

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ ЭМБРИОНОВ НА ДИНАМИКУ ЕЕ ИСТОНЧЕНИЯ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ПРОТОКОЛОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ

© 2023 г. Д. С. Ситников^{1, *}, Д. Е. Мухдина¹, Д. С. Коршунова^{1, 2},
Ю. Ю. Силаева^{1, 2}, М. А. Филатов^{1, 2}, И. В. Ильина¹

¹ФГБУН Объединенный институт высоких температур РАН (ОИВТ РАН), Москва, Россия

²ФГБУН Институт биологии гена РАН (ИБГ РАН), Москва, Россия

*E-mail: Sitnik.ds@gmail.com

Поступила в редакцию 19.06.2023 г.

После доработки 01.09.2023 г.

Принята к публикации 03.10.2023 г.

В работе изучена динамика истончения блестящей оболочки эмбриона мыши в результате процедуры вспомогательного лазерного хетчинга, проводимой на стадии бластоцисты. В качестве модельных выбраны эмбрионы мыши, предварительно подвергнутые циклу заморозки–разморозки (криоэмбрионы). Для микрохирургии оболочки использовались лазерные импульсы фемтосекундной длительности (длина волны излучения – 512 нм, длительность импульса – 100 фс, интенсивность – 2.5 ТВт/см²). Толщина оболочки измерялась перед микрохирургией на стадии бластоцисты (~Е3.5, т.е. 3.5 дня эмбрионального развития) и на стадии хетчинга (т.е. вылупления эмбриона из оболочки, ~Е5). Обнаружено, что блестящая оболочка эмбрионов контрольной группы (криоэмбрионы, не подвергнутые лазерному воздействию) истончается сильнее (с 6.6 (Е3.5) до 4.9 мкм (Е5)) по сравнению с экспериментальными эмбрионами после процедуры вспомогательного лазерного хетчинга (с 7.1 (Е3.5) до 6.4 мкм (Е5)). И в первом, и во втором случаях изменения толщины оболочки являлись статистически значимыми. Полученные результаты сопоставлены с данными для “свежих” эмбрионов, не подвергавшихся процедуре криоконсервации. Выраженного эффекта “затвердевания” блестящей оболочки у криоэмбрионов по сравнению со “свежими” эмбрионами не выявлено. Применение процедуры вспомогательного лазерного хетчинга криоэмбрионов позволило повысить вероятность успешного хетчинга по сравнению с эмбрионами контрольной группы с 38.5 до 52.5%.

DOI: 10.31857/S0040364423040142

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то что лазеры появились только в середине прошлого столетия, область их применения быстро расширялась и не ограничивалась фундаментальными физическими исследованиями. Уже в середине 1960-х гг. доктор медицины, дерматолог Л. Голдман (University of Cincinnati College of Medicine), восхищенный возможностями, которые открывали лазерные технологии, опубликовал первое исследование, оказавшееся основополагающим для областей лазерной эпиляции, лечения варикоза и лазерного удаления татуировок [1]. Примерно в это же время отечественные ученые из Института квантовой электроники “НИИ Полус” под руководством профессора М.Ф. Стельмаха проводили пионерские исследования в области лазерной медицины, и в 1970 г. был создан первый отечественный лазерный хирургический комплекс на базе непрерывного углекислотного лазера (“Скальпель-1”) [2], обеспечивший возможность проведения бескровных операций на поверхностных тканях и внутренних

органах. Помимо данного комплекса и других лазерных аппаратов общемедицинского назначения (УФЛ-01 – “Ягода”, “Узор”, “Квант-15” и др.) разработаны специализированные лазерные комплексы для отдельных областей медицины, в частности для стоматологии (“Ланцет”, “Оптодан” и “Стокос”).

В настоящее время применение лазеров в медицине не ограничивается стоматологией, офтальмологией, дерматологией, оториноларингологией и другими областями, где воздействие осуществляется на органном и тканевом уровнях [3, 4]. Развиваются новые направления, в которых высокоселективное лазерное воздействие выполняется на клеточном уровне, в частности, для проведения различных манипуляций на половых клетках человека и животных. Еще в 1981 г. М. Бернс [5], а позднее и другие исследователи [6] отмечали преимущества применения лазеров в биологии развития и эмбриологии. Важно отметить, что положительный эффект наблюдается при воздействии лазерного излучения как на мужские, так и на

женские половые клетки. В многочисленных исследованиях показана возможность улучшения подвижности сперматозоидов [6], а также их эффективная лазерная иммобилизация (например, для дальнейшей интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в цитоплазму яйцеклетки) [7, 8]. Применительно к женским половым клеткам (неоплодотворенным яйцеклеткам и оплодотворенным яйцеклеткам (зиготам) на ранних стадиях развития) воздействие лазерного излучения в основном осуществляется на так называемую блестящую оболочку — *zona pellucida* (ZP), которая схематично изображена на рис. 1а. Основной целью такого воздействия является нарушение целостности оболочки, в результате чего становится возможным или значительно упрощается выполнение целого ряда процедур. К ним относятся интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида с целью оплодотворения, биопсия бластомеров (забор клеток эмбриона для дальнейшей преимплантационной генетической диагностики), процесс “вылупления” эмбриона (рис. 1б) из оболочки (хетчинг от англ. to hatch — вылупляться) для последующей имплантации в стенку матки и др.

Настоящая работа посвящена изучению особенностей вылупления эмбрионов после лазерного воздействия на оболочку и оценке динамики изменения самой оболочки при наличии и отсутствии лазерного воздействия. Следует отметить, что хетчинг эмбриона (рис. 1б) является важнейшим этапом развития, необходимым для его дальнейшей успешной имплантации. Для эмбрионов, которые по оценке специалиста могут иметь сложности с естественным вылуплением из оболочки, показано применение процедуры локальной деструкции или истончения блестящей оболочки, так называемого вспомогательного хетчинга. Со

временем механические и химические средства деструкции ZP были практически вытеснены лазерными инструментами, а метод получил название вспомогательного лазерного хетчинга (ВЛХ). В клинической практике для выполнения ВЛХ в основном применяются лазеры с длительностью импульсов от сотен микросекунд до нескольких миллисекунд. Воздействие лазерного импульса с типовыми параметрами мощности 300 мВт и длительностью порядка 0.6 мс приводит к локальному нагреву среды в области фокусировки до нескольких сотен градусов [9] и разрушению белков ZP в радиусе ~5 мкм. Для сведения к минимуму риска термического повреждения клеток эмбриона указанную процедуру рекомендовано выполнять на ранних сроках развития эмбриона, когда расстояние между клетками и оболочкой (перивителлиновое пространство) достаточно велико (~20 мкм) [10]. В то же время локальная деструкция оболочки на более поздних стадиях преимплантационного развития эмбриона имеет свои преимущества. Поэтому для решения данной проблемы в настоящей работе предлагается использовать лазерный источник излучения, генерирующий импульсы более короткой длительности, а именно фемтосекундной. Фемтосекундные лазерные источники нашли широкое применение в различных областях науки: от создания источников ТГц-излучения и проведения исследований с их использованием [11] до изучения процессов сверхбыстрого переноса энергии в веществе в сильно неравновесном состоянии [12].

Возможность успешного применения пико- и фемтосекундных лазерных импульсов для решения актуальных задач биологии развития и репродуктивной медицины продемонстрирована в многочисленных исследованиях (см. обзоры [13, 14]). В основе механизма взаимодействия фемтосекундных лазерных импульсов с водной средой (к которым можно отнести и биологические объекты) лежат процессы многофотонного (а не линейного, как в случае с миллисекундными импульсами) поглощения [15]. При этом процесс разрушения белков, составляющих основу ZP, носит преимущественно нетепловой характер — увеличение температуры в области фокусировки лазерного пучка при микрохирургии ZP ультракороткими лазерными импульсами не превышает 3°C [16] (механизмы разрушения и критерии их действия на биообъекты рассмотрены подробно в [15]). Совокупность этих факторов обеспечивает возможность предельной локализации области воздействия и формирование надреза на оболочке шириной порядка 1 мкм, что меньше размера сфокусированного лазерного пучка. Преимущество использования импульсов фемтосекундной длительности, включая минимальное тепловое воздействие и предельно узкую ширину надреза блестящей оболочки, были использованы ранее

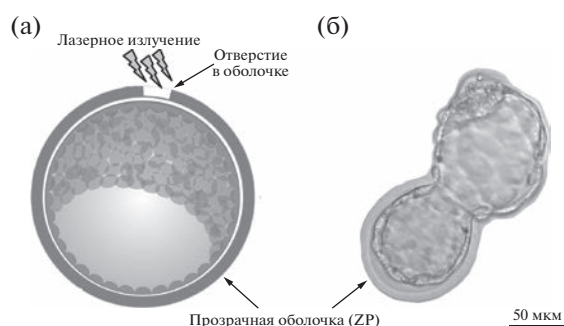


Рис. 1. Лазерная микрохирургия блестящей оболочки эмбриона млекопитающего на одной из преимплантационных стадий развития (стадии бластоцисты) в рамках процедуры ВЛХ: (а) — схематическое представление лазерной микрохирургии блестящей оболочки эмбриона млекопитающего на стадии бластоцисты, (б) — пример эмбриона мыши спустя 24 ч после микрохирургии оболочки, успешно проходящего стадию хетчинга.

для деликатной диссекции ЗР при биопсии полярного тельца [17], а также воплощены в технологиях управляемого вспомогательного хетчинга [18] и лазерной маркировки преимплантационных эмбрионов [19, 20].

Процедура ВЛХ может осуществляться как на свежих эмбрионах, так и на эмбрионах, подвергнутых процедуре криоконсервации. Успешное применение фемтосекундных лазерных импульсов для ВЛХ свежих эмбрионов, находящихся на поздних стадиях преимплантационного развития (на стадии бластоцисты), продемонстрировано в [18]. Но с учетом того, что в клинической практике все чаще в циклах экстракорпорального оплодотворения применяется технология криоконсервации эмбрионов, актуальным является исследование возможности применения фемтосекундных лазерных импульсов для ВЛХ эмбрионов, подвергнутых заморозке и последующему размораживанию (криоконсервированные или криоэмбрионы). Одной из особенностей ВЛХ эмбрионов после криоконсервации и размораживания может быть факт того, что блестящая оболочка частично изменила свои свойства. Гипотеза об уплотнении/“затвердевании” блестящей оболочки криоэмбрионов в настоящее время активно обсуждается среди специалистов [21]. В связи с этим получение данных о динамике изменения толщины блестящей оболочки эмбрионов, подвергнутых циклу заморозки–разморозки и лазерному воздействию при выполнении процедуры ВЛХ, является важной задачей. В рамках настоящей работы исследована динамика изменения толщины блестящей оболочки криоэмбрионов в результате процедуры ВЛХ, когда нарушение целостности ЗР проводится не на стадии зиготы (как описано в [20]), а на более поздней стадии – стадии бластоцисты. Проведено сравнение с данными для эмбрионов, не подвергавшихся циклу заморозки–разморозки, что позволяет получить дополнительную информацию об изменении характеристик оболочки и представляет интерес как с научной, так и с практической точек зрения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Для микрохирургии эмбрионов использовалась установка – фемтосекундный лазерный скальпель (рис. 2), созданная в ОИВТ РАН [22]. Источником импульсов фемтосекундной длительности служила лазерная система ТЕТА (“Авеста”, Троицк). Лазерное излучение, введенное в боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71, фокусировалось в пятно диаметром ~ 2 мкм по полувысоте. Для микрохирургии эмбрионов использовались лазерные импульсы со следующими параметрами: длительность импульса – 280 фс, энергия – 20 нДж, длина волны излучения – 514 нм, частота следования импуль-

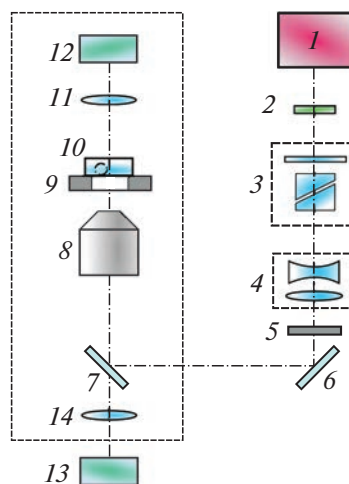


Рис. 2. Схема экспериментальной установки: 1 – фемтосекундный лазер; 2 – преобразователь излучения во вторую гармонику; 3 – узел ослабления лазерного излучения; 4 – узел телескопа; 5 – механический прерыватель лазерного излучения; 6, 7 – зеркала на длину волны лазерного излучения; 8 – микрообъектив; 9 – моторизованный предметный столик; 10 – чашка Петри с эмбрионами; 11 – конденсор микроскопа; 12 – осветитель; 13 – видеокамера; 14 – инвертированный микроскоп.

сов – 2.5 кГц. Эмбрионы помещались в чашки Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм в среду для культивирования. Эмбрион в чашке Петри, установленной на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar; Германия), перемещался относительно неподвижного лазерного луча. Излучение фокусировалось в экваториальной плоскости – плоскости максимального сечения эмбриона. Интенсивность в фокусе микрообъектива (20×0.5 UPlanFL, Olympus, Япония) при выполнении микрохирургических процедур составляла 2.5 ТВт/см^2 . Изображение эмбриона, регистрируемое камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source; Германия), выводилось на экран персонального компьютера. Микрохирургия эмбриона осуществлялась в автоматизированном режиме. Оператор задавал траекторию движения лазерного луча поверх изображения эмбриона в специализированном программном обеспечении, управляющем работой лазера и моторизованного столика, и запускал процедуру на выполнение.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ

Лазерной микрохирургии блестящей оболочки подвергались эмбрионы мыши, предварительно прошедшие цикл заморозки/разморозки, находящиеся на стадии бластоцисты. Эмбрионы мыши достигают данной стадии развития спустя примерно 3.5 сут после оплодотворения (обозначение E3.5). Подробная информация о получении эмбрионов, протоколе криоконсервации–

разморозки и их последующем культивировании представлена в Приложении. Для получения экспериментальных данных эмбрионы мыши (всего 116 штук) разделены на две группы: экспериментальную (Э) — 59 штук и группу параллельного контроля (ПК) — 57 штук. Лазерная диссекция проводилась вне CO_2 -инкубатора при комнатной температуре. Эмбрионы из группы параллельного контроля находились вне инкубатора столько же времени, сколько и эмбрионы экспериментальной группы, но не подвергались воздействию лазерного излучения. Каждая чашка Петри содержала три капли со специализированной средой, в двух каплях находились эмбрионы экспериментальной группы, а в третьей — эмбрионы из группы параллельного контроля.

На рис. 3а представлен эмбрион с нанесенной типовой траекторией лазерного воздействия, которая состоит из трех элементов. Надрез вдоль линии 1 предназначен для нарушения целостности блестящей оболочки и выполнялся на глубину 80–90% от ее толщины. Линии 2, 3 являются вспомогательными и служат для подтверждения вылупления эмбриона через сформированный надрез 1.

Каждый эмбрион подвергался фоторегистрации до и после лазерной микродиссекции. Микродиссекция по заданной траектории осуществлялась с помощью управления включением/выключением лазерного излучения, синхронизованного с движением моторизованного предметного столика. Время диссекции оболочки одного эмбриона при скорости перемещения столика 10 мкм/с составляло несколько секунд. Общее время, затрачиваемое на фоторегистрацию и лазерную микродиссекцию одного эмбриона (включая поиск эмбриона в чашке Петри и его разметку), не превышало 1.5 мин. Отчетливо видимый сформированный надрез оболочки (рис. 3б), соответствующий заданной траектории, свидетельствовал об успешном вы-

полнении микрохирургии оболочки эмбриона. Вылупление эмбрионов происходило, как правило, на пятые сутки после оплодотворения (Е5). В этот же день осуществлялась повторная фоторегистрация эмбрионов, позволяющая оценить динамику изменения толщины блестящей оболочки эмбрионов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Измерение толщины оболочки Δ проводилось в четырех разных областях с угловым шагом $\sim 90^\circ$ для каждого эмбриона экспериментальной группы на момент выполнения операции (стадия Е3.5). Расстояние от внешней до внутренней границы блестящей оболочки эмбриона измерялось по выполненным фотографиям в пикселях в программе ImageJ. Для перевода полученных значений в мкм использовался коэффициент переноса $K = 0.108$ мкм/пиксель, измеренный с помощью шпальной меры (решетка Ронки), временно установленной на предметный столик микроскопа. Аналогичные измерения выполнены и для эмбрионов контрольной группы (Е3.5), а впоследствии — на стадии вылупления эмбриона (стадия Е5) или после ее окончания в обеих группах.

Данные о толщине блестящей оболочки эмбрионов экспериментальной и контрольной групп, подвергнутых процедуре криоконсервации, представлены на рис. 4а, 4б. Анализ данных выявил распределения значений величин, отличные от нормального, поэтому при поиске статистически значимых и незначимых различий использованы непараметрические критерии оценки. Медианное значение Δ_{av} толщины ZP эмбрионов контрольной группы (рис. 4б) демонстрирует статистически значимое уменьшение с 6.63 мкм (интерквартильный размах (ИКР) 6.05–7.37) на стадии Е3.5 до 4.94 (4.63–5.37) на стадии Е5 (использован критерий Уилкоксона для связанных выборок $p < 0.05$). В экспериментальной группе истончение блестящей оболочки выражено существенно меньше — $\Delta_{av}(E3.5) = 7.12$ мкм (ИКР — 6.51–7.63) и 6.36 (5.76–7.2) на стадии Е5, однако это изменение также является статистически значимым. Проведенная статистическая обработка экспериментальных данных (с использованием U-критерия Манна–Уитни) подтвердила статистически значимое различие ($p < 0.05$) значений толщины ZP (Е5) криоэмбрионов в цикле естественного вылупления и после процедуры ВЛХ.

Для сравнения на рис. 4в, 4г представлены данные, полученные для эмбрионов [23], не подвергавшихся процедуре криоконсервации (в иностранной литературе *fresh embryos* — свежие эмбрионы). И если для контрольной группы изменение толщины оказалось также статистически значимым — с 6.35 мкм (5.48–6.75, Е3.5) до 5.18 (4.77–5.69, Е5), то для экспериментальной изменения оказались

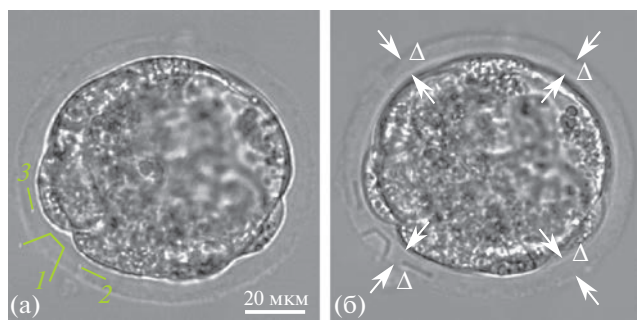


Рис. 3. Фотографии эмбриона: (а) — до проведения микрохирургии оболочки с нанесенной поверх изображения траекторией движения лазерного луча: 1 — надрез для истончения оболочки; 2, 3 — вспомогательные надрезы; (б) — результат лазерного воздействия; стрелки — области измерения толщины оболочки Δ .

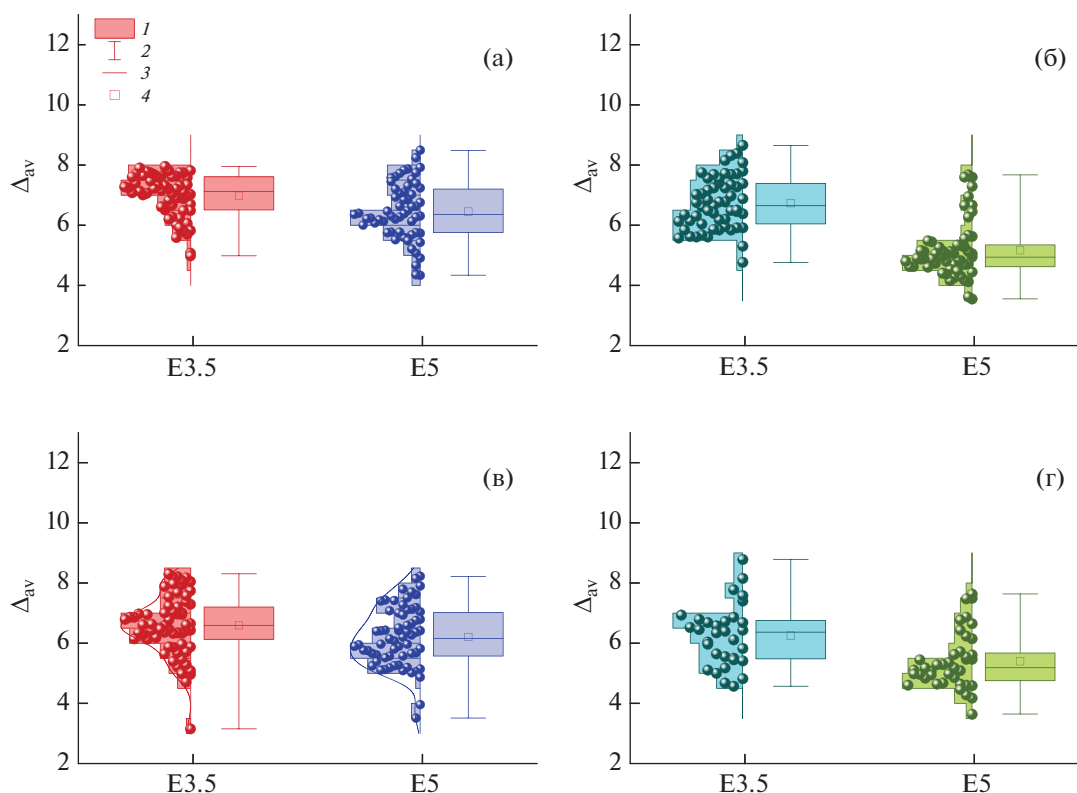


Рис. 4. Изменение толщины ЗР в процессе развития криоэмбрионов в (а) экспериментальной и (б) контрольной группах в сравнении с данными для свежих эмбрионов (в) экспериментальной и (г) контрольной групп из [23] на стадиях E3.5 и E5: 1 – 25–75% ИКР, 2 – вариация, 3 – медиана, 4 – среднее.

несущественными: 6.58 мкм (6.15–7.22, E3.5) против 6.15 (5.57–7.02, E5). Проводя сравнение имеющихся данных, можно сделать следующие выводы. В контрольных группах как для криоэмбрионов, так и для свежих эмбрионов истончение блестящей оболочки более значительно по сравнению с эмбрионами экспериментальных групп. При сравнении данных для экспериментальных групп можно предположить, что в группе свежих эмбрионов лазерная микрохирургия блестящей оболочки практически останавливала процесс дальнейшего истончения оболочки (что тем не менее не мешало успешному хетчингу), а в группе криоэмбрионов истончение оболочки после процедуры микрохирургии продолжалось, хоть и не было столь активным, как в контрольной группе.

Для интерпретации полученных результатов важно понимание механизма хетчинга эмбрионов млекопитающих в целом. В работе [24] отмечено, что данный механизм и предикторы его эффективности известны исследователям не в полной мере и требуют дальнейшего изучения. Несмотря на это, схему процесса вылупления эмбриона в общих чертах можно описать следующим образом [25]. Достигая стадии бластоцисты, эмбрион начинает активно транспортировать воду в полость бластоцисты, увеличиваясь при этом в диа-

метре и оказывая механическое воздействие на оболочку. Блестящая оболочка испытывает растягивающие напряжения и постепенно истончается. При превышении определенного порогового значения растягивающих напряжений происходит разрыв оболочки с образованием щелевидного отверстия, через которое бластоциста может покинуть оболочку, совершая при этом серию сжатий и раздуваний и увеличиваясь в размере. Что касается самой оболочки, то при превышении растягивающими напряжениями предела текучести среда перестает демонстрировать упругие свойства и испытывает пластические деформации. Это объясняет тот факт, что толщина оболочки после вылупления эмбриона не возвращается к своему первоначальному значению, несмотря на прекращение действия растягивающих напряжений.

Помимо динамических механизмов хетчинга существуют еще и молекулярные, к которым можно отнести ферментативную деградацию блестящей оболочки, а также участие цитокинов, гормонов, факторов роста и пр. в регуляции хетчинга. Тем не менее, несмотря на наличие сразу нескольких механизмов хетчинга (биомеханического и молекулярного), исследования *in vitro* показали, что в некоторых случаях более 75% всех морфологически нормальных бластоцист челове-

Измеренные средние толщины блестящей оболочки криоэмбрионов на стадиях E3.5 и E5 для исследованных эмбрионов

	Δ_{av} криоэмбрионов экспериментальной группы, мкм				Δ_{av} криоэмбрионов контрольной группы, мкм			
	группа А (31 эмбрион)		группа Б (28 эмбрионов)		группа А (22 эмбриона)		группа Б (35 эмбрионов)	
	E3.5	E5	E3.5	E5	E3.5	E5	E3.5	E5
Медиана	7.13	6.21	7.12	6.84	6.55	4.98	6.75	4.94
ИКР	6.26–7.66	5.77–6.37	6.68–7.49	5.74–7.42	6.15–7.33	4.73–5.42	6.0–7.47	4.62–5.33
Вариация	5.07–7.96	4.67–7.91	4.98–7.82	4.34–8.48	5.68–8.65	4.92–7.67	4.76–8.38	3.55–7.6

ка не могут успешно завершить хетчинг. В частности, в [26] показано, что при использовании для оплодотворения метода интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ) успешно завершить хетчинг смогли только 23.2% blastocysts. В подобных случаях для повышения вероятности успешного вылупления целесообразным является применение процедуры ВЛХ (в [26] с ее помощью удалось увеличить количество успешно вылупившихся ИКСИ-эмбрионов до 77.8%). Локальное истончение оболочки с помощью лазерного излучения приводит к тому, что разрыв оболочки происходит при меньших значениях растягивающих напряжений, чем в контрольной группе. Это подтверждается сравнением полученных значений Δ_{av} в экспериментальной и контрольной группах (6.4 и 4.94 мкм соответственно).

В [26] отмечается, что используемый метод оплодотворения (ЭКО или ИКСИ) может оказывать влияние на затвердевание блестящей оболочки и ее структуру. Однако это не единственный фактор, способный изменить характеристики оболочки. Полагают, что криоконсервация ооцитов/эмбрионов тоже может вызывать “затвердевание” оболочки [21, 27]. Данный эффект обусловлен слиянием кортикальных гранул с плазматической мембраной и высвобождением их содержимого в слою блестящей оболочки (см. обзор [28]). Процесс слияния мембран является кальций-зависимым и применение таких криопротекторов, как диметилсульфоксид (DMSO) и этиленгликоль, приводит к увеличению его уровня в клетках, усиливая эффект затвердевания [29, 30]. В настоящей работе для криоконсервации эмбрионов использованы растворы B-VIT, отличающиеся сниженным содержанием DMSO — 10% (в отличие от зарубежных аналогов, содержащих порядка 15% DMSO), и B-REV, не содержащий DMSO (ЗАО “Протеинсинтез”, Россия). Это увеличило допустимое время нахождения эмбрионов в растворах и повысило безопасность метода в целом. Полагается, что это может объяснить отсутствие эффекта затвердевания блестящей оболочки, исходя из полученных экспериментальных данных.

Фоторегистрация эмбрионов на этапе хетчинга позволила получить данные об успешности вылупления эмбрионов в разных группах. Несмотря на то что все криоэмбрионы вступили в стадию хетчинга на момент фоторегистрации, не все смогли полностью вылупиться из оболочки, т.е. завершить хетчинг. Эмбрионы, успешно завершившие хетчинг (группа А), и эмбрионы, не сумевшие вылупиться (группа Б), объединены в две группы, для каждой из которых вычислено медианное значение толщины оболочки на стадиях E3.5, E5.

Выполнена проверка того, насколько толщина блестящей оболочки может отличаться в данных группах и, соответственно, влиять на успешность хетчинга. Данные измерений представлены в таблице. На стадии E3.5 медианные толщины оболочек не отличаются для групп А и Б как для экспериментальных (в скобках ИКР) — 7.13 мкм (6.26–7.66) и 7.12 (6.68–7.49), так и для контрольных эмбрионов: 6.55 мкм (6.15–7.33) и 6.75 (6.0–7.47). Сравнение медианных значений толщин ZP контрольных эмбрионов на стадии E5 также показало отсутствие статистически значимых различий в группах А и Б: 4.98 мкм (4.73–5.42) против 4.94 (4.62–5.33). В группах экспериментальных эмбрионов E5 значения толщин оболочки превышают значения толщин для группы контрольных эмбрионов, но статистически значимой разницы в толщинах между вылупившимися и не вылупившимися эмбрионами не обнаружено: 6.21 мкм (5.77–6.37) против 6.84 (5.74–7.42). С учетом того, что разницы в толщинах оболочек между эмбрионами групп А и Б оказались статистически незначимыми, можно предположить, что после начала хетчинга толщина блестящей оболочки уже не является фактором, определяющим успешность полного вылупления эмбриона.

Нужно отметить, что полученные экспериментальные данные подтверждают целесообразность применения процедуры ВЛХ для криоэмбрионов, так как успешное завершение хетчинга в экспериментальной группе наблюдалось в 52.5% случаев (31 из 59 эмбрионов) по сравнению с 38.5% для контрольной группы (22 из 57 эмбрионов). По всей видимости, в результате проведения проце-

дуры криоконсервации происходит изменение не структуры блестящей оболочки, а профиля экспрессии генов, отвечающих за выработку ферментов, проводящих к лизису блестящей оболочки. Данное предположение согласуется с полученными результатами в виде близких значений толщин оболочки в обеих группах и снижением доли вылупившихся эмбрионов в результате криоконсервации по сравнению со свежими эмбрионами [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Толщина блестящей оболочки является важным параметром, оказывающим влияние на развитие эмбриона с момента оплодотворения до имплантации. В частности, слишком толстая оболочка эмбриона может препятствовать его успешному вылуплению и последующей имплантации. Для решения данной проблемы зачастую прибегают к процедуре вспомогательного хетчинга, когда целостность блестящей оболочки нарушается искусственным образом (например, с помощью лазерного излучения). Несмотря на длительное применение (более 30 лет) лазерной микрохирургии оболочки в рамках ВЛХ, полноценные данные о том, как меняются свойства и характеристики оболочки на разных стадиях преимплантационного развития, практически отсутствуют в литературе. Детального изучения динамики изменения толщины оболочки в разных случаях (для свежих или криоэмбрионов, подвергавшихся процедуре ВЛХ или вылупившихся естественным образом) также не проводилось.

В настоящей работе проведены исследования толщины блестящей оболочки эмбрионов мыши, подвергнутых процедурам криоконсервации и лазерной микрохирургии. Измерение толщины осуществлялось как на стадии бластоцисты (E3.5), так и на стадии вылупления (E5). Эмбрионы разделены на две группы: контрольную (цикл естественного вылупления) и экспериментальную (после процедуры ВЛХ). Микрохирургия эмбрионов экспериментальной группы осуществлялась фемтосекундными лазерными импульсами. Проведенный анализ выявил статистически значимые различия в толщине оболочки эмбрионов экспериментальной и контрольной групп на стадии вылупления бластоцисты — 6.4 и 4.9 мкм соответственно. При этом растяжение блестящей оболочки эмбрионов, подвергнутых ВЛХ, выражено слабее (7.1 мкм на стадии E3.5 и 6.4 на стадии E5) по сравнению с контрольной группой (6.6 мкм (E3.5) и 4.9 (E5)). Сравнение полученных результатов с данными для свежих эмбрионов, не подвергавшихся процедуре криоконсервации, не обнаружило проявления эффекта затвердевания блестящей оболочки криоэмбрионов. Целесообразность применения процедуры ВЛХ для криоэмбрионов подтверждается повышением количества эмбрио-

нов, успешно завершивших хетчинг, до 52.5% по сравнению с 38.5% в контрольной группе.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-00608 (<https://rscf.ru/project/22-24-00608/>) на оборудовании УНУ “Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс”, входящей в состав ЦКП “Лазерный фемтосекундный комплекс” ОИВТ РАН.

Все манипуляции с животными производились в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Животные. Для получения эмбрионов использовались гибридные мыши F₁ C57Bl/6JxСВА из питомника Федерального медико-биологического агентства России (филиал “Столбовая”, Россия). Животных содержали в контролируемых условиях (22–24°C при световом режиме 14 : 10 день : ночь) с доступом к питанию (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) и воде *ad libitum*.

Гормональная стимуляция овуляции. Для получения большого числа эмбрионов одновременно применялся широко используемый протокол стимуляции овуляции. В качестве доноров использовались неполовозрелые самки весом 10–12 г в возрасте около 3 нед. Гормональная стимуляция осуществлялась в соответствии с двухступенчатым протоколом: в 13:00 первого дня внутрибрюшинно вводился ГСЖК (препарат Фоллимаг, “Мосагроген”, Россия) из расчета 5 МЕ на одно животное, через 48 ч внутрибрюшинно вводился ХГЧ (препарат Хорулон, Merck Animal Health, США) из расчета 10 МЕ на одно животное, после чего данные самки ссаживались с самцами для спаривания.

Получение эмбрионов. Умерщвление животных осуществлялось путем дислокации шейных позвонков. Получение эмбрионов на стадии зиготы производилось в день обнаружения вагинальной пробки. Из животного с помощью ножниц вырезали яйцеводы и помещали их в предварительно нагретую до 37°C HEPES-содержащую среду Ооклин (“Пан-Эко”, Россия). Затем под контролем стереомикроскопа с помощью игл от шприцев вскрывались ампулярные части яйцеводов и извлекались из них ооцит-кумулюсные комплексы. Затем в данную каплю вносилось примерно 0.03 г гиалуронидазы (препарат Лидаза, “Микроген”, Россия) для очистки зигот от клеток кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывались в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносились в среду для культивирования.

Культивирование эмбрионов до заморозки. Культивирование эмбрионов до стадии морулы (при-

мерно 2.5 дня эмбрионального развития, E2.5) осуществлялось в четырехлуночных планшетах (Thermo Fisher Scientific Nunc; США) с использованием среды для культивирования гамет и эмбрионов CSCM-C (Fujifilm Irvine Scientific; США).

Перевозка эмбрионов. Для транспортировки из ИБГ РАН в ОИВТ РАН замороженные эмбрионы помещались в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Заморозка и разморозка эмбрионов. Криоконсервация и размораживание эмбрионов осуществлялись с помощью коммерческих наборов В-VIT (для витрификации) и Z-REV (для размораживания) в соответствии с рекомендациями производителя (ЗАО “Протеинсинтез”, Россия). Эмбрионы на стадии морулы последовательно помещались в растворы №№ 1, 2, 3 для криоконсервации со временем инкубации 5, 5, 0.5 мин соответственно. Инкубация производилась в каплях объемом 200 мкл одновременно группами по 10 эмбрионов. После чего эмбрионы помещались на носитель закрытого типа (криосоломину) для замораживания и хранения в жидком азоте (Minitube, Германия), защитный колпачок на носитель надевался непосредственно в жидком азоте.

Для размораживания образцы с эмбрионами изымались из жидкого азота, защитный колпачок снимался с носителя и носитель с эмбрионами помещался в каплю объемом 400 мкл раствора № 1 для размораживания. Данная капля имела продолговатую форму, чтобы обеспечить полное погружение части носителя для криоконсервации, несущей эмбрионы, в раствор. Затем эмбрионы отбирались и последовательно переносились в растворы для размораживания №№ 2, 3, 4 на время инкубирования в них 2, 3, 4 мин соответственно. Объем капель растворов №№ 2–4 составлял 200 мкл. Далее эмбрионы помещались в отмывочную среду (Ооклин, ПанЭко) на 5 мин, после чего производился их перенос в среду для культивирования.

Культивирование эмбрионов после разморозки. После разморозки эмбрионы пересаживались в чашки Петри со стеклянным дном (кат. № 200350; SPL Lifesciences, Корея) в каплю среды “Бластоциста” (“Пан-Эко”, Россия) объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле. В одной чашке формировалось по три капли среды, которые покрывались минеральным маслом (Origio, Дания) для предотвращения испарения. Чашки убирались в инкубатор и эмбрионы дорастивались до стадии бластоцисты (примерно 3.5 дня эмбрионального развития, E3.5).

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Dell, США), Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation, США). С использованием критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка проверены гипотезы о нормальности

распределений исследуемых показателей. Поскольку представленные в работе данные имели распределения, отличные от нормального, то для их анализа использовались непараметрические критерии. В данном случае значимыми показателями служили медиана, квартили (25–75%) и вариация (минимальное и максимальное значения) исследуемой величины. Для сравнения двух независимых групп использовался критерий Манна–Уитни (U-критерий), для сравнения двух зависимых групп – критерий Уилкоксона для связанных выборок. Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимался равным 0.05.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldman L., Rockwell R.J., Meyer R., Otten R., Wilson R.G., Kitzmiller K.W. Laser Treatment of Tattoos. A Preliminary Survey of Three Year's Clinical Experience // JAMA. London: Springer London, 1967. V. 201. № 11. P. 841.
2. Кузнецов Е.В. АО “НИИ “Полюс” им. М.Ф. Стельмаха – 60 лет // Лазер-информ: информационный бюллетень Лазерной ассоциации. 2022. Т. 717. № 6. С. 1.
3. Шахно Е.А. Физические основы применения лазеров в медицине. СПб.: НИУ ИТМО, 2012. С. 77.
4. Minaev V.P. 2011–2021 – Ten More Years of Development of Laser Medical Equipment and Technologies // Laser Med. 2021. V. 25. № 2. P. 63.
5. Berns M.W., Aist J., Edwards J., Strahs K. et al. Laser Microsurgery in Cell and Developmental Biology // Science. 1981. V. 213. № 4507. P. 505.
6. Kohli V., Elezzabi A.Y. Prospects and Developments in Cell and Embryo Laser Nanosurgery // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology. 2009. V. 1. № 1. P. 11.
7. Ebner T., Yaman C., Moser M., Sommergruber M., Hartl J., Tews G. Laser Assisted Immobilization of Spermatozoa Prior to Intracytoplasmic Sperm Injection in Humans // Hum. Reprod. 2001. V. 16. № 12. P. 2628.
8. Nahum R.T., Eroglu A., Toth T.L., Perez G., Isaacson K., Leykin L. P-061. Laser-assisted Intracytoplasmic Sperm Injection in Human Oocytes // Hum. Reprod. 1999. V. 14. Suppl. 3. P. 171.
9. Tadir Y., Douglas-Hamilton D.H. Laser Effects in the Manipulation of Human Eggs and Embryos for In Vitro Fertilization // Methods Cell Biol. 2007. V. 82. № 6. P. 409.
10. Douglas-Hamilton D.H., Conia J. Thermal Effects in Laser-assisted Pre-embryo Zona Drilling // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6. № 2. P. 205.
11. Овчинников А.В., Чефонов О.В., Агранат М.Б. Генерация второй оптической гармоники в кремнии при воздействии терагерцевого импульса с высокой напряженностью электрического поля // ТВТ. 2022. Т. 60. № 5. С. 666.
12. Ашитков С.И., Иногамов Н.А., Комаров П.С., Петров Ю.В., Ромашевский С.А., Ситников Д.С., Струлева Е.В., Хохлов В.А. Сверхбыстрый перенос энергии в металлах в сильно неравновесном состоянии, индуцируемом фемтосекундными лазерными

- ми импульсами субтераваттной интенсивности // ТВТ. 2022. Т. 60. № 2. С. 218.
13. *Ilina I., Sitnikov D.* From Zygote to Blastocyst: Application of Ultrashort Lasers in the Field of Assisted Reproduction and Developmental Biology // *Diagnostics*. 2021. V. 11. № 10. P. 1897.
 14. *Ilina I.V., Sitnikov D.S.* Application of Ultrashort Lasers in Developmental Biology: A Review // *Photonics*. 2022. V. 9. № 12. P. 914.
 15. *Vogel A., Noack J., Hüttman G., Paltauf G.* Mechanisms of Femtosecond Laser Nanosurgery of Cells and Tissues // *Appl. Phys. B*. 2005. V. 81. № 8. P. 1015.
 16. *Ситников Д.С., Ильина И.В., Пронкин А.А.* Оценка теплового воздействия лазерных импульсов фемто- и миллисекундной длительности при выполнении микрохирургических процедур в эмбрионах млекопитающих // *Квантовая электроника*. 2022. Т. 52. № 5. С. 482.
 17. *Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Il'ina I.V., Chefonov O.V., Agranat M.B.* Laser Microsurgery of Cells by Femtosecond Laser Scalpel and Optical Tweezers // *High Temp.* 2014. V. 52. № 6. P. 803.
 18. *Ilina I.V., Khramova Y.V., Ivanova A.D., Filatov M.A., Silaeva Yu.Yu., Deykin A.V., Sitnikov D.S.* Controlled Hatching at the Prescribed Site Using Femtosecond Laser for Zona Pellucida Drilling at the Early Blastocyst Stage // *J. Assist. Reprod. Genet. Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2021. V. 38. № 2. P. 517.
 19. *Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S.* Femtosecond Laser is Effective Tool for Zona Pellucida Engraving and Tagging of Preimplantation Mammalian Embryos // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 6. P. 1251.
 20. *Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S.* Application of Femtosecond Laser Microsurgery in Assisted Reproductive Technologies for Preimplantation Embryo Tagging // *Biomed. Opt. Express*. 2019. V. 10. № 6. P. 2985.
 21. *Choi J.K., Yue T., Huang H., Zhao G., Zhang M., He X.* The Crucial Role of Zona Pellucida in Cryopreservation of Oocytes by Vitrification // *Cryobiology*. 2015. V. 71. № 2. P. 350.
 22. *Ильина И.В., Овчинников А.В., Ситников Д.С., Ракитянский М.М., Агранат М.Б., Храмова Ю.В., Семенова М.Л.* Применение фемтосекундных лазерных импульсов в биомедицинских клеточных технологиях // ТВТ. 2013. Т. 51. № 2. С. 198.
 23. *Ситников Д.С., Ильина И.В., Филатов М.А., Силаева Ю.Ю.* Исследование влияния микродиссекции блестящей оболочки эмбрионов млекопитающих на ее толщину // *Вестник РГМУ*. 2023. Т. 1. С. 41.
 24. *Dolgushina N.V., Ibragimova E.O., Romanov A.Yu., Burmenskaya O.V., Makarova N.P., Shafei R.A., Syrkasheva A.G.* Predictors of Spontaneous Human Blastocyst Hatching in ART Programs // *Akush. Ginekol. (Sofia)*. 2018. V. 2. P. 88.
 25. *Шафеев Р.А., Сыркашева А.Г., Романов А.Ю., Макарова Н.П., Долгушина Н.В., Семёнова М.Л.* Хетчинг бластоцисты у человека // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. № 1. С. 8.
 26. *Inoue T., Uemura M., Miyazaki K., Yamashita Y.* Failure of Complete Hatching of ICSI-derived Human Blastocyst by Cell Herniation via Small Slit and Insufficient Expansion Despite Ongoing Cell Proliferation // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 8. P. 1579.
 27. *Larman M.G., Sheehan C.B., Gardner D.K.* Calcium-free Vitrification Reduces Cryoprotectant-induced Zona Pellucida Hardening and Increases Fertilization Rates in Mouse Oocytes // *Reproduction*. 2006. V. 131. № 1. P. 53.
 28. *Sun Q.-Y.* Cellular and Molecular Mechanisms Leading to Cortical Reaction and Polyspermy Block in Mammalian Eggs // *Microsc. Res. Tech.* 2003. V. 61. № 4. P. 342.
 29. *Wiesak T., Złotkowska A., Milewski R.* Effect of Vitrification on the Zona Pellucida Hardening and Follistatin and Cathepsin B Genes Expression and Developmental Competence of *in vitro* Matured Bovine Oocytes // *Cryobiology*. 2017. V. 76. P. 18.