

Использование флуоресцентного красителя для управления лазерным поглощением в фемтосекундной лазерной нанохирургии клеток

Д. Ю. Мартиросян⁺, А. А. Осыченко⁺¹⁾, А. Д. Залесский⁺, О. Т. Калинина⁺, У. А. Точило⁺, Ю. А. Федотов^{+*},
М. С. Сырчина⁺, В. А. Надточенко⁺

⁺ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

* Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр Российской Федерации –
Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна”, 123098 Москва, Россия

Поступила в редакцию 25 февраля 2023 г.

После переработки 2 апреля 2023 г.

Принята к публикации 24 апреля 2023 г.

Использование специфических флуоресцентных красителей способно снизить порог ионизации меченых клеточных структур при фемтосекундном лазерном воздействии. Эта особенность может применяться в рамках лазерной нанохирургии клетки. В этой работе мы используем краситель BioTracker Blue в качестве фотосенсибилизатора, чтобы получить точный контроль абляции цитоплазматической мембраны фемтосекундным лазером и облегчить слияние клеток, индуцированное лазером. Мы обнаружили, что BioTracker Blue (366/441) увеличивает эффективность поглощения лазера с длиной волны 760 и 730 нм. Однако повышение эффективности поглощения, обусловленное окрашиванием BioTracker Blue, не улучшало эффективность слияния клеток в модельных системах: парах суспендированных клеток A549, ооцитов и их полярных телец, двухклеточных эмбрионов.

DOI: 10.31857/S1234567823110125, EDN: djxuxo

Появление фемтосекундных источников лазерного излучения стало ключевым фактором развития биофотоники, а именно, лазерной нанохирургии клетки. В настоящее время фемтосекундная лазерная нанохирургия применяется во многих областях, в том числе и в биомедицине [1]. Одной из наиболее значительных задач является клонирование животных и заместительная митохондриальная терапия человека [2, 3]. Оба этих подхода требуют переноса ядра, который обычно осуществляется путем инъекции донорного ядра [4–6] или слияния клеток (электрослияние [7, 8], слияние при помощи вируса [9–11], химическое слияние с применением полиэтиленгликоля). [12]). Лазерное слияние клеток может быть альтернативой традиционным методам слияния. Самое главное преимущество - это возможность воздействовать лазером непосредственно на контакт клеток, при этом сами клетки остаются практически без воздействия.

Взаимодействие фемтосекундного лазерного излучения с биологическим материалом клетки носит сложный, нелинейный (по интенсивности) и случай-

ный (зависит от точной локализации воздействия) характер. В общем случае мощность поглощаемого излучения (P) может быть описана следующей зависимостью: $P = \sigma_n \cdot I^n$, где I – пиковая интенсивность лазера, σ_n – сечение поглощения при n -фотонном процессе поглощения, n – степень нелинейности процесса, которая указывает на количество одновременно поглощенных фотонов лазерного излучения. Для несущей длины волны фемтосекундного излучения 800 нм при воздействии на клеточный биоматериал это число лежит в пределах 3–6 [13]. Из формулы видно, что малое изменение интенсивности фемтосекундного лазерного излучения приводит к значительному изменению поглощаемой мощности из-за нелинейного характера процесса поглощения.

Стоит отметить, что при поглощении фемтосекундного лазерного излучения в биоматериале могут происходить химические превращения (образование светопоглощающих центров), что, в свою очередь, может приводить к изменению оптических свойств и изменению степени нелинейности поглощения до 1, т.е. процесс поглощения может стать линейным по интенсивности лазерного излучения [14–16]. Это значительно усложняет контроль процесса деструкции

¹⁾e-mail: alina.chemphys@gmail.com

биоматериала. И далее по цепочке изменяется вероятность образования светопоглощающих центров, что приводит к еще более вариабельному результату разрушения.

Одним из подходов к получению более предсказуемого и контролируемого результата фемтосекундной лазерной хирургии является использование специфичных по локализации светопоглощающих агентов. В качестве таких агентов могут выступать флуоресцентные красители, квантовые точки, наночастицы и др. [17–19]. Для нанохирургии флуоресцентные красители выбирают исходя из двух соображений: 1) они специфически связываются со структурой клетки, на которую направлено воздействие (ДНК, клеточная мембрана и т.д.); 2) спектр поглощения красителя обеспечивает двухфотонное или однофотонное поглощение фемтосекундного лазерного излучения (степень нелинейности $n = 2$ и 1 соответственно). Благодаря такому подходу удается: 1) снизить порог интенсивности лазерного излучения для разрушения выделенной клеточной структуры; 2) повысить степень локализации воздействия, поскольку уменьшенная интенсивность излучения с меньшей вероятностью будет поглощаться неокрашенным материалом клетки, 3) увеличить величину поглощаемой мощности лазера, поскольку $\sigma_2 \gg \gg \sigma_3 \gg \sigma_4 \dots$. Эффективность такого подхода продемонстрирована в нашей работе по энуклеации ооцитов мышей, окрашенных ДНК-связывающим красителем Hoechst 33342, с использованием фемтосекундного лазерного излучения [20].

В данной работе мы продемонстрировали еще одну возможность управления процессом разрушения биологического материала за счет особенностей спектра поглощения флуоресцентного красителя. Мы предполагаем, что флуоресцентный краситель BioTracker Blue, связывающийся с липидами, может способствовать усилению поглощения лазерного излучения цитоплазматической мембраной и тем самым способствовать облегчению слияния клеток. Основываясь на спектре возбуждения красителя BioTracker Blue (максимум – 366 нм), мы предполагаем, что при использовании фемтосекундного лазера с длиной волны в диапазоне 600–800 нм может происходить двухфотонное поглощение. В данной работе мы изучаем влияние BioTracker Blue на эффективность поглощения фемтосекундного лазера с длиной волны 730, 760 и 790 нм цитоплазматической мембраной на модельной системе: суспендированных клетках аденокарциномы человека (A549). Мы предполагаем, что индикатором лазерного поглощения является парогоазовый пузырь, по-

скольку он может возникнуть только при существенном локальном повышении температуры и давления [13]. Стоит отметить, что лазерное поглощение может происходить и без возникновения парогоазового пузыря, но для его появления требуется достаточное количество поглощенной энергии. В данных экспериментах парогоазовый пузырь появлялся как в окрашенных, так и в контрольных образцах. Сам факт появления парогоазового пузыря в эксперименте, его характеристики, такие как время жизни и размер, напрямую связаны с количеством поглощенной энергии. Кроме того, в данной работе изучали влияние красителя на эффективность слияния на различных модельных объектах: парах суспендированных клеток A549, ооцитах мыши и их полярных тельцах, двухклеточных эмбрионах мыши.

Для проведения экспериментов использовались фемтосекундные лазерные импульсы (частота следования 80 МГц, энергия до 30 нДж), генерируемые перестраиваемым лазером (Chameleon, Coherent). Средняя мощность излучения перед объективом микроскопа не превышала 400 мВт и регулировалась с помощью поляризатора и полуволновой пластинки. Фемтосекундные импульсы были заведены в инвертированный микроскоп (Olympus IX71) с помощью зеркала (10B20UF.25, Newport), установленного под углом 45° , а затем сфокусированы объективом микроскопа (LUCPlanFLN 60x 0.7 NA, Olympus) на объект изучения. Лазерный луч полностью заполнял входной зрачок объектива. Длительность фемтосекундных импульсов измерялась в предметной плоскости микроскопа с помощью автокоррелятора (Авеста-Проект АА-М) и составляла 100 фс. Общая продолжительность экспозиции контролировалась с помощью механического затвора (SH05, Thorlabs). Частота повторения фемтосекундных лазерных импульсов была настроена с помощью системы выбора импульсов (Pulse Select, APE) до 20 кГц в экспериментах по слиянию клеток A549. Фиксацию изображения и наблюдение за объектами воздействия осуществляли с помощью камеры XIMEA xiQ MQ013MG-ON или XIMEA xiD MD061CU-SY, установленной на микроскопе.

В работе использовали культуру раковых клеток человека A549 (аденокарцинома легкого), полученную от АТСС (Манассас, Вирджиния, США). Протокол ведения клеточной культуры описан в работе [21]. Для лазерных экспериментов клетки, растущие в чашке Петри, обрабатывали 0.25 % раствором трипсина (P034, ПанЭко), центрифугировали 5 мин в микропробирках Eppendorf, супернатант удаляли,

а осадок, содержащий клетки, ресуспендировали в DMEM (11320033, Thermo Fisher Scientific).

Также в экспериментах использовали ооциты и эмбрионы, полученные от самок мышей линии C57Bl/6 возрастом от 6 до 8 недель. Протокол получения двухклеточных эмбрионов описан в работе [22]. Для получения ооцитов со вторым полярным тельцем применяли гаплоидную партеногенетическую активацию путем инкубации ооцитов в среде HTF (MR-070-D, EmbryoMax) с добавлением 5 мМ хлорида стронция (439665, Sigma-Aldrich) и 2 мМ EGTA (E3889, Sigma-Aldrich) в CO₂-инкубаторе с 5 % CO₂ и 37 °С в течение 6 ч, как описано S. Kishigami и T. Wakaуama [23]. Эмбрионы и ооциты культивировали в CO₂-инкубаторе с 5 % концентрацией углекислого газа при температуре 37 °С в KSOM (MR-121-D, EmbryoMax) в четырехлуночных планшетах (179830, Nunc).

Во всех экспериментах объекты помещали на покровное стекло толщиной 0.17 мм (Heinz Hegez) в капле среды. Лазерные манипуляции с ооцитами и эмбрионами проводили в среде M2 (M7167, Sigma), а после лазерной обработки объекты культивировали в CO₂-инкубаторе в KSOM. Эксперименты с ресуспендированными клетками A549 проводили в среде DMEM. Во избежание высыхания, клетки помещали в специальную камеру, состоящую из двух покровных стекол со вставками толщиной около 0.5 мм.

Флуоресцентное окрашивание красителем BioTracker 400 Blue Cytoplasmic Membrane Dye (SCT109, Sigma Aldrich) выполняли следующим образом. Перед началом работы готовили рабочий раствор красителя в соответствии с протоколом, предоставленным Sigma Aldrich: перемешивали 5 мкл красителя и 5 мкл буфера на водяной бане с температурой порядка 50 °С. Полученный раствор использовали в соотношении 10 мкл на 1 мл среды. Клетки, эмбрионы и ооциты окрашивали в течение 20 мин в CO₂-инкубаторе и затем сразу использовали в экспериментах (без промывки). Флуоресцентную визуализацию проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 980 (Carl Zeiss Microscopy, Йена, Германия), 20-кратного объектива Plan-Apochromat (NA = 0.8). Объекты помещали в каплю среды M2 на покровное стекло толщиной 0.17 мм (Zeiss). Однофотонное возбуждение осуществлялось лазером с длиной волны 405 нм. Флуоресценцию регистрировали в диапазоне 413–500 нм.

Для исследования частоты появления парогозовых пузырей в клетках A549 использовали фиксированную энергию импульса 7 нДж для всех длин волн

(790, 760 и 730 нм). Воздействие проводилось однократно, и фиксировался факт появления или отсутствия парогозового пузыря. Для каждой экспериментальной группы было выполнено 300 повторов. Лазер фокусировали на область контакта (слипания) клеток.

Для экспериментов по слиянию клеток параметры лазерного воздействия были выбраны таким образом, чтобы не превышать порог образования парогозового пузыря (значение порога принимается за вероятность появления пузыря в 50 %). С учетом результатов предыдущего этапа работы для клеток A549 были установлены параметры лазерной обработки: для 790 нм – энергия в импульсе 3.2 нДж, 5 повторов на одну пару клеток; для 760 нм – энергия импульса 2.7 нДж, 3 повтора на одну пару клеток; для 730 нм – энергия в импульсе 1.9 нДж, 1 повтор на одну пару клеток. Такой набор параметров лазерного воздействия (энергия импульса, число повторов) для различных длин волн должен был скомпенсировать разницу в частоте образования пузырьков и повысить жизнеспособность клеток после лазерного воздействия. Эксперименты по слиянию двухклеточных эмбрионов мыши и слиянию ооцита с полярным тельцем проводили с частотой повторения импульсов 80 МГц, энергией импульса 0.8 нДж и длительностью пуга 30 мс. Лазер фокусировали на области контакта между двумя клетками, воздействие повторялось до образования первого парогозового пузыря.

Нами была измерена эффективность поглощения лазерного излучения клетками карциномы A549 с флуоресцентным красителем или без него (рис. 1a, b). О том, что имело место лазерное поглощение, свидетельствовало образование парогозового пузыря. Максимум поглощения BioTracker Blue составляет 366 нм, спектр этого красителя показан на рис. 1c. В данной работе использовались длины волн лазера 790, 760 и 730 нм, что соответствует двухфотонному поглощению на длинах волн 395, 380 и 365 нм. Теоретически, поглощение BioTracker Blue должно увеличиваться при уменьшении длины волны с 790 до 730 нм. При воздействии фемтосекундного лазера мог образовываться парогозовый пузырь; типичный парогозовый пузырь показан на рис. 1d. Частота появления парогозового пузыря возрастала с уменьшением длины волны излучения фемтосекундного лазера от 790 до 730 нм как в окрашенных, так и в неокрашенных клетках (рис. 1e). Частота возникновения пузырей в окрашенных клетках была выше, чем в неокрашенных, при длинах волн 730 и 760 нм. Средний диаметр пузырька (рис. 1f) был значительно выше в окрашенных

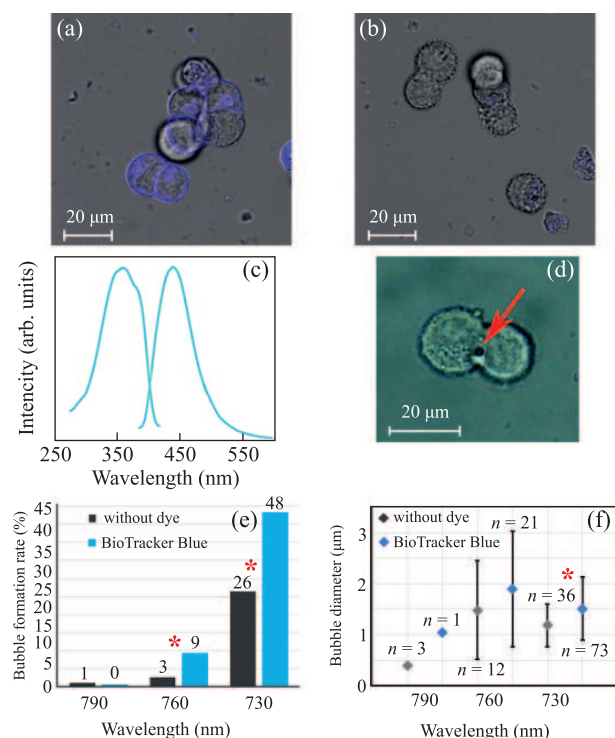


Рис. 1. (Цветной онлайн) (a), (b) – Конфокальные изображения клеток аденокарциномы A549, окрашенных BioTracker Blue (a) и не окрашенных (b). (c) – Спектры возбуждения/испускания BioTracker Blue. (d) – Парогазовый пузырек (показан стрелкой) в месте контакта двух клеток. (e) – Частота появления пузырьков в зависимости от длины волны в окрашенных и контрольных клетках (* $p < 0.01$; точный критерий Фишера). (f) – средний диаметр пузырьков в окрашенных и контрольных клетках (n – количество пузырьков, усы показывают абсолютную ошибку, * $p < 0.01$; T-тест)

клетках при 730 нм ($p = 0.03$; T-тест), а при 760 нм достоверной разницы не обнаружено ($p = 0.15$; T-тест).

Мы обнаружили, что вероятность появления парогазового пузыря возрастала, если применялся краситель. Это указывает на увеличение степени поглощения излучения, которое наиболее заметно при длине волны 730 нм, что соответствует максимуму двухфотонного возбуждения BioTracker Blue. Таким образом, как и ожидалось, краситель повысил эффективность лазерного поглощения – вероятно, за счет снижения степени нелинейности до двухфотонного процесса.

Затем мы изучили влияние красителя BioTracker Blue на вероятность слияния клеток. В этих экспериментах использовали три типа модельных объектов: пары суспендированных клеток A549 (табл. 1), ооциты с полярными тельцами (табл. 2) и двухклеточные

эмбрионы (табл. 3). Во всех сериях экспериментов применяли лазерное излучение с длинами волн 790, 760 и 730 нм и изучали эффективность слияния в образцах с окрашиванием или без окрашивания (контроль). В результате лазерного воздействия мы наблюдали три возможных последствия (рис. 2): слияние клеток, разрушение клеток или отсутствие эффекта (объекты не слились и остались целыми). Для оценки жизнеспособности клеток A549 мы применяли пропидиум йодид (P1304MP, Invitrogen) в конечной концентрации 10 мкМ (рис. 3). Клетки визуализировали под конфокальным микроскопом Carl Zeiss LSM 980 при помощи лазера с длиной волны 488 нм. Флуоресценцию пропидиум йодида регистрировали в диапазоне 550–700 нм.

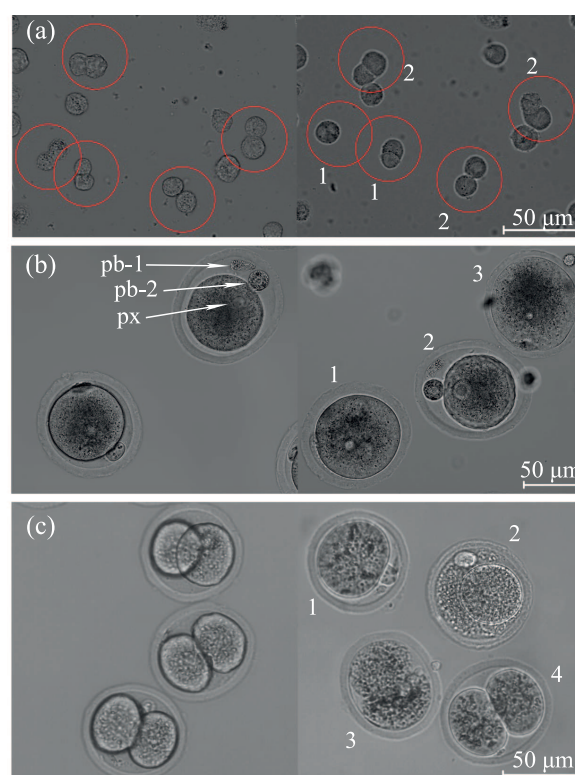


Рис. 2. (Цветной онлайн) (a) – Суспендированные клетки A549. Слева – сразу после лазерного воздействия, справа – через 40 мин после лазерного воздействия (1 – слившиеся клетки, 2 – неслившиеся клетки). (b) – Гаплоидные эмбрионы мыши до (слева) и после (справа) лазерного воздействия (px – пронуклеус, pb-1 – первое полярное тельце, pb-2 – второе полярное тельце, 1 – слившийся ооцит, 2 – не слившийся ооцит, 3 – разрушенный ооцит). (c) – Двухклеточные эмбрионы мыши до (слева) и после (справа) лазерного воздействия (1 – слитый эмбрион, 2 – эмбрион с разрушением одного blastomera, 3 – полностью разрушенный эмбрион, 4 – не слитый эмбрион)

Таблица 1. Слияние клеток A549

Длина волны	Не окрашенные (контроль)		BioTracker Blue	
	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> пар)	Другое	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> пар)	Другое
790 нм	3/43 (21%)	32 не слитых, 8 разрушенных	2/47 (22%)	29 не слитых, 6 разрушенных
760 нм	4/40 (10%)	30 не слитых, 6 разрушенных	3/44 (7%)	36 не слитых, 5 разрушенных
730 нм	3/45 (7%)	36 не слитых, 6 разрушенных	3/47 (6%)	32 не слитых, 12 разрушенных

Таблица 2. Слияние ооцитов и полярных телец

Длина волны	Не окрашенные (контроль)		BioTracker Blue	
	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> ооцитов)	Другое	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> ооцитов)	Другое
790 нм	3/28 (10%)	20 не слитых, 5 разрушенных	6/35 (17%)	18 не слитых, 11 разрушенных
760 нм	3/31 (10%)	23 не слитых, 5 разрушенных	4/29 (14%)	14 не слитых, 11 разрушенных
730 нм	8/33 (24%)	9 не слитых, 16 разрушенных	13/41 (32%)	10 не слитых, 18 разрушенных

Мы сравнили эффективность слияния между разными экспериментальными группами (в зависимости от длины волны и присутствия красителя). Точный критерий Фишера не выявил достоверной разницы между вероятностью слияния во всех экспериментальных группах ($p > 0.05$ во всех парах сравнения). Мы не обнаружили влияния окрашивания BioTracker Blue, а также влияния длины волны на эффективность слияния во всех экспериментах со всеми нашими модельными объектами: клетками аденокарциномы (рис. 2а), ооцитами и их полярными тельцами (рис. 2b) и двухклеточными эмбрионами мыши (рис. 2с).

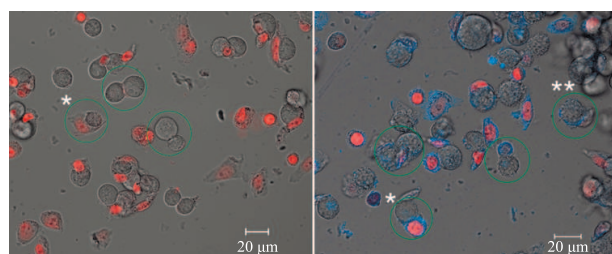


Рис. 3. (Цветной онлайн) Клетки A549 через 1 ч после лазерного воздействия. Справа – клетки, окрашенные BioTracker Blue, слева – клетки без окрашивания. Обведены пары клеток, которые подвергались воздействию лазером, * – разрушенные клетки, ** – слившиеся клетки. Красный цвет свидетельствует о люминесценции пропидидум йодида, локализованного в ядрах поврежденных клеток

Исследование, проведенное Kuetemeyer K. et al., предполагает, что успешное слияние клеток сопровождается формированием парагазового пузыря [24]. В нашей предыдущей работе мы также обнаружили, что парагазовый пузырь необходим для слияния двухклеточных эмбрионов мыши под действием фемтосекундного лазера с длиной волны 800 нм [22]. Предполагается, что пузырь перфорирует плазматическую мембрану клетки [25] и таким образом инициирует слияние.

В текущей работе мы выявили, что ни присутствие красителя, ни смена длины волны не смогли повысить вероятность слияния, несмотря на увеличение частоты появления парагазовых пузырей. Отметим, что необходимость в парагазовом пузыре для слияния клеток зависит так же и от свойств объекта. Например, некоторые пары клеток A549 слились даже без пузыря, но двухклеточные эмбрионы без парагазового пузыря не сливались совсем. Следует отметить, что природа и свойства объекта также являются важным фактором эффективности слияния клеток. Например, что касается двухклеточных эмбрионов, линия и возраст мышей способны влиять на вероятность слияния бластомеров, индуцированного лазером [26]. Что касается клеток в суспензии, то мы ранее показали, что способность клеток к слиянию зависит даже от протокола приготовления [27].

Способность индуцировать слияние клеток без пузырька показана Gong J. et al. [28]. Авторы описывают механизм слияния, индуцированного фемто-

Таблица 3. Слияние двухклеточных эмбрионов

Длина волны	Не окрашенные (контроль)		BioTracker Blue	
	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> эмбрионов)	Другое	Слияние (<i>N</i> слитых/ <i>N</i> эмбрионов)	Другое
790 нм	15/40 (37 %)	10 не слитых, 2 – разрушен один бластомер, 12 – полностью разрушены	24/50 (48 %)	22 не слитых, 1 – разрушен один бластомер, 3 – полностью разрушены
760 нм	22/40 (55 %)	18 не слитых, 1 – полностью разрушен	24/43 (55 %)	23 не слитых, 4 – разрушен один бластомер, 1 – полностью разрушен
730 нм	23/40 (57 %)	14 не слитых, 3 – полностью разрушены	17/41 (41 %)	19 не слитых, 3 – разрушен один бластомер, 2 – полностью разрушены

секундным лазером, основываясь на повышении активности молекул фосфолипидов с последующей дезорганизацией наружных слоев мембран и последующим их слиянием [28]. Известно, что в результате многофотонной ионизации образуется плазма низкой плотности, и она состоит из радикалов и свободных электронов [13]. Краситель, связанный с цитоплазматической мембраной, может продуцировать дополнительные свободные радикалы за счет двухфотонного поглощения. Возможно, окисление и/или распад липидов в результате фотолиза в области лазерной обработки также может нарушать образование пор и слияние клеток.

Следует отметить, что все флуоресцентные красители имеют специфические спектры поглощения. Это означает, что эти спектры неоднородны и разные длины волн электромагнитного излучения поглощаются с разной эффективностью. С точки зрения нелинейности процесса поглощения лазерного излучения, использование флуоресцентного красителя позволило снизить показатель нелинейности n . И в то же время, мы получаем возможность изменять значение σ в формуле $P = \sigma \cdot I^n$ за счет изменения длины волны лазерного излучения. Современные источники фемтосекундного лазерного излучения позволяют перестраивать длину волны в значительном диапазоне (690–1000 нм). Видно, что σ линейно влияет на величину поглощаемой мощности лазерного излучения, поэтому влияние изменения длины волны лазера на величину поглощаемой мощности носит плавный характер (согласуется со спектром поглощения флуоресцентного красителя). Необходима дальнейшая работа в этом направлении для улучшения понимания механизмов фемтосекундного лазерного воздействия на биологические структуры и повышения эффективности лазерной нанохирургии в целом.

Заключение. Мы рассмотрели использование флуоресцентных красителей как метод управления

количеством поглощаемой энергии при фемтосекундной лазерной микро- и нанохирургии. Мы показали, что краситель BioTracker Blue способен усиливать абсорбцию лазерного излучения, что подтверждается увеличением диаметра парогазовых пузырьков и частотой их появления. Однако связь между количеством поглощенной энергии и эффективностью слияния клеток до сих пор остается неясной, и требуется дальнейшая работа в этом направлении. Мы считаем, что оптимизации требует как сам процесс облучения (оптимальные параметры: длина волны, частота повторения, энергия импульса, длительность облучения), так и подбор красителя. Идея использования красителя для управления процессом поглощения фемтосекундного излучения может быть применена в других исследованиях и носит общий характер.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП ФИЦ ХФ 506694 и УНУ ФИЦ ХФ РАН 1440743.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда # 21-75-10155.

1. Y. Quan, H. Bing, and M. Zhuo-Chen, *Micromachines* **13**(10), 1653 (2022).
2. J. Zhang, G. Zhuang, Y. Zeng, J. Grifo, C. Acosta, Y. Shu, and H. Liu, *Reprod. Biomed. Online* **33**, 529 (2016).
3. D. P. Wolf, N. Mitalipov, and S. Mitalipov, *Trends Mol. Med.* **21**(2), 68 (2016).
4. T. Wakayama, A. C. Perry, M. Zuccotti, K. R. Johnson, and R. Yanagimachi, *Nature* **394**(6691), 369 (1998).
5. S. Kamimura, K. Inoue, N. Ogonuki, M. Hirose, M. Oikawa, M. Yo, O. Ohara, H. Miyoshi, and A. Ogura, *Biol. Reprod.* **89**(2), 1 (2013).
6. A. Ogura, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Noguchi, K. Takano, R. Nagano, O. Suzuki, J. Lee, F. Ishino, and J. Matsuda, *Biol. Reprod.* **62**(6), 1579 (2000).