

УДК 577.34

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОЙ ПЕРФОРАЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭМБРИОНОВ МЫШИ *in vitro*

© 2015 Е.О. Захарченко¹, А.А. Залесский¹, А.А. Осыченко¹,
А.С. Кривохарченко¹, А.К. Шахбазян¹, А.В. Рябова³,
В.А. Надточенко^{1,2,4*}

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва; электронная почта: nadtochenko@gmail.com

² Институт проблем химической физики РАН, Московская обл.,
142432 Черноголовка

³ Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН,
119991 Москва

⁴ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 199991 Москва

Поступила в редакцию 13.01.15

После доработки 23.02.15

Изучено влияние операции лазерной оптической перфорации блестящей оболочки (*zona pellucida*) эмбрионов мыши на их жизнеспособность и развитие. Лазерными импульсами с длиной волны генерации 1,48 мкм и длительностью 2 мс выполнены операции по утончению блестящей оболочки, перфорации одного или двух отверстий для эмбрионов на стадиях развития: двух бластомеров, морулы и бластоцисты. Изучено развитие мышинных эмбрионов до стадии бластоцисты и бластоцисты, вышедшей из *zona pellucida*. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием Z-теста. Показано, что утончение или единичная перфорация блестящей оболочки эмбриона на стадии двух бластомеров или морулы не влияет на развитие эмбрионов до стадии бластоцисты и бластоцисты, вышедшей из *zona pellucida*, но ускоряет выход на один день по сравнению с контрольной группой *in vitro*. Оптоперфорация двух отверстий на стадии двух бластомеров или морулы несущественно влияет на вероятность образования бластоцисты, но резко понижает вероятность выхода из блестящей оболочки. Также негативный эффект имеет оптоперфорация на стадии бластоцисты, после этой операции выход из *zona pellucida* не наблюдался. Подсчет клеток в бластоцистах после перфорации одного отверстия на стадии двух бластомеров или морулы показал, что число клеток в эмбрионах, выходящих из *zona pellucida* или полностью вышедших из нее, не отличается от числа клеток в таких же контрольных группах. Этот факт указывает на то, что метод лазерной оптоперфорации одного отверстия является удобным и безопасным экспериментальным приемом для осуществления дальнейших манипуляций с эмбрионом внутри блестящей оболочки, таких как извлечение полярного тельца или внесение стволовых клеток под блестящую оболочку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биофотоника, фотобиология, лазерная оптоперфорация, эмбрион, лазерный хэтчинг.

Лазерные операции на клетках и эмбрионах – актуальное направление современной фотобиологии и биофотоники. Высокая плотность мощности остро сфокусированного лазерного излучения способна обеспечить эффективное воздействие света на вещество клетки или эмбриона. Точная фокусировка лазерного пятна обеспечивает строго контролируруемую перфорацию мембран. Настоящая работа посвящена изучению влияния оптоперфорации блестящей оболочки эмбрионов млекопитающих с помощью остро сфокусированного лазерного излучения

на длине волны 1,48 мкм на дальнейшее развитие эмбриона. Такая лазерная операция предложена для использования в практике экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ). Культивируемые *in vitro* яйцеклетки и эмбрионы часто имеют нарушение в процессе естественного выхода из блестящей оболочки – «хэтчинга», что снижает вероятность имплантации и наступления беременности [1]. Метод вспомогательного «хэтчинга» (от англ. *assisted hatching*) – искусственное нарушение целостности блестящей оболочки эмбриона при механическом или химическом воздей-

* Адресат для корреспонденции.

ствии, был предложен для увеличения имплантации эмбрионов в эндометрий матки [2]. Лазерная перфорация блестящей оболочки эмбриона — самый молодой метод вспомогательного «хэтчинга» [3, 4]. Использование лазера позволяет обеспечить высокую точность воздействия, стерильность и малую инвазивность, что делает лазер удобным инструментом для проведения микроманипуляций. Однако в настоящее время существуют неоднозначные результаты по использованию данного метода. Сообщается о значительном повышении вероятности наступления беременности при использовании вспомогательного хэтчинга [5, 6]. Также утверждают о негативном влиянии метода [7]. Существует мнение об отсутствии различий в группах с искусственной перфорацией и без нее [8, 9].

Цель данной работы — изучить влияние различных манипуляций на развитие эмбрионов *in vitro* до стадии бластоцисты и способность бластоцист выходить из блестящей оболочки, выявить эффективность различных методик лазерного вспомогательного «хэтчинга». Подсчет клеток проводили для оценки качества бластоцист, развившихся *in vitro* после лазерной перфорации.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение эмбрионов. В экспериментах использовали самок мышей линии C57BL/6 и самцов линии СВА. Возраст животных составлял 1,5–2 мес. Для получения достаточного количества эмбрионов самок гормонально стимулировали. Для суперовуляции использовали гормоны: гонадотропин сыворотки жеребых кобыл («Intervet», США) и человеческий хорионический гонадотропин («Intervet», США). Гормоны (10 ед) вводили внутривенно с интервалом в 48 ч, предпочтительное время введения — вечер (16–18 ч). Это время выбирают исходя из того, что овуляция у мыши наступает спустя 10–13 ч после укола хорионического гонадотропина, это время примерно совпадает со временем спаривания самца с самкой (поздняя ночь—раннее утро). Эмбрионы выделяли на стадии двух бластомеров (2-й день после оплодотворения) путем промывания яйцеводов. Для вымывания использовали среду M2 («Sigma», США). Манипуляции с эмбрионами производили в капле среды M2 на покровном стекле. Эмбрионы культивировали в четырехлуночных чашках («Nunc», США) в среде M16 в инкубаторе с 5%-ным содержанием CO₂ при температуре 37°.

Лазерный перфоратор. Микрохирургические операции были выполнены на установке лазер-

ного манипулятора, разработанного в ИХФ РАН. Принципиальная схема оптического блока, использованного в эксперименте, представлена на рис. 1. В оптический путь инвертированного микроскопа OLYMPUS IX71 по оптоволокну с микрообъективом на конце через дихроическое зеркало заведено излучение диодного лазера («Thorlabs», США, длина волны $\lambda = 1,48$ мкм, выходная мощность 500 мВт, мощность лазерного излучения в предметной плоскости составляла 110 мВт). Излучение подавали в виде импульса и/или последовательности отдельных импульсов. Длительность импульса лазера могли варьировать от 50 нс до 5 с с помощью управляющего блока питания лазера, разработанного на основе генератора импульсов («Thorlabs», США). Во всех экспериментах по перфорации использовали длительность импульса 2 мс. Излучение лазера фокусировали объективом Olympus 60x LUCPLFLN с числовой апертурой NA = 0,7. Диаметр пучка составил $2w_0 = 1,22 \cdot \lambda / NA = 2,58$ мкм; продольный размер $z_0 = (\pi w_0^2) / \lambda = 3,53$ мкм [10], плотность энергии в области фокусировки составила $4,2 \times 10^3$ Дж/см². Коэффициент поглощения воды для длины волны 1,48 мкм составляет $0,003 \text{ см}^{-1}$ [11], при типичной использу-

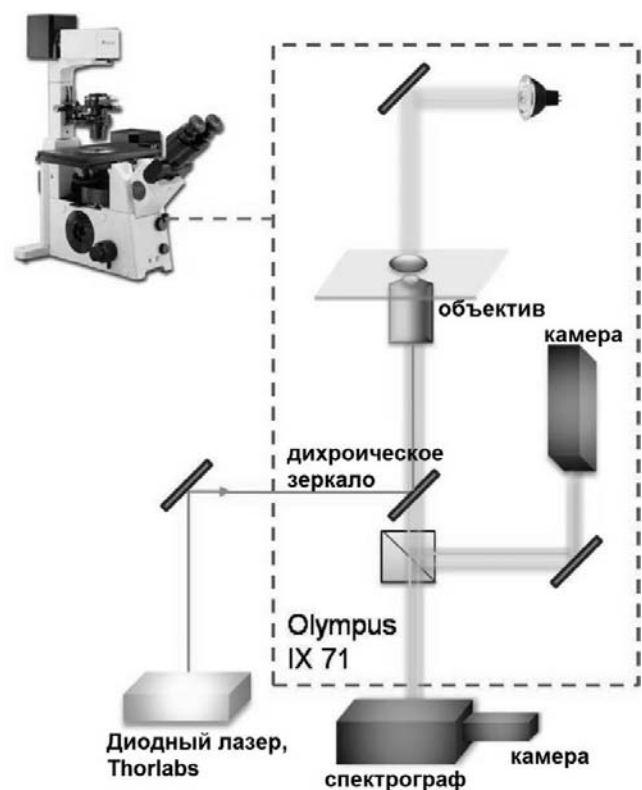


Рис. 1. Блок-схема лазерной установки для перфорации. Элементы установки указаны на рисунке

емой длительности импульса 2 мс скачок температуры в перетяжке (в пятне диаметром 2,58 мкм) составлял $\sim 75^\circ$. Управление X,Y-координатами столика микроскопа и длительностью лазерных импульсов осуществляли с помощью компьютера. Микрохирургию блестящей оболочки эмбрионов выполняли в области, максимально удаленной от blastomerov, таким образом, чтобы волна тепла, исходящая из пятна перетяжки после лазерного импульса, не травмировала blastomer. Используемый лазерный импульс приводил к образованию круглого отверстия размером 2 мкм. По заданной программе лазерное пятно перемещалось по полю блестящей оболочки, подавался импульс и таким образом последовательно происходила перфорация оболочки. Операции по лазерной перфорации осуществлялись на покровном стекле, на котором эмбрионы помещались в каплю среды M2 объемом 50 мкл. После лазерного воздействия эмбрионы помещали в четырехлуночные чашки со средой M16 и культивировали в CO_2 -инкубаторе. Время операции не превышало 2 мин и эффекты, связанные с испарением капли, были не существенны.

Количество клеток в blastocистах оценивали с помощью двух методов: приготовлением суховоздушных препаратов по Тарковскому и окраской Hoechst с последующей визуализацией на конфокальном флуоресцентном микроскопе. Для приготовления суховоздушных препаратов по методу Тарковского [12] использовали: гипотонический раствор NaCl, смесь метанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3 : 1, раствор краски Гимза 7% («ПанЭко», Россия). На предметное стекло в каплю гипотонического раствора NaCl помещали эмбрион на ~ 5 мин. Когда гипотонический раствор почти полностью испарялся, на эмбрион наносили каплю фиксирующей смеси (ледяной уксусной кислоты и метанола). После испарения фиксатора стекло помещали в 7%-ный раствор краски Гимза на 15 мин. Далее под микроскопом считали ядра blastocист.

Конфокальная микроскопия. Окраску красителем Hoechst 33342 («Sigma», США) проводили в среде M16 в CO_2 -инкубаторе с содержанием краски 5 мкг/мл в течение 10–20 мин. Затем эмбрионы отмывали в среде, не содержащей краситель, и регистрировали флуоресценцию. Локализацию флуоресценции на выщипываемых blastocистах фиксировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710-NLO («Jena», «Carl Zeiss Microscopy», Германия). Образцы из чашек для *in vitro* культивирования переносили на стерильные чашки Петри с тонким стеклянным дном

толщиной 0,16 мм в среде для манипуляций M2. Для получения изображений использовали объектив Plan_Apochromat с увеличением 20 \times (апертура 0,8). Двухфотонное возбуждение флуоресценции красителя Hoechst 33342 производили фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II («Coherent», США) с длиной волны 770 нм и максимальной плотностью мощности 25 мВт, регистрировали флуоресценцию в диапазоне 400–550 нм при конфокальной диафрагме диаметром 600 μm . Для получения изображения в проходящем свете использовали CW лазер 561 нм. Размер изображений – 512 \times 512 пикселей (0,58 нм/пиксель), скорость сканирования 1,58 μs /пиксель. Для получения 3D реконструкции blastocист получали серию изображений с шагом 5,3 μm по вертикали.

В работе выполнены следующие операции лазерной оптоперфорации блестящей оболочки:

1) *утончение дуги блестящей оболочки, равной 0,4 радиана.* В данном эксперименте у эмбрионов на стадии двух blastomerov блестящую оболочку с внешней стороны подвергали лазерному утончению с длиной дуги 20 мкм и на глубину, равную половине толщины оболочки. В экспериментальной и контрольной группе было 30 эмбрионов;

2) *утончение дуги блестящей оболочки, равной π радиан.* В этом эксперименте утончали половину окружности блестящей оболочки (π радиан, или 180 $^\circ$). Операцию проводили у эмбрионов на стадии двух blastomerov и на стадии морулы. Результат перфорации показан на рис. 2. В обеих экспериментальных группах было по 30 эмбрионов, в контрольной – 26 эмбрионов;

3) *единичная лазерная перфорация блестящей оболочки.* Производили одно сквозное отверстие через толщину блестящей оболочки, диаметр отверстия составлял 20 мкм. Операцию проводили у эмбрионов на стадии двух blastomerov и на стадии морулы. Результат перфорации показан на рис. 2. В группе с перфорацией на стадии двух blastomerov было 33 опытных эмбриона, на стадии морулы 37 эмбрионов, и в контрольной группе 30 эмбрионов;

4) *двойная лазерная перфорация блестящей оболочки.* В данном эксперименте осуществляли две перфорации друг напротив друга (диаметрально противоположное расположение). Операцию проводили у эмбрионов на стадии двух blastomerov и на стадии морулы. В первой экспериментальной подгруппе перфорировали оболочку двухклеточных эмбрионов, размер области перфорации составлял 10 мкм, во второй подгруппе на стадии морулы размер области перфорации также составлял 10 мкм и в третьей подгруппе на стадии морулы были выполнены

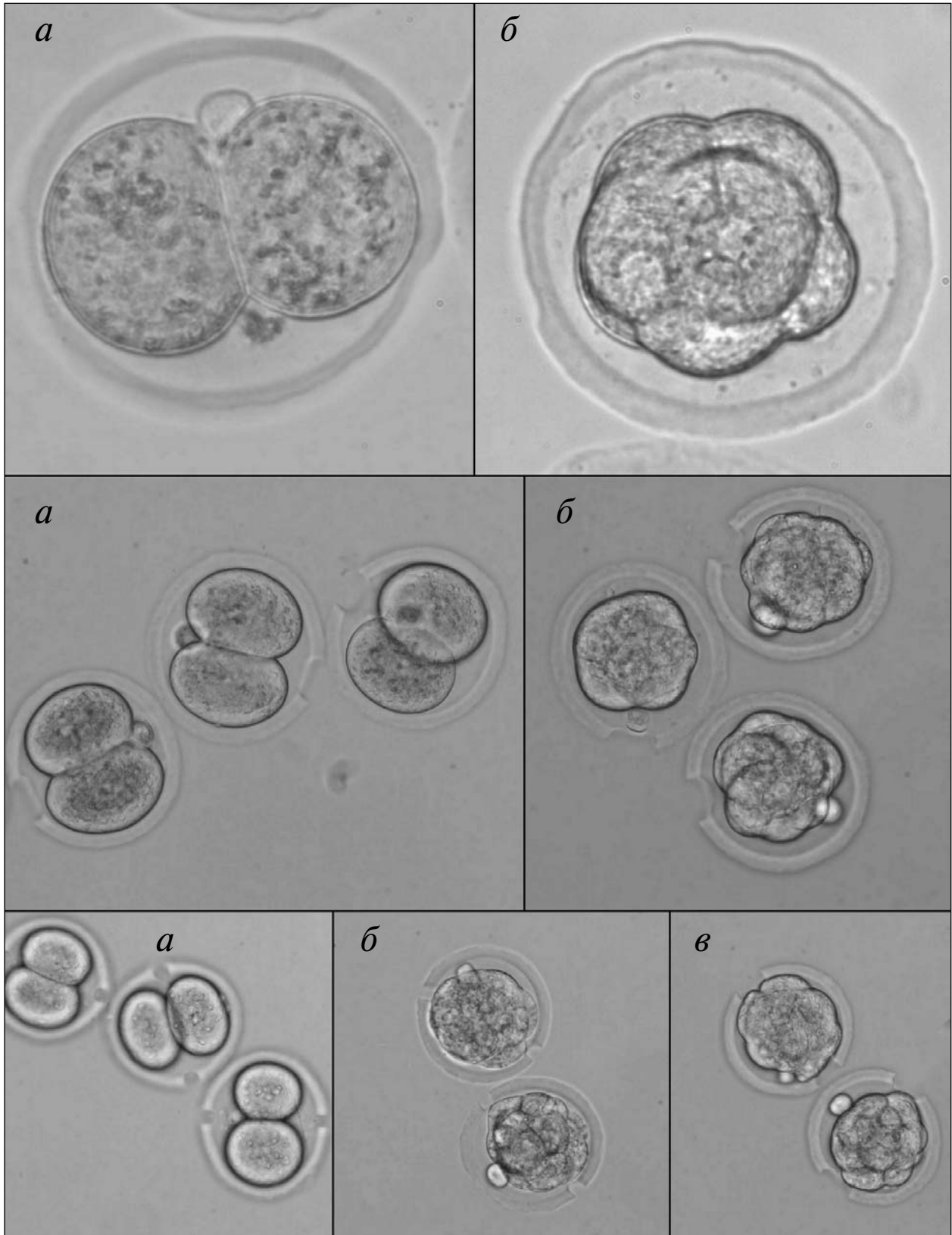


Рис. 2. Изображение эмбрионов мыши, подвергнувшихся операции оптоперфорации. Верхний ряд: операция утончения дуги блестящей оболочки, равной π радиан; второй ряд: операция единичной перфорации; третий ряд: операция двойной перфорации. *a* – Эмбрион на стадии двух бластомеров; *б* – эмбрион на стадии морулы; *в* – вылипившийся эмбрион

два отверстия размером 20 мкм. Результат перфорации показан на рис. 2. В каждой группе было по 30 эмбрионов;

5) *единичная лазерная перфорация блестящей оболочки эмбрионов на стадии бластоцист.* В данном эксперименте изучено влияние лазерной перфорации блестящей оболочки на 5-й день эмбрионального развития на стадии бластоцисты. Эмбрионы извлекали из яйцеводов мышей на 2-й день эмбрионального развития на стадии двух бластомеров и культивировали в среде в M16 до 5-го дня. На 5-й день бластоцисты подвергли лазерному воздействию, диаметр перфорации был порядка 20 мкм. Контрольная группа продолжила культивирование в инкубаторе до 6-го дня. Число эмбрионов в каждой группе составило 30. Эмбрионы контрольных групп лазерному воздействию не подвергались.

Статистическая обработка полученных результатов была проведена в программе STATISTICA 6.0. В работе для проверки статистической достоверности использовали z -тест, уровень значимости $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 изображены эмбрионы на разных стадиях развития — выходящая из блестящей оболочки бластоциста и бластоциста, полностью вышедшая из блестящей оболочки. В нормальном развитии мыши образование бластоцисты *in vivo* происходит на 4-й день развития (день, следующий за оплодотворением, которое происходит в ночные часы либо рано утром, считается первым), на 5-й день происходит вы-

лупление бластоцисты из блестящей оболочки и ее имплантация в матку. *In vitro* развитие происходит с отставанием на ~12 ч, и на 5-й день развития мы наблюдаем экспандированные бластоцисты, на 6-й — вылупление из блестящей оболочки [13]. В таблице указаны результаты подсчета эмбрионов, достигших стадии бластоцисты (5-й день развития), выходящих из блестящей оболочки на 5-й день и полностью вышедших из zona pellucida на 6-й день развития после оптоперфорации по типу: 1) утончение дуги блестящей оболочки на сегмент 0,4 радиана; 2) утончение дуги блестящей оболочки равной π радиан; 3) единичная лазерная перфорация блестящей оболочки; 4) двойная лазерная перфорация блестящей оболочки.

Анализ этих данных показывает, что оптоперфорация не влияет на развитие эмбрионов до стадии бластоцисты (5-й день развития), но заметно влияет на количество бластоцист, выходящих из блестящей оболочки на пятый день развития. В отличие от контрольных групп, где не наблюдалось выхода бластоцист из блестящей оболочки, в группах с оптоперфорацией бластоцисты выходили из zona pellucida. На шестой день развития количество эмбрионов, полностью вышедших из блестящей оболочки, оказалось практически одинаковым как для контрольной группы, так и для групп с единичной перфорацией или утончением оболочки.

Двойная перфорация блестящей оболочки значительно снижает количество эмбрионов, выходящих из zona pellucida. Процесс выхода эмбриона из блестящей оболочки, наступивший на пятый день развития, останавливается, и количество полностью вышедших из zona pellucida

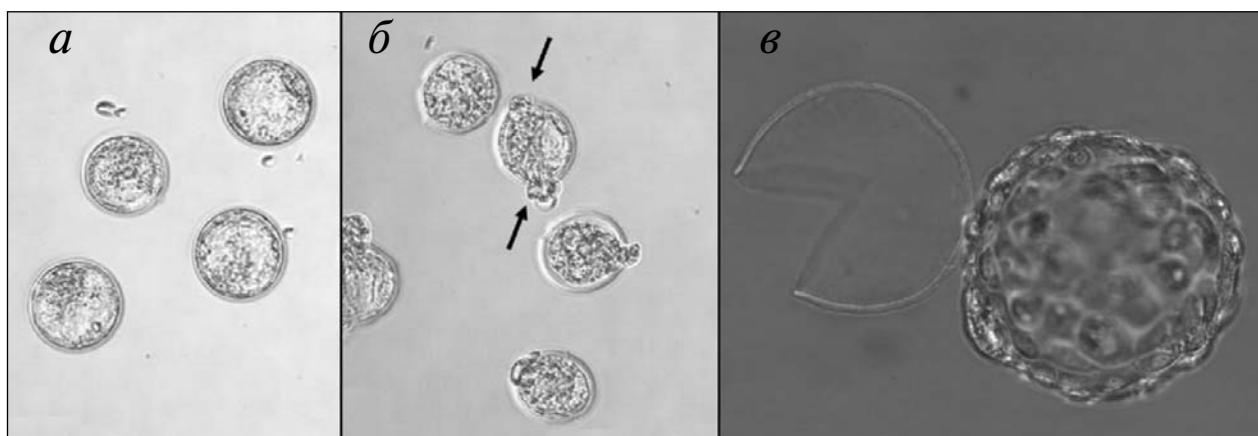


Рис. 3. Изображение эмбриона на разных стадиях развития. *a* — Бластоциста в контрольной группе (5-й день развития); *б* — вылупляющаяся бластоциста (5-й день развития). Стрелками показан выход бластоцисты из двух отверстий; *в* — вылупившийся эмбрион

Результаты развития эмбрионов после оптоперфорации

Группа эмбрионов/ выборка	Бластоцисты на 5-й день	Вылупляющиеся на 5-й день	Вылупившиеся на 6-й день
Утончение дуги блестящей оболочки на сегмент 0,4 радиана			
Стадия двух бластомеров/ $n = 30$	93,3% (28/30)	6,6% (2/30)	33,3% (10/30)
Контроль/ $n = 30$	90,0% (27/30)	0% (0/30)	30,0% (9/30)
Утончение дуги блестящей оболочки на сегмент π радиана			
Стадия двух бластомеров/ $n = 30$	90,0% (27/30)	0,00% (0/30)	30,0% (9/30)
Стадия морулы/ $n = 30$	96,6% (29/30)	26,6% (8/30)	46,7% (14/30)
Контроль/ $n = 26$	92,3% (24/26)	0,00% (0/26)	26,9% (7/26)
Едиичная лазерная перфорация блестящей оболочки			
Стадия двух бластомеров/ $n = 33$	90,9% (30/33)	84,8% (28/33)	30,3% (10/33)
Стадия морулы/ $n = 37$	91,8% (34/37)	67,5% (25/37)	32,4% (12/37)
Контроль/ $n = 30$	93,3% (28/30)	0,00% (0/30)	30,0% (9/30)
Двойная лазерная перфорация блестящей оболочки			
2 отверстия 10 мкм на стадии двух бластомеров $n = 30$	80,0% (24/30)	46,6% (14/30) из одного отверстия	3,3% (1/30)
2 отверстия 10 мкм на стадии морулы $n = 30$	90,0% (27/30)	63,3% (19/30): 60,% (18/30) из одного отверстия 3% (1/30) из двух отверстий	0,00% (0/30)
2 отверстия 20 мкм на стадии морулы $n = 30$	93,3% (28/30)	58% (18/30): 56% (17/30) из одного отверстия 3,3% (1/30) из двух отверстий	10,0% (3/30)
Контроль $n = 30$	93,3% (28/30)	0,00%	30,0% (9/30)
Лазерная перфорация блестящей оболочки бластоцист			
Бластоцисты $n = 30$			0,00% (0/30)
Контроль $n = 30$			36,6% (11/30)

бластоцист оказывается небольшим. Особенно сильно этот негативный эффект проявляется при перфорации двух отверстий диаметром 10 мкм. Процент вышедших из оболочки эмбрионов при перфорации на стадии двух бластомеров равен 3,3 (1/30), а при перфорации на стадии морулы — 0 (0/30). В контрольной группе бластоцисты, полностью вышедшие из блестящей оболочки, составляют 30% (9/30). В группе, где перфорации диаметром 20 мкм производили на стадии морулы, количество бластоцист, полностью вышедших из zona pellucida, составляет 10% (3/30). Для выхода из блестящей оболочки эмбрионы преимущественно использовали только одно из двух отверстий. Неблагоприятный эффект двойной перфорации, продемонстрированный в нашей рабо-

те, согласуется с данными работы [14], где сообщается, что нанесение двух отверстий размером 12–15 мкм в блестящей оболочке на стадии зиготы препятствуют полному выходу бластоцисты из zona pellucida. Все эмбрионы использовали для выхода оба отверстия и затем деградировали.

После перфорации блестящей оболочки на стадии бластоцисты выхода из zona pellucida у оперированных эмбрионов не наблюдалось, тогда как в контрольной группе эмбрионы выходили из оболочки со значительно более высоким успехом: 36,6% (11/30), ($p < 0,05$).

Проведен подсчет клеток в бластоцистах после едиичной перфорации. На рис. 4 представлено среднее число клеток после операции перфорации для различных экспериментальных

групп. Статистический анализ показывает, что значимое снижение числа клеток наблюдается в бластоцистах, не покинувших zona pellucida после оптоперфорации на стадии морулы. Это

наблюдение частично согласуется с результатом недавно опубликованной работы [15], в которой наблюдали снижение числа клеток у бластоцист после перфорации блестящей оболочки. В на-

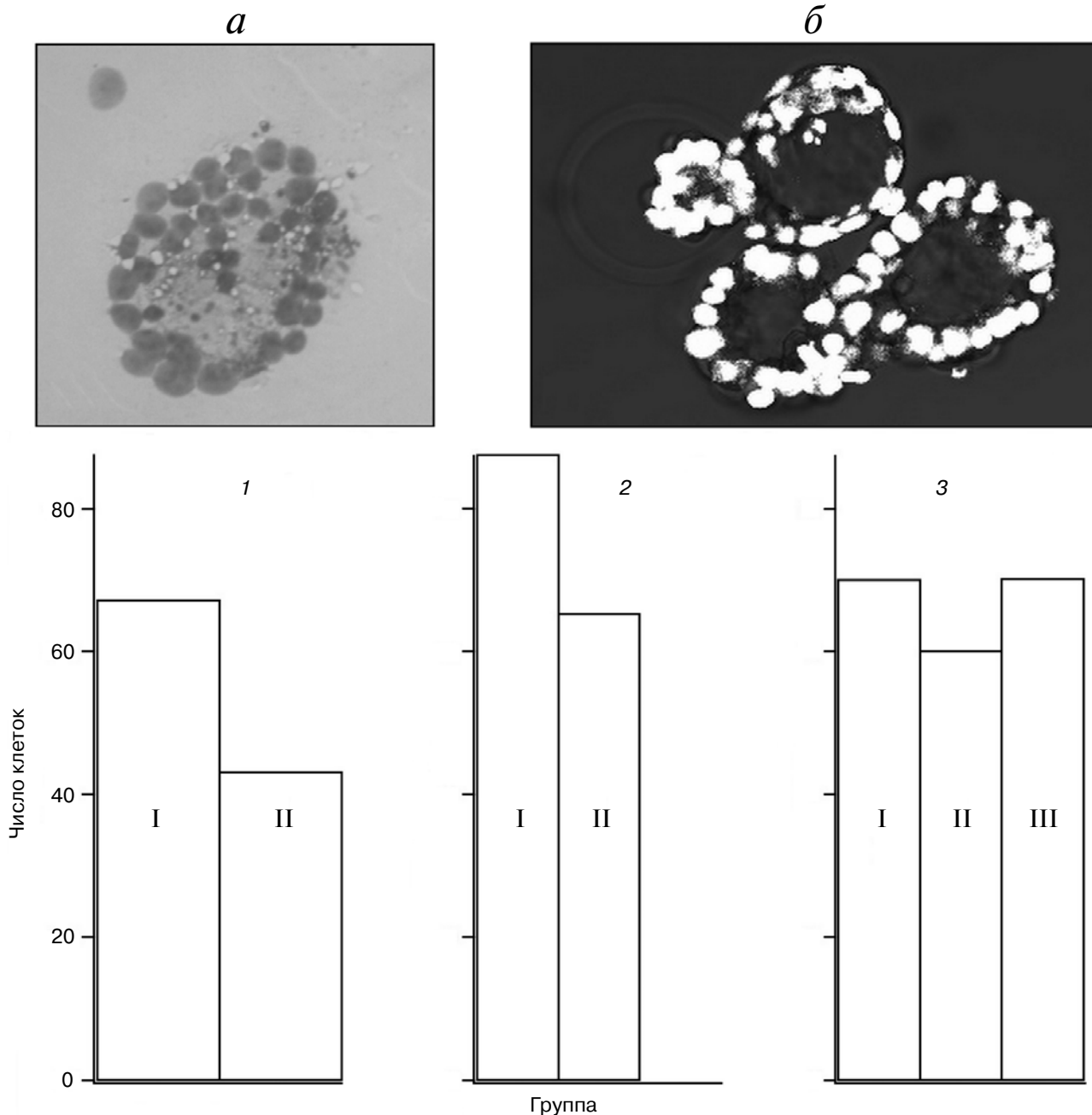


Рис. 4. Результаты подсчета клеток в бластоцистах. Вставка: *a* – ядра клеток эмбриона, окрашенные методом Тарковского; *б* – изображения окрашенных ядер клеток, полученных на конфокальном микроскопе. Число клеток в бластоцисте: 1 – не вышедших из блестящей оболочки: I – контрольная группа ($n = 7$, ср. знач. = 67,3), II – группа после единичной перфорации на стадии морулы ($n = 6$, ср. знач. = 43,2); 2 – покинувших блестящую оболочку: I – контрольная группа ($n = 4$, ср. знач. = 87,5), II – группа после единичной перфорации на стадии двух бластомеров ($n = 13$, ср. знач. = 65,3); 3 – на стадии выхода из блестящей оболочки: I – контрольная группа ($n = 9$, ср. знач. = 70,1), II – группа после единичной перфорации на стадии двух бластомеров ($n = 7$, ср. знач. = 60,1), III – группа после единичной перфорации на стадии морулы ($n = 9$, ср. знач. = 70,2)

шей работе это снижение характерно для невылупившихся бластоцист, а для бластоцист, которые начали вылупление или полностью вышли из блестящей оболочки, единичная перфорация существенно на число клеток не повлияла.

Применение вспомогательного хэтчинга, включая лазерное воздействие, остается до сих пор спорным вопросом при осуществлении экстракорпорального оплодотворения [1, 16, 17]. В данной работе экспериментально показано, что лазерное воздействие на блестящую оболочку на разных сроках эмбрионального развития не оказывает негативного воздействия на способность эмбрионов развиваться до стадии бластоцисты. Утончение половины окружности блестящей оболочки на стадии морулы и единичная лазерная перфорация оболочки ускоряли начало вылупления эмбрионов. Для выхода из zona pellucida эмбрионы всегда использовали вспомогательное отверстие, сделанное лазером, и не образуют новых отверстий. Утончение небольшого участка блестящей оболочки, половины периметра оболочки и единичная перфорация не влияют на количество бластоцист, полностью вышедших из оболочки на шестой день развития. Однако мно-

жественная лазерная перфорация снижает процент вылупившихся бластоцист. Негативный эффект на развитие эмбриона оказывает перфорация блестящей оболочки на стадии бластоцисты.

Анализ подсчета клеток показал, что после оптоперфорации количество клеток снижается только в тех бластоцистах, которые не покидают блестящую оболочку. После единичной оптоперфорации блестящей оболочки число клеток в бластоцистах, выходящих или полностью вышедших из zona pellucida, не отличается от контрольной группы.

Этот факт указывает на возможность широкого применения операции одиночной перфорации блестящей оболочки, если необходимо проникнуть под эту оболочку для выполнения каких-либо дополнительных манипуляций с эмбрионом. С этой точки зрения метод лазерной оптоперфорации одного отверстия является удобным и безопасным экспериментальным приемом для манипуляций с эмбрионом внутри блестящей оболочки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант 14-14-00856).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mohamad, E.H., Constanze, F.-H., and Khaled, R.A. (2011) Assisted hatching in assisted reproduction: a state of the art, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **28**, 119–128.
- Cohen, J., Malter, H., Fehilly, C., Wright, G., Elsner, C., Kort, H., and Massey, J. (1988) Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration, *J. Lancet.*, **16**, 162.
- Palanker, D., Ohad, S., Lewis, A., Simon, A., Shenkar, J., Penchas, S., and Laufer, N. (1991) Technique for cellular microsurgery using the 193-nm excimer laser, *J. Lasers Surg. Med.*, **11**, 580–586.
- Tadir, Y. (1988) Ten years of laser-assisted gametes and embryo manipulation, *Contemp. Obstet. Gynecol.*, **9**, 2–10.
- Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Massey, J., Mayer, M.P., and Wiemer, K. (1990) Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation, *J. Hum. Reprod.*, **5**, 7–13.
- Mansour, R.T., Rhodes, C.A., Aboulghar, M.A., Serour, G.I., and Kamal, A. (2000) Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study, *J. Hum. Reprod.*, **15**, 1061–1064.
- Primi, M.P., Senn, A., Montag, M., Van der Ven, H., Mandelbaum, J., Veiga, A., Barri, P., and Germond, M.A. (2004) European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with a diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient populations. *J. Hum. Reprod.*, **19**, 2325–2333.
- Hurst, B.S., Tucker, K.E., Awoniyi, C.A., and Schlaff, W.D. (1998) Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **15**, 62–64.
- Sifer, C., Sellami, A., Poncelet, C., Kulski, P., Martin-Pont, B., Bottero, J., Porcher, R., Cedrin-Durnerin, I., Hugues, J.N., and Wolf, J.P. (2006) A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers, *J. Hum. Reprod.*, **21**, 2384–2389.
- Silfvast, W.T. (2004) in *Laser Fundamentals* (2nd ed.). Cambridge, N.Y., 102–103.
- Hale, G.M., and Querry, M.R. (1973) Optical Constants of Water in the 200 nm to 200 microm Wavelength Region, *Appl. Opt.*, **12**, 555–563.
- Tarkowski, A.K. (1966) An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs, *Cytogenetics*, **5**, 394–400.
- Манк М. (1990) *В кн. Биология развития млекопитающих*, Методы, Мир, Москва, с. 33–34.
- Montag, M., Koll, B., Holmes, P., and van der Ven (2000) Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts *in vitro* versus *in vivo*, *J. Biol. Reprod.*, **62**, 1738–1744.
- Chailert, C., Sanmee, U., Piromlertamorn, W., Samchimchom, S., and Vutyavanich, T. (2013) Effects of partial or complete laser-assisted hatching on the hatching of mouse blastocysts and their cell numbers, *J. Reprod. Biol. Endocrinol.*, **19**, 11–21.
- Balaban, B., Urman, B., Yakin, K., and Isiklar, A. (2006) Laser-assisted hatching increases pregnancy and implantation rates in cryopreserved embryos that were allowed to cleave *in vitro* after thawing: a prospective randomized study, *J. Hum. Reprod.*, **21**, 2136–2140.
- Valojerdi, M.R., Eftekhari-Yazdi, P., Karimian, L., Hassani, F., and Movaghar, B. (2010) Effect of laser zona thinning on vitrified-warmed embryo transfer at the cleavage stage: a prospective, randomized study, *J. Reprod. BioMed. Online*, **20**, 234–242.

**EFFECT OF LASER OPTOPERFORATION
OF ZONA PELLUCIDA ON MOUSE EMBRYO
DEVELOPMENT *in vitro***

**E. O. Zakharchenko, A. A. Zalesskij¹, A. A. Osychenko¹,
A. S. Krivokharchenko, A. K. Shakhbazyan¹,
A. V. Ryabova, V. A. Nadtochenko^{1,2,4*}**

¹ *N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Moscow 119991, Russia; E-mail: nadtochenko@gmail.com*

² *Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, Moscow region 142432, Russia*

³ *A. M. Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy
of Sciences, Moscow 119991, Russia*

⁴ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty
of Chemistry, Moscow 119991, Russia*

Received January 13, 2015

Revision received February 23, 2015

An effect on mouse embryo viability and development after zona pellucida laser optical perforation has been studied. Operations of zona pellucida thinning or single or double perforation were carried out on 2-cell embryo, morula, and blastocyst stage with laser pulse (wavelength 1.48 μm , pulse duration 2 ms). Statistical analysis of embryo development up to the blastocyst stage and hatching efficiency were performed. It was shown that 2-cell or morula stage embryo zona pellucida thinning or single perforation did not affect development to the blastocyst stage and number of hatched embryos, but it accelerates embryo hatching compared to control groups a day earlier *in vitro*. Double optoperforation on 2-cell embryo or morula stage did not significantly affect development to the blastocyst stage, but strongly decreased the number of hatched embryos. Also, zona pellucida perforation at the blastocyst stage had negative effect: hatching did not occur after this manipulation. Blastocyst cell number calculation after single zona pellucida perforation at 2-cell and morula stages showed that cell number of hatching or hatched blastocysts did not differ from the same control groups. This fact points out that laser single optoperforation method is a useful and safe experimental tool that allows further manipulations within zona pellucida.

Key words: biophotonics, photobiology, laser optoperforation, embryo, laser hatching