

3.1. Номер проекта

16-53-52046 МНТ_a

3.2. Название проекта

Механизм лазерного воздействия на ранние эмбрионы млекопитающих при фемтосекундной нанохирургии: физико-химическое и биохимическое исследование.

3.3. Коды классификатора, соответствующие содержанию фактически проделанной работы (в порядке значимости) (поле заполняется автоматически, коды вносятся из заявки)

03-540

3.4. Заявленные цели Проекта на период, на который предоставлен грант

1. Оптимизация параметров лазерного воздействия, а именно, временные и пространственные характеристики лазерного луча, оптимизация условий проведения микроманипуляций, характеристик лазерной установки в целом. Оптимизированная установка для проведения нанохирургических операций на эмбрионах и ооцитах млекопитающих будет создана на базе ИХФ РАН (Москва).
2. Определение реакционноспособных интермедиатов при селективном воздействии на отдельные органеллы.
3. Проведение подробного исследования биохимических характеристик ооцитов и эмбрионов при помощи многофотонной фемтосекундной микроскопии, фемтосекундной методики КАРС, TOF-SIMS масс-спектрометрии (ИХФ РАН, Москва).
4. Селективное фемтосекундное лазерное воздействие на ядрышки в ооцитах и в эмбрионах. Разработка методик селективной инактивации генетического материала в ооцитах и эмбрионах при сохранении целостности цитоплазмы.
5. Детальное изучение морфо-биохимических изменений, происходящих в ооците/эмбрионе после фемтосекундного лазерного воздействия.

3.5. Полученные за период, на который предоставлен грант, результаты с описанием методов и подходов, использованных в ходе выполнения проекта (описать, уделив особое внимание степени оригинальности и новизны)

1 Оптимизация параметров лазерного воздействия, а именно, временные и пространственные характеристики лазерного луча, оптимизация условий проведения микроманипуляций, характеристик лазерной установки в целом. Оптимизированная установка для проведения нанохирургических операций на эмбрионах и ооцитах млекопитающих будет создана на базе ИХФ РАН (Москва).

Механизм поглощения фемтосекундного лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона.

Из литературных данных известно, что свет с длиной волны в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне попадает в так называемое «окно прозрачности» биологической ткани. В живой клетке практически отсутствуют вещества, которые способны эффективно линейно поглощать свет в диапазоне 650-1350 нм: то есть, излучение в этом спектральном диапазоне не способно вызывать нагрев и химические превращения в клетке [1].

Для лазерной нанохирургии применяются объективы с высокой числовой апертурой для достижения «острой» фокусировки: пучок света фокусируется в объеме эллипс с полувысотой 1,5 мкм и полушириной 0,7 мкм, а поглощение лазерного излучения возникает в области еще меньшей, чем фокальная. Благодаря «острой» фокусировке достигается высокая интенсивность лазерного излучения в фокальной области, что обеспечивает поглощение по нелинейному механизму.

Для изучения механизма нелинейного поглощения фемтосекундного лазерного излучения, как правило, используют воду. Классический механизм нелинейного поглощения описывается как последовательность процессов, в их основе лежат эффекты фотоионизации. Фотоионизация происходит за счет появления свободных электронов по механизмам многофотонной, туннельной и/или лавинной ионизации [2].

При наложении на атом внешнего электрического поля происходит деформация потенциального поля атома, и с одной из сторон потенциальной ямы возникает барьер конечной величины. Электрон с определенной вероятностью способен туннелировать: т.е., оказаться по другую сторону барьера. Так реализуется механизм туннельной ионизации.

Многофотонная ионизация происходит, когда на электрон, находящийся в потенциальной яме, одновременно попадает два или более фотонов. Электрон поглощает фотоны выходит из потенциальной ямы и отрывается от ядра атома. Принято считать, что свободные электроны при лазерном воздействии возникают преимущественно по механизму многофотонной ионизации [3].

Механизмы туннельной и многофотонной ионизации были подробно рассмотрены в теории Келдыша, в которой предлагается использовать параметр $\gamma = \omega(\mu \cdot I_p)^{1/2} / e \cdot |E|$ (μ – приведенная масса электрона и дырки, I_p – потенциал ионизации, E – амплитуда напряженности электрического поля световой волны) для определения механизма поглощения [4]. Величина γ называется потенциалом ионизации, и при $\gamma \gg 1$ преимущественно реализуется механизм многофотонной ионизации. При $\gamma \ll 1$ основной вклад вносит механизм туннельной ионизации. В случае $\gamma \sim 1$ предполагается сосуществование обоих механизмов.

Таким образом, при поглощении лазерного излучения происходит ионизация, что, в свою очередь, ведет к образованию плазмы. В условиях действия лазером на вещество возможно образование плазмы двух типов: плазмы высокой плотности (с концентрацией свободных электронов больше, чем критическая - 10^{20-21} электрон/см³) и плазмы низкой плотности (с концентрацией свободных электронов меньше критической). Плазма низкой плотности образуется по механизмам туннельной и многофотонной ионизации при плотности мощности лазера порядка 10^{11-14} Вт/см². Плазма высокой плотности образуется при плотности мощности лазера более 10^{15} Вт/см² по механизму лавинной ионизации. Плазма высокой плотности связана с появлением такого состояния, как оптический пробой. Эмпирическим критерием оптического пробоя является образование кавитационных пузырей.

Для лазерной нанохирургии, как правило, используют плотности мощности 10^{11-14} Вт/см², поэтому в работе с биологическими объектами исследователи, как правило, имеют дело с плазмой низкой плотности, которая не вызывает образования кавитационных пузырей. Тем не менее, для полноты картины необходимо рассмотреть все возможные эффекты, вызываемые остросфокусированным лазерным излучением.

Действие одиночным фемтосекундным импульсом и цугом фемтосекундных импульсов.

Традиционно для лазерной нанохирургии фемтосекундными импульсами используют два режима воздействия: цугом импульсов или одиночным импульсом. При действии одиночным импульсом, как правило, используют частоту генерации 1 кГц и подают на объект только один импульс; при действии цугом обычно используют частоту 80 МГц и подают на объект цуг импульсов с длительностью порядка микросекунд. В режиме работы с цугом используется энергия в импульсе намного ниже энергии оптического пробоя; поглощение и нагрев происходят постепенно, в течение всего цуга. В случае с одиночным импульсом часто используются энергии, превышающие порог пробоя. Кавитационные пузыри и ударные волны распространяются на область, намного превышающую область фокуса, и наносят существенные повреждения клетке. Кроме того, основные нанохирургические операции можно совершить в режиме плазмы низкой плотности, который реализуется при работе с цугами импульсов.

В рамках оптимизации установки для проведения нанохирургических операций были выполнены работы по достижению минимально возможной области фокусировки

лазерного излучения. Это достигалось путём тонкой настройки геометрических параметров лазерного пучка, а именно: диаметр пучка и его расходимость. Оптимальный диаметр определялся размерами входного зрачка объектива, требовалось обеспечить незначительное перекрытие пучком входного зрачка объектива. Настройка параметра расходимости лазерного пучка позволила обеспечить минимальные размеры области перетяжки в направлении распространения лазерного излучения. В работе преимущественно использовался объектив Olympus 60X, N.A. 0.7, диаметр входного зрачка составлял порядка 4 мм. Диаметр лазерной перетяжки в предметной плоскости составил 1,4 мкм, (длина волны лазерного излучения 800 нм), длина лазерной перетяжки в направлении распространения луча 2,2 мкм, плотность потока мощности при использовании импульсов с энергией лежащей в диапазоне 0.3-2 нДж, составила $2.0-13.2 \cdot 10^{11}$ Вт/см². Достигая минимальности геометрических размеров области фокусировки лазерного излучения, мы получили два важных для лазерной нанохирургии следствия: 1) достигается максимальная плотность потока фотонов при заданной энергии импульса, что позволяет проводить операции с максимальной эффективностью; 2) достигается максимальная локализация воздействия. Дальнейшая модернизация установки может быть вызвана получением новых знаний о механизмах взаимодействия фемтосекундного лазерного излучения с биоматериалом. Одно из самых многообещающих направлений на наш взгляд является исследования эффективности нанохирургических операций в зависимости от частоты повторения импульсов.

1. Andrew M. Smith, M.C.M., Shuming Nie, *Second window for in vivo imaging*. Nature Nanotechnology, 2009. **4**: p. 710–711
2. Vogel, A., *Optical Breakdown in Water and Ocular Media, and its Use for Intraocular Photodisruption* 2001: Shaker.
3. Ajit P. Joglekar, H.-h.L., Edgar Meyhofer, Gerard Mourou, Alan J. Hunt, *Optics at critical intensity: Applications to nanomorphing*. PNAS, 2004. **101**(16): p. 5856–5861.
4. Л.В.Келдыш, *Ионизация в сильном поле электромагнитной волны*. Журнал Экспериментальной и Теоретической Физики, 1965. **20**(5): p. 1307-1314.
5. Vogel, A., et al., *Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues*. Applied Physics B-Lasers and Optics, 2005. **81**(8): p. 1015-1047.

2. Определение реакционноспособных интермедиатов при селективном воздействии на отдельные органеллы.

Образование светопоглощающих центров при действии остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением на ооциты.

Нами установлено, что при действии остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением в клетке образуются светопоглощающие центры (А. А. Астафьев,

А. Д. Залесский, А. М. Шахов, А. А. Осыченко, В. А. Надточенко, *Химия Высоких Энергий*, 2016). В данной работе воздействие проводили цугом фемтосекундных импульсов с длиной волны 800 нм на различные области ооцита: в цитоплазму, ядро и ядрышко. Во всех случаях в месте воздействия формировались вещества, способные линейно поглощать непрерывное лазерное излучение с длиной волны 800 нм (в то время как даже длительное действие этим излучением – до десяти минут - не вызывало никаких изменений в клетке).

Было показано, что светопоглощающие центры обладают люминесцентными свойствами. Максимум спектра люминесценции соответствует 520 нм (Рис. 1). Люминесценцию можно возбуждать как однофотонно (на длине волны 462 нм), так и двухфотонно (на длине волны 790 нм).

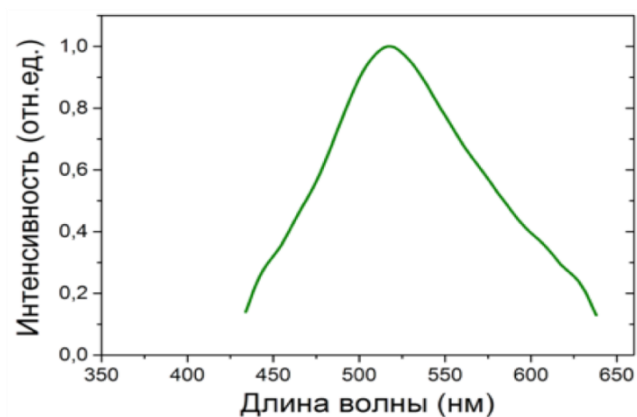


Рис. 1. Спектр люминесценции светопоглощающих центров.

Размер светопоглощающих центров можно менять, варьируя параметры лазерного воздействия. Минимальный размер светопоглощающих центров – 500 нм. Светопоглощающие центры в ядре, цитоплазме и ядрышке ооцита показаны на Рис. 2. Их люминесценция выглядит достаточно контрастной по сравнению с автолюминесценцией образца. Установлено, что светопоглощающие центры не диффундируют по всему объему клетки, а сохраняют свою форму. Показано, что светопоглощающие центры способны сохраняться в клетке продолжительное время (не метаболизируются) – как минимум сутки (Рис. 3) и не влияют на способность ооцитов к развитию до стадии метафазы II (Таблица 1). Точный тест Фишера с поправкой Бонферрони для множественных сравнений не выявил достоверных различий в способности к развитию ооцитов, содержащих светопоглощающие центры, с контрольной группой.

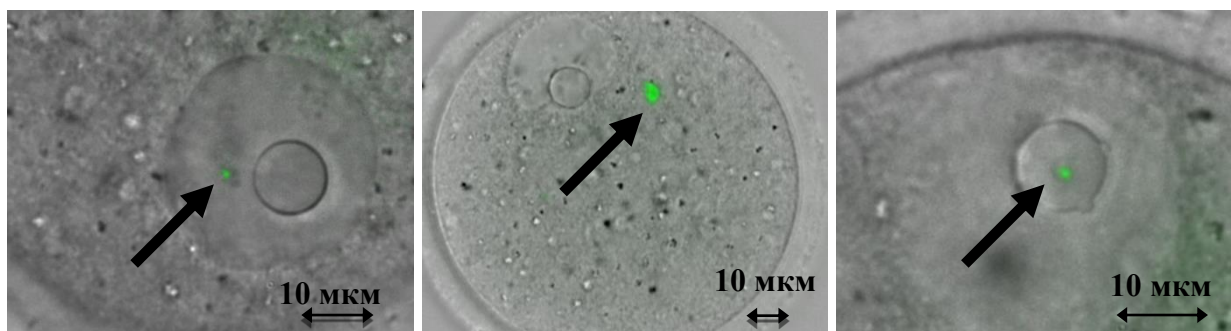


Рис. 2. Светопоглощающие центры в ядре (слева), цитоплазме (посередине) и ядрышке (справа) ооцитов. Стрелки указывают на светопоглощающие центры.

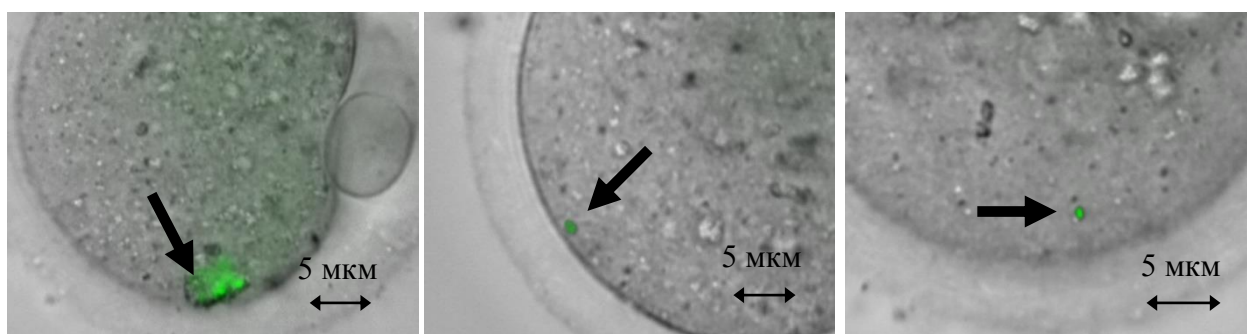


Рис. 3. Люминесценция светопоглощающих центров после действия остросфокусированным лазерным излучением в ядро (слева), цитоплазму (справа) и ядрышко (справа) в ооцитах мыши спустя 24 часа после воздействия.

Таблица 1. Развитие ооцитов до стадии метафазы II при действии на них остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения с целью создания светопоглощающих центров.

	Действие в ядро	Действие в цитоплазму	Действие в ядрышко	Контроль
Развитие до стадии метафазы II: % ооцитов на стадии МII (количество ооцитов, дошедших до стадии метафазы II / количество исходных ооцитов)	70% (7/10)	90% (9/10)	80% (8/10)	80% (8/10)

Основное преимущество светопоглощающих центров – это возможность их создания внутри клетки без повреждения ее мембраны. Данная методика позволяет

создавать окрашенные центры в строго заданной точке и затем следить за ее перемещением. Такой опыт был проведен на ооцитах. Светопоглощающий центр создали в ядре, он был заякорен на нить хроматина (Рис. 4). Видеосъемка в течении продолжительного времени позволяла отслеживать положение люминесцентной точки. На Рис. 4 показаны кадры из последовательной фотосъемки, которые позволяют отслеживать миграцию светопоглощающего центра внутри ядра. По сути, мы наблюдали процессы ремоделирования хроматина, что невозможно увидеть на живой клетке без применения специфического красителя.

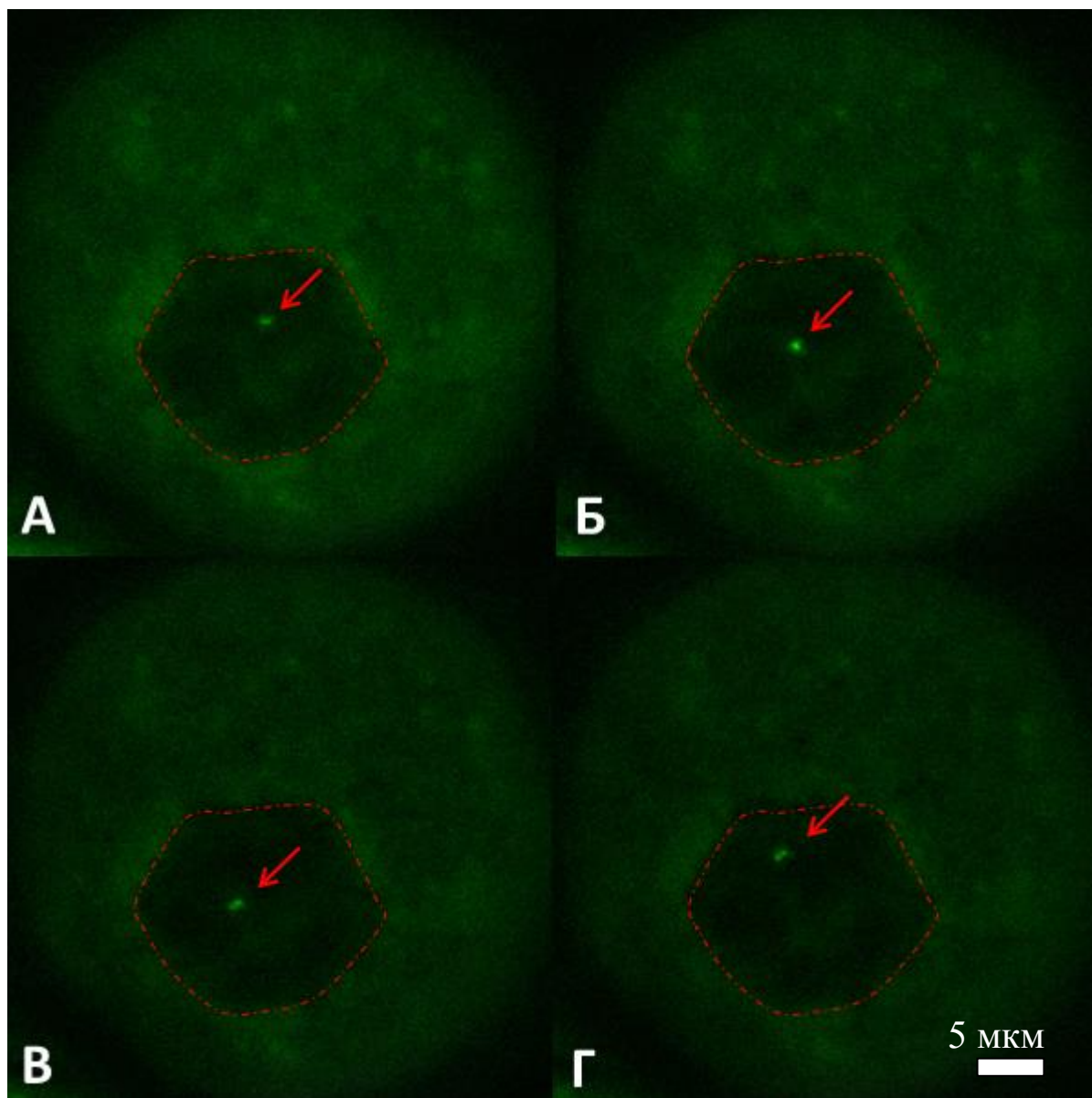


Рис. 4. Миграция светопоглощающего центра в ядре ооцита мыши. Стрелка показывает на светопоглощающий центр, пунктиром отмечена область ядра. А – расположение точки на нулевой секунде (0 сек), Б – положение точки на 56 сек, В – положение точки на 231 сек; Г – положение точки на 350 сек.

Состав светопоглощающих центров был исследован при помощи методики CARS-микроскопии (Рис. 5) и рамановской спектроскопии (Рис. 6). Оба спектра имеют D- и G-полосы, характерные для графитоподобных структур. Эти данные позволяют предположительно отнести светопоглощающие центры к классу веществ – углеродные точки (C-Dots).

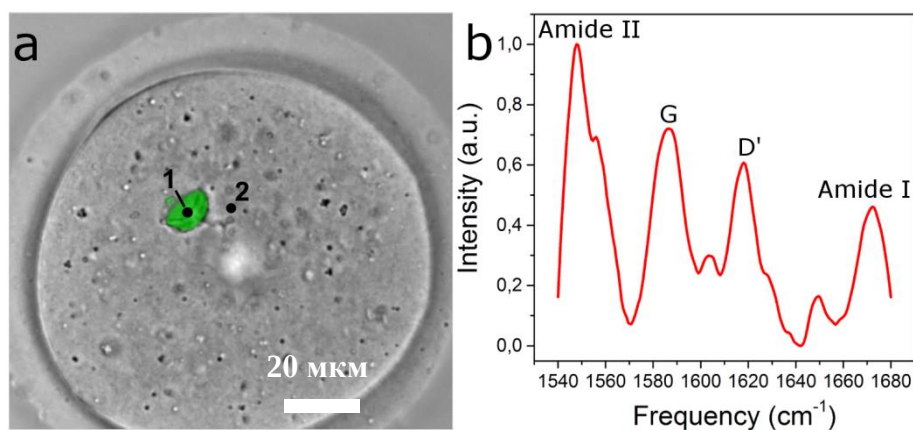


Рис. 5. а – светопоглощающий центр в цитоплазме ооцита; б - спектр CARS.

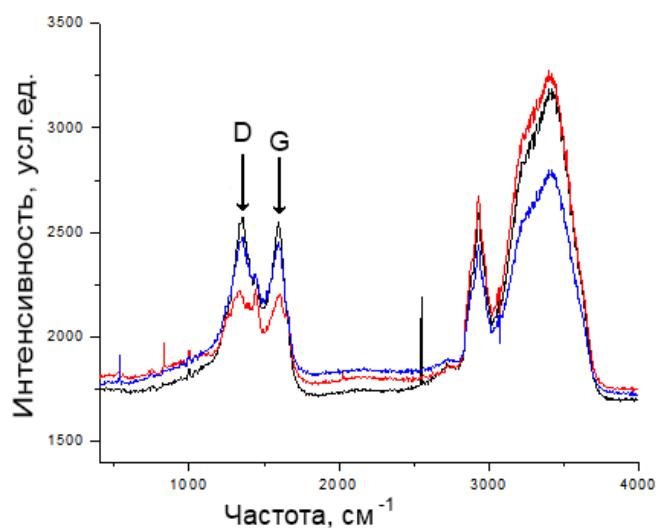


Рис. 6. Рамановский спектр (спектр комбинационного рассеяния) светопоглощающих центров. На спектре показаны D- и G- полосы, частота которых соответствует 1355 и 1590 см⁻¹.

Формирование флуоресцентных областей в ооцитах мыши на стадии *germinal vesicle* при воздействии импульсным лазером 1.48 мкм.

Для воздействия на ооциты мыши была собрана оптическая система, в которой непрерывнолазерное излучение с длиной волны 1.48 мкм заводилось через систему

зеркал в исследовательский (инвертированный) микроскоп Olympus IX71. Ооциты на стадии зародышевого пузырька (germinal vesicle) выделялись из яичников мыши и помещались в фосфатный буфер (ФБ). Капля с ооцитами в ФБ помещалась на покровное стекло, которое помещалось на двухкоординатную платформу, установленную на микроскоп и управляемую с компьютера. Излучение лазера фокусировалось через объектив Olympus 60X 0.7 NA в ооциты мыши, перетяжка лазера имела диаметр 4 мкм и длину порядка 10 мкм.

При воздействии на ооциты мыши непрерывное инфракрасное лазерное излучение модулировалось для получения импульсов длительностью 50-100 мкс, с энергией в импульсе 10-100 мкДж и с частотой повторения от 5 до 500 Гц. Воздействие производилось как в одной точке в цитоплазме ооцита, так и в некоторой области размерами порядка 20 мкм за счет запрограммированных передвижений столика по двум координатам. Время экспозиции лазера точно подбиралось и регулировалось при помощи механического затвора. После облучения ооцитов мыши ИК лазером формировались дефекты сложной формы, которые были видны на оптическом изображении (рис.7).

Для возбуждения флуоресценции был использован синий лазерный диод, работающий на длине волны 462 нм. Флуоресцентные изображения с экспозицией до 1с регистрировались на КМОП камеру XIMEA xiQ MQ013MG-ON. Оптические и флуоресцентные изображения отдельных ооцитов приведены на рисунке 2. Флуоресценция ооцитов в месте воздействия лазера отличалась от автофлуоресценции материала ооцита, что видно из характерного свечения различных областей (рис 8Б, Г). Причем яркость флуоресценции обработанной области в ооците была примерно в 2-3 раза больше автофлуоресценции окружающего материала и зависела от параметров лазерного излучения. Был найден оптимальный по яркости флуоресценции режим воздействия: длительность импульса – 100 мкс, энергия в импульсе – 100 мкДж, частота повторения – 50 Гц. Длительность экспозиции лазера варьировалась в пределах от 1 до 60 с в зависимости от размера облучаемой области.

Для регистрации спектров флуоресценции ооцитов мыши была использована система, состоящая из фемтосекундного лазера (Ti:Sa Spectra-physics Tsunami) для двухфотонного возбуждения флуоресценции на длине волны 780 нм, и спектроскопической ПЗС камеры PI-MAX 2 (Princeton Instruments) на которую попадал сигнал после прохождения флуоресценции через монохроматор Acton SP300i. Спектры флуоресценции обработанного лазером и нетронутого материала заметно отличались по форме и максимуму интенсивности. Из Рис. 9 видно, что после воздействия ИК лазера не только менялась форма и возрастала интенсивность флуоресцентного сигнала, но и положение пика смещалось в длинноволновую область.

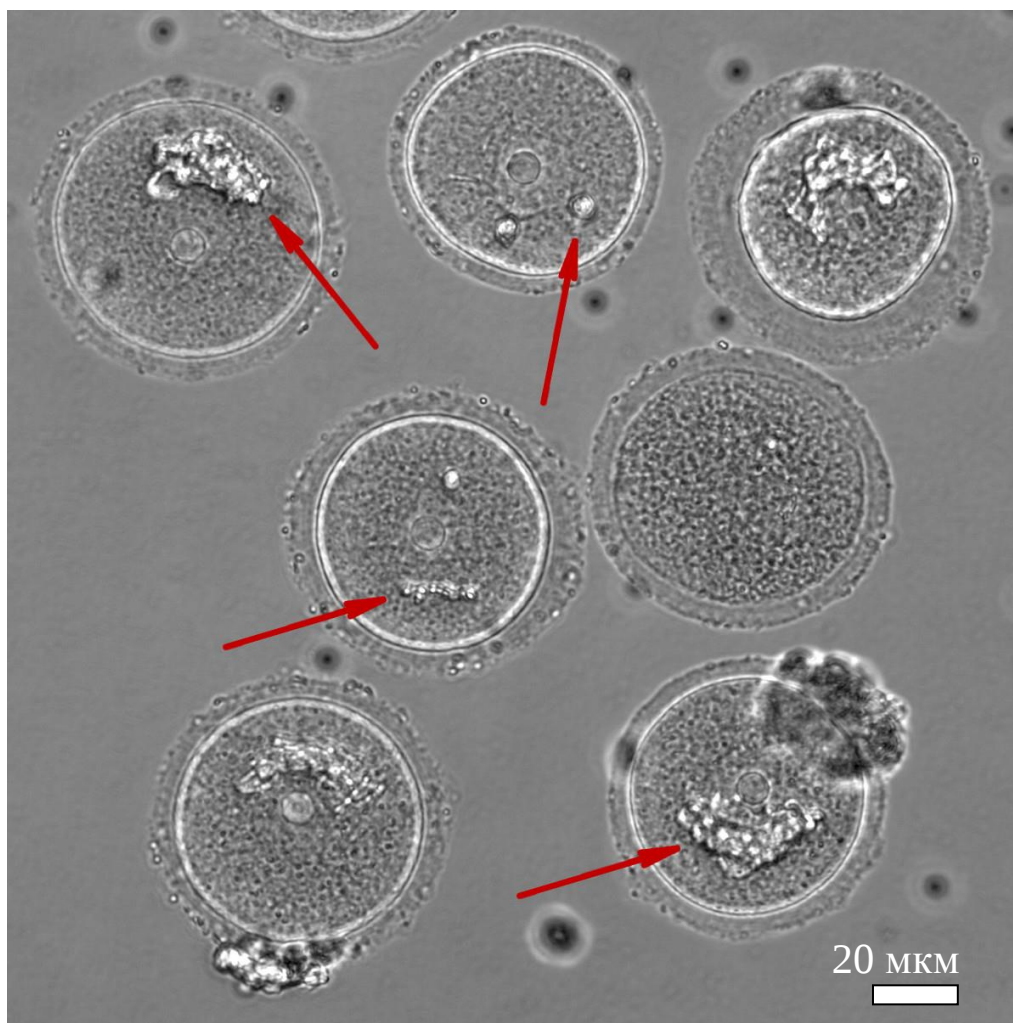


Рис. 7. Различные виды дефектов, формируемых в цитоплазме ооцитов мыши при воздействии лазером 1.48 мкм.

Сравнивая полученные результаты воздействия фемтосекундного лазерного излучения и излучения непрерывного лазера ИК-диапазона можно сделать несколько важных выводов:

- 1) Использование лазерных источников воздействующих на ооциты мыши через локальный нагрев фокального объема позволяет индуцировать химические изменения в биоматериале, приводящих к образованию продуктов флуоресцирующих при возбуждении в синем спектральном диапазоне (450-480 нм).
- 2) Локальная тепловая обработка участков цитоплазмы ооцитов мыши приводит не только к усилению флуоресценции, но и к изменению формы её спектра, и смещению максимума на 10-20 нм ближе к длине волны 530 нм.
- 3) Воздействие ИК лазером на длине волны 1.48 мкм вызывает изменения в биоматериале схожие по спектрам флуоресценции с воздействием фемтосекундным лазером ближнего ИК диапазона. Однако количественные и качественные различия во флуоресценции показывают, что при воздействии фемтосекундного лазера происходят более сложные процессы, которые не сводятся только к термическому воздействию на материал ооцита и,

вероятно, обусловлены наличием сложных фотохимических реакций, в результате которых могут образовываться флуоресцентные углеродные наночастицы.

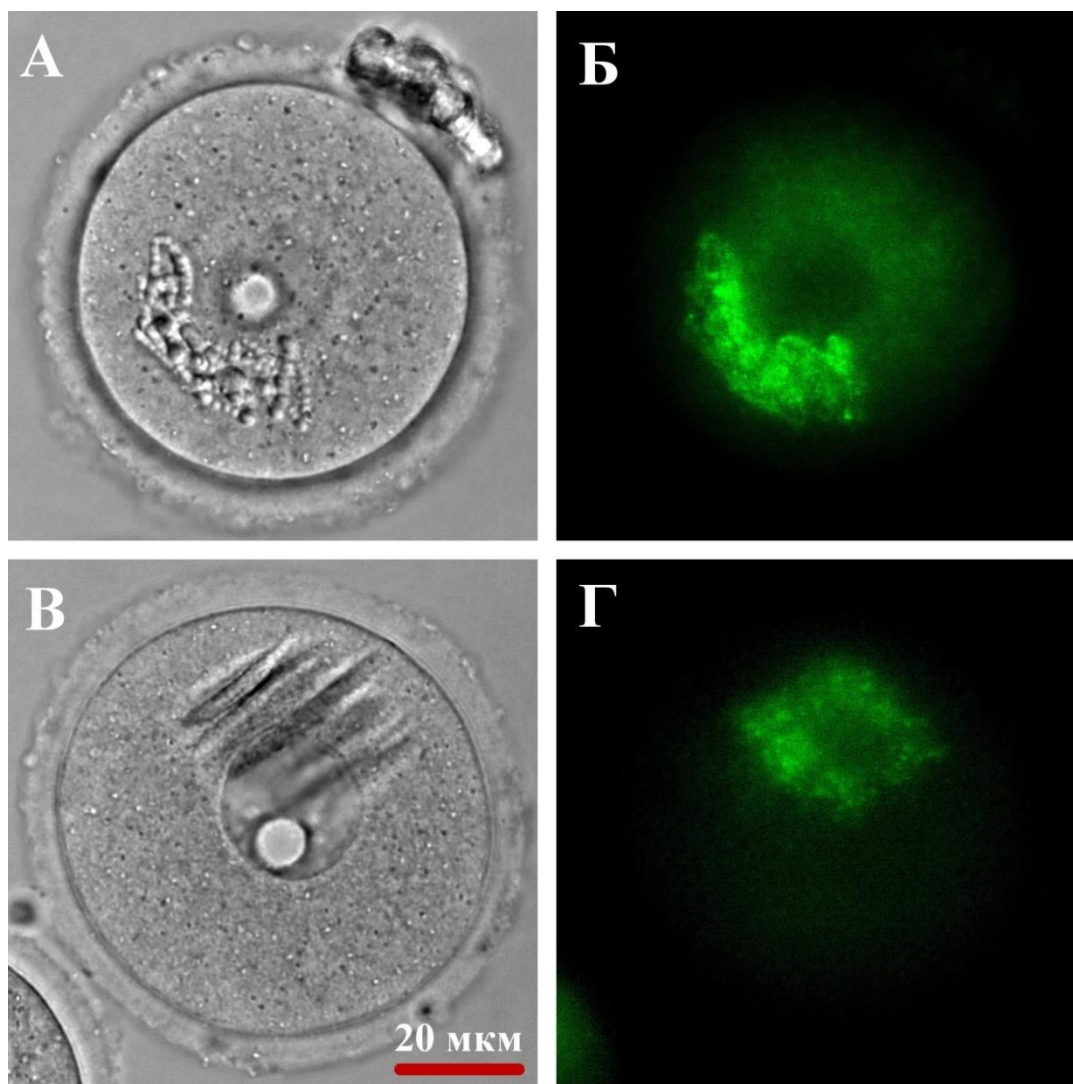


Рис. 8. Оптические (А, В) и флуоресцентные (Б, Г) изображения ооцитов мыши после воздействия лазера 1.48 мкм. Изображения А и Б получены в плоскости, ортогональной оптической оси лазерного пучка, изображения В и Г – в плоскости параллельной оси лазерного пучка. На флуоресцентных изображениях (Б, Г) хорошо заметна повышенная светимость обработанных лазером областей.

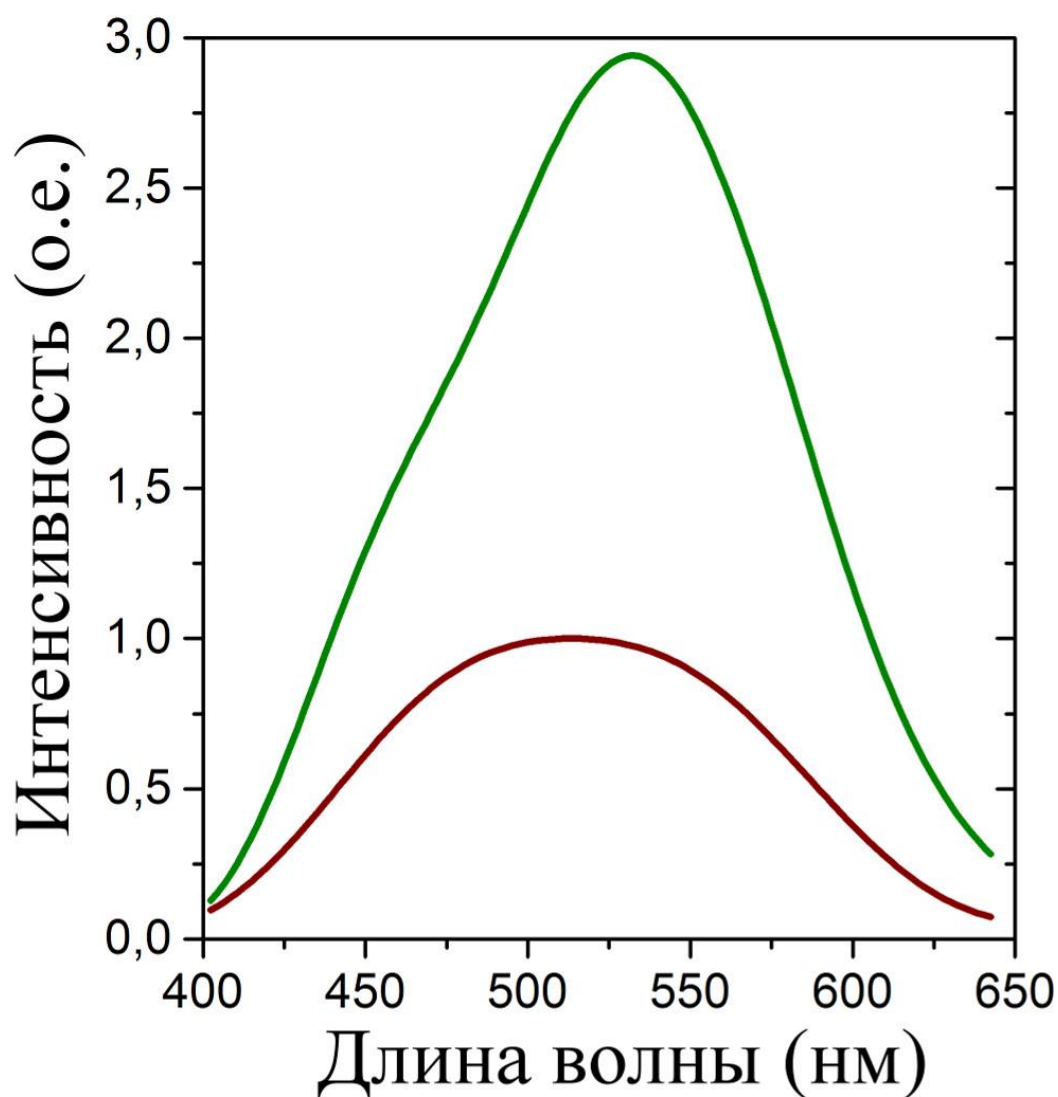


Рис. 9. Спектры двухфотонной флуоресценции цитоплазмы ооцита (коричневый) и области, обработанной лазером 1.48 мкм (зеленый), полученные при возбуждении фемтосекундными импульсами на длине волны 780 нм.

3. Проведение подробного исследования биохимических характеристик ооцитов и эмбрионов при помощи многофотонной фемтосекундной микроскопии, фемтосекундной методики КАРС, TOF-SIMS масс-спектрометрии (ИХФ РАН, Москва).

Парогазовый пузырь как методика для оценки вязкоупругих свойств внутриклеточных компонентов.

В работе предлагается использовать парогазовый пузырь как новый способ оценки вязкоупругих свойств внутриклеточных компонентов. Фемтосекундным лазерным

излучением действовали на ооциты (в область цитоплазмы, ядра и ядрышка) и эмбрионы (в область контакта двух бластомеров) – Рис. 10. В области воздействия с некоторой вероятностью образовывался парогазовый пузырь. Порог образования парогазового пузыря при действии в ядро и цитоплазму был опубликован в прошлом отчете. Ниже приведена таблица, содержащая уже опубликованные (ядро и цитоплазма) и новые (ядрышко и область контакта) данные по образованию парогазового пузырька при действии различными параметрами фемтосекундного лазерного воздействия (Таблица 2). Действие в область контакта двух бластомеров рассматривали как действие на плазматическую мембрану клетки. В различные области клетки действовали пятикратно набором параметров: энергия в импульсе 0,5, 1 и 2 нДж, длительность цуга импульсов 15, 30 и 60 мс.

Порог – это значение параметров воздействия, при которых вероятность образования парогазового пузыря превышает 50%. При действии в цитоплазму, ядрышко и область контакта значение порог достигался при значении энергии импульса в 1 нДж. В ядре порог так и не был достигнут.

Таблица2. Статистика образования парогазовых пузырей (%) при изменении параметров фемтосекундного лазерного воздействия.

	Ядро	Цитоплазма	Ядрышко	Контакт
0,5 нДж 15 мс	0	0	0	0
0,5 нДж 30 мс	0	0	0	0
0,5 нДж 60 мс	0	0	9%	0
1 нДж 15 мс	8%	30%	66%	50%
1 нДж 30 мс	6%	30%	88%	57%
1 нДж 60 мс	6%	60%	94%	91%
2 нДж 15 мс	3%	26%	98%	91%
2 нДж 30 мс	12%	60%	98%	98%
2 нДж 60 мс	20%	64%	98%	100%

Были измерены основные параметры парогазовых пузырей – это их максимальный размер и время существования (Рис. 11). Максимальный размер определяли, выбирая на видеозаписи тот кадр, где пузырь имел наибольший размер. При действии цугом импульсов на клетку пузырь достигал максимального размера за время порядка 40-80 мс, а затем медленно схлопывался.

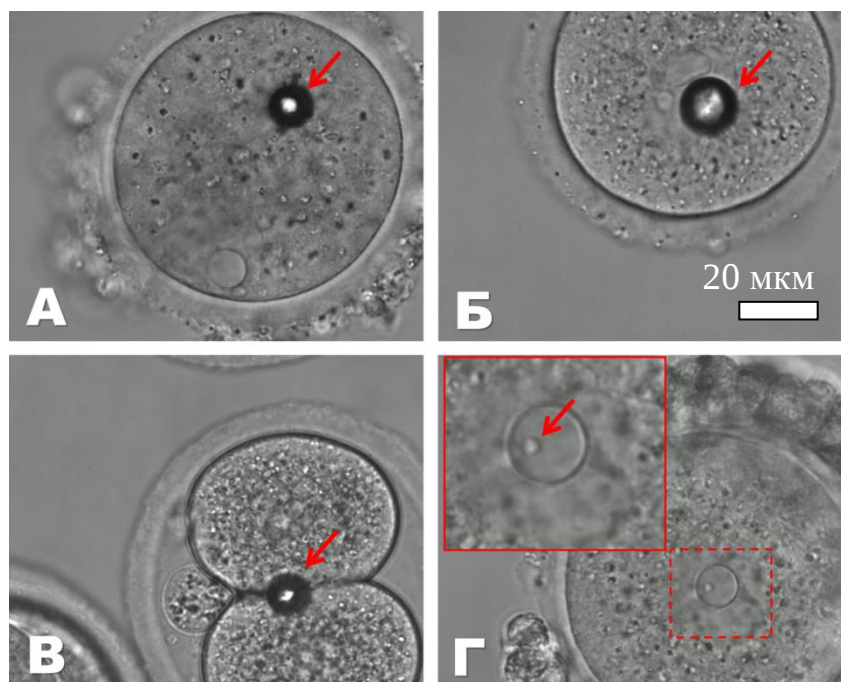


Рис. 10. Парогазовый пузырь в цитоплазме (А), ядре (Б), области контакта (В) и ядрышке (Г). Г – пунктиром показана область, которая в красной рамке представлена в увеличенном масштабе. Стрелки указывают на парогазовый пузырь.

На Рис. 10 видно, что пузырь в ядрышке имеет иную морфологию. В цитоплазме, ядре и области контакта парогазовый пузырь имеет черную окантовку и белую середину; в ядрышке парогазовый пузырь виден как белое пятнышко. Эта разница может быть вызвана различными преломляющими свойствами материала.

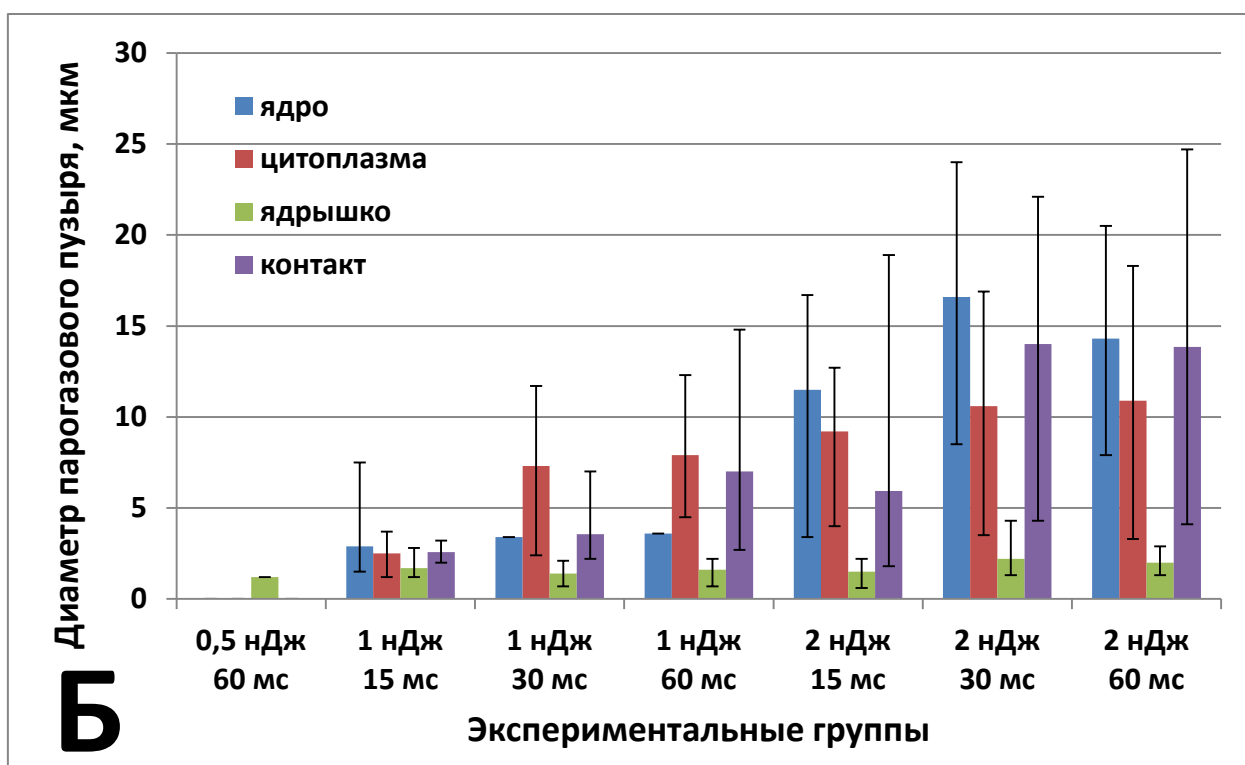
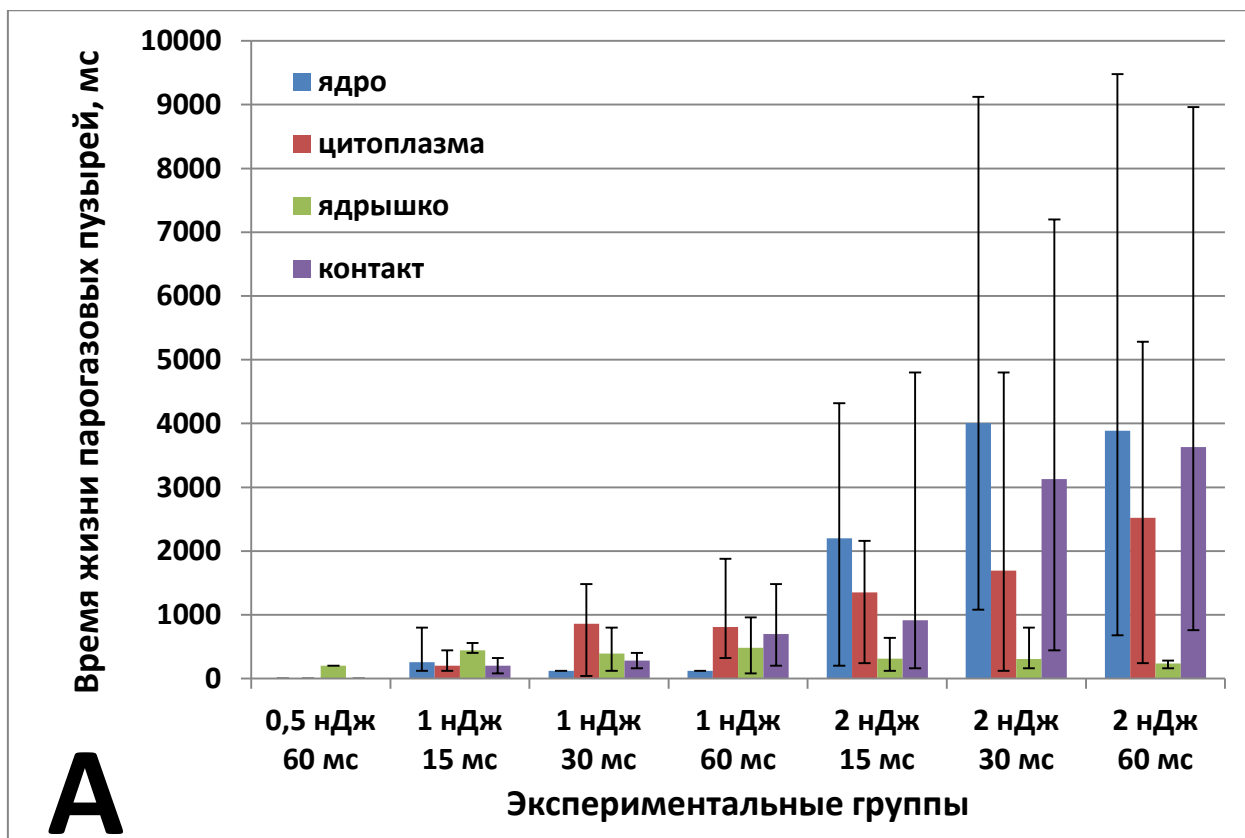


Рис. 11. Время жизни (А) и диаметр (Б) парогозовых пузырьков, возникающих в разных областях клетки (ядре, цитоплазме, ядрышке и в области клеточного контакта) при различных параметрах фемтосекундного лазерного воздействия.

Была посчитана корреляция времени жизни и объема парогозового пузыря. Время жизни парогозового пузыря коррелирует с его размером (Рис. 12). Для подтверждения корреляции использовали коэффициент корреляции Пирсона. Коэффициент Пирсона считали для ядра, цитоплазмы, ядрышка и области контакта. Для ядра было 49 пар значений, для цитоплазмы 34 и для ядрышка 37. Значение коэффициента Пирсона (r), соответствующее идеальной положительной корреляции, соответствует единице (+1); значение -1 соответствует идеальной отрицательной корреляции. Для ядра $r = 0,97$; для цитоплазмы $r = 0,87$, для области контакта $r = 0,81$ и для ядрышка $r = 0,2924$. Это означает, что для парогозовых пузырей, образующихся в ядре, цитоплазме и области контакта, характерна сильная положительная линейная корреляция размера (объема) и времени жизни, то есть, они пропорциональны друг другу с некоторым коэффициентом K : $t \text{ (мс)} \sim D \text{ (мкм)} \cdot K$. Для пузырей, образующихся в ядрышке, корреляция размера и времени жизни слабая и не имеет явного линейного характера.



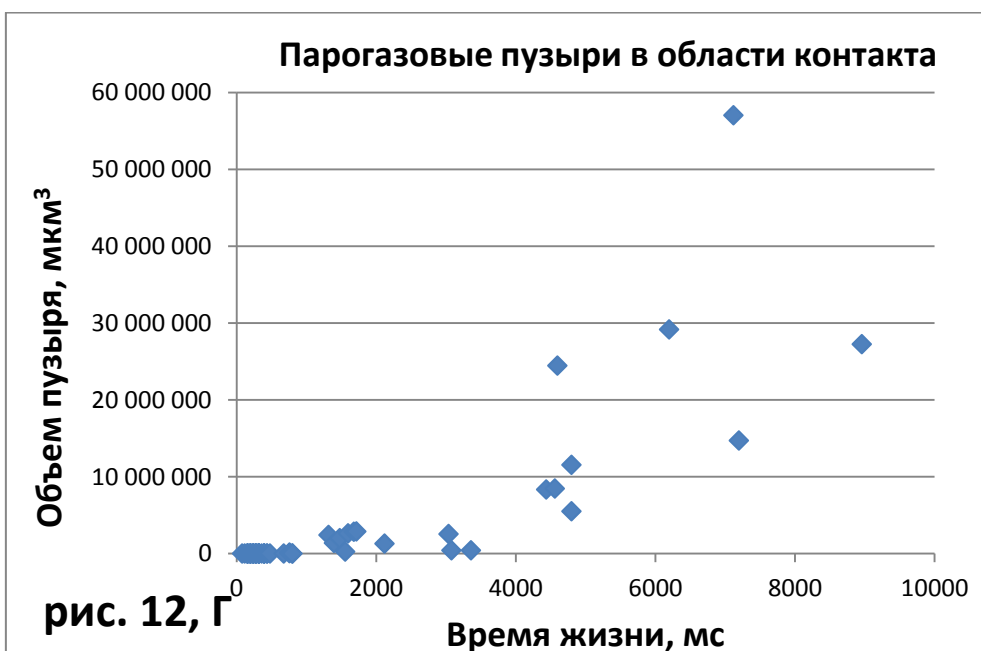
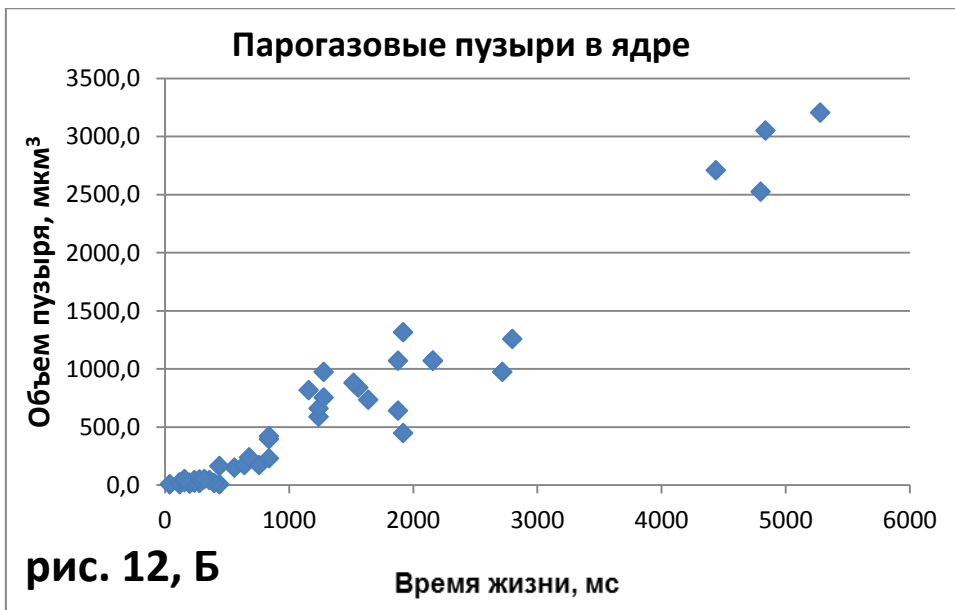


Рис. 12. Зависимость объема пузыря от времени жизни в цитоплазме (А), ядре (Б), ядрышке (В) и области контакта (Г) при действии цугом фемтосекундных импульсов на клетку.

Коэффициент **К** можно получить, если нормировать время жизни на размер парогазового пузыря, а именно – на объем. Объем парогазового пузыря рассчитывали по формуле объема шара исходя из значений диаметра: $V = \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot D^3$. Для каждой пары значений времени жизни и объема парогазового пузыря получали свой коэффициент **К**, и затем рассчитывали средний **К** для разных областей клетки: ядра ($K = 11,7$), цитоплазмы ($K = 12,3$), области контакта ($K = 1,56$) и ядрышка ($K = 310,6$). Размерность коэффициента **К**, таким образом, считается в $\text{мс}/\text{мкм}^3$, и его смысл заключается в том, что он показывает, как скоро возмущение, привнесенное лазерным воздействием, будет релаксировать в среде. Этот коэффициент характеризует вязкость среды, в которой проводится воздействие. Полученные данные указывают на то, что ядрышко по сравнению с ядром и цитоплазмой – очень плотная среда, и ее вязкость сродни упругости. Вязкость в области контакта двух бластомеров оказалась наименьшая.

Полученные данные согласуются с результатами, представленными в литературе. Цитоплазму предлагается рассматривать как порозластичный материал, состоящий из фибрилл (нитей цитоскелета), крупных глобул (органелл) и мелких частиц (белков, включений и др.), между которыми находится вода [1]. Аналогичным образом можно предложить модель ядра как совокупность переплетенных между собой филаментов. Пороговый механизм образования парогазового пузырька вполне вписывается в предложенную модель. В зависимости от того, куда попадет лазерный импульс (будет это органелла, филамент или вода) зависит, образуется пузырек или нет.

Так же известно, что ядрышко является наиболее плотной компонентой клетки [2]. В работе [3] показано, что ядрышко имеет плотную гранулярную структуру. Наименьший размер парогазового пузыря в ядрышке по сравнению с другими структурами, а так же наибольшая вероятность образования парогазового пузыря позволяют рассматривать ядрышко как конгломерат из плотно упакованных гранул с минимальным расстоянием между ними.

Таким образом, при помощи остросфокусированного фемтосекундного лазерного воздействия было установлено, что ядрышко имеет наибольшую плотность и вязкость из всех клеточных компонентов. Предложенную в данной работе методику можно применять для оценки вязкоупругих свойств клеточных компонентов.

1. Emad Moeendarbary, L.V., Marco Fritzsche, Andrew R. Harris, Dale A. Moulding, Adrian J. Thrasher, Eleanor Stride, L. Mahadevan and Guillaume T. Charras, *The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material*. Nature Materials, 2013. **12**: p. 253-261.
2. MOROZ, P.E., *The Cell in the Field of Gravity and the Centrifugal Field*. J. theor. Biol., 1984. **107**: p. 303-320.
3. . А.А. Астафьев, А.А.Г., А.А. Осыченко, А.Е. Солодина, М.С. Сырчина, А.А. Титов, А.М. Шахов, А.Г. Погорелов, В.Н. Погорелова, А.И. Панаит, В.А. Надточено, *Структурные особенности ядрышка в ооците мыши на стадии зародышевого пузырька, выявленные методами атомно-силовой микроскопии, электронной сканирующей микроскопии и времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов*. Российские нанотехнологии 2017. **12**(7-8): p. 13-16.

4. Селективное фемтосекундное лазерное воздействие на ядрышки в ооцитах и в эмбрионах. Разработка методик селективной инактивации генетического материала в ооцитах и эмбрионах при сохранении целостности цитоплазмы.

В данной части работы проводили селективное воздействие остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением на преовуляторные ооциты мыши. Остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением воздействовали на ядрышка ооцитов, воздействие повторяли пятикратно. На основе уже полученных данных были выбраны параметры лазерного воздействия, существенно превышающие порог образования парогазового пузыря. На ядрышко воздействовали цугами фемтосекундных импульсов с энергией импульса 1,5 нДж и длительностью 120 мс, с энергией импульса 2,25 нДж и длительностью цуга 120 мс, 240 мс, 400 мс и 600 мс. Так же в ядрышко действовали одиночными фемтосекундными импульсами с длительностью 30 мс и энергией 43 нДж и 75 нДж.

Известно, что ооциты способны *in vitro* развиваться до стадии метафазы II (MII). В начале эксперимента ооциты находились на GV (germinalvesicle) стадии, тогда был отчетливо виден зародышевый пузырек (ядро и ядрышко). Затем ооцит переходит на стадию GVBD (germinalvesiclebreakdown) – у ооцита растворялся зародышевый пузырек; часто появлялся бугорок, содержащий ДНК, готовящуюся к первому редукционному делению мейоза. Затем происходит первое редукционное деление мейоза: половина генетического материала отделяется вместе с полярным тельцем, а другая половина остается в ооците – так выглядит стадия MII. Успешным для ооцита является достижение стадии MII. Так же возможен вариант, что ооцит оставался на исходной стадии – GV. И возможным был вариант разрушения ооцита. Процедура инактивации тормозила развитие

ооцита на стадии GVBD – ооцит уходил с исходной стадии GV, готовясь к мейозу, но не достигал МП. В таком случае считалось, что генетический материал ооцита инактивирован.

Возможные исходы развития ооцита после фемтосекундного лазерного воздействия показаны на Рис. 13.

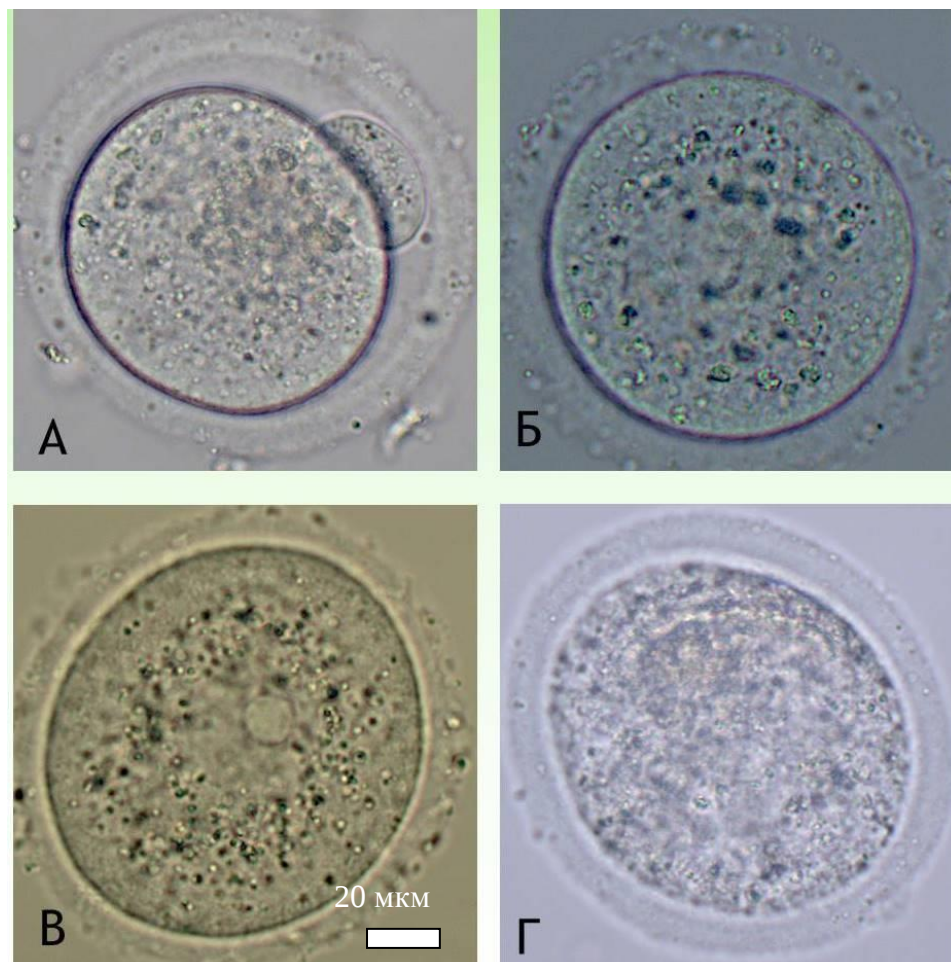


Рис. 13. Возможные исходы развития ооцита в результате фемтосекундного лазерного воздействия. А – достижение стадии МП, Б – стадия GVBD, В - стадия GV, Г – деградация.

Результаты по инаktivации генетического материала ооцитов путем воздействия остросфокусированного фемтосекундного лазерного излучения на ядрышко представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Инаktivация генетического материала ооцитов при действии на ядрышко остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением. В таблице указан % достижения стадии от общего числа образцов.

Параметры воздействия		GVBD	МII	GV	деградация
Цуг импульсов	1,5 нДж 120 мс	48%	28%	12%	12%
	2,25 нДж 120 мс	33%	33%	17%	17%
	2,25 нДж 240 мс		17%	33%	50%
	2,25 нДж 400 мс	30%	10%		60%
	2,25 нДж 600 мс	10%	40%		50%
Одиночный импульс	43 нДж	30%	50%		20%
	75 нДж	50%	20%	10%	20%
Контроль		29%	40%	14%	17%

Показано, что способность к созреванию – т.е., достижения стадии МII – так же, как вероятность инактивации ооцитов, не существенно зависит от параметров воздействия. При увеличении параметров воздействия увеличивается количество разрушенных (деградировавших) ооцитов. При действии в ядрышко параметрами воздействия, превышающими порог образования парогозового пузыря и выходящими за предел неинвазивного воздействия, образуется парогозовый пузырь, превосходящий ядрышко по размеру и вызывающий его разрушение (Рис. 14).

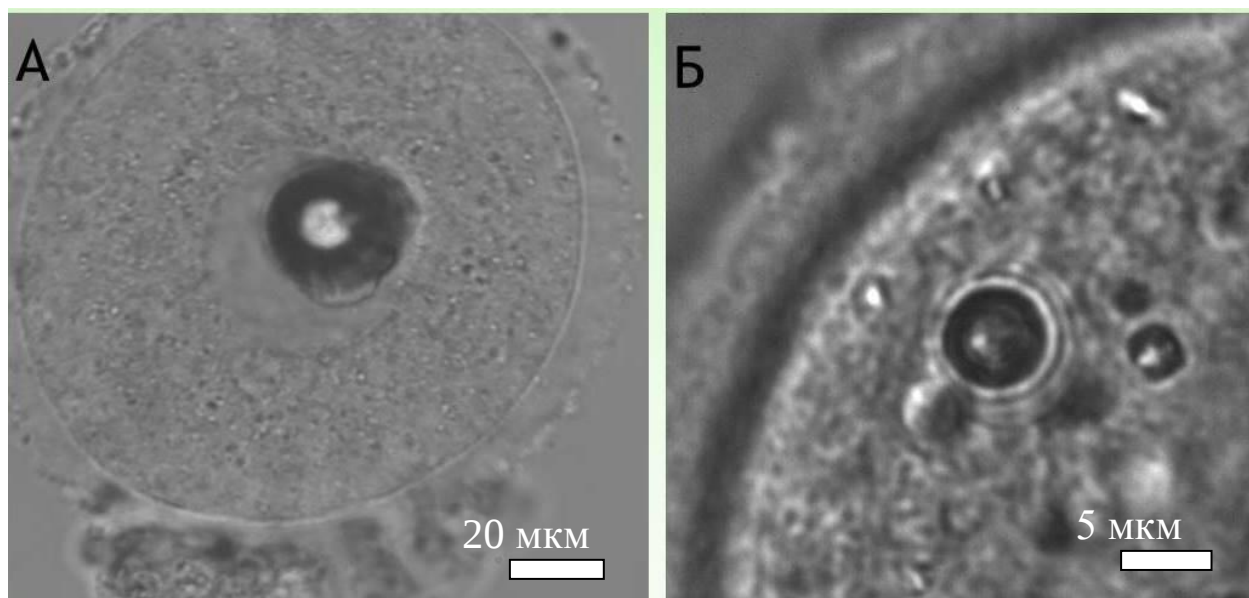


Рис. 14. Парогозовый пузырь в ядрышке. А – при действии цугом фемтосекундных импульсов с параметрами 2,25 нДж 600 мс; Б – при действии одиночным фемтосекундным импульсом с энергией 75 нДж.

Проводились опыты по инактивации генетического материала путем действия остросфокусированным лазерным излучением в ядро ооцитов мыши (Таблица 4). Лазерное излучение с энергиями в импульсе 0,5 нДж, 1 нДж и 2 нДж фокусировали в область хроматина, воздействие повторяли пятикратно, каждый раз облучая новую область. Длительность цугов составляла 15 мс, 30 мс и 60 мс. Всего было 9 опытных групп и одна контрольная.

Таблица 4. Инактивация генетического материала ооцита при воздействии цугами фемтосекундных импульсов на материал ядра. В таблице указаны % достижения стадии от общего числа ооцитов.

Параметры воздействия	GVBD	МII	GV	Деградация
0,5 нДж 15 мс	30%	45%	10%	15%
0,5 нДж 30 мс	35%	55%	10%	
0,5 нДж 60 мс	39%	43%	15%	3%
1 нДж 15 мс	42%	31%	15%	12%
1 нДж 30 мс	30%	23%	33%	14%
1 нДж 60 мс	40%	40%	20%	
2 нДж 15 мс	30%	47%	17%	6%
2 нДж 30 мс	40%	33%	13,5%	13,5%
2 нДж 60 мс	50%	40%	3%	7%
контроль	33%	55%	3%	9%

5. Детальное изучение морфо-биохимических изменений, происходящих в ооците/эмбрионе после фемтосекундного лазерного воздействия.

Исследование морфо-биохимических изменений, происходящих в ооцитах и эмбрионах после фемтосекундного лазерного воздействия.

Исследование морфо-биохимических изменений, происходящих в ооцитах и эмбрионах, изучали на процедуре фемтосекундного лазерного слияния клеток. Процедура слияния клеток в настоящее время проводится при помощи ряда методик, таких как слияние вирусом Сендай [1], химическое слияние (с использованием полиэтиленгликоля, ПЭГ) [2], электрослияние [3] и лазерное слияние [4]. Преимущество слияния при помощи лазера заключается, прежде всего, в том, что воздействие производится строго на область контакта и не затрагивает клетки целиком. Кроме того, только методика лазерного слияния позволяет сливать выбранные клетки в многоклеточной структуре [5].

Несмотря на то, что данная процедура широко известна, ряд вопросов до настоящего времени оставались неизученными. Известно, что двухклеточные эмбрионы после слияния образуют тетраплоидные бластоцисты [5]. В различных работах содержатся противоречивые данные по возникновению тетраплоидности. Утверждается, что ядра двухклеточных эмбрионов сливаются (лазерное слияние) [6], либо что ядра перед делением образуют общую метафазную пластинку (ПЭГ + электрослияние) [7]. Так же есть работа, где показано, что ядра эмбрионов не сливаются (электрослияние) [8].

Так же малоисследованным остается вопрос объединения и перемешивания компонентов клетки после слияния. Есть работа, в которой использовали краситель calcein, и показали, что перемешивания содержимого клеток при слиянии не происходит [9]. На этом данные по этому вопросу исчерпаны.

В данной работе получена новая информация о механизме тетраплоидизации при лазерном слиянии двухклеточных эмбрионов мыши, а так же изучены процессы перемешивания цитоплазматического материала при слиянии клеток на модели ооцитов.

Механизм формирования тетраплоидности при фемтосекундном лазерном слиянии.

Для исследования механизма формирования тетраплоидности использовали доимплантационные эмбрионы мыши на стадии двух клеток. Остросфокусированное лазерное излучение направляли в область контакта двух бластомеров. Параметры лазерного воздействия были: энергия в импульсе – 1 нДж, длительность цуга импульсов – 30 мс. Воздействие повторяли до образования парогазового пузыря. После воздействия эмбрионы культивировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37° в среде M16 (Sigma). Спустя 1-2 часа отбирали эмбрионы, в которых произошло слияние (две клетки объединились в одну) и пересаживали их в отдельную чашку. Слитые и контрольные эмбрионы поделили поровну, и в половину образцов добавили препарат колхицин, который разбирает микротрубочки и останавливает деление клетки на стадии метафазы. Таким образом, получилось 4 группы: слитые без колхицина, слитые с колхицином,

контроль с колхицином, контроль без колхицина. Эмбрионы культивировали с колхицином приблизительно 6 часов – до тех пор, пока слитые эмбрионы без колхицина не поделились. В этот момент все эмбрионы были окрашены флуоресцентным красителем Hoechst 33342 и были исследованы на флуоресцентном микроскопе (Рис. 1).

Эмбрионы (слитые и контрольные), обработанные колхицином, содержали метафазные пластинки; в эмбрионах без колхицина видны ядра. В слитом эмбрионе, обработанном колхицином, видны две метафазные пластинки на разных полюсах клетки; на изображении в фокус попала только одна из пластинок, вторая находилась в другой оптической плоскости (Рис. 15, А1, Б1). Слитый и поделившийся эмбрион содержит в каждой клетке по интерфазному ядру (Рис. 15, А2, Б2). Контрольный эмбрион, обработанный колхицином, содержит по одной метафазной пластинке в каждой клетке (Рис. 15, А3, Б3) и контрольный эмбрион без колхицина, перейдя на четырехклеточную стадию, содержит по одному ядру в каждой клетке (Рис. 15, А4, Б4). Таким образом, формирования общей метафазной пластинки, так же как и слияния ядер не было показано.

Полученные данные указывают на то, что тетраплоидность при фемтосекундном лазерном слиянии возникает по механизму «проскальзывания» митоза, описанному в литературе как один из возможных вариантов выхода из митотической катастрофы [10]. Очевидно, при слиянии клеток и формировании общей цитоплазмы ядра продолжают свой естественный клеточный цикл, удваивая количество ДНК в S-фазе, готовясь к митозу. Однако нормальное деление клетки нарушено слиянием; ядра формируют метафазные пластинки (каждое ядро формирует свою метафазную пластинку), и затем цитоплазматический материал разделяется пополам. Каждая новообразованная клетка содержит удвоенное количество генетического материала – тетраплоидный набор.

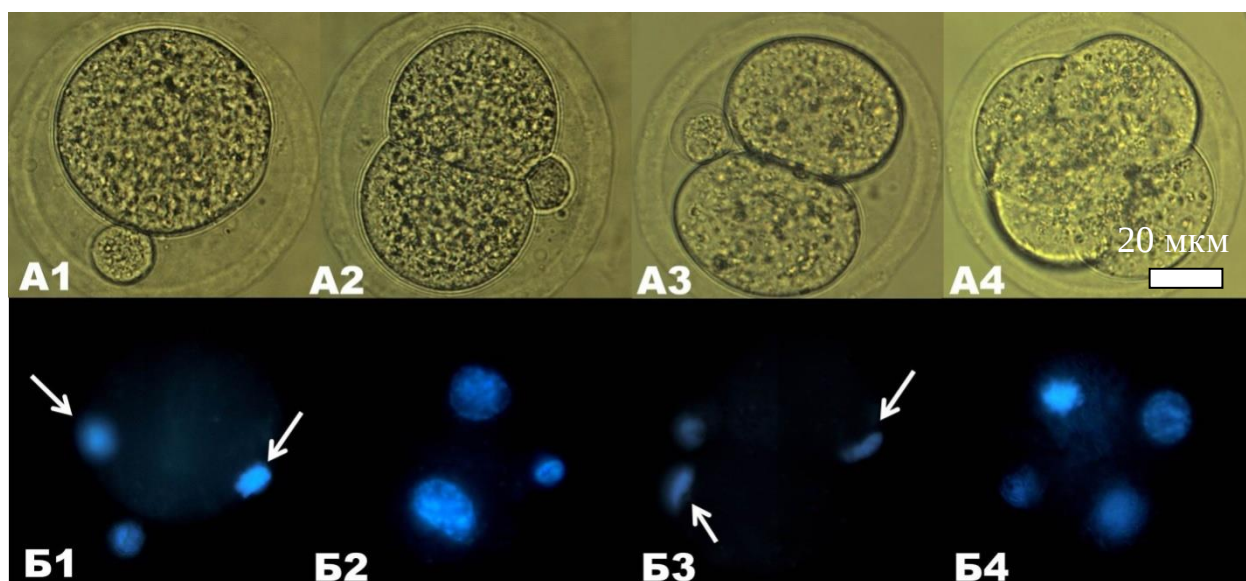


Рис. 15. Поведение ядер в эмбрионах. А – изображения в проходящем свете, Б – флуоресцентные изображения, окраска Hoechst 33342 на ДНК. Стрелки показывают на метафазные пластинки. 1 – слитый эмбрион с добавлением колхицина; 2 – слитый эмбрион без добавления колхицина; 3 – контрольный эмбрион с колхицином; 4 – контрольный эмбрион без добавления колхицина.

Обмен цитоплазматического материала при слиянии и делении клеток.

Для выполнения данного исследования была разработана специальная модельная система. Модельная система предполагала использование ооцитов от двух разных линий мышей: трансгенных мышей линии мышей C57BL/6-Tgn(ActbEGFP)10sbJY, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (greenfluorescenceprotein, GFP), и мышей линии C57Bl, клетки которых не содержат GFP. GFP в данном случае рассматривался как маркер гиалоплазмы – жидкой части цитоплазмы, содержащей воду, растворенные в ней вещества и небольшие белки, но не содержащую цитоскелет. Ооциты получали методикой суперовуляции и очищали от блестящей оболочки при помощи реагента гиалуронидазы.

Для создания пар «зеленых» и «обычных» ооцитов предварительно подготавливали чашки с микролунками. Лунки делали вручную, используя нагреваемый в пламени горелки капилляр. Чашку заполняли средой M2 с добавлением лектина (L8902, Sigma) – агента, вызывающего слипание клеток, в концентрации 40 мкг/мл. В каждую лунку помещали по одному «зеленому» и одному «обычному» ооциту (Рис. 16). В течение 15 минут ооциты формировали пару, и затем их использовали для эксперимента.

В область контакта ооцитов воздействовали остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением. Энергия в импульсе составляла 1 нДж и длительность экспозиции – 15 мс. Воздействие повторяли до образования парогазового пузыря. В результате воздействия ожидалось увидеть один из исходов: GFP равномерно перераспределится между клетками, либо GFP останется на исходном полюсе.

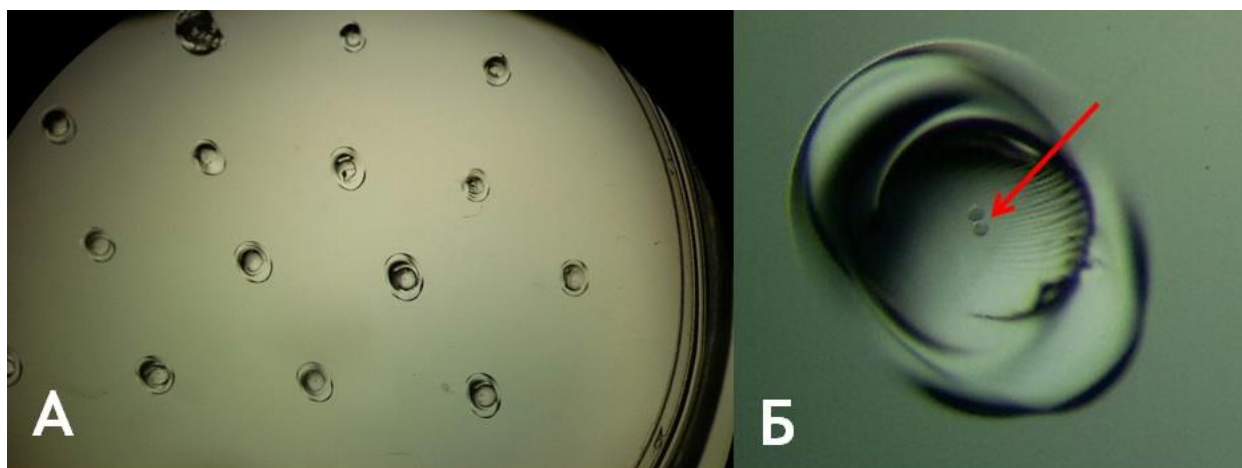


Рис. 16. А – общий вид чашки с микролунками; Б – пара ооцитов в микролунке (стрелка указывает на ооциты).

Оказалось, что перетекание GFP начинается сразу после действия фемтосекундным лазерным импульсом в область контакта. Перетекание начинается до того, как клетки объединят свою цитоплазму и плазматические мембраны (Рис. 17). Из 11 пар ооцитов в 8 парах происходило перетекание GFP, и в 3 парах оно отсутствовало. Из тех ооцитов, где перетекания не наблюдалось, не было ни одного случая слияния. Из 8 пар, в которых происходило перетекание, 4 пары слились и 4 сохранили исходную форму. Очевидно, в некоторых случаях парогазовый пузырь не нарушает целостность прилегающих друг к другу мембран, и в таком случае перетекания GFP не происходит; либо частично разрушает мембраны, но размера поры недостаточно для объединения цитоплазмы и плазматических мембран, а только лишь для перетекания гиалоплазмы – небольших, растворенных в воде молекул и белков.

Установлена динамика перетекания GFP через образованную парогазовым пузырем пору (Рис. 18). Перетекание GFP регистрировали при помощи флуоресцентной съемки. Изображения получали каждые 5 секунд. Исходя из полученных изображений считали средний сигнал люминесценции по выделенной области (в «зеленой» клетке и в «обычной» клетке). Установлено, что полное выравнивание уровня люминесценции происходит за время 500-600 секунд после лазерного воздействия. Зная время перетекания (500с) и расстояние перемещения (размер ооцита, 100 мкм), по формуле Эйнштейна-Смолуховского $\langle \bar{x} \rangle^2 = 2Dt$ можно рассчитать коэффициент диффузии GFP-белка в цитоплазме клетки: $D = 10^{-7}$. Этот коэффициент совпадает по порядку с коэффициентом диффузии белка в плазме крови (тоже 10^{-7}). Это означает, что перетекание гиалоплазмы клетки, которую в данной модели маркирует GFP, носит характер диффузии.

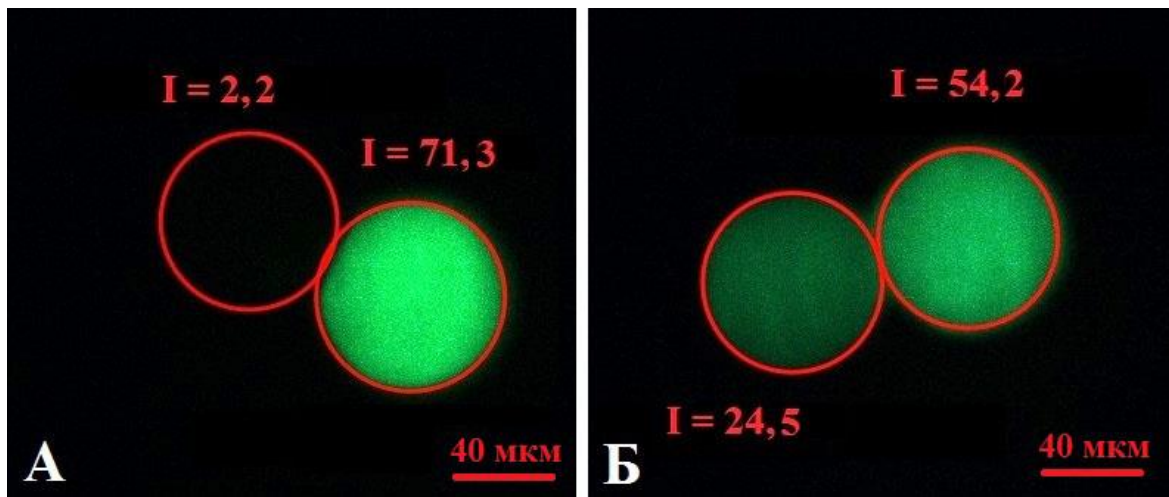


Рис.17. Перетекание GFP между ооцитами после воздействия остросфокусированным фемтосекундным лазерным излучением. А – изображение до начала воздействия; Б – изображение спустя 250 секунд после воздействия.

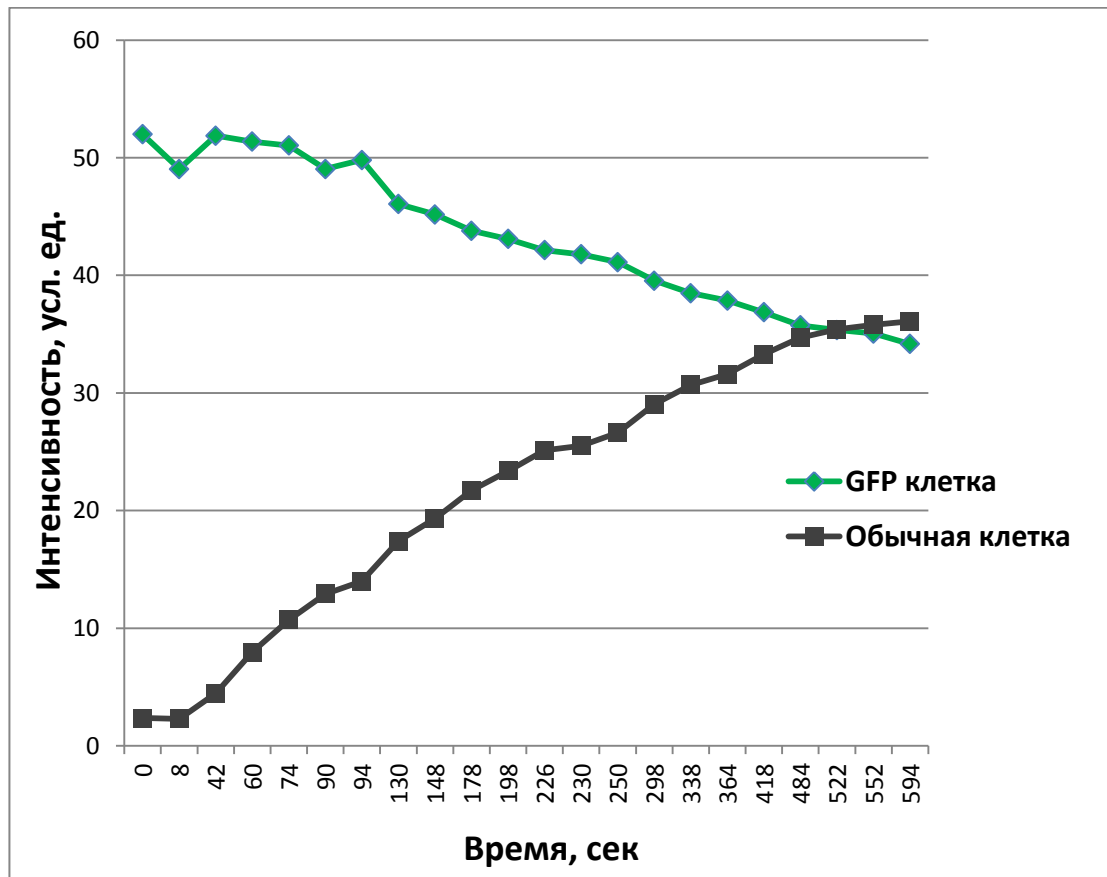


Рис. 18. Динамика перетекания GFP из «зеленой» клетки в «обычную».

Дополнительно был проведен эксперимент, целью которого было выяснить, что происходит с менее подвижным цитоплазматическим материалом двух ооцитов при их слиянии.

Методика.

Ооциты мыши на стадии пост-GV делились на две группы. Одна из групп окрашивалась красителем BODIPY при инкубации в растворе красителя с концентрацией 3 мкг/мл в течение 15 минут. Затем окрашенный и неокрашенный ооциты попарно помещались в каплю буфера PBS, приводились в соприкосновение иглой и склеивались лектином, который добавлялся в буферный раствор. Чашка с парой ооцитов в буферном растворе помещалась на предметный столик микроскопа Olympus IX71. Для слияния пары производилось лазерное воздействие по региону контакта между двумя ооцитами цугом фемтосекундных лазерных импульсов, сфокусированных объективом микроскопа (40x, 0.75N.A.) в область диаметром около 1.5 мкм. Параметры импульсов: длина волны 790 нм, длительность 30 фс, частота повторения 80 МГц, энергия импульса 2.7 нДж, длительность цуга 20 мс. После лазерного воздействия происходило слияние ооцитов в течение периода времени в десятки минут. Процесс слияния отслеживался с помощью последовательности флуоресцентных изображений, полученных на CMOS-видеокамере XIMEAxiQ, установленной на микроскопе. Возбуждение флуоресценции излучением диода излучением лазерного диода $\lambda=462$ нм (Nichia NDB 7675), возбуждающее излучение отсекалось спектральным фильтром Thorlabs FELH500. Время экспозиции на камере составляло 1 сек, период между кадрами 20 сек. Также до и после слияния снималось изображение ооцитов в проходящем свете.

Результаты

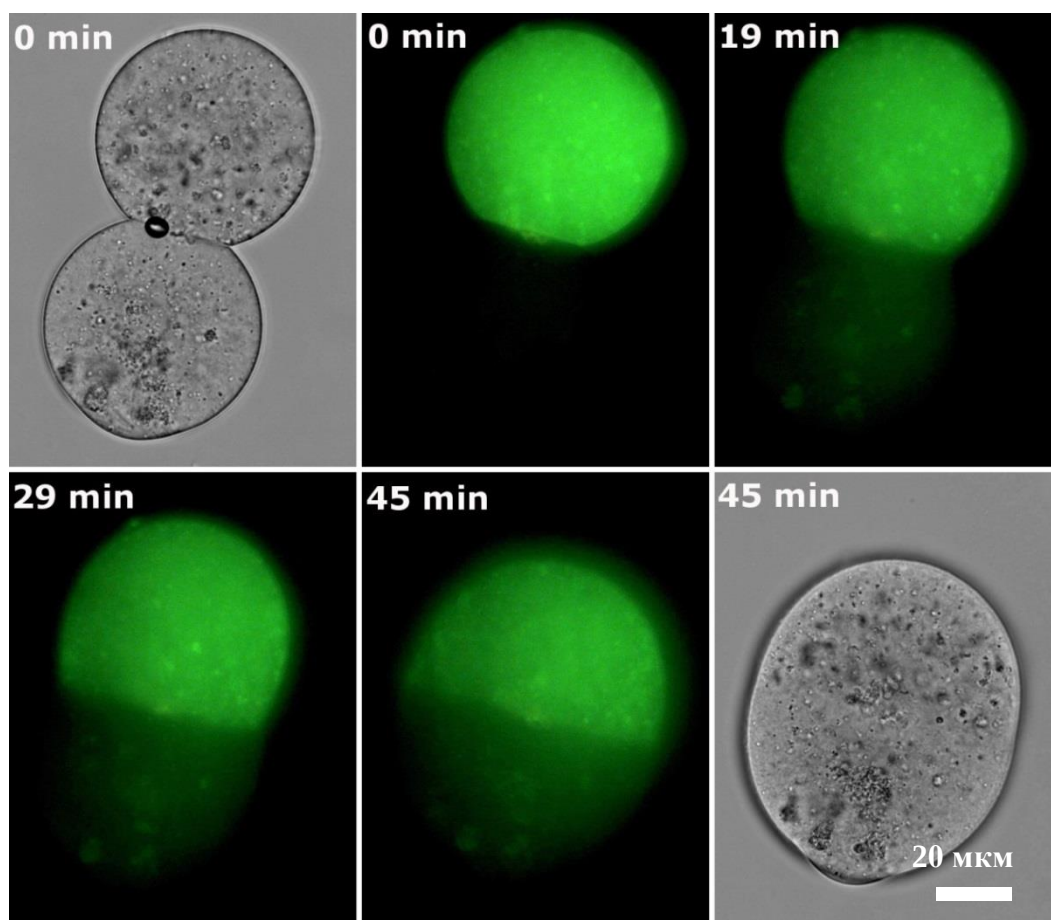


Рис. 19. Процесс слияния пары окрашенного и неокрашенного ооцита, изображения флуоресцентные и в проходящем свете. На кадрах указано время с начала слияния в минутах.

Основным результатом было то, что даже после слияния двух ооцитов, которое занимало время до часа, сохранялось деление цитоплазмы объединенной клетки на флуоресцирующую (содержащую BODIPY в большой концентрации) и нефлуоресцирующую части (Рис. 19). Появление слабой флуоресценции у неокрашенного ооцита являлось реакцией на лазерное воздействие, похожая реакция проявлялась в контрольной группе из пар ооцитов, не содержащих краситель. Этот результат указывает на то, что при слиянии клеток не происходит перемешивания цитоплазматического материала. Вместо этого в цитоплазме слившейся клетки остаётся две части, соответствующие исходным клеткам.

6.Дополнительные исследования по корректировкам основного плана проекта.

Оптическая ловушка (или оптический лазерный пинцет) способен захватывать и удерживать микро- и субмикроразмерные частицы за счет сил давления света на материальные объекты. Эти силы со стороны остросфокусированного лазерного луча образуют квазипотенциальное поле с выраженной ямой потенциала, которая выступает как оптическая ловушка. Перемещение лазерного фокуса в пространстве может сопровождаться перемещением захваченного объекта. Ловушка создавалась при фокусировке непрерывного излучения Ti:Sapphire лазера на длине волны 790 нм с поперечной модой Гаусса TEM_{00} . Фокусировку осуществляли объективом микроскопа 60x NA=0.7. Радиус перетяжки лазерного пучка равен 0.68 мкм. Средняя мощность лазерного излучения в предметной плоскости объектива составляла 260 мВт. Интенсивность лазерного излучения в перетяжке составляла $1.79 \cdot 10^7$ Вт/см². Длина волны 790 нм соответствует «окну прозрачности» биологического материала, коэффициент поглощения в этой области пренебрежимо мал. В опытах с манипулированием GV ооцитом при помощи оптического пинцета эффектов, связанных с повреждением объекта, не обнаружено.

Калибровка силы захвата оптическим пинцетом ядрышка GV ооцита (ЯПТ). Для калибровки сил захвата ядрышка (ЯПТ) оптическим пинцетом мы модифицировали методику калибровки, основанную на измерении сил гидродинамического трения Стокса. Фокус оптического пинцета позиционировали в ЯПТ ооцита. Оптическая ловушка с постоянной скоростью перемещалась в пространстве и увлекала за собой ЯПТ. ЯПТ смещалось внутри ооцита на ограниченное расстояние близкое к 6 мкм. Далее ЯПТ внутри ооцита останавливалось, встретив «внутреннюю преграду», которая, по-видимому, соответствовала ядерной оболочке. Усилие, приложенное от оптического пинета к ядрышку, передавалось всей клетке, что приводило к движению целого ооцита. Калибровку оптического пинцета позволила провести естественная адгезия к покровному стеклу кумулюсных клеток, окружающих ооцит. Кумулюсные клетки проявляли упругие свойства, так, после прекращения действия оптического пинцета ооцит возвращался в исходное положение. Ооцит смещали до критического значения близкого по величине к 10 мкм, когда силы упругого растяжения $F_{упр}$ становятся равными силе захвата

оптического пинцета $F_{\text{оп}}$ и попытка сдвинуть ооцит далее приводит к «срыву» оптического захвата. Из анализа динамики возвращения ооцита в исходное положение определена сила захвата. Динамика возвращения ооцита в исходное положение определяется упругой силой и силой гидродинамического трения Стокса: $Ma = F_{\text{упр}} - F_{\text{ст.тр.}}$. M – масса ооцита близка по величине к 4.6×10^{-10} кг. Ускорение a и скорость v ооцита измерены из анализа видеозаписи. Сила гидродинамического трения Стокса $F_{\text{ст.тр.}}$ равна $6\pi\eta Rv$, где η вязкость воды, R гидродинамический радиус ооцита с учётом зоны пеллюцида и его величина составляла 48 мкм. Динамика возвращения ооцита записывалась как видеоизображение. Минимальное время между кадрами съёмки равно $\Delta t = 0.1$ сек (обусловлено параметрами камеры). Из проведенных измерений была получена величина силы захвата пост-ядрышка (ЯПТ) оптическим пинцетом $F_{\text{оп}} = 7$ пикоНьютонов (пН).

Перемещение ЯПТ в ооците и вязкость среды окружающей ЯПТ. При силе захвата $F_{\text{оп}} = 7$ пН смещение ядрышка составило величину около 6 мкм за время 46 сек. Движение ЯПТ происходило с приблизительно постоянной скоростью 0.13 мкм/сек, как движение в вязкой среде, т.е. сила трения Стокса уравнивала силу оптического пинцета. Исходя из уравнения $F_{\text{ст.тр.}} = 6\pi\eta rv$, r радиус ЯПТ, было оценено значение вязкости $\eta = 0,55$ Па*сек окружающей ЯПТ среды (содержимого ядра). Эта вязкость приблизительно в 1000 раз превышает вязкость воды. Таким образом, можно заключить, что характер движения ЯПТ можно рассматривать, как движение в вязкой среде с коэффициентом вязкости $\eta = 0,55$ Па*сек в области, ограниченной границей ядра.

Деформация ядрышка в ооците, упругость ядрышка. Сила оптического пинцета, приложенная к ядрышку, приводит к его деформации. Эта деформация ЯПТ является полностью упругой. После снятия приложенной силы ЯПТ возвращается к исходной форме. При силе $F_{\text{оп}} = 7$ пН было оценено растяжение ЯПТ, которое составило $x = 1.9$ мкм. Отсюда была получена оценка величины коэффициента упругости $k = 3.7$ пН/мкм, где $F_{\text{упр}} = kx$. Эти данные указывают, что ЯПТ испытывает упругие деформации при растяжении силой оптического захвата со стороны оптического пинцета. Коэффициент упругости ядрышка оценивается $k = 3.7$ пН/мкм. ЯПТ не проявляет признаков пластической деформации.

В целом, исследования, проведенные нами в этой части работы, показали, что на стадии GV ооцита механические свойства ЯПТ описываются как упругие с коэффициентом

упругости $k = 3.7$ пН/мкм. При механическом воздействии интенсивного кавитационного пузырька наблюдается разрыв материала ЯПТ, что указывает на существование предела прочности для упругой деформации ЯПТ, который пока определить не представляется возможным.

3.6.1.5. Количество научных работ по Проекту, опубликованных за период, на который предоставлен грант (цифрами) в соавторстве с зарубежными участниками

2

3.7. Участие в научных мероприятиях по тематике Проекта за период, на который предоставлен грант (каждое мероприятие с новой строки, указать названия мероприятий и тип доклада)

1. PHOENIX 2017 – International medical student`s conference, Mangalore, India, устный доклад.

2. VIII Съезд Российского фотобиологического общества, п. Шепси, РФ, устный доклад.

3. TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS, Нижний Новгород, РФ устный доклад.

4. Advanced Laser Technology, Busan, Korea, устный доклад.

5. 59-я научная конференция МФТИ, устный доклад.

3.8. Участие в экспедициях по тематике Проекта, за период, на который предоставлен грант (указать номера проектов)

нет

3.10. Адреса (полностью) ресурсов в Интернете, подготовленных авторами по данному проекту, например, <http://www.somewhere.ru/mypub.html>

<http://fs.chph.ras.ru/report>

3.11. Библиографический список всех публикаций по Проекту, опубликованных за период, на который предоставлен грант, в порядке значимости: монографии, статьи в научных изданиях, тезисы докладов и материалы съездов, конференций и т.д.

1. Gulina A., Nadtochenko V., Astafiev A., Pogorelova V., Rtimie S. Pogorelov A., "Correlating microscopy techniques and ToF-SIMS analysis of fully grown mammalian oocytes", The Royal Society of Chemistry, N.-13, V.-141, 4121-4129, 2016.

2. Сметанина И.Г., Татаринова Л.В., Кривохарченко А.С., "Влияние низких концентраций гипоксантина на созревание и оплодотворение ооцитов крупного рогатого скота in vitro", Известия Российской Академии Наук - серия биологическая, № 5, Т. – 44, 489-492, 2017

3. Osychenko A. A., Zalessky A. D., Kostrov A. N., Ryabova A. V., Krivokharchenko A. S., Nadtochenko V. A., "Femtosecond laser surgery of two-cell mouse embryos: effect on viability development and tetraploidization", J. Biomed. Opt. 22(12) 125006(2017)

4. Осыченко А.А., Залесский А.Д., Астафьев А.А., Рябова А.В., Надточенко В.А., «Создание химерных животных и чистых линий животных при помощи оптического-лазерного манипулятора», Труды 59-й научной конференции МФТИ с международным участием, Москва, 148-149, 2016 г.

5. Optical manipulator approach for chimeric and germ line animal production. Osychenko A.A., Zalessky A.D., Ryabova A.V., Nadtochenko V.A. PHOENIX 2017 – International medical student`s conference, Mangalore, India. 22-26 of March, 2017. Abstractbook, p. 155.

6. Noninvasive monitoring of living early mammalian embryo development (*Invited*) A.V. Karmenyan, A.S. Krivokharchenko, E.V. Perevedentseva, H.-H. Chang, Ashek-i-Ahmed, L.-C.Liu, and C.-L. Cheng, VI International Symposium TOPICAL PROBLEMS OF BIOPHOTONICS 28 July – 03 August, 2017, St.-Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia Proceedings, Nizhny Novgorod, 2017, p. 166

7. Spectroscopic study of NP influence on in vitro development of preimplantation mouse embryos (*Invited*). A. Karmenyan, A. Krivokharchenko, H. H. Chang, E. Perevedentseva, L.C. Liu, M. Kormacheva, Ashek-I-Ahmed, C. L. Cheng. ALT-17, p.171, ThC-II-1., 2017

8. Осыченко А. А., Залесский А. Д., Шахов А. М., Надточенко В. А., «Возможности лазерной нанохирουργии для работы с биологическими объектами», VIII Съезд РФО, тезисы, 106., 2017 г.

9. Шахов А. М., Осыченко А.А., Сырчина М. С., Астафьев А. А., Айбуш А. В., «Создание флуоресцентных центров в ооцитах мыши с помощью фемтосекундных лазерных импульсов», VIII Съезд РФО, тезисы, 112. 2017 г.

3.12. Библиографический список совместных публикаций (в соавторстве с зарубежным партнером по проекту) за период, на который предоставлен грант: монографии и статьи в научных изданиях с указанием импакт-фактора журнала по базе данных Web of Science (исключая тезисы докладов и материалы съездов, конференций и т.д.)

нет

3.13. Приоритетное направление развития науки, технологий и техники РФ, которому, по мнению исполнителей, соответствуют результаты данного проекта

Наука о жизни

3.14. Критическая технология РФ, которой, по мнению исполнителей, соответствуют результаты данного проекта

Технологии биоинженерии

3.15. Основное направление технологической модернизации экономики России, которому, по мнению исполнителей, соответствуют результаты данного проекта

Медицинские технологии, прежде всего диагностическое оборудование, а также лекарственные средства.

3.16. Направление из Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации

3.17. Преимущества, полученные в результате международного сотрудничества (использование оборудования, наработок, доступ к уникальным объектам и условиям и т.д.)

Institution/Department: Tzu-Chi University располагает значительными возможностями для проведения иммуноцитохимических исследований и генетического анализа методами RT-PCR, что важно для полноты исследований проекта. Команда участников проекта Тайваня имеет пионерские результаты в области биофотоники, в частности, в применении оптического захвата для высокоточных измерений взаимодействия белок-белковых взаимодействий, протеин-ДНК взаимодействий и взаимодействий бактериальной клетки с окружающей средой, межклеточных (клетка-мембрана) и внутриклеточных локальных вязкостно-эластичных свойств индивидуальной клетки.