

**Получение реконструированных доимплантационных эмбрионов
млекопитающих методами высокоточной фемтосекундной лазерной
нанохирургии**

Научный руководитель – Надточенко Виктор Андреевич

Медведева Софья Максимовна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический
факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: soniamedov@gmail.com

Искусственное слияние клеток — современный метод фундаментальных и биомедицинских исследований. К настоящему времени используются следующие способы слияния: химический, в электрическом поле, вирусное слияние. В настоящей работе развивается метод высокоточной фемтосекундной лазерной нанохирургии для слияния ооцитов и бластомеров в эмбрионах мыши. Метод позволяет сливать определенные клетки внутри многоклеточной структуры без ее разрушения и с высокой точностью локализовать зону воздействия.

Показано, что подвергшийся фемтосекундному лазерному воздействию биоматериал сохраняет способность к дальнейшему развитию и делению [2]. Лазерное слияние — перспективный метод для получения чистых линий химерных животных и для терапевтического клонирования [1].

Несмотря на то, что техника слияния широко применяется, в настоящий момент имеется мало данных о механизме слияния, динамике объединения мембран и цитоплазматического содержимого клеток. Предполагается, что после слияния мембран, происходит объединение цитоплазмы клеток и ядра сливаются, однако, однозначного вывода о механизме тетраплоидизации существующие данные сделать не позволяют [3].

Целью настоящей работы является разработка методики исследования слияния двух ооцитов или бластомеров эмбриона инициированное остросфокусированным фемтосекундным импульсом в области контакта мембран. Также проведено исследование взаимодействия ядер в объединенной клетке после слияния.

В работе использовали две линии мышей в качестве доноров: гибридных СВА/С57В1 и трансгенных С57В1, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (green fluorescence protein, GFP). Ооциты, полученные путем суперовуляции, освобождали от блестящей оболочки и помещали попарно в микролунки, где они контактировали и склеивались под действием лектина. В каждой паре один из ооцитов содержал GFP. Воздействие лазерным импульсом производили в области контакта мембран ооцитов. Процесс слияния наблюдали на флуоресцентном микроскопе и записывали в виде серии фотографий. Был исследован процесс взаимодействия цитоплазмы в реконструированной клетке. Кроме того, была обнаружена зависимость скорости слияния от температуры.

Для исследования поведения ядер использовали двухклеточные эмбрионы мыши, которые так же сливали при помощи фемтосекундного лазера. Эмбрионы окрашивали витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342, их судьбу отслеживали от момента слияния до момента первого деления. Было показано, что слияния ядер в объединенной клетке не происходит.

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-53-52046 МНТ_а.

Источники и литература

- 1) Шахбазян А.К. и др. Получение химерных бластоцист мыши методами лазерной нанохирургии // Онтогенез. 2013. Т.44. No 6. С. 403-408.
- 2) Krivokharchenko A. et al. Laser fusion of mouse embryonic cells and intra-embryonic fusion of blastomeres without affecting the embryo integrity // PLOS One. 2012. V.7. No 12.
- 3) Kuetemeyer K. et al. Femtosecond laser-induced fusion of nonadherent cells and two-cell porcine embryos // J.Biomed.Optics. 2011. V.16. No 8.