

Фемтосекундная лазерная микрохирургия различных клеток и доимплационных эмбрионов млекопитающих

Аветик Шахбазян, Artashes Karmenyan, Александр Кривохарченко, Олег Саркисов

Разработаны методы неинвазивной или малоинвазивной фемтосекундной лазерной микрохирургии и ее использование для получения индивидуальных эмбриональных стволовых клеток. Уникальная установка включает три лазера (непрерывный, фемтосекундный и полупроводниковый) и оснащена оборудованием, позволяющем использовать атомно-силовую микроскопию, регистрировать флуоресцентные спектры и интегральную люминесценцию, а также осуществлять непрерывную видео регистрацию в процессе лазерных процедур. Для подбора оптимальных условий проведения микрохирургических манипуляций, в установке отработана возможность изменения различных параметров лазерного луча (мощности излучения, длительности импульса, chirpирование импульса, экспозиция облучения).

Возможности новой фемтосекундной технологии микрохирургии продемонстрирована на различных примерах: многоскальпельной микрохирургии ядерных эритроцитов голубя и нейронов, слиянии клеток и ооцитов. Для примера на рис.1. показано слияние трех клеток (бластомеров) внутри 4-клеточного эмбриона. Слева показан 4-клеточный эмбрион мыши с видимым контактом между тремя бластомерами. В середине эмбрион с одной нормальной и одной большой клеткой, образовавшейся после слияния трех бластомеров. Справа показана флуоресценция трех ядер с использованием витального красителя Hoechst 33342.

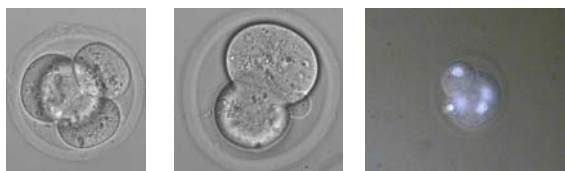


Рис.2. Лазерное слияние с образованием трехядерных клеток внутри эмбриона.

Флуоресценция свидетельствует, что разрушения ядер не произошло. Из рисунка видно, что мембрана также не разрушена. Сегодня основным методом слияния клеток является метод электрослияния. Этот метод может разрушать мембрану и не позволяет делать выбор клеток для слияния. В наших же экспериментах

впервые в мире продемонстрировано лазерное слияние двух и трех клеток внутри 4-клеточного мышинового эмбриона без разрушения мембраны и жизнеспособности эмбриона.

Развиваемая лазерная микрохирургия использовалась для создания технологии получения индивидуальных эмбриональных стволовых клеток. В качестве источника цитопластов использовали яйцеклетки (ооциты) на стадии метафазы II мышей, а в качестве источника донорских ядер использовали клетки кумулюса или фибробласты мышей. Ключевыми этапами клонирования являются: инактивация фемтосекундным лазерным излучением хромосомной пластинки ооцита; вырезание в блестящей мембране пространства для введения соматической клетки в перевителиновое пространство; оптическое перемещение соматической клетки с нужным геномом до контакта с ооцитом; лазерное слияние ооцита с соматической клеткой. В результате получается реконструированный эмбрион с желаемым геномом. Развиваемая нами технология должна обеспечить эффективность так называемого процесса репрограммирования с последующим развитием реконструированного эмбриона. Новизна развиваемого подхода заключается в том, что все этапы проводятся только лазерными методами без использования механических, электрических и химических процедур.