

## ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕПЛООВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕМТОСЕКУНДНЫХ ЛАЗЕРНЫХ ИМПУЛЬСОВ НА ЭМБРИОНЫ МЫШИ В РАМКАХ ПРОЦЕДУРЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО ХЕТЧИНГА

М. В. Кубекина<sup>1,2</sup>✉, М. А. Филатов<sup>1,2</sup>, Ю. Ю. Силаева<sup>1,2</sup>, Д. С. Ситников<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Объединенный институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия

Одной из причин бесплодия является нарушение хетчинга — процесса вылупления эмбриона из специальной защитной оболочки (ZP, *zona pellucida*), непосредственно перед имплантацией. Часто нарушение хетчинга обусловлено уплотнением или утолщением ZP. Для преодоления бесплодия в таких случаях прибегают к процедуре вспомогательного лазерного хетчинга, когда с помощью лазера в ZP делают отверстие, облегчая выход эмбриона из нее. Вопрос безопасности применения лазера для проведения процедуры вспомогательного хетчинга остается открытым, поскольку лазерное излучение способно нагревать окружающую среду и потенциально вызывать у эмбрионов термический шок. Целью настоящей работы было оценить безопасность фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрионы мыши в рамках процедуры вспомогательного хетчинга, используя методы исследования жизнеспособности эмбрионов и уровней экспрессии генов HSP. Для диссекции ZP в работе использовали новый тип источника лазерных импульсов фемтосекундной длительности. Энергия указанных импульсов на два порядка ниже энергии миллисекундных лазерных диссекторов, применяемых в клиниках в настоящий момент. Для оценки фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрион производили окрашивание эмбрионов домашней мыши (*Mus musculus*) флуоресцентными красителями, а также оценивали уровни экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока: *Hsp90aa1* и *Hspa5*. После выполнения процедуры вспомогательного лазерного хетчинга с использованием фемтосекундного лазера клетки эмбрионов сохраняли жизнеспособность, а уровни экспрессии генов, кодирующих белки теплового шока, повышались незначительно по сравнению с группой отрицательного контроля ( $p = 0,408$ ).

**Ключевые слова:** эмбрион, мышь, бластоциста, блестящая оболочка, *zona pellucida*, вспомогательный лазерный хетчинг, фемтосекундные лазерные импульсы, белки теплового шока

**Финансирование:** работы по проведению манипуляций с эмбрионами при помощи лазера и оценка уровней экспрессии генов, ответственных за синтез белков теплового шока, выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 23-19-00424 на оборудовании УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс», входящей в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН. Работы по получению эмбрионов были выполнены при финансовой поддержке гранта номер 075-15-2021-668 (от 29.07.2021) УНУ Трансгенбанк.

**Вклад авторов:** М. В. Кубекина — проведение иммунофлуоресцентного окрашивания и определение уровня экспрессии белков теплового шока, написание статьи; М. А. Филатов — работа с эмбрионами, статистические методы обработки, написание статьи; Ю. Ю. Силаева — общее руководство экспериментом; Д. С. Ситников — проведение лазерной микрохирургии, обработка результатов, написание статьи; все авторы — обсуждение и редактирование статьи.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол № 1 от 25 сентября 2023 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.

✉ Для корреспонденции: Марина Владиславовна Кубекина  
ул. Вавилова, д. 34/5, 119334, г. Москва, Россия; marykumy@gmail.com

Статья получена: 07.11.2023 Статья принята к печати: 07.12.2023 Опубликовано онлайн: 26.12.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.046

## EXPLORATION OF THE FEMTOSECOND LASER PULSE THERMAL EFFECTS ON THE MOUSE EMBRYOS DURING THE ASSISTED HATCHING PROCEDURE

Kubekina MV<sup>1,2</sup>✉, Filatov MA<sup>1,2</sup>, Silaeva YuYu<sup>1,2</sup>, Sitnikov DS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Impaired hatching of the embryo from the *zona pellucida* (ZP), the specialized protective shell, immediately before implantation is one of the factors of infertility. Hatching impairment is often due to the ZP hardening or thickening. In such cases, the laser assisted hatching procedure is used to overcome infertility. During this procedure a hole is drilled in the ZP facilitating the embryo release. The question of the safe use of laser for assisted hatching remains open, since laser beam can heat the environment and cause thermal shock in embryos. The study was aimed to assess safety of the mouse embryo femtosecond laser exposure during the assisted hatching procedure using the embryo viability and HSP gene expression assessment methods. A new type of pulsed laser was used in the study for the ZP dissection — the femtosecond laser. The energy of such pulses was two orders of magnitude lower than the energy of laser dissectors currently used in the clinics. To assess the femtosecond laser exposure to the embryo, the house mouse (*Mus musculus*) embryos were stained with fluorescence dyes, and expression of the genes encoding heat shock proteins (*Hsp90aa1* and *Hspa5*) was assessed. The embryonic cells remained viable after the laser assisted hatching procedure involving the use of a femtosecond laser, while expression levels of the genes encoding heat shock proteins were slightly increased compared to the negative control group ( $p = 0.408$ ).

**Keywords:** embryo, mouse, blastocyst, *zona pellucida*, laser assisted hatching, femtosecond laser pulses, heat shock proteins

**Funding:** the procedures involving manipulating embryos using a laser and assessment of expression of the genes responsible for synthesis of heat shock proteins were supported by RSF (project 23-19-00424) and conducted using the equipment of the UNU "Laser Terawatt Femtosecond Complex", which was a part of the Center for Collective Usage "Laser Femtosecond Complex" of the Joint Institute for High Temperatures RAS. The procedures to acquire embryos were supported by the UNU "Transgenbank" grant (№ 075-15-2021-668 of July 29, 2021).

**Author contribution:** Kubekina MV — immunofluorescence staining and assessment of the heat shock protein expression levels, manuscript writing; Filatov MA — handling embryos, statistical processing, manuscript writing; Silaeva YuYu — general management of the experiment; Sitnikov DS — laser microsurgery, data processing, manuscript writing; all authors — discussion and manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the Ethics Committee of the Institute of Gene Biology RAS (protocol № 1 dated 25 September 2023) and conducted in strict compliance with the provisions of the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

✉ Correspondence should be addressed: Marina V. Kubekina  
Vavilova, 34/5, 119334, Moscow, Russia; marykumy@gmail.com

Received: 07.11.2023 Accepted: 07.12.2023 Published online: 26.12.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.046

Проблема бесплодия затрагивает миллионы людей [1]. Его причины чрезвычайно многообразны и для лечения применяют методы вспомогательных репродуктивных технологий, в том числе проведение процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и культивирования эмбрионов *in vitro*, т. е. вне тела матери. Снаружи предимплантационные эмбрионы млекопитающих (и человека в том числе) покрыты особой защитной оболочкой — блестящей оболочкой (ZP, *zona pellucida*). Она образована гликопротеинами, которые образуют пористую структуру [2, 3]. Благодаря наличию очень маленьких пор (диаметром лишь в несколько десятков нанометров) блестящая оболочка обеспечивает доступ к эмбриону питательных веществ из окружающей его среды, но препятствует проникновению в эмбрион вирусов и бактерий, т. е. выполняет защитную функцию. По мере своего развития эмбрион проходит ряд стадий: дробление, образование морулы, образование бластоцисты. При достижении стадии бластоцисты эмбрион должен покинуть блестящую оболочку. Процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки называют хетчингом (от англ. *hatch* — вылупляться). После хетчинга в норме происходит имплантация эмбриона, т. е. его прикрепление к стенке матки. В случае нарушения хетчинга эмбрион не сможет покинуть блестящую оболочку и имплантироваться. Бесплодие вследствие нарушения процесса имплантации — очень распространенное явление. Причины, которые обуславливают нарушение процесса хетчинга, различны: блестящая оболочка слишком толстая или слишком твердая, или клетки эмбриона вырабатывают недостаточное количество ферментов, необходимых для локального разрушения блестящей оболочки. В таких случаях прибегают к проведению процедуры вспомогательного хетчинга, при которой в блестящей оболочке делают отверстие, что облегчает хетчинг эмбриона.

Существуют различные способы осуществления вспомогательного хетчинга: химический, механический и лазерный. При использовании химического метода блестящую оболочку обрабатывают специфическими химическими агентами, разрушающими блестящую оболочку, например, кислым раствором Тироде [4] или ферментами, например, проназой [5]. Однако данная обработка может повлиять непосредственно и на сами клетки эмбриона, что может привести к снижению его способности нормально развиваться дальше. При механическом хетчинге отверстие в блестящей оболочке выполняют с помощью специальной микроиглы [6, 7], однако в процессе данной манипуляции с высокой долей вероятности можно повредить и клетки эмбриона, что тоже негативно скажется на его развитии. Во многих клиниках ЭКО наиболее популярен вспомогательный лазерный хетчинг (ВЛХ) [8, 9]. В этом случае отверстие в блестящей оболочке выполняют с помощью миллисекундных лазерных диссекторов. Они позволяют формировать в блестящей оболочке отверстие размером 5–10 мкм, достаточное как для истончения оболочки, так и для ее диссекции на всю глубину. Разрушение ZP происходит за счет нагрева среды до температуры в несколько сотен градусов [10]. Негативные последствия применения миллисекундных (мс) диссекторов заключаются в нагреве окружающей среды вокруг области воздействия, что может привести к повреждению клеток эмбриона. Так, при использовании диссектора Zylos-tk (Hamilton Thorne; США) с длительностью импульса 0,5 мс и мощностью

300 мВт) тепло за время действия импульса успевает распространиться на расстояние около 16 мкм от центра лазерного пучка и привести к увеличению температуры до 60 °С [11]. Диссекцию блестящей оболочки эмбриона по указанной причине рекомендуется выполнять на ранней стадии развития, когда перивителлиновое пространство достаточно велико (более 15 мкм).

Наиболее перспективными в использовании представляются фемтосекундные (фс) лазеры, позволяющие достичь высокой интенсивности излучения при малой энергии лазерных импульсов. В результате лазерного воздействия фс-длительности происходит нагрев среды в области фокусировки излучения, а в силу короткой длительности импульса тепло не успевает распространиться в стороны. Теоретические оценки показали, что размер области нагрева сопоставим с размером пятна сфокусированного лазерного пучка [12], а максимальный нагрев водной среды при интенсивности лазерных импульсов 1,8–5 ТВт/см<sup>2</sup> на длине волны излучения 514 нм соответствует диапазону значений 5–30 °С [13]. В предыдущих работах для микрохирургии эмбрионов было использовано излучение на указанной длине волны с интенсивностью ~2,5 ТВт/см<sup>2</sup> [14]. В настоящей работе интенсивность в фокусе лазерного луча составляет 3 ТВт/см<sup>2</sup>. Для оценки безопасности использования лазерного излучения фс-длительности для вспомогательного хетчинга на эмбрионах мыши нами были проведены эксперименты по изучению жизнеспособности эмбрионов после лазерной микрохирургии ZP в рамках процедуры ВЛХ. Кроме того, были проведены эксперименты по оценке уровней экспрессии генов, ответственных за синтез белков теплового шока (HSP, heat shock protein), которые начинают вырабатываться в клетках, в частности, при повышении температуры. HSP необходимы для поддержания нативной пространственной структуры белков, которое приобретает особую важность в условиях теплового стресса. У эукариот белки теплового шока семейств Hsp70 и Hsp90 наиболее сильно активируются тепловым стрессом, поэтому представители именно этих семейств выбраны для настоящего исследования [15].

Таким образом, целью настоящей работы было оценить безопасность фемтосекундного лазерного воздействия на эмбрионы мыши в рамках процедуры вспомогательного хетчинга, используя методы исследования жизнеспособности эмбрионов и уровней экспрессии генов HSP.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальная установка

Эксперименты по микрохирургии эмбрионов выполняли на установке «Фемтосекундный лазерный скальпель» (ОИВТ РАН, Россия) [16]. Для создания лазерного скальпеля использовали излучение фс-лазера ТЕТА (Авеста, Троицк, Россия). Лазерные импульсы на выходе из источника имели следующие параметры: длительность импульса  $\tau$  — 280 фс, энергия — 330 мкДж, длина волны излучения  $\lambda$  — 1028 нм, частота следования импульсов — 2,5 кГц. На пути излучения был установлен кристалл KDP (дигидроортофосфат калия,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), осуществляющий преобразование инфракрасного излучения в видимое; из кристалла выходило излучение на длине волны  $\lambda$ , равной 514 нм. Далее оно заводилось в правый боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71 и

фокусировалось микрообъективом 20xUPlanFL (Olympus; Япония) с числовой апертурой NA, равной 0,5 в пятно радиусом  $r = 1,4$  мкм по уровню  $1/e$ . Узел ослабления, установленный после лазерного источника (рис. 1), служил для регулировки энергии импульсов. Узел телескопа был предназначен для согласования диаметра лазерного пучка со световой апертурой микрообъектива и избегания потери энергии при диафрагмировании на оправе линз микрообъектива. Для контроля энергии лазерных импульсов использовали фотодиод DET36A2 (Thorlabs Inc.; США), на который ответвляли часть лазерного пучка при помощи тонкой стеклянной пластинки (отражение Френеля). Сигнал с фотодиода оцифровывали с помощью осциллографа Tektronix TDS 5054. Калибровку амплитуды сигнала фотодиода выполняли с помощью измерителя мощности, состоящего из фотодиодного детектора S120VC и консоли PM100D (Thorlabs Inc.; США). Детектор временно устанавливали на предметный столик микроскопа SCAN IM 120×80 (Märzhäuser Wetzlar; Германия) и регистрировали лазерное излучение на выходе микрообъектива.

Для проведения микрохирургии эмбрионы рассаживали в чашки Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм (излучение фокусировалось сквозь дно чашки). Чашку Петри устанавливали на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar, Германия) для перемещения эмбриона относительно неподвижного лазерного луча. Изображение эмбриона регистрировали КМОП-камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source; Германия) и выводили на экран персонального компьютера. Для автоматизации процедуры микрохирургии использовали программное обеспечение, написанное в среде LabView (National Instruments, США). Оно позволяло оператору осуществлять управление следующими параметрами: энергия, частота следования импульсов и расходимость лазерного излучения, а также задавать траекторию движения лазерного луча, рисуя прямо поверх изображения эмбриона. Диссекцию ZP осуществляли последовательностью лазерных импульсов при скорости перемещения эмбриона относительно луча 0,01 мм/с.

## Содержание животных

В настоящей работе использовали мышей гибридов первого поколения CBA x C57Bl/6J. Животных содержали при световом режиме — 14 ч света и 10 ч темноты и температуре, поддерживаемой в диапазоне 22–24 °С. Воду и питание (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) животные получали *ad libitum*. Все манипуляции с животными производили в соответствии с рекомендациями Комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

## Манипуляции с ранними эмбрионами

Большое число зигот получали с помощью общеизвестного протокола стимуляции овуляции с применением фолликулостимулирующего гормона и хорионического гонадотропина [17]. Гормональную стимуляцию осуществляли в соответствии с двухступенчатым протоколом: в 13:00 первого дня внутрибрюшинно вводили ГСЖК (препарат Фоллимаг, Мосагроген, Россия) из расчета 5 МЕ на одно животное; через 48 ч внутрибрюшинно вводили ХГЧ (препарат Хорулон; Merck Animal Health, США) из расчета 10 МЕ на одно животное, после чего ссаживали данных самок с самцами для спаривания.

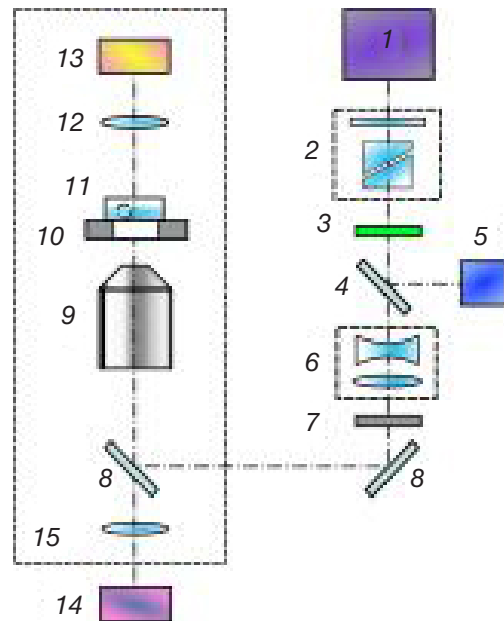


Рис. 1. Схема фемтосекундного лазерного скальпеля. 1 — фс-лазер, 2 — узел ослабления, 3 — кристалл ГВГ, 4 — стеклянная пластинка, 5 — фотодиод, 6 — узел телескопа, 7 — механический прерыватель лазерного излучения, 8 — зеркала на длину волны лазерного излучения, 9 — микрообъектив, 10 — моторизованный предметный столик, 11 — чашка Петри с эмбрионами, 12 — конденсор микроскопа, 13 — осветитель, 14 — видеокамера, 15 — инвертированный микроскоп

Факт спаривания определяли утром следующего дня по наличию вагинальной пробки.

## Получение эмбрионов

Выделение эмбрионов производили на стадии зиготы (0,5 дня эмбрионального развития, E0,5), после чего осуществляли их культивирование *in vitro*. Для получения эмбрионов самок умерщвляли путем дислокации шейных позвонков. Выделенные яйцеводы помещали в среду Ооклин («ПанЭко»; Россия), где отсепарировали жировую ткань с помощью игл от шприцов и пинцетов. Очищенные яйцеводы переносили в чистую каплю среды Ооклин объемом 100 мкл, где вскрывали ампулярную часть яйцевода, что позволяло получить зиготы, окруженные клетками кумулюса. Затем в данную каплю вносили примерно 0,03 г гиалуронидазы (препарат лидаза, Микроген, Россия) для очистки зигот от клеток кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывали в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносили в среду для культивирования.

## Культивирование эмбрионов

Культивирование эмбрионов до стадии морулы (E2,5) осуществляли в четырехлуночных планшетах (Termo Scientific Nunc, США), использовали среду для культивирования гамет и эмбрионов (Fujifilm Irvine Scientific, США). От стадии морулы до стадии бластоцисты (E3,5) эмбрионы культивировали в покрытых минеральным маслом (Origio; Дания) каплях среды объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле.

## Транспортировка эмбрионов

Получение эмбрионов и их культивирование до стадии морулы осуществляли на базе ИБГ РАН, тогда как

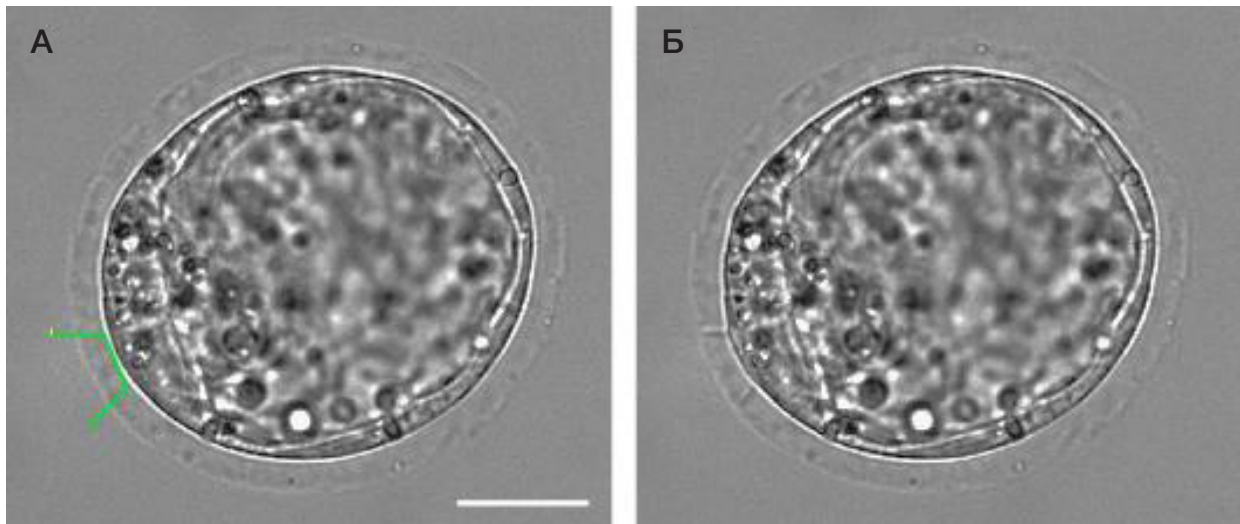


Рис. 2. Фотографии эмбриона до проведения микрохирургии оболочки (А) и после (Б). Масштабный отрезок — 20 мкм

культивирование эмбрионов до стадии бластоцисты и процедуру ВЛХ выполняли на базе ОИВТ РАН. Для транспортировки эмбрионы помещали в эппендорф объемом 0,5 мл, заполненный средой, основанной на буфере HEPES (Ооклин, «Панэко», Россия). Для поддержания постоянной температуры при перевозке эмбрионов эппендорф с эмбрионами помещали в термос с водой, заранее нагретой до 37 °С. Транспортировку эмбрионов осуществляли в течение 90 мин.

### Группы эмбрионов

В исследовании эмбрионы были разделены на четыре группы: отрицательный (1) и положительный (2) контроли, нежизнеспособные эмбрионы (3), а также экспериментальная группа (4). В группе нежизнеспособных эмбрионов число эмбрионов составляло 4 шт., в остальных группах по 30 шт.

1. В качестве отрицательного контроля были использованы эмбрионы, культивировавшиеся при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>/воздух 37 °С) в инкубаторе (Binder; Германия).

2. В качестве положительного контроля были использованы бластоцисты, подвергшиеся тепловому воздействию при 42 °С в течение 30 мин. Тепловое воздействие также осуществляли в углекислотном инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>/воздух 42 °С). В ходе воздействия эмбрионы находились в той же культуральной среде, что и интактные эмбрионы, а также в такой же культуральной посуде (четырёхлуночных планшетах). Далее бластоцисты данной группы культивировали при стандартных условиях в течение 2 ч для формирования ответной реакции на тепловое воздействие.

3. Для получения нежизнеспособных эмбрионов осуществляли их обработку фиксирующим раствором (4%-й параформальдегид в фосфатно-солевом буфере (phosphate buffered saline, PBS)), а затем их пермеабелизацию в 0,003% растворе Тритона в PBS.

4. В экспериментальную группу входили эмбрионы, подвергнутые лазерному воздействию в рамках процедуры ВЛХ. Микрохирургию прозрачной оболочки эмбрионов осуществляли на стадии бластоцисты (~Е3,5). За день до эксперимента эмбрионы на стадии морулы рассаживали в подготовленные чашки Петри (кат. № 200350, SPL Lifesciences; Корея) со стеклянным дном (по

три эмбриона в каждую каплю) и переносили в инкубатор. В каждой чашке Петри предварительно создавали по три капли со средой для культивирования объемом ~20 мкл, которые затем покрывали жидким парафиновым маслом для сред ЭКО 1 (кат. № Э0350-160, «ПанЭко»; Россия). В день эксперимента чашку Петри доставали из инкубатора и закрепляли на предметном столике микроскопа. Общее время пребывания эмбрионов вне инкубатора не превышало 10 мин.

### Эксперимент

Для осуществления процедуры ВЛХ оператор наносил поверх изображения эмбриона траекторию движения лазерного луча, задавая форму надреза блестящей оболочки эмбриона (рис. 2А, зеленая ломаная линия). Как и в предыдущем исследовании [16], форма надреза имела U-образную форму — лазерный луч прорезал оболочку на 80–90% ее толщины. Программный комплекс осуществлял процедуру микрохирургии в автоматизированном режиме, перемещая эмбрион по заданной траектории относительно неподвижного луча и управляя моментами включения и выключения лазерного излучения. Энергия лазерных импульсов в эксперименте составляла 30 нДж. Результат микрохирургии показан на рис. 2Б.

### Флуоресцентное окрашивание

Окрашивание групп эмбрионов производили одновременно тремя красителями:

1) Hoechst 33342 (Thermo Scientific; США) — контроль окрашивания, возбуждение/эмиссия 350/461, рабочая концентрация 1 мкг/мл;

2) Propidium Iodide (Thermo Scientific; США) — окрашивание нежизнеспособных клеток возбуждение/эмиссия 493/636, рабочая концентрация 500 нМ;

3) Calcein-AM (Sigma Aldrich; США) — окрашивание живых клеток, возбуждение/эмиссия 494/517, рабочая концентрация 1 мкМ.

Флуоресцентные красители доводили до рабочей концентрации в среде для культивирования гамет и эмбрионов. В такой среде эмбрионы культивировали в течение 30 мин при 37 °С в инкубаторе. После этого эмбрионы отмывали от красителей в трех каплях свежей среды Ооклин («ПанЭко»; Россия), а затем оценивали их

Таблица. Праймеры, использованные в исследовании (последовательности указаны в направлении от 5' к 3')

Название гена	Genbank No	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	Длина продукта
Hprt	NM_013556.2	CAGCGTCGTGATTAGCGATGA	GCCACAATGTGATGGCCTCC	174
Hsp90aa1	NM_010480.5	TGAGCAGTATGCCTGGGAGT	CGACCCATTGGTTCACCTGT	75
Hspa5	NM_001163434.1	GGAATGACCCTTCGGTGACAG	GTCTTGGTTTGCCACCTCC	109

жизнеспособность на флуоресцентном инвертированном микроскопе Eclipse Ti-E (Nikon; Япония).

### Определение уровня экспрессии генов

Выделение РНК проводили с использованием реактива TRIzol по протоколу фирмы-производителя (Thermo Scientific; США). Обратную транскрипцию для получения комплементарной ДНК (кДНК) проводили набором MMLV RT по протоколу фирмы-производителя («Евроген»; Россия). Определение экспрессии генов проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad; США) с применением готовой смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген»; Россия). Образцы кДНК от бластоцист амплифицировали в трех повторностях с использованием праймеров на референсный ген *Hprt* и гены белков теплового шока *Hsp90aa1* и *Hspa5*. Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров приведены в таблице. Уровень экспрессии генов *Hsp90aa1* и *Hspa5* считали по общеизвестному методу  $\Delta\text{Ct}$  [18].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### Определение жизнеспособности эмбрионов путем флуоресцентного окрашивания

Для определения влияния лазерной микрохирургии на жизнеспособность эмбрионов мыши было проведено флуоресцентное окрашивание всех групп эмбрионов (рис. 3).

Эмбрионы после лазерной микрохирургии окрашиваются красителем Calcein-AM, также как группы положительного и отрицательного контроля, при этом красителем Propidium Iodide окрашивается только группа нежизнеспособных эмбрионов. Эти результаты позволяют сделать вывод о сохранении жизнеспособности в экспериментальной группе эмбрионов после лазерной микрохирургии. Небольшая разница в интенсивности окрашивания Calcein-AM и Hoechst 33342 объясняется смещением настроек камеры микроскопа, которые необходимо вручную подбирать при оценке каждой группы эмбрионов.

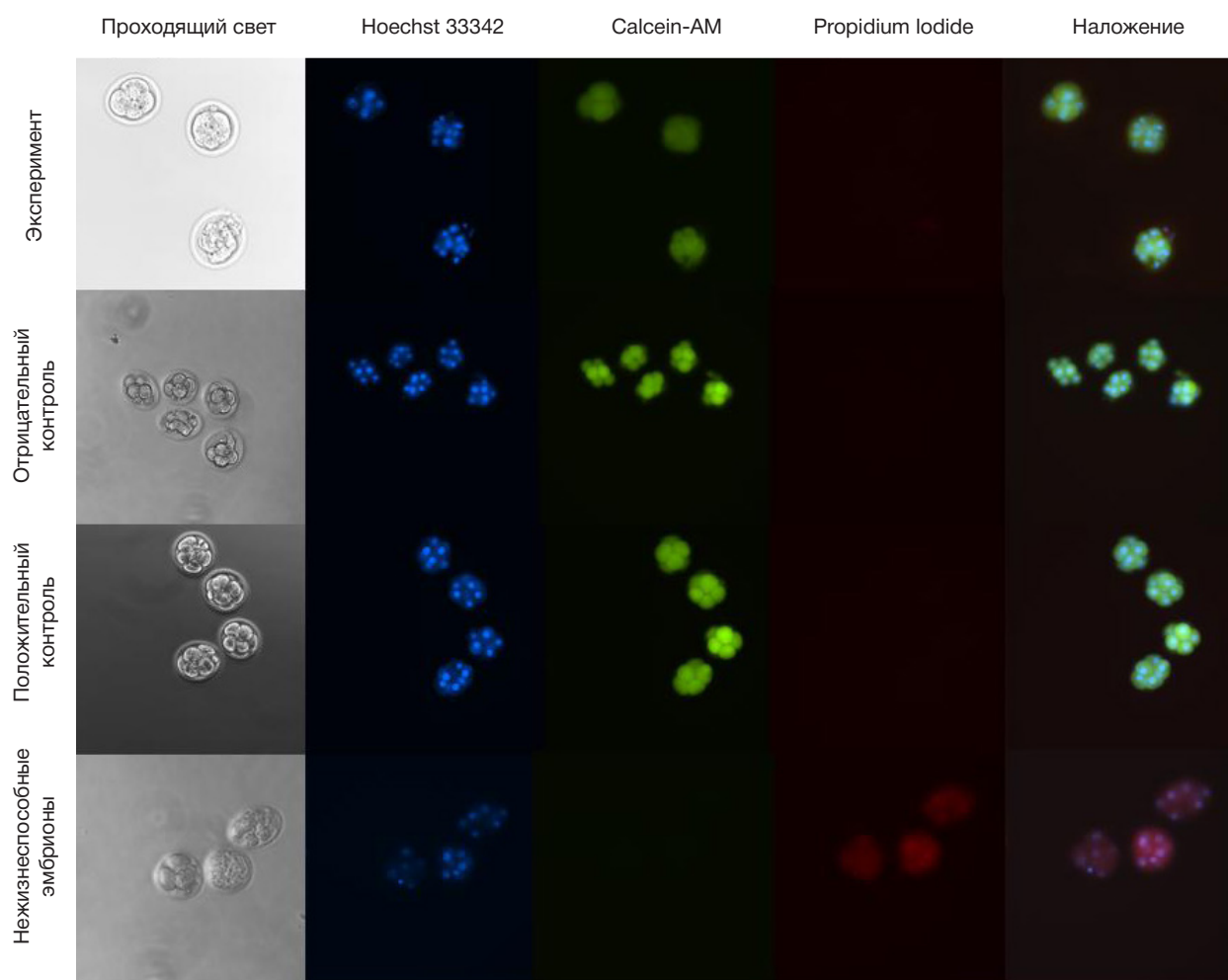


Рис. 3. Флуоресцентное окрашивание эмбрионов разных групп. Жизнеспособные эмбрионы окрашивались красителем Calcein-AM, нежизнеспособные — Propidium Iodide, ядра жизнеспособных и нежизнеспособных эмбрионов — Hoechst 33342

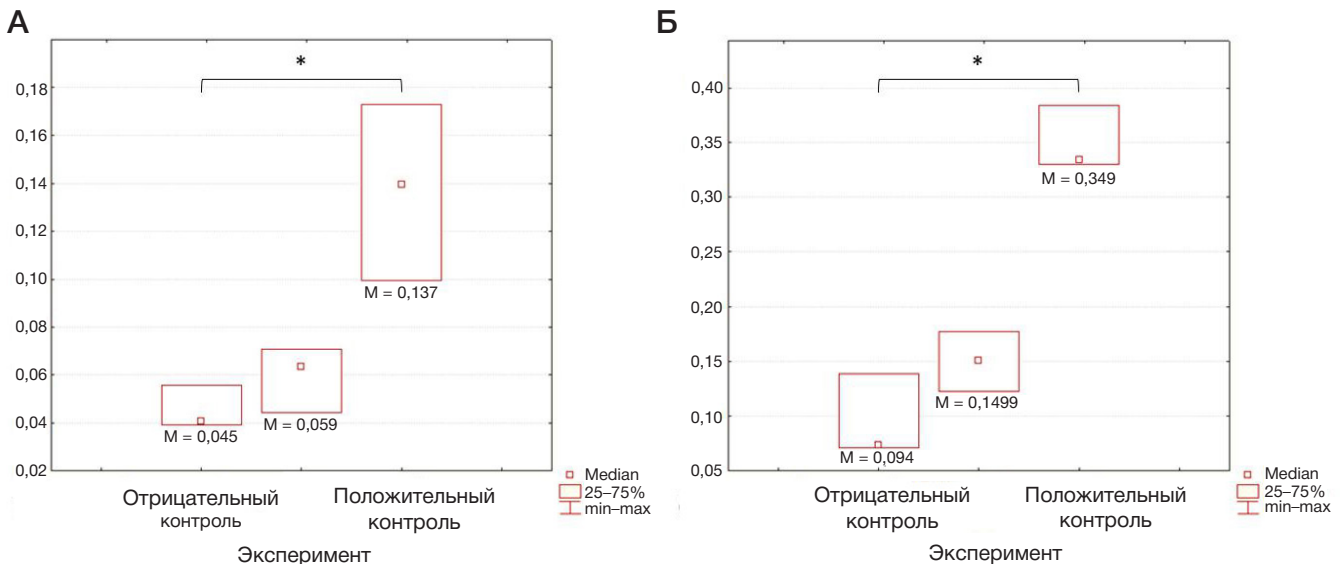


Рис. 4. Графическое изображение уровня экспрессии генов белков теплового шока в группах отрицательного и положительного контроля, а также в экспериментальной группе эмбрионов. Экспрессия генов белков теплового шока *Hsp90aa1* (А) и *Hspa5* (Б)

#### Определение уровня экспрессии генов теплового шока *Hsp90aa1* и *Hspa5*

Известно, что воздействие лазерного импульса на биологический объект сопровождается термическим локальным нагревом [19, 20]. Культивирование эмбрионов при нефизиологичных высоких температурах ( $\geq 39$  °C) способствует росту уровня экспрессии генов белков теплового шока [21]. Усиление экспрессии этих генов является частью клеточного ответа на тепловой шок. Для определения влияния лазерной микрохирургии на экспрессию генов белков теплового шока *Hsp90aa1* (семейство *Hsp90*) и *Hspa5* (семейство *Hsp70*) в эмбрионах было проведено исследование уровня экспрессии этих генов в группах отрицательного и положительного контроля, а также в экспериментальной группе эмбрионов, подвергнутых лазерному воздействию (рис. 4).

В связи с отсутствием нормального распределения среди полученных данных для анализа использовали непараметрический критерий. Сравнение данных проводили с использованием непараметрического критерия Краскела–Уоллеса. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Обнаружены статистически значимые различия между группами отрицательного и положительного контроля ( $p = 0,033$ ) для обоих рассматриваемых генов. Различия между остальными группами не являются статистически значимыми:  $p = 0,408$  при сравнении экспериментальной группы и группы положительного контроля и  $p = 0,890$  при сравнении экспериментальной группы и группы отрицательного контроля при исследовании экспрессии обоих генов *Hsp90aa1* и *Hspa5*.

Уровни экспрессии генов *Hsp90aa1* и *Hspa5* в группах отрицательного и положительного контроля имеют достоверные различия, однако различия между экспериментальной группой и группой отрицательного контроля, а также между экспериментальной группой и группой положительного контроля в величине уровня экспрессии обоих генов недостоверны. Исходя из этого, можно сделать предположение, что лазерная микрохирургия может вызывать незначительное повышение уровня экспрессии генов HSP в бластоцистах мыши.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Температура является ключевым фактором в развитии эмбрионов, и ее влияние в контексте имитации физиологических и биохимических условий половых путей было исследовано в ряде работ [22–24]. Предыдущие исследования подтверждают влияние термического стресса на репродуктивную эффективность как у домашних животных, так и у человека. Повышение температуры влияет на созревание ооцитов и развитие эмбрионов, особенно на ранних стадиях развития до активации генома зиготы. Это делает ооциты и эмбрионы более уязвимыми к тепловому стрессу, что может вызвать нарушения в их развитии. Подобные эффекты были описаны еще несколько десятилетий назад [22–24].

Существуют данные, указывающие на то, что лазерное облучение может оказывать негативные эффекты на живые объекты, например, связанные с термическим воздействием [25, 26]. Вопрос безопасности миллисекундного лазерного воздействия на эмбрионы до сих пор остается открытым. Результаты исследований указывают на определенные риски и негативные последствия этой процедуры [27]. В частности, применение лазерного воздействия для вспомогательного хетчинга на стадии 6–8 клеток привело к значительному снижению количества клеток в эмбрионах. Аналогично, на двухклеточной стадии было обнаружено увеличение фрагментации ДНК на стадии бластоцисты. Авторы исследования выразили беспокойство относительно того, что, несмотря на увеличение частоты хетчинга, повреждения ДНК могут оказать воздействие на потенциал имплантации и последующее развитие эмбрионов. Похожие выводы о негативных последствиях нарушения целостности оболочки на ранних этапах преимплантационного развития были сделаны в работе [28].

Исследование, проведенное еще в 1999 г., показало, что бластоциста, как правило, реагирует на миллисекундные лазерные импульсы, что приводит к ее коллапсу [29]. Восстановление бластоцисты занимает некоторое время, что усложняет прогнозирование сроков хетчинга и может затруднить проведение процедуры биопсии трофобласта. С этой точки зрения применение фемтосекундных лазерных импульсов может быть более эффективным, поскольку микрохирургия оболочки даже

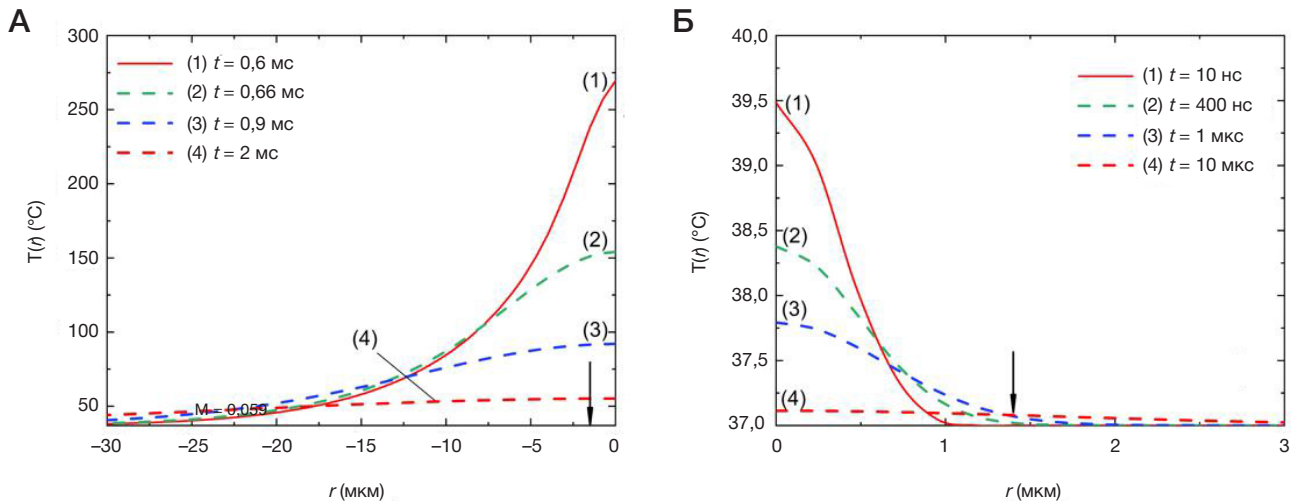


Рис. 5. Радиальные профили температур  $T(r, z = 0)$  в различные моменты времени для импульса (А) миллисекундной и (Б) фемтосекундной длительности. Стрелками отмечен размер лазерного пучка по уровню  $1/e$ . Время  $t$  отсчитывают от начала действия импульса

на поздней стадии развития эмбриона не приводит к коллапсированию бластоцисты и нарушению сроков ее хетчинга. Тем не менее, существующие данные свидетельствуют о том, что и применение фемтосекундных лазеров может представлять опасность для биологических объектов. Так, их воздействие может приводить к гибели стромальных клеток роговицы кролика [30].

Для оценки теплового воздействия, оказываемого лазерными импульсами, ранее было выполнено моделирование результата поглощения импульсов фемтосекундной длительности в сравнении с миллисекундной (рис. 5) [31]. Пространственные распределения температуры для мс ( $\lambda = 1480 \text{ нм}$ ,  $\tau = 0,6 \text{ мс}$ ,  $P = 180 \text{ мВт}$ ) и фс ( $\lambda = 514 \text{ нм}$ ,  $\tau = 280 \text{ фс}$ , интенсивность  $I_0 = 2,5 \times 10^{12} \text{ Вт/см}^2$ ) импульсов представлены как в момент достижения максимальной температуры (сплошная кривая), так и на стадии остывания среды (пунктирные кривые). Параметры воздействия признаны оптимальными для диссекции блестящей оболочки [10, 31]. При фемтосекундном воздействии тепло сосредоточено преимущественно в пределах области фокусировки пучка ( $r < 1,4 \text{ мкм}$ ), что создает предпосылки для безопасной микрохирургии эмбриона в рамках ВЛХ. Миллисекундный импульс в то же время способен прогреть существенно более объемную область среды и требует аккуратности для сведения к минимуму риска термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к ЗР, при диссекции последней.

Для оценки безопасности использования фемтосекундного лазера при проведении процедуры ВЛХ, нами были проведены эксперименты по окрашиванию эмбрионов флуоресцентными красителями и по определению уровней экспрессии генов HSP. Показано,

что даже после микрохирургии ЗР эмбрионы сохраняли жизнеспособность (наблюдается окрашивание эмбрионов витальным красителем Calcein-AM).

Для определения теплового шока, которому были подвергнуты эмбрионы в результате лазерного воздействия, были измерены уровни экспрессии генов, кодирующих два ключевых гена белков теплового шока: *Hsp90aa1* и *Hspa5*. Мы обнаружили статистически значимые различия в уровнях экспрессии данных генов между группами положительного и отрицательного контроля, тогда как уровни экспрессии данных генов в экспериментальных группах статистически значимо не отличались от контрольных групп. Полученные результаты демонстрируют хорошее согласие с теоретическими оценками.

## Выводы

Полученные результаты данного пилотного исследования позволяют сделать предположение, что наблюдаемые эффекты могут быть обусловлены локальным действием лазера, и эмбрион в целом сохраняет жизнеспособность. Таким образом, для всесторонней оценки безопасности и эффективности применения процедуры вспомогательного лазерного хетчинга с использованием фс-лазера требуется проведение дополнительных исследовательских работ. Необходимо осуществить экспериментальное сравнение фемтосекундного лазера и широко используемых в клинической практике инфракрасных лазеров в контексте их влияния на экспрессию белков теплового шока, а также оценить воздействие фемтосекундного лазера на эмбрионы мыши *in vivo*, выполнив их пересадку сурrogатным матерям.

## Литература

- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. Hum Reprod Update. 2015; 21 (4): 411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25801630.
- Krivosogova AS, Bruter AV, Makutina VA, Okulova YD, Ilchuk LA, Kubekina MV, et al. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. Theriogenology. 2022; 193: 77–86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.007.
- Báez F, Camargo AA, Gastal GDA. Ultrastructural Imaging Analysis of the Zona Pellucida Surface in Bovine Oocytes. Microsc Microanal. 2019; 25 (4): 1032–6. DOI: 10.1017/S1431927619000692. Epub 2019 May 28. PMID: 31134876.
- An L, Liu Y, Li M, Liu Z, Wang Z, Dai Y, et al. Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice. FASEB J. 2021; 35 (9): e21812. DOI: 10.1096/fj.202100653R. PMID: 34411354.

5. Nishio E, Moriwaki T, Yoshii K, Udagawa Y. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol.* 2006; 5 (4): 263–7. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00151.x.
6. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (2): 119–28. DOI: 10.1007/s10815-010-9495-3. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21042844; PMCID: PMC3059528.
7. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 2006; 86 (6): 1596–600. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.031. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055494.
8. Wang Y, Chen C, Liang J, Fan L, Liu D, Zhang X, et al. A comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching. *Lasers Med Sci.* 2022; 37 (1): 1–9. DOI: 10.1007/s10103-020-03230-9.
9. Xu W, Zhang L, Zhang L, Jin Z, Wu L, Li S, Shu J. Laser-assisted hatching in lower grade cleavage stage embryos improves blastocyst formation: results from a retrospective study. *J Ovarian Res.* 2021; 14 (1): 94. DOI: 10.1186/s13048-021-00844-7.
10. Tadir Y, Douglas-Hamilton DH. Laser Effects in the Manipulation of Human Eggs and Embryos for In Vitro Fertilization. *Methods Cell Biol.* 2007; 82 (06): 409–31.
11. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *J Biomed Opt.* 2001; 6 (2): 205.
12. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B.* 2005; 81 (8): 1015–47. DOI: 10.1007/s00340-005-2036-6.
13. Liang X-X, Zhang Z, Vogel A. Multi-rate-equation modeling of the energy spectrum of laser-induced conduction band electrons in water. *Opt Express.* 2019; 27 (4): 4672. DOI: 10.1364/oe.27.004672.
14. Ilina IV, Khramova YV, Ivanova AD, Filatov MA, Silaeva YY, Deykin AV, et al. Controlled hatching at the prescribed site using femtosecond laser for zona pellucida drilling at the early blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38 (2): 517–29. DOI: 10.1007/s10815-020-01998-x.
15. Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell.* 2011; 23 (2): 741–55. DOI: 10.1105/tpc.110.076018.
16. 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; 1: 41–8. DOI: 10.24075/vrgmu.2023.002.
17. Филатов М. А., Окулова Ю. Д., Шафеев Р. А., Коршунова Д. С., Силаева Ю. Ю. Криоконсервация как подход к сохранению уникальных линий генетически модифицированных животных. *Биотехнология.* 2022; 38 (6): 64–72. DOI: 10.56304/S0234275822060072.
18. Кубекина, М. В., Калинина, А. А., Коршунова, Д. С., Брутер, А. В., Силаева, Ю. Ю. Модели митохондриальной дисфункции с индуцируемой экспрессией мутантного варианта гена Polg. *Вестник РГМУ.* 2022; 2: 12–19. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.021.
19. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys.* 2013; 35 (10): 1406–14. DOI: 10.1016/j.medengphy.2013.03.011.
20. Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4 (1): 1–12. DOI: 10.2165/00128071-200304010-00001. PMID: 12477368.
21. Choi I, Dasari A, Kim NH, Campbell KH. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31 (2): 171–9. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.04.017.
22. Monty DE, Jr, Racowsky C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology.* 1987; 28 (4): 451–65. DOI: 10.1016/0093-691x(87)90250-0. PMID: 16726328.
23. Edwards JL, Ealy AD, Hansen PJ. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology.* 1995; 44 (3): 329–37. DOI: 10.1016/0093-691x(95)00188-e. PMID: 16727733.
24. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev.* 1997; 46 (2): 138–45. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R. PMID: 9021745.
25. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *Journal of Biomedical Optics.* 2001; 6 (2): 205. DOI: 10.1117/1.1353796.
26. Tucker M, Ball, G. Assisted hatching as a technique for use in human in vitro fertilization and embryo transfer is long overdue for careful and appropriate study. *The Journal of Clinical Embryology.* 2009; 12 (1): 9–14.
27. Honguntikar SD, Uppangala S, Saliyan SR, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK. Laser-assisted hatching of cleavage-stage embryos impairs developmental potential and increases DNA damage in blastocysts. *Lasers Med Sci.* 2015; 30 (1): 95–101. DOI: 10.1007/s10103-014-1625-1. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24989334.
28. Sanmee U, Piromlertamorn W, Vutyavanich T. The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Clin Exp Reprod Med.* 2016; 43 (3): 152–6. DOI: 10.5653/cepm.2016.43.3.152. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27689037; PMCID: PMC5039307.
29. Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J.* 1999; 40 (3): 398–403. PMID: 10411968.
30. de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Chaurasia SS, Hammel J, et al. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg.* 2009; 25 (10): 869–74. DOI: 10.3928/1081597X-20090917-08.
31. Sitnikov DS, Ilina IV, Pronkin AA. Assessment of the thermal effect of femtosecond and millisecond laser pulses in microsurgery of mammalian embryos. *Quantum Electron.* 2022; 52 (5): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047.

## References

1. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015; 21 (4): 411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25801630.
2. Krivonogova AS, Bruter AV, Makutina VA, Okulova YD, Ilchuk LA, Kubekina MV, et al. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. *Theriogenology.* 2022; 193: 77–86. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.09.007.
3. Báez F, Camargo ÁA, Gastal GDA. Ultrastructural Imaging Analysis of the Zona Pellucida Surface in Bovine Oocytes. *Microsc Microanal.* 2019; 25 (4): 1032–6. DOI: 10.1017/S1431927619000692. Epub 2019 May 28. PMID: 31134876.
4. An L, Liu Y, Li M, Liu Z, Wang Z, Dai Y, et al. Site specificity of blastocyst hatching significantly influences pregnancy outcomes in mice. *FASEB J.* 2021; 35 (9): e21812. DOI: 10.1096/fj.202100653R. PMID: 34411354.
5. Nishio E, Moriwaki T, Yoshii K, Udagawa Y. Chemical removal of zona pellucida versus laser assisted hatching after repeated failures of assisted reproductive technology. *Reprod Med Biol.* 2006; 5 (4): 263–7. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00151.x.
6. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Ali KR. Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 28 (2): 119–28. DOI: 10.1007/s10815-010-9495-3. Epub 2010 Nov 2. PMID: 21042844; PMCID: PMC3059528.
7. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Pantos K. Laser versus mechanical assisted hatching: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril.* 2006; 86 (6): 1596–600. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.05.031. Epub 2006 Oct 20. PMID: 17055494.
8. Wang Y, Chen C, Liang J, Fan L, Liu D, Zhang X, et al. A



- comparison of the clinical effects of thinning and drilling on laser-assisted hatching. *Lasers Med Sci.* 2022; 37 (1): 1–9. DOI: 10.1007/s10103-020-03230-9.
9. Xu W, Zhang L, Zhang L, Jin Z, Wu L, Li S, Shu J. Laser-assisted hatching in lower grade cleavage stage embryos improves blastocyst formation: results from a retrospective study. *J Ovarian Res.* 2021; 14 (1): 94. DOI: 10.1186/s13048-021-00844-7.
  10. Tadir Y, Douglas-Hamilton DH. Laser Effects in the Manipulation of Human Eggs and Embryos for In Vitro Fertilization. *Methods Cell Biol.* 2007; 82 (06): 409–31.
  11. Douglas-Hamilton DH, Conia J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *J Biomed Opt.* 2001; 6 (2): 205.
  12. Vogel A, Noack J, Hüttman G, Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B.* 2005; 81 (8): 1015–47. DOI: 10.1007/s00340-005-2036-6.
  13. Liang X-X, Zhang Z, Vogel A. Multi-rate-equation modeling of the energy spectrum of laser-induced conduction band electrons in water. *Opt Express.* 2019; 27 (4): 4672. DOI: 10.1364/oe.27.004672.
  14. Ilina IV, Khramova YV, Ivanova AD, Filatov MA, Silaeva YY, Deykin AV, et al. Controlled hatching at the prescribed site using femtosecond laser for zona pellucida drilling at the early blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38 (2): 517–29. DOI: 10.1007/s10815-020-01998-x.
  15. Hahn A, Bublak D, Schleiff E, Scharf KD. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell.* 2011; 23 (2): 741–55. DOI: 10.1105/tpc.110.076018.
  16. Sitnikov DS, Ilina IV, Filatov MA, Silaeva YY. Assessment of the zona pellucida microdissection on its thickness in mammalian embryos. *Bulletin of RSMU.* 2023; 1: 38–44. DOI: 10.24075/brsmu.2023.002.
  17. Filatov MA, Okulova JuD, Shafei RA, Korshunova DS, Silaeva JuJu. Kriokonservacija kak podhod k sohraneniju unikal'nyh linij geneticheskij modifitsirovannyh zhivotnyh. *Biotehnologija.* 2022; 38 (6): 64–72. DOI: 10.56304/S0234275822060072. Russian.
  18. Kubekina MV, Kalinina AA, Korshunova DS, Bruter AV, Silaeva YY. Models of mitochondrial dysfunction with inducible expression of Polg pathogenic mutant variant. *Bulletin of RSMU.* 2022. № 2. P. 11–7. DOI: 10.24075/brsmu.2022.021.
  19. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: assessment of thermal damage and healing. *Med Eng Phys.* 2013; 35 (10): 1406–14. DOI: 10.1016/j.medengphys.2013.03.011.
  20. Capon A, Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4 (1): 1–12. DOI: 10.2165/00128071-200304010-00001. PMID: 12477368.
  21. Choi I, Dasari A, Kim NH, Campbell KH. Effects of prolonged exposure of mouse embryos to elevated temperatures on embryonic developmental competence. *Reprod Biomed Online.* 2015; 31 (2): 171–9. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.04.017.
  22. Monty DE, Jr, Racowsky C. In vitro evaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed, superovulated dairy cows. *Theriogenology.* 1987; 28 (4): 451–65. DOI: 10.1016/0093-691x(87)90250-0. PMID: 16726328.
  23. Edwards JL, Ealy AD, Hansen PJ. Regulation of heat shock protein 70 synthesis by heat shock in the preimplantation murine embryo. *Theriogenology.* 1995; 44 (3): 329–37. DOI: 10.1016/0093-691x(95)00188-e. PMID: 16727733.
  24. Edwards JL, Hansen PJ. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev.* 1997; 46 (2): 138–45. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199702)46:2<138::AID-MRD4>3.0.CO;2-R. PMID: 9021745.
  25. Douglas-Hamilton DH, Conia, J. Thermal effects in laser-assisted pre-embryo zona drilling. *Journal of Biomedical Optics.* 2001; 6 (2): 205. DOI: 10.1117/1.1353796.
  26. Tucker M, Ball, G. Assisted hatching as a technique for use in human in vitro fertilization and embryo transfer is long overdue for careful and appropriate study. *The Journal of Clinical Embryology.* 2009; 12 (1): 9–14.
  27. Honguntikar SD, Uppangala S, Salian SR, Kalthur G, Kumar P, Adiga SK. Laser-assisted hatching of cleavage-stage embryos impairs developmental potential and increases DNA damage in blastocysts. *Lasers Med Sci.* 2015; 30 (1): 95–101. DOI: 10.1007/s10103-014-1625-1. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24989334.
  28. Sanmee U, Piromlertamorn W, Vutyavanich T. The effect of the site of laser zona opening on the complete hatching of mouse blastocysts and their cell numbers. *Clin Exp Reprod Med.* 2016; 43 (3): 152–6. DOI: 10.5653/cepm.2016.43.3.152. Epub 2016 Sep 22. PMID: 27689037; PMCID: PMC5039307.
  29. Montag M, van der Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. *Croat Med J.* 1999; 40 (3): 398–403. PMID: 10411968.
  30. de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Chaurasia SS, Hammel J, et al. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg.* 2009; 25 (10): 869–74. DOI: 10.3928/1081597X-20090917-08.
  31. Sitnikov DS, Ilina IV, Pronkin AA. Assessment of the thermal effect of femtosecond and millisecond laser pulses in microsurgery of mammalian embryos. *Quantum Electron.* 2022; 52 (5): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047.