

УДК 544.032.65; 57.017.642

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ МИКРОДИССЕКЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ ЭМБРИОНА С ПОМОЩЬЮ ИНФРАКРАСНЫХ ФЕМТОСЕКУНДНЫХ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ

© 2024 г. Д. С. Ситников^{1, *}, Д. Е. Мухдина¹, М. А. Филатов^{1, 2}, Ю. Ю. Силаева^{1, 2}

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 25.10.2023 г.

После доработки 05.12.2023 г.

Принята к публикации 04.12.2023 г.

В настоящей работе диссекция блестящей оболочки эмбриона мыши осуществлялась с использованием фемтосекундных лазерных импульсов инфракрасного диапазона спектра (длина волны излучения — 1028 нм, длительность — 280 фс, частота следования импульсов — 2.5 кГц). Работа посвящена исследованию с помощью оптической микроскопии зависимости ширины надреза D , формируемого лазерным излучением, от энергии E лазерных импульсов и скорости v перемещения луча. Впервые показано, что одно и то же значение ширины надреза может быть получено при различном сочетании указанных параметров. Предложено аналитическое выражение для описания зависимости ширины формируемого надреза на блестящей оболочке $D(E, v)$ при заданной частоте следования лазерных импульсов 2.5 кГц. Определены границы применимости функционала $D(E, v)$, которые охватывают значительный диапазон скорости лазерного луча $0.25 \leq v \leq 100$ мкм/с, а также перекрывают диапазон энергий от минимальных значений, соответствующих началу появления надреза, вплоть до возникновения оптического пробоя водной среды $115 \leq E \leq 190$ нДж. Полученные результаты позволяют получить быструю оценку ширины планируемого надреза для любой комбинации параметров E и v при микрохирургии блестящей оболочки эмбриона в рамках различных вспомогательных репродуктивных технологий.

DOI: 10.31857/S0040364424010147

ВВЕДЕНИЕ

Для борьбы с бесплодием, значительно распространенной проблемой в современном мире, применяется весь арсенал вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ): от культивирования эмбрионов *in vitro* до процедуры экстракорпорального оплодотворения, включая введение сперматозоида в цитоплазму ооцита (метод ИКСИ, от англ. ICSI — intra cytoplasmic sperm injection) сквозь защитную оболочку. Данная оболочка, называемая блестящей оболочкой эмбриона (*zona pellucida*, ZP), представляет собой гликопротеиновую структуру, окружающую ооцит на ранних стадиях развития, и выполняет роль барьера для защиты эмбриона от микроорганизмов, вирусов и иммунных клеток, которые могут присутствовать в яйцевом [1, 2]. Важнейшим этапом развития, необходимым для имплантации эмбриона в эндометрий матки, является его хетчинг,

или вылупление, т.е. высвобождение эмбриона из блестящей оболочки. Существует ряд факторов, при наличии которых эмбрион может испытывать затруднение с самостоятельным вылуплением. В клиниках репродуктивной медицины для минимизации рисков невылупления эмбриона была разработана технология вспомогательного хетчинга, когда целостность оболочки эмбриона нарушается искусственным образом (химически, механически либо с помощью лазерного излучения). В последнее десятилетие широкое распространение получил метод микрохирургии ZP с использованием инфракрасных лазерных диссекторов миллисекундной длительности — вспомогательный лазерный хетчинг (ВЛХ). Обзор всей совокупности методов, применяемых во вспомогательных репродуктивных технологиях, можно найти в работе [3]. В результате поглощения лазерного импульса происходит локальное разрушение белков

блестящей оболочки вследствие нагрева области воздействия до температур в несколько сотен градусов [4]. Одним из вариантов исполнения данной процедуры является локальное истончение блестящей оболочки (рис. 1а); также возможно формирование сквозного отверстия в ней (рис. 1б).

Размер области диссекции в результате воздействия одиночным миллисекундным лазерным импульсом составляет от 5 до 20 мкм, что существенно превышает размер сфокусированного лазерного луча (~3 мкм). Это обусловлено теплопроводностью водной среды, в которую помещен эмбрион, и большой длительностью лазерного импульса. Технология ВЛХ несет риск термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к его оболочке, и предполагает возможность диссекции на ранних стадиях развития эмбриона, когда перивителлиновое

пространство (расстояние между прозрачной оболочкой и клетками эмбриона) достаточно велико (~20 мкм) [6].

Для решения данной проблемы в настоящей работе предлагается использовать фемтосекундный лазерный источник излучения. Такие лазеры применяются в различных областях науки: от создания источников ТГц-излучения и проведения исследований с их использованием [7–10] до изучения прочностных свойств материалов [11–15] и процессов сверхбыстрого переноса энергии в веществе в сильно неравновесном состоянии [16, 17], а также от инъекций на клеточном уровне [18–20] до офтальмологии [21, 22]. Фемтосекундные лазеры нашли также широкое применение в биологии развития в целом и вспомогательных репродуктивных технологиях в частности (см. обзоры [23–26]). Они представляют перспективную альтернативу миллисекундным диссекторам, позволяющую устранить указанные выше недостатки благодаря фундаментальным особенностям взаимодействия с веществом. Нелинейные механизмы поглощения фемтосекундного лазерного излучения (например, многофотонное поглощение) в водной среде [27, 28] позволяют локализовать область воздействия. В результате размер формируемого надреза на блестящей оболочке может быть меньше геометрического размера области фокусировки лазерного луча, что значительно повышает точность микрохирургических процедур. Кроме того, предельно короткая длительность в совокупности с высокой мощностью импульса обеспечивают минимальный нагрев среды в области воздействия [29]. Это, в свою очередь, позволяет повысить безопасность лазерной микрохирургии эмбриона и расширить область применения фемтосекундных лазеров в ВРТ. Так, технологии управляемого ВЛХ [30] и бесконтактной лазерной маркировки преимплантационного эмбриона с целью исключения риска перепутывания [31] являются примерами их успешного применения.

Возможность применения фемтосекундных лазерных импульсов как видимого, так и инфракрасного диапазонов спектра была продемонстрирована ранее [32, 33]. Однако вопрос влияния параметров лазерного излучения на формируемый надрез блестящей оболочки был рассмотрен только для импульсов видимого диапазона ($\lambda = 514$ нм) [34]. Было показано, что надрез заданной ширины может быть получен при различном сочетании таких параметров, как энергия фемтосекундных импульсов E и скорость перемещения лазерного луча v . Целью настоящей работы является изучение влияния данных параметров на ширину формируемого надреза при использовании фемтосекундных импульсов инфракрасного диапазона, а также выбор оптимальных значений для выполнения микрохирургических

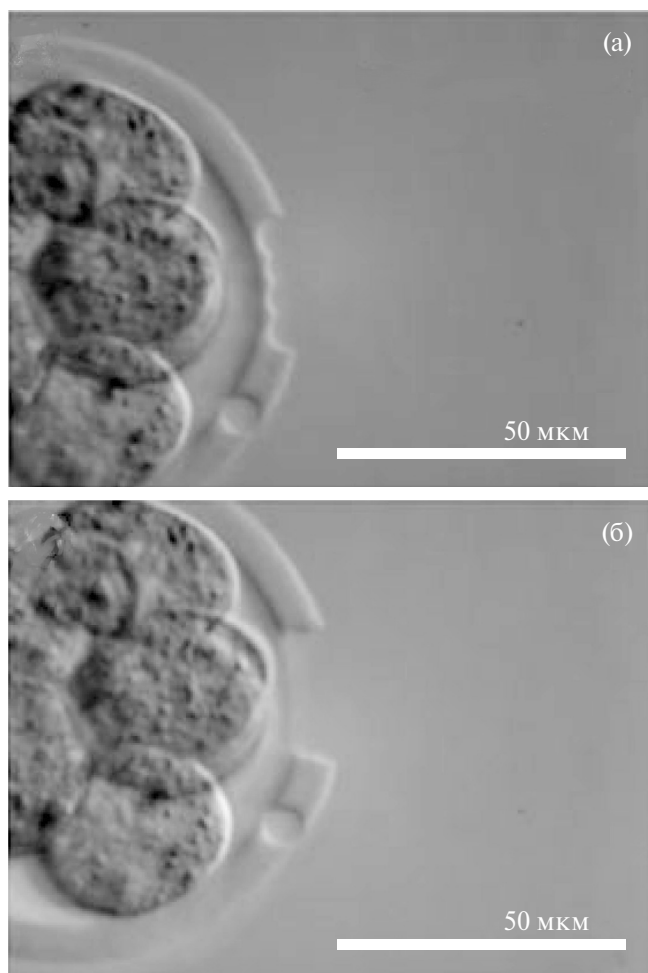


Рис. 1. Примеры истончения (а) и формирования (б) сквозного отверстия в блестящей оболочке [5]: система Fertilase™ (MTM, Germany), 1.48 мкм, мощность — 100 мВт, длительность импульса — 5 мс, размер одиночной перфорации — 5 мкм.

процедур на блестящей оболочке эмбриона в рамках вспомогательных репродуктивных технологий.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Микрохирургия эмбрионов выполнялась на установке “Фемтосекундный лазерный скальпель—оптический пинцет”, представленной на рис. 2 [35, 36]. В качестве лазерного скальпеля использовалось излучение фемтосекундного лазерного источника ТЕТА (ООО “Авеста Проект”), генерирующего лазерные импульсы со следующими параметрами: длительность $\tau = 280$ фс, энергия $E = 330$ мкДж, длина волны излучения $\lambda = 1028$ нм, частота следования импульсов $f \leq 2.5$ кГц. Отличие от установки, использованной в предыдущих исследованиях [35–37], состоит в том, что из схемы был изъят кристалл, преобразующий излучение во вторую гармонику (514 нм). На выходе из лазера был собран узел поляризационного ослабителя, состоящий из полуволновой пластинки и призменного поляризатора. Полуволновая пластина была закреплена на моторизованном поворотном столике 8MR151 (Standa), подключенном к персональному компьютеру, обеспечившему возможность удаленной регулировки энергии лазерных импульсов. Для контроля значений энергии лазерных импульсов использовался фотодиод DET36A2 (Thorlabs Inc.), часть лазерного пучка на который отвечалась тонкой стеклянной пластинкой (отражение Френеля). Сигнал с фотодиода оцифровывался с помощью осциллографа Tektronix TDS 5054. Лазерное излучение заводилось в правый боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX–71 и фокусировалось микрообъективом $20\times$ UPlanFL (Olympus) с числовой апертурой $NA = 0.5$. Узел телескопа, установленный на пути лазерного излучения до заведения в микроскоп, служил для согласования диаметра лазерного пучка с апертурой микрообъектива. Задняя линза телескопа была закреплена на линейном моторизованном столике 8MT173-25 (Standa). Вторая функция телескопа заключалась в регулировке расходимости лазерного излучения за счет изменения расстояния между линзами. Для калибровки амплитуды сигнала фотодиода на предметный столик микроскопа SCAN IM 120×80 (Märzhäuser Wetzlar) устанавливался измеритель мощности, регистрирующий лазерное излучение на выходе микрообъектива микроскопа. Измеритель состоял из фотодиодного детектора S120VC и консоли PM100D (Thorlabs Inc.).

Микрохирургия эмбрионов выполнялась в специальных чашках Петри со стеклянным дном (кат. № 200350, SPL Lifesciences). Эмбрионы помещались в каплю питательной среды и покрывались слоем минерального масла, препятствовавшего испарению. Чашка устанавливалась на моторизованном предметном столике микроскопа. Диссекция ЗР эмбриона осуществлялась перемещением

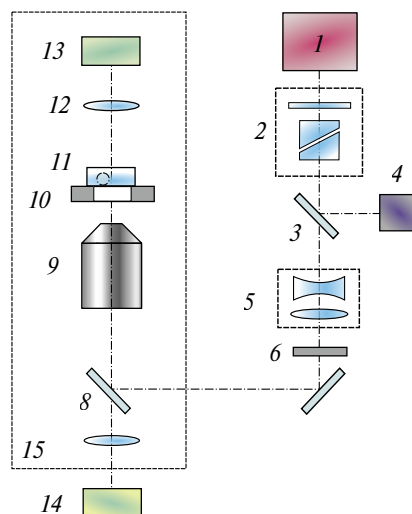


Рис. 2. Схема экспериментальной установки: 1 – фемтосекундный лазер; 2 – узел ослабления лазерного излучения; 3 – стеклянная пластинка; 4 – фотодиод; 5 – узел телескопа; 6 – механический прерыватель лазерного излучения; 7, 8 – зеркала на длину волны лазерного излучения; 9 – микрообъектив; 10 – моторизованный предметный столик; 11 – чашка Петри с эмбрионами; 12 – конденсор микроскопа; 13 – осветитель; 14 – видеокамера; 15 – инвертированный микроскоп.

последнего относительно неподвижного лазерного луча. Излучение фокусировалось с помощью микрообъектива в плоскости максимального сечения эмбриона – в “экваториальной” плоскости. Изображение эмбриона регистрировалось КМОП-камерой (КМОП – комплементарная структура на транзисторах металл–оксид–полупроводник; англ. CMOS) DFK 72AUC02 (the Imaging Source). Масштаб переноса изображения был предварительно оценен с помощью оптической меры ГОСТ 7513-56, установленной на предметный столик микроскопа, и составил $K = 0.1082$ мкм/пиксель.

Для автоматизации процедуры микрохирургии использовалось программное обеспечение, написанное в среде LabView (National Instruments). Оно позволяло оператору управлять такими параметрами, как энергия, частота следования импульсов и расходимость лазерного излучения, а также задавать траекторию движения лазерного луча поверх изображения эмбриона, регистрируемого КМОП-камерой. С помощью программного обеспечения осуществлялось управление включением/выключением лазерного излучения, синхронизированного с движением моторизованного предметного столика.

ОЦЕНКА РАЗМЕРА ЛАЗЕРНОГО ПУЧКА

Для оценки плотности энергии и интенсивности сфокусированного лазерного излучения

необходимо знать радиус перетяжки лазерного пучка r_0 . Пространственное распределение плотности энергии на поверхности мишени определяется функцией Гаусса

$$F(r) = \frac{E}{\pi r_0^2} e^{-(r/r_0)^2},$$

где E – энергия лазерного импульса, r – радиальная координата. Когда плотность энергии F превышает пороговое значение абляции материала F_{abl} , происходит унос материала мишени с последующим формированием кратера радиусом r_{abl} :

$$F(r_{abl}) = \frac{E}{\pi r_0^2} e^{-\left(\frac{r_{abl}}{r_0}\right)^2} = F_{abl},$$

откуда зависимость квадрата радиуса кратера абляции r_{abl}^2 представляет собой линейную регрессию по переменной $\ln(E)$ [38]:

$$r_{abl}^2(E) = r_0^2 \ln E - \ln(\pi r_0^2 F_{abl}). \quad (1)$$

Измерив размеры кратеров r_{abl} для серии лазерных импульсов с различной энергией E и вычислив коэффициенты регрессии $\alpha_1 = r_0^2$ и $\alpha_2 = \ln(\pi r_0^2 F_{abl})$, можно определить радиус перетяжки лазерного пучка r_0 и пороговое значение плотности энергии абляции материала мишени F_{abl} . Мишень полированного монокристаллического арсенида галлия является удобным образцом для исследования, поскольку кратеры на его поверхности при превышении порогового значения $F_{abl} > 0.2$ Дж/см² хорошо различимы.

Среда для культивации эмбриона представляет собой водную среду с небольшим добавлением солей и компонентов, поддерживающих требуемую кислотность и осмолярность. Поскольку значение показателя преломления среды не отличается существенно от значения для воды (1.336 против 1.333; рефрактометр ИРФ 454Б2М), определение параметра лазерного пучка r_0 было выполнено в воде. Мишень GaAs была установлена на дне чашки Петри на проставки-спейсеры толщиной ~100 мкм и покрыта дистиллированной водой (рис. 3а). Далее выполнялась фокусировка микробиолинзы для достижения резкого изображения поверхности мишени на экране персонального компьютера с последующей настройкой лазерного телескопа для получения на поверхности мишени кратера круглой формы. Полученная зависимость размера кратера абляции от энергии лазерных импульсов вида $r_{abl}^2 = f(\ln(E))$ представлена на рис. 3б. Сфокусированный пучок лазерного излучения имел слегка эллиптическую форму, а его размеры, вычисленные на основе коэффициентов регрессии, вдоль большой и малой осей составили $r_{0x} = 1.6$ и $r_{0y} = 1.5$ мкм соответственно.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ И МЕТОДИКА ОЦЕНКИ ШИРИНЫ НАДРЕЗА

Лазерной микрохирургии блестящей оболочки подвергались эмбрионы мыши, находящиеся на двух- или четырехклеточной стадии развития (процесс подготовки эмбрионов стандартен и изложен подробно в [39]). Морфология эмбрионов обеспечивала достаточно большое расстояние (около 10–15 мкм) между клетками эмбриона и его оболочкой, облегчая проведение микрохирургических

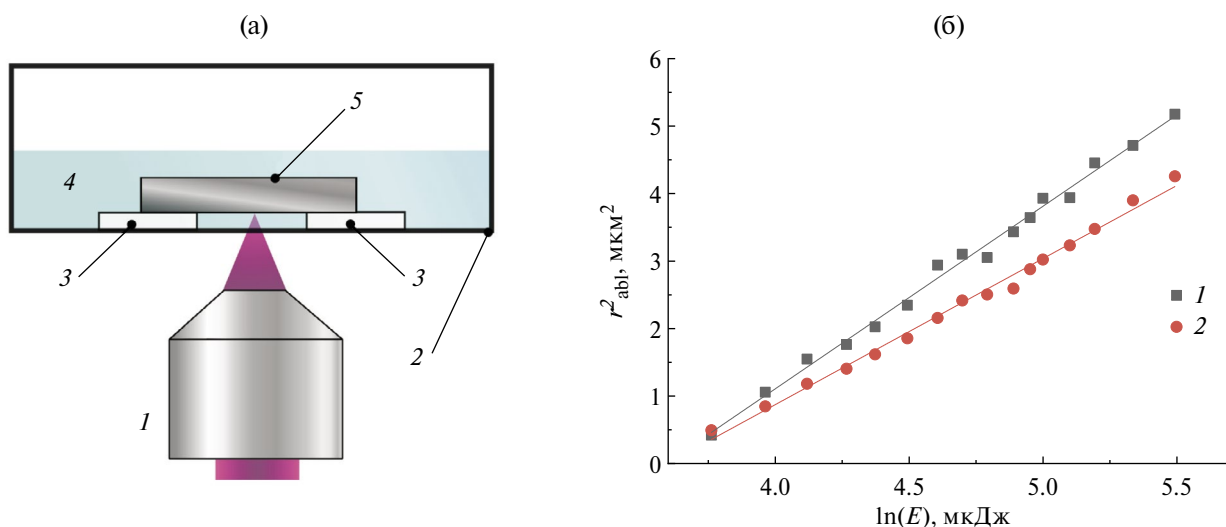


Рис. 3. Измерение размера лазерного пятна: (а) мишенный узел: 1 – микробиолинза, 2 – чашка Петри со стеклянным дном, 3 – проставки, 4 – вода, 5 – мишень; (б) – зависимость квадрата размера кратера r_{abl}^2 от логарифма энергии $\ln(E)$: 1, 2 – размеры вдоль большой и малой осей кратера.

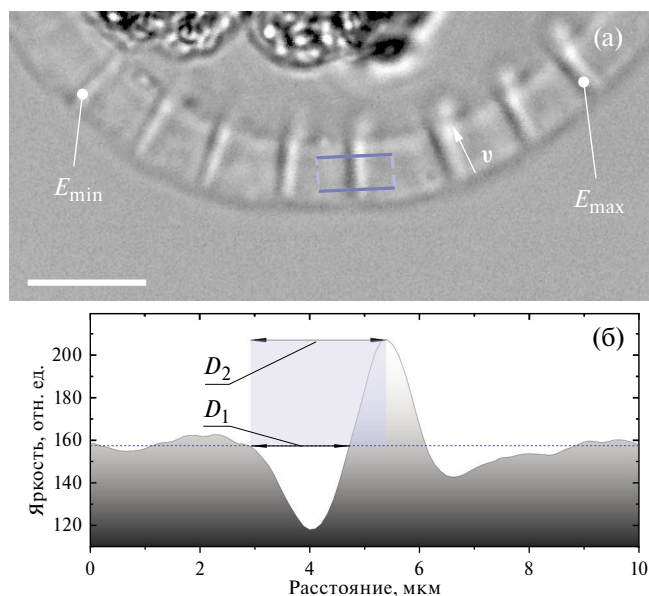


Рис. 4. Микрофотография (а) фрагмента блестящей оболочки эмбриона после выполнения микрохирургии при различных энергиях лазерных импульсов ($v = 0.01$ мм/с, $f = 2.5$ кГц); $E_{\min} = 134$ нДж, $E_{\max} = 190$ нДж; прямоугольник ограничивает область для построения профилей сечения; (б) осредненный профиль сечения: D_1 , D_2 — ширины надреза, измеренные по среднему уровню яркости блестящей оболочки и от максимума светлого “бортика” на профиле соответственно.

процедур. Диссекция блестящей оболочки осуществлялась последовательностью лазерных импульсов при линейном перемещении эмбриона относительно лазерного луча с заданной скоростью v . В собранной экспериментальной схеме лазерный луч оставался неподвижен, а перемещение эмбриона с заданной скоростью осуществлялось с помощью моторизованного двухкоординатного предметного стола микроскопа. Для простоты восприятия здесь и ниже по тексту под скоростью луча v понимается скорость движения эмбриона относительно неподвижного луча.

На рис. 4а представлена микрофотография фрагмента оболочки эмбриона после выполнения серии надрезов при различной энергии лазерных импульсов E . Оператор задавал набор траекторий в виде линий, направленных к центру эмбриона и перпендикулярных к поверхности блестящей оболочки.

Перемещение лазерного луча относительно эмбриона осуществлялось в радиальном направлении: от внешней границы блестящей оболочки эмбриона к внутренней. Скорость луча при движении вдоль траектории $v = 0.01$ мм/с и частота импульсов $f = 2.5$ кГц в данной серии экспериментов оставались неизменными. При перемещении эмбриона от одной траектории к другой (холостое

перемещение при выключенном излучении) скорость составляла 0.05 мм/с во избежание больших ускорений при начале и окончании движения. Расстояние между надрезами выбиралось не менее 10 мкм.

Для определения ширины надреза строился профиль сечения его изображения, расположенный перпендикулярно надрезу. Профиль сечения представляет собой зависимость яркости от пространственной координаты (рис. 4б). Область надреза выглядит на профиле сечения как “канавка” с уровнем яркости, опускающимся до значений ~ 120 , и “бортиком”, достигающим значений 210. Минимальное и максимальное значения яркости (0 и 255) соответствуют черному и белому цвету на микрофотографии. При этом средний уровень яркости блестящей оболочки вне области лазерного воздействия соответствует диапазону значений 150–160. Формирование светлого “бортика” предположительно связано с процессами преломления и полного внутреннего отражения. При распространении света от осветителя микроскопа сквозь блестящую оболочку эмбриона свет отражается от стенки надреза и попадает в регистрирующую изображение КМОП-камеру. Противоположная стенка надреза остается при этом в тени, а ее положение характеризуется темной областью на изображении. При уменьшении ширины надреза количество отраженного светлой области уменьшается и яркость светлого бортика снижается. Результатом измерения ширины надреза служила величина D_{av} , равная полусумме значений D_2 и D_1 (рис. 4б), а их полуразность определяла точность измерения ΔD (показана отрезками на рис. 5 и 6 в виде погрешности). Осреднение осуществлялось по 50 сечениям, обозначенным прямоугольником на рис. 4а.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенных ранее исследованиях [31, 39] значение скорости $v = 0.01$ мм/с было выбрано с точки зрения времени, затрачиваемого на выполнение микрохирургии блестящей оболочки. Такое значение скорости позволяло избежать больших ускорений эмбриона, лежащего свободно на дне перемещаемой чашки Петри. При этом время на выполнение надреза в рамках процедуры вспомогательного хетчинга эмбриона было достаточно мало и не превышало 2–3 с, что позволяло минимизировать пребывание группы экспериментальных эмбрионов вне инкубатора. Зависимость ширины надреза от энергии лазерных импульсов была получена ранее для скорости $v = 0.01$ мм/с (см. [34], $\lambda = 514$ нм). В настоящей работе исследование воздействия инфракрасных импульсов ($\lambda = 1028$ нм) дополнено измерениями как

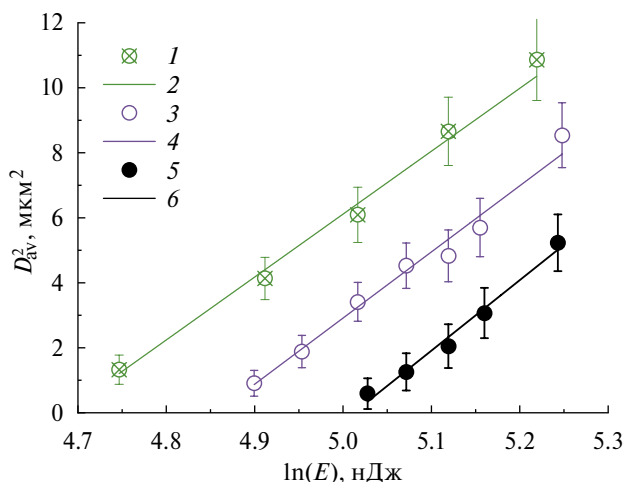


Рис. 5. Зависимости квадрата ширины надреза D_{av}^2 от логарифма энергии лазерных импульсов $\ln(E)$ при $f = 2.5$ кГц и различных скоростях перемещения: 1 – $v = 0.0025$ мм/с, 3 – 0.01, 5 – 0.05; 2, 4, 6 – линейные аппроксимации.

при меньших ($v = 0.0025$ мм/с), так и больших ($v = 0.05$ мм/с) значениях скорости луча (рис. 5).

Надрезы на блестящей оболочке становятся видимыми при достижении энергией лазерных импульсов определенного значения E_{min} , которое тем больше, чем выше скорость перемещения луча. Максимально допустимые значения E_{max} определяются интенсивностью лазерных импульсов, вызывающих оптический пробой водной среды. Последний приводил к формированию кавитационного пузыря, который мог отбросить эмбрион в сторону. Снижение скорости относительно номинальной $v = 0.01$ мм/с позволило сформировать видимые надрезы при меньшей энергии лазерных импульсов.

Особенностью воздействия фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны 1028 нм является достаточно узкий диапазон значений E_{max}/E_{min} . Если для видимого излучения ($\lambda = 514$ нм) данное соотношение составляло ~ 3 [30], то для $\lambda = 1028$ нм при $v = 0.01$ мм/с $E_{max}/E_{min} \approx 1.5$. Минимальное значение энергии ИК-импульсов, необходимое для формирования надреза, превышает значение для излучения видимого диапазона ($\lambda = 514$ нм, $v = 0.01$ мм/с) примерно в семь раз. Данное обстоятельство обусловлено совокупностью двух факторов: большим размером перетяжки лазерного пучка r_0 для ИК-излучения и большим значением интенсивности лазерного импульса, необходимым для инициации процесса многофотонного поглощения при представлении водной среды в виде аморфного диэлектрика [28, 29]. При значениях $E_{max} > 200$ нДж проявлялись признаки оптического пробоя в виде кавитационных пузырей.

Диссекция ЗР эмбриона заключается в ее локальном разрушении в результате поглощения лазерного излучения. Взаимодействие фемтосекундного лазерного импульса со средой приводит к образованию “свободных” электронов в зоне проводимости в результате действия процессов многофотонной ионизации и туннельного эффекта Зенера [28, 40]. Вследствие нелинейности процесса поглощения электроны оказываются существенно локализованными в области фокусировки лазерного излучения. Одним из возможных механизмов разрушения белков, составляющих основу блестящей оболочки, является фотохимический эффект, приводящий либо к диссоциации молекул воды и созданию активных форм кислорода, разрушающих белки, либо к непосредственному нарушению связей (механизмы фемтосекундной нанохирургии клеток более подробно изложены в работах [28, 41]).

Ширина надреза определяется совокупностью параметров, включающих скорость v перемещения лазерного пучка, радиус его перетяжки r_0 , а также частоту следования импульсов f , определяющих их пространственное перекрытие при перемещении лазерного пучка по траектории: $D \sim Er_0 f/v$. Для определения оптимальных параметров лазерного воздействия при $\lambda = 1028$ нм проведена серия экспериментов для различных скоростей перемещения эмбриона v при фиксированной частоте импульсов f . Ширина надреза блестящей оболочки D_{av} оценивалась по изложенной выше методике. Исследования проведены для трех значений энергии лазерных импульсов: $E_1 = 136$ нДж – энергия, близкая к минимальной, при которой на блестящей оболочке эмбриона замечен эффект лазерного воздействия при $v = 0.01$ мм/с,

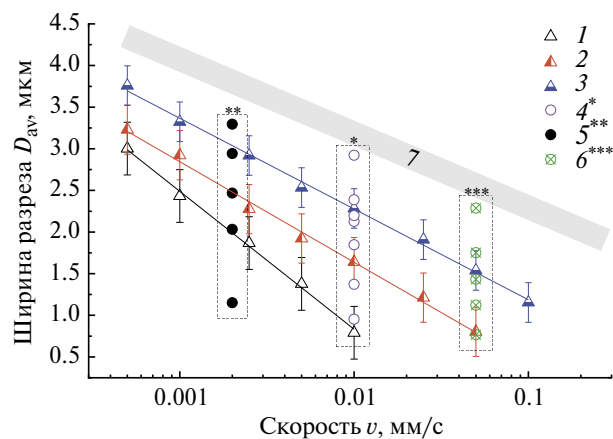


Рис. 6. Зависимости ширины надреза блестящей оболочки от скорости лазерного пучка $D_{av}(v)$ при $f = 2.5$ кГц и различных значениях энергии лазерного импульса: 1 – $E = 136$ нДж; 2 – 152; 3 – 174; 4* – 134, 141, 151, 159, 167, 173, 190; 5** – 115, 135, 151, 167, 185; 6*** – 152, 159, 167, 174, 189; 7 – область оптического пробоя; данные для E^* , E^{**} , E^{***} взяты с рис. 5.

Коэффициенты линейной регрессии

Энергия E , нДж	136	154	174
β_1	-2.48 ± 0.14	-0.78 ± 0.09	0.10 ± 0.08
β_2	1.66 ± 0.05	1.20 ± 0.04	1.09 ± 0.02

$E_2 = 154$ нДж и $E_3 = 174$ нДж. Частота следования импульсов составляла $f = 2.5$ кГц. Зависимости $D_{av}(v)$ при заданной энергии E и фиксированной частоте следования лазерных импульсов f показаны на рис. 6 в виде маркеров; значения $D_{av}(v)$ и $D_{av}(E)$ демонстрируют неплохое согласие с точностью ~ 0.2 мкм. Линии – аппроксимации экспериментальных значений уравнением линейной регрессии по переменной $\lg(v)$:

$$D_{av}(v) = \beta_1 - \beta_2 \lg(v). \quad (2)$$

Значения коэффициентов β представлены в таблице.

Увеличение энергии лазерных импульсов на 13% и 28% относительно E_1 позволило повысить скорость луча относительно номинального значения $v = 0.01$ мм/с. Максимальная скорость v , при которой формируется видимый надрез, увеличилась в пять раз для E_2 ; максимальное значение v для E_3 в эксперименте достигнуто не было и предположительно составляет $v \sim 0.2$ мм/с для $D_{av} \approx 0.8$ мкм. Значение ширины $D_{av} \approx 0.8 \pm 0.2$ мкм является минимальным наблюдаемым в эксперименте при любых сочетаниях E и v . Снижение энергии импульсов или увеличение скорости в попытке получить надрез меньшей ширины приводили к результату, неразличимому оптической системой микроскопа. Полученные результаты свидетельствуют о том, что применение фемтосекундных лазерных импульсов для микрохирургии блестящей оболочки эмбриона позволяют получить надрез, ширина которого меньше размера перетяжки лазерного пучка. Если рассматривать предельные значения сверху, то независимо от скорости v максимально допустимая энергия для ИК-импульсов не превышала $E_{\max} \leq 200$ нДж. При больших значениях проявлялись признаки оптического пробоя в виде кавитационных пузырей (область 7 на рис. 6).

Анализ полученных зависимостей показал, что заданное значение ширины надреза блестящей оболочки эмбриона можно получить при различных сочетаниях энергии лазерного импульса и скорости луча. Например, ширина $D \approx 1.5$ мкм может быть достигнута при следующем сочетании параметров: $E = 136$ нДж и $v = 0.004$ мм/с; $E = 152$ нДж и $v = 0.013$ мм/с; $E = 174$ нДж и $v = 0.05$ мм/с (данные представлены для $f = 2.5$ кГц и $r_0 = 1.56$ мкм). Указанные значения могут быть отмасштабированы для другой частоты f

пропорциональным изменением скорости v , например, для частоты $f = 5$ кГц значения v нужно разделить на 2.

С практической точки зрения интерес представляет нахождение функции ширины надреза D от двух переменных: энергии E и скорости v . Зависимость D от энергии лазерных импульсов E описывается уравнением (1), а от скорости луча v – уравнением (2). При этом линии, аппроксимирующие экспериментальные данные на рис. 6, имеют разный наклон, что свидетельствует о присутствии в зависимости $D(v)$ слагаемого, определяющего вклад энергии E лазерного импульса. Поэтому форма поверхности $D(\lg(v), \ln(E))$ не является плоскостью, и для придания поверхности большей пластичности добавлены корректирующие слагаемые третьей степени:

$$D(E, v) = (a + b \lg(v) + c E^3) \times (d \sqrt{\ln(E)} + e + h v^3). \quad (3)$$

Найденные значения коэффициентов с использованием функции *fittype* в среде Matlab R2021b составили: $a = 1.553$, $b = 0.5229$, $c = -3.468 \times 10^{-7}$, $d = 16.79$, $e = -39.95$, $h = 357$. Ошибка аппроксимации экспериментальных данных заданной поверхностью не превысила 0.2 мкм (определяется точностью стыковки данных в сериях $D_{av}(v)$ и $D_{av}(E)$), что соответствует погрешности не более 10%. Коэффициент детерминации составил $R^2 = 0.9868$. Границы применимости функционала (3) задаются неравенствами $0.25 \leq v \leq 100$ мкм/с и $115 \leq E \leq 190$ нДж для всех $D(E, v) > 0.7$ мкм.

Проведенные ранее исследования показали, что для реализации процедуры вспомогательного лазерного хетчинга [39] с использованием фемтосекундных лазерных импульсов с длиной волны $\lambda = 514$ нм достаточно выполнить надрез шириной около 1 мкм. Надрезы для индивидуальной маркировки эмбрионов [31] являлись отчетливо различимыми при $D \sim 1-1.5$ мкм. Таких же размеров надрезов следует придерживаться и при реализации микрохирургических процедур с помощью ИК-импульсов. Таким образом, можно утверждать, что фемтосекундные импульсы инфракрасного диапазона спектра оказались применимы для микрохирургии блестящей оболочки и позволяют формировать надрезы той же минимальной ширины, что и излучение с длиной волны $\lambda = 514$ нм [34].

В общем случае, при выборе оптимальной комбинации параметров лазерного воздействия можно руководствоваться следующими соображениями. В конфигурации с неподвижным лазерным лучом и перемещающимся предметным столиком с эмбрионом в чашке Петри скорости $v > 0.03$ мм/с следует избегать в силу большого ускорения, испытываемого

эмбрионом в начале движения и большого риска его смещения из начального положения (эмбрион лежит на дне чашки и не закреплен). С другой стороны, скорости $v < 0.001$ мм/с существенно увеличивают время диссекции и общее время нахождения эмбриона (или группы эмбрионов) вне инкубатора. Таким образом, выбор параметров следует начинать с задания желаемой ширины надреза блестящей оболочки. Для минимизации термического воздействия нужно выбирать наименьшие значения энергии E для желаемой ширины надреза D , принимая во внимание ограничения допустимой скорости в диапазоне $v = 0.001–0.03$ мм/с в соответствии с полученной зависимостью $D(E, v)$. Оптимальная область параметров отмечена пунктиром на рис. 7 с учетом перечисленных соображений. В случае применения конфигурации экспериментальной схемы с неподвижным предметным столиком и управляемым положением луча ограничение скорости сверху не имеет смысла.

Резюмируя различия в реализации технологии микрохирургии блестящей оболочки с использованием излучения с длинами волн 514 и 1028 нм, можно сделать следующие выводы. Энергия лазерных импульсов для ИК-излучения более чем в два раза выше по сравнению с излучением видимого диапазона. Это объясняется как большим диаметром сфокусированного лазерного пучка (в силу дифракции), так и меньшей энергией ИК-кванта. Последнее обстоятельство имеет большое значение в силу многофотонного характера поглощения, лежащего в основе взаимодействия фемтосекундного излучения с водной средой, представляемой в виде аморфного диэлектрика [28, 29]. В результате при переходе от видимого излучения к ИК

минимальная энергия импульса, необходимого для диссекции блестящей оболочки, увеличивается, а диапазон допустимых энергий сужается, будучи ограниченным сверху явлением оптического пробоя водной среды. Увеличивается и средняя мощность ИК-излучения. Поэтому область оптимальных значений параметров лазерного воздействия с длиной волны 1028 нм уже, чем на 514 нм. С этой точки зрения импульсы видимого диапазона выглядят предпочтительнее.

Вместе с тем оба рассмотренных значения длины волны излучения оказались пригодны для задачи формирования надреза на блестящей оболочке эмбриона. Однако для окончательного заключения о преимуществах использования излучения видимого или инфракрасного диапазонов спектра, а также о безопасности их применения требуется проведение дополнительных исследований биологических эффектов, индуцируемых лазерным воздействием в прилегающих клетках эмбриона. Последние являются предметом дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведены экспериментальные исследования влияния параметров лазерного воздействия на ширину надреза, формируемого в блестящей оболочке при выполнении микрохирургии ZP эмбриона мыши инфракрасными лазерными импульсами. Исследованы зависимости ширины надреза как от энергии лазерных импульсов E при заданной скорости перемещения лазерного луча v , так и от скорости v при различных энергиях E лазерных импульсов. Показано, что заданного значения ширины надреза можно достичь при различном сочетании параметров лазерного воздействия. Проведен анализ диапазона их допустимых значений, а полученная зависимость ширины надреза аппроксимирована функционалом переменных энергии и скорости. Допустимые значения составили $v = 0.001–0.03$ мм/с и $E = 115–190$ нДж. Показано, что фемтосекундные импульсы инфракрасного диапазона спектра могут быть применены для микрохирургии блестящей оболочки эмбриона. Полученные результаты имеют практическое значение для реализации процедур вспомогательного лазерного хетчинга и маркировки эмбрионов, поскольку ширина формируемого надреза влияет на читаемость наносимого цифро-буквенного обозначения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-19-00424, <https://rscf.ru/project/23-19-00424/>) на оборудовании УНУ “Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс”, входящим в состав ЦКП “Лазерный фемтосекундный комплекс” ОИВТ РАН.

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол

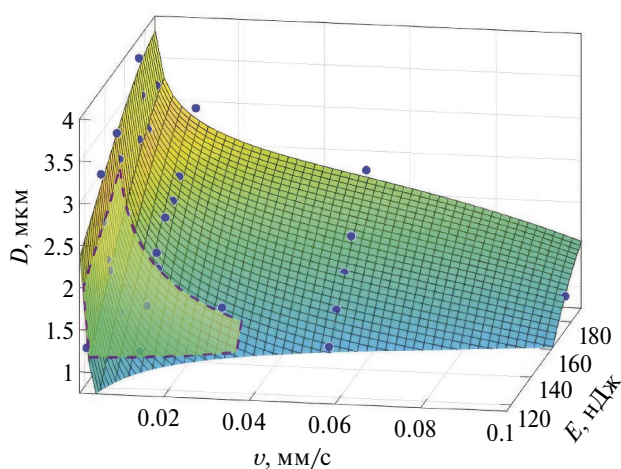


Рис. 7. Зависимость ширины надреза блестящей оболочки D от энергии лазерных импульсов E и скорости v : синие маркеры — экспериментальные данные, представленные на рис. 6; поверхность — аппроксимация уравнением (3).

№ от 5 декабря 2021 г.) и проведено в строгом соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ricardo Loret de Mola J., Garside W.T., Bucci J., Tureck R.W., Heyner S.* Analysis of the Human Zona Pellucida During Culture: Correlation with Diagnosis and the Preovulatory Hormonal Environment // *J. Assist. Reprod. Genet.* 1997. V. 14. № 6. P. 332.
2. *Krivosnogova A.S., Bruter A.V., Makutina V.A., Okulova Y.D., Ilchuk L.A., Kubekina M.V., Khamatova A.Y. et al.* AAV Infection of Bovine Embryos: Novel, Simple and Effective Tool For Genome Editing // *Theriogenology.* 2022. V. 193. P. 77.
3. *Davidson L.M., Liu Y., Griffiths T., Jones C., Coward K.* Laser Technology in the ART Laboratory: A Narrative Review // *Reprod. Biomed. Online.* 2019. V. 38. № 5. P. 725.
4. *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.
5. *Schimmel T., Cohen J., Saunders H., Alikani M.* Laser-assisted Zona Pellucida Thinning Does Not Facilitate Hatching and May Disrupt the in Vitro Hatching Process: A Morphokinetic Study in the Mouse // *Hum. Reprod.* 2014. V. 29. № 12. P. 2670.
6. *Douglas-Hamilton D.H., Conia J.* Thermal Effects in Laser-Assisted Pre-Embryo Zona Drilling // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. № 2. P. 205.
7. *Чефонов О.В., Овчинников А.В., Агранат М.Б.* Электрооптический эффект в кремнии, наведенный импульсом терагерцевого излучения // *ТВТ.* 2021. Т. 59. № 6. С. 844.
8. *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.
9. *Vicario C., Shalaby M., Hauri C.P.* Subcycle Extreme Nonlinearities in GaP Induced by an Ultrastrong Terahertz Field // *Phys. Rev. Lett.* 2017. V. 118. № 8. P. 083901.
10. *Jazbinsek M., Puc U., Abina A., Zidansek A.* Organic Crystals for THz Photonics // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. № 5. P. 882.
11. *Струлёва Е.В., Комаров П.С., Евлашин С.А., Ашитков С.И.* Поведение магниевое сплава при высокоскоростной деформации под действием ударно-волновой нагрузки // *ТВТ.* 2022. Т. 60. № 5. С. 793.
12. *Струлёва Е.В., Комаров П.С., Евлашин С.А., Ашитков С.И.* Высокоскоростное разрушение пленок кобальта под действием нагрузок, создаваемых пикосекундным лазерным импульсом // *ТВТ.* 2023. Т. 61. № 6. С. 536.
13. *Ашитков С.И., Струлева Е.В., Комаров П.С., Евлашин С.А.* Ударное сжатие молибдена при воздействии ультракоротких лазерных импульсов // *ТВТ.* 2023. Т. 61. № 5. С. 790.
14. *Zuanetti B., McGrane S.D., Bolme C.A., Prakash V.* Measurement of Elastic Precursor Decay in Pre-Heated Aluminum Films under Ultra-fast Laser Generated Shocks // *J. Appl. Phys.* 2018. V. 123. P. 195104.
15. *Колобов Ю.Р., Корнеева Е.А., Кузьменко И.Н., Скоморохов А.Н., Кудряшов С.И., Ионин А.А., Макаров С.В. и др.* Влияние поверхностной обработки фемтосекундным импульсным лазерным излучением на механические свойства субмикроструктурного титана // *ЖТФ.* 2018. Т. 88. № 3. С. 396.
16. *Ашитков С.И., Иногамов Н.А., Комаров П.С., Петров Ю.В., Ромашевский С.А., Ситников Д.С., Струлёва Е.В., Хохлов В.А.* Сверхбыстрый перенос энергии в металлах в сильно неравновесном состоянии, индуцируемом фемтосекундными лазерными импульсами субтераваттной интенсивности // *ТВТ.* 2022. Т. 60. № 2. С. 218.
17. *Radue E.L., Tomko J.A., Giri A., Braun J.L., Zhou X., Prezhdo O.V., Runnerstrom E.L., Maria J.-P., Hopkins P.E.* Hot Electron Thermoreflectance Coefficient of Gold During Electron Phonon Nonequilibrium // *ACS Photonics.* 2018. V. 5. № 12. P. 4880.
18. *Ильина И.В., Овчинников А.В., Чефонов О.В., Ситников Д.С., Агранат М.Б., Микаелян А.С.* Бесконтактная микрохирургия клеточных мембран с помощью фемтосекундных лазерных импульсов для оптоинъекции в клетки заданных веществ // *Квантовая электроника.* 2013. Т. 43. № 4. С. 365.
19. *Davis A.A., Farrar M.J., Nishimura N., Jin M.M., Schaffer C.B.* Optoporation and Genetic Manipulation of Cells Using Femtosecond Laser Pulses // *Biophys. J. Biophysical Society.* 2013. V. 105. № 4. P. 862.
20. *Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D.* Introducing Genes into Cultured Mammalian Cells // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2019. V. 2019. № 11. P. 715.
21. *Agarwal K., Hatch K.* Femtosecond Laser Assisted Cataract Surgery: A Review // *Semin. Ophthalmol.* 2021. V. 36. № 8. P. 618.
22. *Latz C., Asshauer T., Rathjen C., Mirshahi A.* Femtosecond-laser Assisted Surgery of the Eye: Overview and Impact of the Low-energy Concept // *Micromachines.* 2021. V. 12. № 2. P. 122.
23. *Ilina I.V., Sitnikov D.S.* From Zygote to Blastocyst: Application of Ultrashort Lasers in the Field of Assisted Reproduction and Developmental Biology // *Diagnostics.* 2021. V. 11. № 10. P. 1897.

24. *Irina I.V., Sitnikov D.S.* Application of Ultrashort Lasers in Developmental Biology: A Review // *Photonics*. 2022. V. 9. № 12. P. 914.
25. *Raghunathan R., Singh M., Dickinson M.E., Larin K.V.* Optical Coherence Tomography for Embryonic Imaging: A Review // *J. Biomed. Opt.* 2016. V. 21. № 5. P. 50902.
26. *Borile G., Sandrin D., Filippi A., Anderson K.I., Romanato F.* Label-free Multiphoton Microscopy: Much More Than Fancy Images // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2657.
27. *Vogel A., Venugopalan V.* Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues // *Chem. Rev.* 2003. V. 103. № 2. P. 577.
28. *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.
29. *Ситников Д.С., Ильина И.В., Пронкин А.А.* Оценка теплового воздействия лазерных импульсов фемто- и миллисекундной длительности при выполнении микрохирургических процедур на эмбрионах млекопитающих // *Квантовая электроника*. 2022. Т. 52. № 5. С. 482.
30. *Irina 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. Exp.* 2019. V. 10. № 6. P. 2985.
31. *Irina 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.
32. *Irina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S.* Application of Femtosecond Laser Scalpel and Optical Tweezers for Noncontact Biopsy of Late Preimplantation Embryos // *High Temp.* 2015. V. 53. № 6. P. 804.
33. *Irina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S.* Femtosecond Laser Assisted Hatching: Dependence of Zona Pellucida Drilling Efficiency and Embryo Development on Laser Wavelength and Pulse Energy // *High Temp.* 2016. V. 54. № 1. P. 46.
34. *Sitnikov D.S., Filatov M.A., Irina I.V.* Optimal Exposure Parameters for Microsurgery of Embryo Zona Pellucida Using Femtosecond Laser Pulses // *Appl. Sci.* 2023. V. 13. № 20. P. 11204.
35. *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 // *ТБТ*. 2013. Т. 51. № 2. С. 198.
36. *Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Irina 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.
37. *Ситников Д.С., Ильина И.В., Филатов М.А., Силаева Ю.Ю.* Исследование влияния микродиссекции блестящей оболочки эмбрионов млекопитающих на ее толщину // *Вестн. РГМУ*. 2023. № 1. С. 41.
38. *Liu J.M.* Simple Technique for Measurements of Pulsed Gaussian-beam Spot Sizes // *Opt. Lett.* 1982. V. 7. № 5. P. 196.
39. *Irina I.V., Khramova Y.V., Ivanova A.D., Filatov M.A., Silaeva Y.Y., 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.* 2021. V. 38. № 2. P. 517.
40. *Joglekar A.P., Liu H.H., Meyhofer E., Mourou G., Hunt A.J.* Optics at Critical Intensity: Applications to Nanomorphing // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. V. 101. № 16. P. 5856.
41. *Hoy C.L., Ferhanoglu O., Yildirim M., Kim K.H., Karajanagi S.S., Chan K.M.C., Kobler J.B., Zeitels S.M., Ben-Yakar A.* Clinical Ultrafast Laser Surgery: Recent Advances and Future Directions // *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* 2014. V. 20. № 2. P. 242.