 (6.7%)	100 (3/3)	10 (3/30)
2		44.5	20	3 (15%)	10 (50%)	6 (30%)	1 (5%)	100 (3/3)	15 (3/20)
3		44–45	32	8 (25%)	13 (41%)	8 (25%)	3 (9.3%)	87 (7/8)	22 (7/32)
4		44–45	30	8 (27%)	14 (47%)	2 (6.7%)	6 (20%)	37 (3/8)	10 (3/30)
5		45	35	5 (14%)	15 (43%)	0 (0%)	15 (42.8%)	40 (2/5)	6 (2/35)
6		45–46.5	50	10 (20%)	17 (34%)	14 (28%)	9 (18%)	70 (7/10)	14 (7/50)
7		47	12	1 (8%)	6 (50%)	2 (16.7%)	3 (25%)	100 (1/1)	8 (1/12)
8		47	24	6 (25%)	11 (46%)	2 (8.3%)	5 (20.8%)	66 (4/6)	16 (4/24)
Суммарные данные:			233	44 (19%)	104 (45%)	41 (17%)	44 (19%)	75 (30/44)	13 (30/233)
9	CBA/C57Bl/6	44–45	40	13 (33%)	17 (43%)	5 (12.5%)	5 (12.5%)	46 (6/13)	15 (6/40)
10		45	20	4 (20%)	10 (50%)	1 (5%)	5 (25%)	75 (3/4)	15 (3/20)
11		45	20	12 (60%)	4 (20%)	0 (0%)	4 (20%)	41 (5/12)	25 (5/20)
12		45	50	20 (40%)	17 (34%)	3 (6%)	10 (20%)	45 (9/20)	18 (9/50)
13		47	20	10 (50%)	3 (15%)	0 (0%)	7 (35%)	0 (0/20)	0 (0/20)
14		47	20	5 (25%)	8 (40%)	0 (0%)	7 (35%)	0 (0/20)	0 (0/20)
Суммарные данные:			170	64 (38%)	59 (35%)	9 (5%)	38 (22%)	35 (23/64)	12 (23/170)

бластомеров. На рис.2,б показан случай, когда два blastомера не слились после образования кавитационного пузырька, индуцированного лазерным импульсом. Далее показаны случаи разрушения после лазерного импульса одного из blastомеров (рис.2,в) и вызванное лазером разрушение обеих клеток (рис.2,з). Во всех случаях диаметр кавитационного пузырька составлял 1–4 мкм, причем разброс его значений носил случайный характер. Исход операции лазерного слияния можно наблюдать приблизительно через 30–60 мин; этого времени достаточно, чтобы оба blastомера слились в одну клетку.

В табл.1 суммируются результаты всех опытов по слиянию эмбрионов, проведенных на двух указанных линиях мышей, а также содержатся данные по развитию слитых эмбрионов. Использовались эмбрионы на стадии развития от 43.5 до 47 ч (время отсчитывалось от укола мыши гормоном ХГЧ при гормональной подготовке животных). В этот период эмбрион находится на клеточной стадии G2. Опыты проводили в разные дни, но при одинаковых условиях работы лазера. Как видно из табл.1, наилучший результат по вероятности слияния (60%) практически совпал с полученным ранее (61.5%) в [7]. Однако совокупность всех данных табл.1 показывает существенный разброс вероятности успешного слияния в разных опытах. Во-первых, можно заключить, что вероятность слияния двухклеточного эмбриона не зависит от времени его развития в пределах 43.5–47 ч. Во-вторых, сравнение вероятностей всех возможных событий (слияния/неслияния/одноклеточного эмбриона/разрушенного эмбриона) у мышей линий C57BL/6 и CBA/C57Bl/6 показывает, что в среднем вероятность слияния в последнем случае выше ($38\% \pm 12\%$), чем у мышей чистой линии ($19\% \pm 7\%$). Вероятности события неслияния для гибридной и чистой линий составляют $46\% \pm 7\%$ и $33\% \pm 13\%$ соответственно. В пределах статистического разброса вероятность неслияния для обеих линий одинакова. Отношение вероятностей разрушения одного blastомера для гибридной и чистой линий равно $6.8\% \pm 1.9\%$ к $19\% \pm 9\%$, а разрушения обоих blastомеров составляют $4\% \pm 3\%$ к $25\% \pm 9\%$. Эти

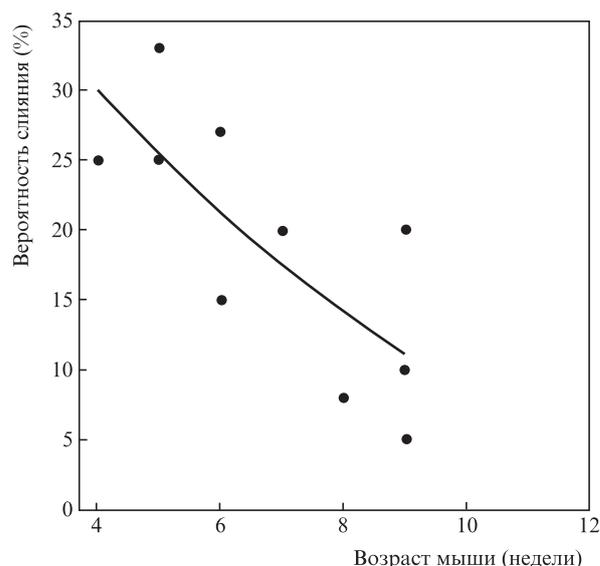


Рис.3. Зависимость вероятности слияния двухклеточного эмбриона от возраста мыши. Вероятность слияния для каждой точки определялась на основе выборки из 12–50 эмбрионов.

данные показывают, что гибридная линия обеспечивает более высокую вероятность слияния двух клеток, но зато и полное разрушение двух клеток у этой линии более вероятно.

Была выполнена серия опытов по слиянию blastомеров внутри эмбрионов, полученных от мышей в возрасте от 4 до 9 недель. На рис.3 показана зависимость вероятности слияния двух blastомеров от возраста мыши. Вероятность определялась по выборке от 12 до 50 эмбрионов, большинство точек относится к выборкам из 20 эмбрионов. Как видно из рисунка, прослеживается корреляция между возрастом донора и вероятностью слияния — эмбрионы от более молодых особей сливаются с большей вероятностью.

Слитые эмбрионы и эмбрионы, испытавшие лазерное воздействие, но не претерпевшие слияния blastомеров, а

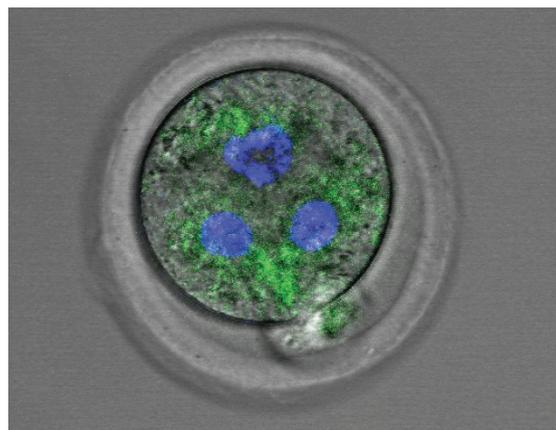
Табл.2. Развитие эмбрионов после воздействия фемтосекундным лазером до стадии бластоцисты.

Эмбрионы	Количество эмбрионов	Количество бластоцист (%)	Количество вылупившихся бластоцист (%)
Контрольная группа	156	84 (131/156)	13 (21/156)
Слитые эмбрионы	108	49 (53/108)	0.9 (1/108)
Не слитые эмбрионы	136	59 (80/136)	3 (4/136)
Эмбрионы с одним разрушенным blastomere	33	39 (13/33)	0 (0/33)

также эмбрионы с одним разрушенным blastomere способны к дальнейшему развитию *in vitro*. Их развитие в этих группах до стадии бластоцисты наблюдалось отдельно (табл.2). Как видно из приведенных в ней данных, воздействие фемтосекундного лазера существенно снижает процент образовавшихся бластоцист и еще более существенно снижает процент вылупившихся. Здесь следует особо отметить эмбрионы, в которых не произошло слияния. В этих эмбрионах после воздействия импульса заметные морфологические изменения отсутствовали, но развитие до стадии бластоцисты отличалось от развития эмбрионов контрольной группы.

Поскольку вероятность образования бластоцист является значимым параметром, характеризующим жизнеспособность эмбриона после лазерного воздействия, мы провели сравнительный статистический анализ развития зародышей до стадии бластоцисты в контрольной группе и в трех группах с различным исходом операции: слияния blastomeres не произошло; два blastomeres успешно слились; один из blastomeres разрушился. Для проверки достоверности различия между группами использовали точный критерий Фишера [20], который подходит для статистического анализа небольших выборок данных и широко применяется в биологии [20]. Результаты анализа показали, что в контрольной группе эмбрионы достоверно лучше развивались, чем эмбрионы после воздействия фемтосекундного лазерного излучения, при этом уровень значимости статистических оценок $p = 2 \times 10^{-6}$ для контрольной группы и группы без слияния (в биологии граничный уровень значимости $p < 0.05$ [20]). Развитие эмбрионов после разрушения одного из blastomeres и эмбрионов со слитыми blastomeres оказалось статистически неразличимым ($p = 0.42$). Также статистически неразличимо развитие эмбрионов со слитыми blastomeres и эмбрионов без их слияния ($p = 0.15$). Таким образом, во всех трех группах с разным исходом операции вероятность развития зародышей до стадии бластоцисты снизилась по сравнению с контрольной группой примерно одинаково. При этом результат операции (слияние, неслияние или разрушение одного из blastomeres) повлиял на вероятность развития эмбриона до бластоцисты статистически незначительно.

Сравнение вероятности слияния и дальнейшего развития эмбрионов, полученных от линий мышей C57BL/6 и CBA/C57BL/6, показало, что эмбрионы, полученные от чистой линии, сливаются с невысокой вероятностью (19%, 44/233), но хорошо развиваются до стадии бластоцисты (75%, 30/44), а эмбрионы гибридной линии, напротив, сливаются с более высокой вероятностью (38%, 46/170), но реже достигают стадии бластоцисты (35%, 23/64). Однако соотношение количества бластоцист, полученных из прооперированных эмбрионов обеих линий, оказалось

Рис.4. Эмбрион, полученный путем слияния трех blastomeres. Цветное изображение см. на 3-й странице обложки, а также на сайте «Квантовой электроники» <http://www.quantum-electron.ru>.

одинаковым: 13% (30/226) для C57BL/6 и 12% (23/170) для CBA/C57BL/6. Данные, описывающие развитие слитых эмбрионов в каждом эксперименте, приведены в табл.1. Дисперсионный анализ (ANOVA) [21] с последующим попарным сравнением групп выявил значимые различия между эффективностью слияния (0.0046, уровень значимости $p < 0.05$) и развитием слитых эмбрионов до стадии бластоцисты (0.018), однако не выявил достоверных различий в общей эффективности получения тетраплоидных бластоцист (доля бластоцист, полученных из слитых эмбрионов, от общего числа прооперированных зародышей) у чистой и гибридной линий (0.9).

Статистический анализ вероятности слияния и дальнейшего развития эмбрионов позволил заключить, что биологические характеристики эмбриона существенно влияют на эффективность получения бластоцист после операции с использованием фемтосекундного лазера.

Выше приведены данные по слиянию двухклеточных эмбрионов. Следует особо отметить, что по сравнению с методами химического и электрического слияния метод фемтосекундного лазерного слияния обладает уникальной возможностью: он позволяет проводить слияние нескольких выбранных клеток внутри многоклеточной структуры [7]. В настоящей работе продемонстрирована возможность слияния клеток на стадии трех blastomeres с использованием фемтосекундного лазера (рис.4). Наличие трех ядер в одной клетке показано с помощью окрашивания красителем Hoechst 33342 и последующей визуализации на конфокальном микроскопе.

Работа поддержана грантом Министерства образования РФ № 14.604.21.0058 (уникальный идентификатор RFMEFI60414X0058).

1. Botvinick E.L., Venugopalan V., Shah J.V., Liaw L.H., Berns M.W. *Biophys. J.*, **87** (6), 4203 (2004).
2. Cui L.B., Zhao Z.J., Zhou X.Y., Li Q., Huang X.Y., Sun F.Z. *Zygote*, **1**, 87 (2012).
3. Davis A.A., Farrar M.J., Nishimura N., Jin M.M., Schaffer C.B. *Biophys. J.*, **105** (4), 862 (2013).
4. Fujita M., Onami S. *Phys. Biology*, **8**, 6 (2011).
5. Karmenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A., Krivokharchenko A.S., Chiou A.E., Chailakhyan L.M. *Molec. Reprod. Dev.*, **76** (10), 975 (2009).
6. Kohli V., Acker J.P., Elezzabi A.Y. *Opt. Interact. Tiss. Cells XVII*, **6084**, 8414 (2006).
7. Krivokharchenko A., Karmenyan A., Sarkisov O., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. *PLoS One*, **7** (12), e50029 (2012).

8. Kuetemeyer K., Lucas-Hahn A., Petersen B., Niemann H., Heisterkamp A. *J. Biomed. Opt.*, **16**, 8 (2011).
9. Niioka H., Smith N.I., Fujita K., Inouye Y., Kawata S. *Opt. Express*, **16** (19), 14476 (2008).
10. Sung L.Y., Shen P.C., Jeong B.S., Xu J., Chang C.C., Cheng W.T., Wu J.S., Lee S.N., Broek D., Faber D., Tian X.C., Yang X., Du F. *Biol. Reprod.*, **76** (2), 232 (2007).
11. He H., Chan K.T., Kong S.K., Lee K.Y.L., et al. *Appl. Phys. Lett.*, **93**, 16 (2008).
12. Minai L., Yeheskely-Hayon D., Golan L., Bisker G., Dann E.J., Yelin D. *Small*, **8** (11), 1732 (2012).
13. Gong J., Zhao X., Xing Q., Li F., Li H., Li Y., Chai L., Wang Q., Zheltikov A. *Appl. Phys. Lett.*, **92**, 9 (2008).
14. He H., Kong S.K., Chan K.T. *J. Innov. Opt. Health Sci.*, **4** (2), 113 (2011).
15. Ильина И.В., Овчинников А.В., Ситников Д.С., Ракитянский М.М., Агранат М.Б., Храмова Ю.В., Семенова М.Л. *ТВТ*, **51** (2), 198 (2013).
16. Iliina I.V., Ovchinnikov A.V., Sitnikov D.S., Chefonov O.V., Agranat M.B., Khramova Yu.V., Semenova M.L. <https://bor.unibe.ch/ALT-Proceedings/article/view/61/128>.
17. Rakityanskiy M.M., Iliina I.V., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Khramova Y.V., Semenova M.L. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, **40**, Supplement 1, S-237 (2011).
18. Iliina I.V., Rakityanskiy M.M., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Khramova Yu.V., Semenova M.L. *AIP Conf. Proc.*, **1464**, 560 (2012).
19. Залесский А.Д. *Канд. дис.* (М., ИХФ, 2013).
20. Браунли К.А. *Статистическая теория и методология в науке и технике* (М.: Наука, 1977, с. 53).
21. Мятлев В.Д., Панченко Л.А., Ризниченко Г.Ю., Терехин А.Т. *Теория вероятностей и математическая статистика. Математическое моделирование* (М.: Академия, 2009, с. 124).