

УДК 544.032.65; 57.017.642

ВЛИЯНИЕ ПРОТОКОЛА КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОХИРУРГИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ ЭМБРИОНОВ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

© 2024 г. Д. С. Ситников *, Д. Е. Мухдина

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

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

Поступила в редакцию 18.04.2024 г.

После доработки 05.07.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Объектом исследования в настоящей работе являлась блестящая оболочка эмбриона мыши, подвергнутого процедурам витрификации и разморозки (крио-эмбрион). Диссекция оболочки осуществлялась лазерными импульсами фемтосекундной длительности видимого диапазона спектра (длина волны излучения — 514 нм, длительность — 280 фс, частота следования импульсов — 2.5 кГц). Исследована зависимость ширины надреза D , формируемого лазерным излучением на блестящей оболочке эмбриона, от интенсивности I лазерных импульсов и скорости v перемещения луча. Полученные результаты были сопоставлены с данными для эмбрионов, не подвергавшихся процедуре криоконсервации («свежие» эмбрионы). Примененный статистический метод анализа (ANCOVA, или ковариационный анализ) продемонстрировал отсутствие статистической разницы в значениях зависимостей $D(I, v)$ для двух групп: свежих и крио-эмбрионов. Таким образом, параметры лазерного излучения для микрохирургии свежих эмбрионов подходят для диссекции блестящей оболочки эмбрионов, подвергнутых процедурам витрификации и разморозки.

DOI: 10.31857/S0040364424050131

ВВЕДЕНИЕ

Блестящая оболочка, или *zona pellucida* (ZP), представляет собой прозрачную эластичную гликопротеиновую оболочку, окружающую яйцеклетку, и выполняет ряд важнейших функций на стадии оогенеза, оплодотворения и преимплантационного развития. Хетчинг (вылупление, от англ. hatching) — этап разрыва блестящей оболочки и выхода эмбриона для последующей имплантации в стенку матки. Самостоятельный хетчинг может быть затруднен в силу ряда причин, включая нарушение выработки ферментов, отвечающих за лизис оболочки, или наличие более толстой оболочки (например, более 18 мкм у человека [1]). Для решения этой проблемы в современных клиниках репродуктивной медицины специалисты применяют локальную микрохирургию ZP с использованием миллисекундных лазерных диссекторов — вспомогательный лазерный хетчинг (ВЛХ). Поглощение лазерного импульса приводит к локальному нагреву среды

в области фокусировки до нескольких сотен градусов [2] и разрушению белков оболочки. Размер области диссекции зависит от энергии лазерного импульса и составляет от 5 до 20 мкм. В силу возможного риска термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к оболочке, данную процедуру рекомендовано выполнять на ранних сроках развития эмбриона, для которых характерно большее расстояние (~20 мкм [3]) между клетками и оболочкой, называемое перивителлиновым пространством.

Альтернативой коммерческим диссекторам могут служить фемтосекундные лазеры, успешно применяемые для решения актуальных задач биологии развития и репродуктивной медицины (см. обзоры [4, 5]). Нелинейные механизмы поглощения фемтосекундного лазерного излучения в водной среде [6, 7] позволяют локализовать область лазерного воздействия и сформировать надрез на блестящей оболочке шириной меньше геометрического размера сфокусированного лазерного излучения. Предельная

локализация (надрез шириной ~ 1 мкм) сделала возможным развитие технологии бесконтактной лазерной гравировки преимплантационных эмбрионов [8, 9] для их индивидуальной маркировки. Процесс локального нарушения целостности ZP фемтосекундными импульсами носит нетепловой характер — увеличение температуры в области фокусировки составляет единицы градусов, а сам процесс нагрева и остывания имеет субмикросекундную длительность [10]. Делikatность фемтосекундного воздействия позволила разработать технологию управляемого вспомогательного лазерного хетчинга [11], выполняемую на поздней стадии развития эмбриона (стадии бластоцисты) без нарушения динамики его развития, а также продемонстрировать возможность бесконтактной биопсии с его использованием [12].

В клинической практике в циклах экстракорпорального оплодотворения все чаще применяют технологию криоконсервации эмбрионов, что позволяет отложить процедуру переноса на более поздний срок или сохранить их для повторной беременности. Одной из особенностей эмбрионов после цикла заморозки/разморозки является изменение физико-химических свойств их ZP. Речь идет о гипотезе так называемого уплотнения/затвердевания блестящей оболочки [13]. С этой точки зрения интерес представляет исследование влияния процедуры криоконсервации эмбрионов на результат микрохирургии с использованием фемтосекундных лазерных импульсов, а также сравнение диапазона значений параметров лазерного воздействия при диссекции свежих и крио-эмбрионов.

Объектом исследования в настоящей работе является блестящая оболочка эмбриона, подвергнутого процедуре витрификации и последующей заморозке (здесь и далее обозначаемого как крио-эмбрион). Витрификация — это один из способов заморозки эмбриона, отличающийся большой скоростью понижения температуры и позволяющий свести к минимуму формирование кристаллов льда и избежать повреждения клеток. Вопрос влияния параметров лазерного излучения на формируемый надрез блестящей оболочки был ранее изучен для фемтосекундных импульсов как видимого ($\lambda = 514$ нм) [14], так и инфракрасного ($\lambda = 1028$ нм) [15] диапазонов спектра. Было показано, что надрез заданной ширины D может быть получен при различном сочетании таких параметров, как энергия фемтосекундных импульсов E и скорость перемещения лазерного луча v . Для описания полученных зависимостей были построены функционалы $D(E, v)$. Цель настоящей работы заключается в исследовании влияния указанных параме-

тров лазерного воздействия на ширину надреза блестящей оболочки крио-эмбрионов, а также сравнение полученных результатов с данными для эмбрионов, не подвергнутых процедуре заморозки/разморозки.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА

Для микрохирургии эмбрионов использовалась установка «Фемтосекундный лазерный скальпель-оптический пинцет» [16, 17], представленная на рис. 1. Источником излучения служил фемтосекундный лазер ТЕТА (ООО «Авеста Проект»), генерирующий лазерные импульсы длительностью $\tau = 280$ фс с энергией $E = 330$ мкДж с частотой следования $f \leq 2.5$ кГц. В нелинейном кристалле DKDP (дейтерированный дигидрофосфат калия, KD_2PO_4) происходило удвоение частоты и преобразование инфракрасного излучения ($\lambda = 1028$ нм) в видимое с длиной волны $\lambda = 514$ нм. Энергия лазерных импульсов в эксперименте регулировалась с помощью узла, представляющего собой поляризационный ослабитель, расположенный между источником и кристаллом DKDP. Лазерное излучение, заведенное в боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71, фокусировалось микрообъективом $20\times UPlanFL$, $NA = 0.5$ (Olympus) в пятно радиусом $r_0 = 1.42$ мкм по уровню $1/e$ от максимума интенсивности. Подробное описание методики измерения размера пятна изложено в [15].

Микрохирургия эмбрионов проводилась в специальных чашках Петри со стеклянным

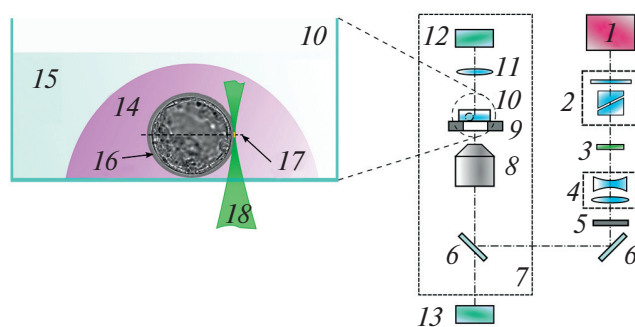


Рис. 1. Схема экспериментальной установки: 1 — фемтосекундный лазер, 2 — поляризационный ослабитель, 3 — кристалл DKDP, 4 — телескоп, 5 — механический прерыватель лазерного излучения, 6 — зеркала на длину волны лазерного излучения, 7 — инвертированный микроскоп, 8 — микрообъектив, 9 — моторизованный предметный столик, 10 — чашка Петри с эмбрионом, 11 — конденсор микроскопа, 12 — осветитель, 13 — видеокамера, 14 — капля питательной среды, 15 — минеральное масло, 16 — эмбрион, 17 — экваториальная плоскость, 18 — лазерный луч.

дном толщиной 170 мкм (кат. № 200350, SPL Lifesciences). Эмбрионы рассаживались в капли питательной среды (по три штуки в каждую каплю). Для предотвращения испарения капли покрывались слоем жидкого парафинового масла (ПанЭко, категория № Э0350-160). Чашка Петри, установленная на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar), перемещалась относительно неподвижного лазерного луча. Излучение фокусировалось в экваториальной плоскости — плоскости максимального сечения эмбриона. Его изображение, регистрируемое камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source), выводилось на экран персонального компьютера. Оператор задавал траекторию движения лазерного луча поверх изображения эмбриона в специализированном программном обеспечении, управляющем работой лазера и моторизованного столика. Микрохирургия эмбриона осуществлялась в автоматизированном режиме.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОЦЕНКА ШИРИНЫ НАДРЕЗА

Объектом исследования служили эмбрионы мыши, предварительно прошедшие цикл заморозки/разморозки (далее крио-эмбрионы), находящиеся как на четырехклеточной стадии развития, так и стадии морулы. Блестящая оболочка эмбриона на рассматриваемых стадиях не подвергается ни механическим растягивающим напряжениям, ни воздействию протеаз, размягчающих ЗР при вылуплении. Последние вырабатываются клетками трофэктодермы бластоцисты (см. работы [18, 19] и приводимые в них ссылки), которые отсутствуют у морулы и эмбрионов более ранних стадий. Указанные факторы свидетельствуют о неизменности толщины оболочки и ее свойств, а следовательно, о пригодности эмбрионов на выбранных этапах развития для задач исследования. Были отобраны

эмбрионы в количестве 10 штук, остановившиеся в своем развитии и не вошедшие ни в экспериментальную, ни в контрольную группы в предыдущем исследовании [20]. Подробная информация о получении эмбрионов и их культивировании изложена в работе [21], протокол криоконсервации—разморозки представлен в Приложении к работе [20]. Эмбрионы на ранней стадии развития представляют собой удобный объект для исследования. Их морфология обеспечивает достаточно большое расстояние (около 10 мкм) между клетками и оболочкой эмбриона, что позволяет избежать повреждения клеток при поиске оптимальных параметров лазерного воздействия. Сама оболочка имеет большую ширину (8–10 мкм), что удобно при оценке ширины формируемого лазерного надреза.

Диссекция блестящей оболочки осуществлялась последовательностью лазерных импульсов при линейном перемещении эмбриона относительно лазерного луча с заданной скоростью v в радиальном направлении от внешней границы блестящей оболочки эмбриона к внутренней. На рис. 2 представлена микрофотография фрагмента оболочки эмбриона после выполнения серии надрезов при различной энергии лазерных импульсов E ; скорость луча $v = 0.01$ мм/с и частота импульсов $f = 2.5$ кГц.

Для определения ширины надреза строился профиль сечения его изображения (перпендикулярно надрезу), который представлял собой зависимость яркости от пространственной координаты (подробнее см. [15]). При определении ширины выполненного надреза D осуществлялось осреднение измерений по 50 сечениям, обозначенным прямоугольником на рис. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Надрезы на блестящей оболочке крио-эмбрионов становились видимыми при достижении определенного значения энергии лазерных импульсов $E_{\min}$, которое было тем больше, чем выше была скорость перемещения луча. Данное наблюдение полностью соответствует результатам, полученным в предыдущем исследовании со свежими эмбрионами [14]. Максимально допустимые рабочие значения $E_{\max}$ ограничивались энергией лазерных импульсов, вызывающих оптический пробой водной среды $E_{\text{ОВ}}$, и не превосходили эту энергию ($E_{\max} < E_{\text{ОВ}}$). Последний приводил к формированию парового пузыря, который мог отбросить эмбрион в сторону. Другая опасность для эмбриона состояла в том, что возникновение пузыря в толще блестящей оболочки в непосредственной близости к внутренней границе ЗР сопровождалось повреждением мембраны близлежащих клеток и

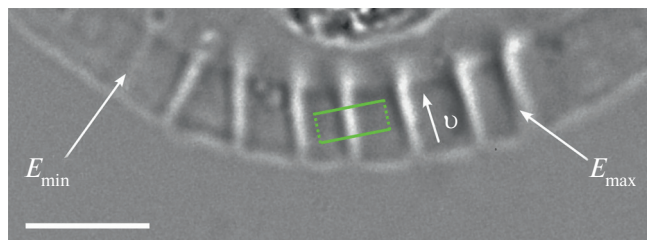


Рис. 2. Микрофотография фрагмента блестящей оболочки эмбриона после выполнения микрохирургии при различной энергии лазерных импульсов ($v = 0.01$ мм/с, $f = 2.5$ кГц); $E_{\min} = 30$ нДж, $E_{\max} = 68$ нДж; масштабная линейка — 25 мкм; прямоугольником отмечена область для построения профилей сечения.

вытеканием их содержимого в полость оболочки. Полученные в настоящей работе значения энергии, пригодные для микрохирургии ZP (от $E_{\min} = 30$ нДж до $E_{\max} = 68$ нДж), оказались выше соответствующих значений для свежих эмбрионов ($E_{\min} = 19$ нДж, $E_{\max} = 51$ нДж [14]). Данный факт является следствием большего значения радиуса пучка ($r_0 = 1.42$ мкм против $r_0 = 1.12$ мкм в [14]). Поэтому для сравнения результатов микрохирургии в разных исследованиях целесообразно от энергии перейти к параметру импульса, отнесенному к площади, такому как интенсивность. При аппроксимации временной формы импульса, а также пространственного распределения его плотности мощности функцией Гаусса значение интенсивности может быть оценено по формуле [22]

$$I = \frac{2\tau_d \sqrt{\ln 2} E}{\sqrt{\pi} \pi r_0^2 \tau} = \frac{0.94 \tau_d E}{\pi r_0^2 \tau},$$

где $\tau_d = 0.95$ — коэффициент пропускания дна чашки Петри на длине волны лазерного излучения.

Интенсивности $I_{\text{ОВ}}$, при которых в эксперименте наблюдался оптический пробой, сопровождавшийся формированием пузырей, в случае свежих и крио-эмбрионов оказались достаточно близки: 4.7 и 4.5 ТВт/см² соответственно (значения энергии составили $E_{\text{ОВ}} \approx 90$ нДж здесь и $E_{\text{ОВ}} \approx 58$ нДж в работе [14], в которой область энергий при пробое обозначена на рис. 3 как ОВ). В работе [23], посвященной экспериментальному исследованию оптического пробоя воды лазерными импульсами фемтосекундной длительности, значение пороговой интенсивности на длине волны $\lambda = 520$ нм составило $I_{\text{th}} \approx 3$ ТВт/см². В качестве критерия оптического пробоя в указанной работе использовалось образование кавитационного пузырька, радиус которого составлял ~ 250 нм; с ростом энергии импульса размер пузырька увеличивался. Интенсивности, соответствующие формированию пузыря размером ~ 5 мкм, в настоящей статье и в [23] совпадают с погрешностью 10%: 4.5 и 4.1 ТВт/см² соответственно. Различие в значениях интенсивности можно объяснить использованием в работе [23] высококачественной оптики с большей числовой апертурой $NA = 0.8-0.9$, обеспечивавшей фокусировку лазерного излучения в пятно, близкое по качеству к дифракционному.

Минимальные энергии лазерных импульсов в экспериментах со свежими и крио-эмбрионами при одинаковых значениях скорости луча и частоте следования импульсов ($v = 0.01$ мм/с, $f = 2.5$ кГц), при которых в толще блестящей оболочки эмбрионов визуализировался надрез, соответствовали интенсивности

$I_{\min} \approx 1.53 \pm 0.05$ ТВт/см². Таким образом, именно интенсивность лазерных импульсов является адекватным параметром для сравнения индуцированных эффектов при воздействии фемтосекундных лазерных импульсов как на блестящую оболочку эмбриона, так и на водную среду. Интенсивности, пригодные для микрохирургии блестящей оболочки эмбриона, должны быть меньше порога оптического пробоя среды, в которой он находится.

Ширина надреза определяется совокупностью параметров, включающих радиус перетяжки лазерного пучка r_0 , скорость его перемещения v и частоту следования f , которые определяют пространственное перекрытие лазерных импульсов при перемещении по траектории $D \sim r_0 f/v$. Для определения диапазона допустимых параметров лазерного воздействия была проведена серия экспериментов при различных значениях скорости v и фиксированной частоте $f = 2.5$ кГц. Исследования $D(v)$ были проведены для трех значений интенсивности лазерных импульсов: $I = 1.3$ ТВт/см² (значение, близкое к минимальному, при котором на блестящей оболочке эмбриона замечен эффект лазерного воздействия при $v = 0.005$ мм/с), 2.4 и 2.8 (серии 4–6 на рис. 3 соответственно).

Одна из целей настоящего исследования заключалась в сравнении ширины формируемого надреза для групп свежих и крио-эмбрионов. Для сопоставления значений указанных групп зависимости $D(E)$, полученные в [14] для свежих эмбрионов, были пересчитаны в зависимости $D(I)$. Для наглядности маркеры для каждого из трех значений интенсивности выделены цветом (черный, красный и синий). Дополнительно на график нанесены линии — аппроксимации экс-

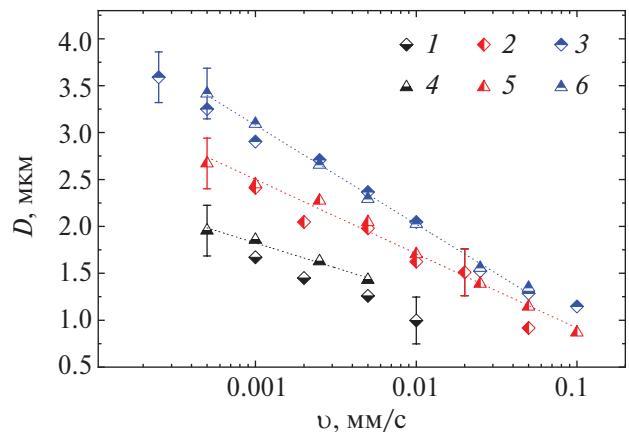


Рис. 3. Зависимости ширины надреза ZP от скорости лазерного пучка $D(v)$ при различных значениях интенсивности I : 1 — свежие эмбрионы, $I = 1.4$ ТВт/см²; 2 — 2.2; 3 — 2.75; 4 — крио-эмбрионы, $I = 1.3$ ТВт/см²; 5 — 2.4; 6 — 2.8.

периментальных данных крио-группы уравнением линейной регрессии по переменной $\lg(v)$, значения коэффициентов которой представлены в табл. 1:

$$D(v) = \beta_1 - \beta_2 \lg(v).$$

Сравнение надрезов при близких интенсивностях в сериях для свежих и крио-эмбрионов показало, что значения ширины надреза совпадают в пределах погрешности измерений с тенденцией к небольшому (~ 0.25 мкм) увеличению для крио-эмбрионов.

ANCOVA (от англ. analysis of covariance) – модель дисперсионного анализа, позволяющая проводить сравнение средних значений одной непрерывной зависимой переменной по двум или более независимым переменным (факторам) и определять эффекты взаимодействий ковариат и ковариат с факторами. Ковариата – это переменная, которая потенциально связана с целевой (зависимой) переменной, но ее влияние не является целью проводимого анализа. Факторная переменная делит генеральную совокупность на группы. ANCOVA позволяет проверить нулевую гипотезу о влиянии других переменных на средние значения единственной зависимой переменной в различных группах [24].

В настоящей работе ANCOVA использовалась для определения статистической разницы результатов микрохирургии в группах свежих и крио-эмбрионов. Зависимой переменной вы-

ступала ширина надреза D ; значения интенсивности I и скорости v служили ковариатами в модели, а фактор «group», принимающий значение 1 или 2, делил совокупность данных на две группы: 1) свежие и 2) крио-эмбрионы (1–3 и 4–6 на рис. 3). Для решения данной задачи использовалась функция *ancova* из пакета *pingouin* [25] для языка python, входной набор данных для которой представлен в табл. 2 (маркеры 1–3 и 4–6 на рис. 3; по 19 значений в группе). Каждое из 19 значений в группе было получено путем осреднения по 50 профилям сечений изображения соответствующего надреза (как на рис. 2).

Результатом ANCOVA являются вычисленные значения сумм квадратов (SS, sums of squares), степеней свободы (DF, degrees of freedom), значения F -критерия (F -statistics), нескорректированного уровня значимости (p -unc, uncorrected p -values) и частичного эта-квадрата (np^2 , partial eta-squared). Все перечисленные значения приведены в табл. 3.

Здесь np^2 – это метрика размера эффекта, показывающая долю вариации в зависимой переменной, которая объясняется конкретным фактором или ковариатой. Она варьируется от 0 до 1 и интерпретируется так: 0.01 – малый эффект, 0.06 – средний эффект, 0.14 и выше – сильный эффект. $DF = 1$ означает, что в этом анализе имеется одна степень свободы, которая соответствует количеству уровней группы минус один. В контексте дисперсионного анализа и ANCOVA одна степень свободы указывает на наличие двух уровней в факторе (в данном случае две группы сравнения). Значение $SS = 0.022496$ говорит о том, что вклад группы в общую дисперсию низкий. F -критерий сравнивает вариативность между группами и вариативность внутри них. Значение $F = 1.13$ для фактора «group» указывает, что дисперсия, связанная с этим фактором, практически равна дисперсии ошибки, т.е. фактору «group» не удастся внести значимый вклад в общую вариативность зависимой переменной D . Поскольку значение $p = 0.29$ для «group» больше заданного уровня $p = 0.05$, а значение F – низкое, нулевая гипотеза об отсутствии статистически значимых различий между группами свежих и крио-эмбрионов считается верной. Большое значение $F = 304.1$ и крайне низкое $p = 1.57 \times 10^{-18}$ показывают, что ковариата I является значимым предиктором, который существен-

Таблица 1. Коэффициенты линейной регрессии для крио-эмбрионов

I , ТВт/см ²	1.3	2.4	2.8
β_1	2.23 ± 0.14	0.12 ± 0.07	-0.09 ± 0.06
β_2	0.53 ± 0.05	0.79 ± 0.03	1.05 ± 0.02

Таблица 2. Данные для ANCOVA

№ значения	D , мкм	I , ТВт/см ²	$\lg(v)$, [мм/с]	Группа
1	1.34607	2.80351	−1.30103	1
2	1.55857	2.80351	−1.60206	1
3	2.02607	2.80351	−2.00000	1
...				
37	1.45031	1.40202	−2.60206	2
38	1.67147	1.40202	−3.00000	2

Таблица 3. Результаты ANCOVA

	SS	DF	F	p -unc	np^2
Group	0.022496	1	1.133907	0.29	0.032
I	6.033028	1	304.096406	1.57×10^{-18}	0.899
v	14.651584	1	738.517025	1.21×10^{-24}	0.956

но влияет на зависимую переменную D , что наглядно продемонстрировано на рис. 3. Значение $np^2 = 0.899$ — почти 90% дисперсии объяснены этой ковариатой, что указывает на очень сильный эффект. Аналогичные результаты получены и по ковариате v : $F = 738.52$ и $p = 1.21 \times 10^{-24}$ свидетельствуют о сильнейшем влиянии v на ширину надреза D , а $np^2 = 0.956$ — что ковариата v обуславливает около 95.6% вариации.

Таким образом, можно утверждать, что процедуры витрификации и разморозки эмбрионов не оказывают влияния на результат микрохирургии блестящей оболочки эмбриона. Полученные ранее значения параметров лазерного воздействия для свежих эмбрионов подходят для диссекции ZP крио-эмбрионов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было выполнено исследование зависимости ширины формируемого надреза на блестящей оболочке эмбриона от параметров лазерного воздействия для эмбрионов, подвергнутых процедуре витрификации и разморозки. Микрохирургия оболочки осуществлялась фемтосекундными лазерными импульсами длительностью 280 фс, следующими с частотой 2.5 кГц, на длине волны излучения 514 нм. Исследована зависимость ширины надреза как от интенсивности лазерных импульсов I при заданной скорости перемещения лазерного луча v , так и от скорости v при различных значениях интенсивности I . Проведено сравнение результатов с экспериментальными данными для свежих эмбрионов, полученных ранее для той же длины волны излучения. Показано, что, как и в случае свежих эмбрионов, заданного значения ширины надреза можно достичь при различном сочетании параметров лазерного воздействия, а диапазоны допустимых значений интенсивности I и скорости перемещения лазерного пучка v для свежих и крио-групп совпадают. Обнаруженные различия в ширине формируемого надреза в ZP между группами свежих и крио-эмбрионов, по мнению авторов, обусловлены различием размера сфокусированного лазерного пучка r_0 в соответствующих исследованиях и статистически незначимы. Это в свою очередь позволяет использовать полученные ранее аналитические зависимости ширины надреза от параметров лазерного воздействия для свежих эмбрионов при прогнозировании результатов диссекции ZP эмбрионов в протоколе криоконсервации с поправкой на размер сфокусированного лазерного пучка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках госзадания № 075-00270-24-00 на оборудовании УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекунд-

ный комплекс», входящей в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН.

Авторы выражают благодарность М.А. Филатову и Ю.Ю. Силаевой за предоставленные эмбрионы.

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено этическим комитетом ИБГ РАН (протокол 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. Marco-Jiménez F., Naturil-Alfonso C., Jiménez-Trigos E., Lavara R., Vicente J.S. Influence of Zona Pellucida Thickness on Fertilization, Embryo Implantation and Birth // *Anim. Reprod. Sci.* 2012. V. 132. № 1–2. P. 96.
2. 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.
3. Douglas-Hamilton D.H., Conia J. Thermal Effects in Laser-assisted Pre-embryo Zona Drilling // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. № 2. P. 205.
4. Ilina I., Sitnikov D. From Zygote to Blastocyst: Application of Ultrashort Lasers in the Field of Assisted Reproduction and Developmental Biology // *Diagnosics*. 2021. V. 11. № 10. P. 1897.
5. Ilina I.V., Sitnikov D.S. Application of Ultrashort Lasers in Developmental Biology: A Review // *Photonics*. 2022. V. 9. № 12. P. 914.
6. Vogel A., Venugopalan V. Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues // *Chem. Rev.* 2003. V. 103. № 2. P. 577.
7. 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.
8. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S. Femtosecond Laser is Effective Tool for Zona Pellucida Engraving and Tagging of Preimplantation Mammalian Embryos // *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019. V. 36. № 6. P. 1251.
9. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S. Application of Femtosecond Laser Microsurgery in Assisted Reproductive Technologies for Preimplantation Embryo Tagging // *Biomed. Opt. Express*. 2019. V. 10. № 6. P. 2985.
10. 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.
11. Ilina 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.
12. *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.
 13. *Choi J.K., Yue T., Huang H., Zhao G., Zhang M., He X.* The Crucial Role of Zona Pellucida in Cryopreservation of Oocytes by Vitrification // *Cryobiology.* 2015. V. 71. № 2. P. 350.
 14. *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.
 15. *Ситников Д.С., Мухдина Д.Е., Филатов М.А., Силаева Ю.Ю.* Определение оптимальных параметров воздействия при микродиссекции блестящей оболочки эмбриона с помощью инфракрасных фемтосекундных лазерных импульсов // *ТВТ.* 2024. Т. 62. № 1. С. 121.
 16. *Irina I.V., Ovchinnikov A.V., Sitnikov D.S., Rakityanskiy M.M., Agranat M.B., Khramova Y.V., Semenova M.L.* Application of Femtosecond Laser Pulses in Biomedical Cell Technologies // *High Temp.* 2013. V. 51. № 2. P. 173.
 17. *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.
 18. *O'Sullivan C., Rancourt S., Liu S., Rancourt D.* A Novel Murine Trypsase Involved in Blastocyst Hatching and Outgrowth // *Reproduction.* 2001. V. 122. № 1. P. 61.
 19. *Ma M., Zhang L., Liu Z., Teng Y., Li M., Peng X., An L.* Effect of Blastocyst Development on Hatching and Embryo Implantation // *Theriogenology.* 2024. V. 214. P. 66.
 20. *Ситников Д.С., Мухдина Д.Е., Коршунова Д.С., Силаева Ю.Ю., Филатов М.А., Ильина И.В.* Влияние лазерной микродиссекции блестящей оболочки эмбрионов на динамику ее истончения при использовании протоколов криоконсервации // *ТВТ.* 2023. Т. 61. № 4. С. 632.
 21. *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. Т. 1. № 1. С. 41.
 22. *Shchatsinin I.* Theses. Free Clusters and Free Molecules in Strong, Shaped Laser Fields. Berlin, Germany: Freie Universitat, 2009. 94 p.
 23. *Vogel A., Linz N., Freidank S., Paltauf G.* Femtosecond-Laser-induced Nanocavitation in Water: Implications for Optical Breakdown Threshold and Cell Surgery // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 100. № 3. P. 038102.
 24. Анализ ковариации (ANCOVA). 2021. <https://www.ibm.com/docs/ru/spss-statistics/beta?topic=features-analysis-covariance-ancova>
 25. *Vallat R.* Pingouin: Statistics in Python // *J. Open Source Software.* 2018. V. 3. № 31. P. 1026.