

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МИКРОДИССЕКЦИИ БЛЕСТЯЩЕЙ ОБОЛОЧКИ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ЕЕ ТОЛЩИНУ

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

<sup>1</sup> Объединенный институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

Блестящая оболочка (*zona pellucida*, ZP) — динамически меняющийся объект, играющий важную роль на преимплантационной стадии развития эмбриона. Ее толщина может оказывать влияние на успешность имплантации и частоту наступления беременности, в ряде исследований ее рассматривают как прогностический критерий. Целью работы было исследовать динамику толщины блестящей оболочки эмбриона мыши в результате процедуры вспомогательного лазерного хетчинга (ВЛХ), когда нарушение целостности ZP проводят на стадии бластоцисты. Для микрохирургии оболочки использовали импульсы излучения фемтосекундной длительности. Измерение толщины оболочки проводили как на стадии микрохирургии бластоцисты (~E3.5, т. е. 3,5 дня эмбрионального развития), так и на стадии вылупления (~E5). Обнаружены статистически значимые различия толщины ZP эмбрионов в контрольной группе — с 6,21 мкм (E3.5) до 5,4 мкм (E5). В группе, подвергавшейся ВЛХ, изменения толщины с 6,6 мкм (E3.5) до 6,2 мкм (E5) оказались статистически незначимыми. Отслеживание толщины ZP индивидуального эмбриона от стадии бластоцисты до стадии вылупления позволило оценить коэффициент истончения для контрольной и экспериментальной групп. Полученные данные свидетельствуют о снижении предела прочности оболочки при проведении ВЛХ и могут служить базисом для последующих исследований ее свойств в случае применения протоколов криоконсервации эмбрионов.

**Ключевые слова:** бластоциста, толщина блестящей оболочки, истончение, вспомогательный лазерный хетчинг, фемтосекундные лазерные импульсы

**Финансирование:** экспериментальные исследования по ВЛХ были выполнены с использованием УНУ «Лазерный тераваттный фемтосекундный комплекс», входящим в состав ЦКП «Лазерный фемтосекундный комплекс» ОИВТ РАН при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Государственного задания № 075-01129-23-00. Эмбрионы были получены с использованием Уникальной научной установки «Трансгенбанк» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках проекта (Соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021).

**Вклад авторов:** Д. С. Ситников — проведение лазерной микрохирургии, обработка результатов, написание статьи; И. В. Ильина — идея исследования, написание статьи; М. А. Филатов — работа с эмбрионами, статистическая обработка, написание статьи; Ю. Ю. Силаева — руководство; обсуждение и редактирование статьи — все авторы.

**Соблюдение этических стандартов:** все манипуляции с животными производили в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и рекомендациями комиссии по биоэтике Института биологии гена РАН.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Сергеевич Ситников  
ул. Красноказарменная, д. 17а, г. Москва, 111116, Россия; sitnik.ds@gmail.com

**Статья получена:** 09.11.2022 **Статья принята к печати:** 30.12.2022 **Опубликована онлайн:** 27.01.2023

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2023.002

## ASSESSMENT OF THE ZONA PELLUCIDA MICRODISSECTION ON ITS THICKNESS IN MAMMALIAN EMBRYOS

Sitnikov DS<sup>1</sup> ✉, Ilina IV<sup>1</sup>, Filatov MA<sup>2</sup>, Silaeva YuYu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The zona pellucida (ZP) is a dynamically changing object that plays an important role during the preimplantation stage of embryogenesis. The ZP thickness may affect the implantation success and pregnancy rate, it is considered as a prognostic factor in a number of studies. The study was aimed to assess the dynamic changes in the mouse embryonic ZP thickness after laser assisted hatching (LAH) that involved breaching the ZP integrity at the blastocyst stage. Femtosecond laser pulses were used to perform the zona microsurgery. The zona thickness was measured both at the stage of blastocyst microsurgery (~E3.5, i.e. 3.5 days of embryogenesis) and at the hatching stage (~E5). Significant differences in the ZP thickness were revealed in the control group of embryos: from 6.21 μm (E3.5) to 5.4 μm (E5). The changes in thickness from 6.6 μm (E3.5) to 6.2 μm (E5) observed in the group subjected to LAH were non-significant. Tracing the ZP thickness of a particular embryo from the blastocyst stage to the hatching stage made it possible to estimate the thinning coefficients in the experimental and control groups. The findings that indicate lower tensile strength of the zona in case of LAH can provide the basis for further research on the ZP properties in case of using the embryo cryopreservation protocols.

**Keywords:** blastocyst, zona pellucida thickness, thinning, laser assisted hatching, femtosecond laser pulses

**Funding:** experimental studies of laser assisted hatching were performed using the unique scientific facility “Terawatt Femtosecond Laser Complex” in the Center for Collective Usage “Femtosecond Laser Complex” of JIHT RAS and were funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment № 075-01129-23-00). Embryos were obtained using the unique scientific facility Transgenebank and supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (grant № 075-15-2021-668 of 29.07.2021).

**Author contribution:** Sitnikov DS — laser microsurgery, data processing, manuscript writing; Ilina IV — study concept, manuscript writing; Filatov MA — handling embryos, statistical processing, manuscript writing; Silaeva YuYu — management; discussion and manuscript editing — all authors.

**Compliance with ethical standards:** animals were handled in accordance with the Declaration of Helsinki and the guidelines issued by the Bioethics Commission at the Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry S. Sitnikov  
Krasnokazarmennaya, 17a, Moscow, 111116, Russia; sitnik.ds@gmail.com

**Received:** 09.11.2022 **Accepted:** 30.12.2022 **Published online:** 27.01.2023

**DOI:** 10.24075/brsmu.2023.002

Блестящая оболочка (*zona pellucida*, ZP) представляет собой внеклеточный матрикс, окружающий ооцит на ранних стадиях развития и выполняющий ряд важных функций на стадии оогенеза, оплодотворения и преимплантационного развития. Блестящая оболочка выполняет функцию физического барьера для защиты эмбриона от микроорганизмов, вирусов и иммунных клеток, которые могут присутствовать в яйцеводе [1]. Она позволяет ооциту после овуляции свободно перемещаться в фаллопиевой трубе, предотвращает имплантацию эмбриона в стенку яйцевода [2], обеспечивает возможность видоспецифичного оплодотворения, индукцию акросомной реакции у сперматозоидов и блокирование полиспермного оплодотворения [3]. Ограничение объема эмбриона внутри ZP на стадии дробления обеспечивает более тесный контакт между бластомерами, необходимый для компактизации [4], а в дальнейшем поддерживает целостность внутренней клеточной массы (ВКМ) [5]. Толщина блестящей оболочки эмбриона имеет большое значение и оказывает влияние на его дальнейшую судьбу — от оплодотворения до его имплантации в эндометрий.

Существует ряд факторов, под влиянием которых эмбрион может испытывать затруднение с самостоятельным вылулплением из оболочки и последующей имплантацией, например, при наличии более толстой (более 17 мкм) [6, 7] или плотной блестящей оболочки, либо в случае, если нарушена выработка ферментов, отвечающих за лизис *zona pellucida* [8]. В последнее десятилетие широкое распространение в клиниках приобрела процедура вспомогательного лазерного хетчинга (ВЛХ), основанная на воздействии на ZP лазерными импульсами для истончения или сквозного иссечения оболочки с целью упрощения последующего вылулпления эмбриона. Как правило, для этого применяют инфракрасные лазерные диссекторы миллисекундной длительности. В результате поглощения лазерного импульса оболочкой происходит локальное разрушение белков ZP вследствие нагрева до нескольких сотен градусов [9]. Размер области диссекции обусловлен энергией лазерного импульса, теплофизическими свойствами объекта и составляет 5–20 мкм. Ввиду возможного риска термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих к оболочке, лазерную микродиссекцию рекомендуют делать с соблюдением жестких регламентов, в основном, на ранних стадиях преимплантационного развития эмбриона, для которых характерно более широкое перивителлиновое пространство (т. е. расстояние между прозрачной оболочкой и клеточной мембраной яйцеклетки или зиготы) по сравнению с поздними стадиями преимплантационного развития.

Альтернативой применяемым коммерческим решениям может служить технология лазерной микрохирургии с использованием лазерных импульсов фемтосекундной длительности. В основе физики взаимодействия фемтосекундного импульса с биологическим объектом лежат процессы многофотонного поглощения, а процесс локального нарушения целостности ZP носит нетепловой характер [10]. Данное обстоятельство позволяет предельно локализовать область лазерного воздействия, ограничиваясь размером пятна фокусировки излучения в пределах ~1,5–2 мкм. Преимущества использования фемтосекундных лазерных импульсов, включая минимальную ширину диссекции ZP и минимизацию теплового воздействия излучения на прилегающие клетки эмбриона, были реализованы ранее в технологиях

управляемого вспомогательного хетчинга [11] и маркировки эмбрионов на преимплантационной стадии развития [12, 13].

Интерес к исследованиям свойств ZP повышается желанием обнаружить надежные индикаторы качества ооцита. Именно качество ооцитов рассматривают как один из ключевых факторов фертильности женщины, поскольку оно определяет исходный потенциал для развития эмбриона [14]. Так, в ряде работ были исследованы корреляции толщины ZP (как одного из индикаторов) [15, 16], а также вариабельность ее значения у эмбриона с частотой наступления беременности и имплантации [6, 15, 17, 18]. Механические свойства оболочки рассматривали также в качестве предикторов успешности развития ооцитов после оплодотворения [19], качества эмбрионов [20] и успешности имплантации [21].

Несмотря на то что ВЛХ применяют в клинической практике несколько десятилетий, детальных исследований, посвященных тому, как данная процедура влияет на структуру, морфологию прозрачной оболочки, чрезвычайно мало. Актуальность проведения подобных исследований не вызывает сомнений, так как анализ динамических изменений прозрачной оболочки при искусственном нарушении ее целостности по сравнению с естественным циклом позволит получить дополнительную информацию о механизмах разрушения/истончения оболочки и факторах, определяющих успешность вылулпления и последующей имплантации эмбрионов. Кроме того, на сегодняшний день в клиническую практику внедрены эффективные подходы криоконсервации эмбрионов на любой стадии их преимплантационного развития с использованием метода витрификации. В то же время имеются данные об изменении физико-химических свойств ZP таких эмбрионов и возможном ее уплотнении или утолщении (так называемое уплотнение блестящей оболочки (*zona hardening*)) [22]. С учетом этого, важно изучение влияния ВЛХ на изменение свойств оболочки, так как полученные данные могут служить основой при сравнительном анализе особенностей вылулпления эмбрионов, подвергавшихся витрификации.

Целью работы является исследование влияния ВЛХ с помощью фемтосекундного лазера на характеристики блестящей оболочки эмбрионов домово́й мыши на стадии бластоцисты. Данный этап развития эмбриона является начальным в процессе хетчинга эмбриона, на котором блестящая оболочка подвергается существенным деформирующим нагрузкам. Принципиальную возможность микрохирургии оболочки на стадии бластоцисты (т. е. на более поздней стадии преимплантационного развития) обеспечивает применение лазерных импульсов фемтосекундной длительности. Как было показано нами ранее [11, 23], микрохирургия ZP с их использованием не оказывает негативного влияния на дальнейшее развитие эмбриона.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Экспериментальная установка

Эксперименты по микрохирургии эмбрионов выполняли на установке «Фемтосекундный лазерный скальпель» (рис. 1), созданной в ОИВТ РАН [24]. В качестве лазерного скальпеля использовали излучение фемтосекундного лазерного источника ТЕТА («Авеста»; Триец). Лазерные импульсы после преобразования во вторую гармонику излучения в кристалле ДКДП имели следующие параметры: длительность импульса — 280 фс, энергия — 50 мкДж,

длина волны излучения — 514 нм, частота следования импульсов — 2,5 кГц. Лазерное излучение заводилось в правый боковой порт инвертированного микроскопа Olympus IX-71 и фокусировалось микрообъективом 20xUPlanFL (Olympus; Япония) с числовой апертурой NA = 0,5 в пятно диаметром ~2 мкм по полувысоте. Узел ослабления, установленный на пути лазерного излучения до заведения в микроскоп, служил для регулировки энергии лазерных импульсов, а узел телескопа — для согласования диаметра лазерного пучка с апертурой микрообъектива. При выполнении микрохирургических процедур энергия лазерных импульсов составляла 20 нДж, что соответствовало интенсивности 2,5 ТВт/см<sup>2</sup>. Эмбрионы рассаживали в каплю среды для культивирования в чашке Петри со стеклянным дном толщиной 170 мкм. Чашку Петри устанавливали на моторизованном предметном столике микроскопа (Märzhäuser Wetzlar; Германия) для перемещения эмбриона относительно неподвижного лазерного луча. Излучение фокусировали в плоскости максимального сечения эмбриона — в «экваториальной» плоскости. Изображение эмбриона регистрировали камерой DFK 72AUC02 (The Imaging Source; Германия). Для автоматизации процедуры микрохирургии использовали программное обеспечение, позволяющее оператору задавать траекторию движения лазерного луча поверх изображения эмбриона.

### Животные

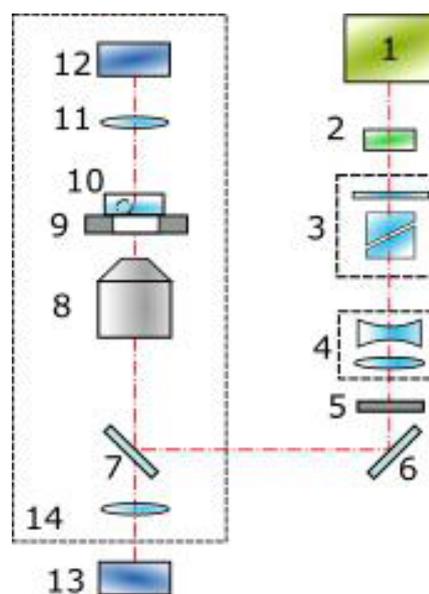
Для получения эмбрионов использовали гибридных мышей F1 C57Bl/6JxСВА из питомника Федерального медико-биологического агентства России (филиал «Столбовая»; Россия). Животных содержали в контролируемых условиях (22–24 °С при световом режиме 14 ч день : 10 ч ночь) с доступом к питанию (специализированный экструдированный комбикорм для разведения мышей) и воде *ad libitum*.

### Гормональная стимуляция овуляции

Для получения большого числа эмбрионов одновременно применяли широко используемый протокол стимуляции овуляции. В качестве доноров использовали неполовозрелых самок весом 10–12 г в возрасте около трех недель. 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.

### Получение эмбрионов

Умерщвление животных осуществляли путем дислокации шейных позвонков. Получение эмбрионов на стадии зиготы производили в день обнаружения вагинальной пробки. Из животного с помощью ножниц вырезали яйцеводы и помещали их в предварительно нагретую до 37 °С HEPES-содержащую среду Ооклин («Пан-Эко»; Россия). Затем под контролем стереомикроскопа с помощью игл от шприцов вскрывали ампулярные части яйцеводов и извлекали из них ооцит-кумулюсные комплексы. Затем в данную каплю вносили примерно 0,03 г гиалуронидазы (препарат Лидаза; «Микроген», Россия) для очистки зигот от клеток



**Рис. 1.** Схема фемтосекундного лазерного скальпеля. 1 — фемтосекундный лазер; 2 — преобразователь излучения во вторую гармонику; 3 — узел ослабления; 4 — узел телескопа; 5 — механический прерыватель лазерного излучения; 6, 7 — зеркала на длину волны лазерного излучения; 8 — микрообъектив; 9 — моторизованный предметный столик; 10 — чашка Петри с эмбрионом; 11 — конденсор микроскопа; 12 — осветитель; 13 — КМОП-камера; 14 — инвертированный микроскоп

кумулюса. Полученные зиготы последовательно отмывали в четырех каплях среды Ооклин, после чего переносили в среду для культивирования.

### Перевозка эмбрионов

Для транспортировки из ИБГ РАН в ОИВТ РАН для проведения процедуры ВЛХ эмбрионы помещали в предварительно нагретую до 37 °С HEPES-содержащую среду Ооклин («Пан-Эко»; Россия). Перевозку осуществляли в пробирках эппендорф объемом 2 мл. Пробирку с эмбрионами перевозили при стабильном тепловом режиме +37 °С. После перевозки эмбрионы отмывали в среде для культивирования, трижды перенося их по каплям.

### Культивирование эмбрионов

Культивирование эмбрионов до стадии морулы (примерно 2,5 дня эмбрионального развития, E2,5) осуществляли в четырехлуночных планшетах (Thermo Fisher Scientific Nunc; США), используя среду для культивирования гамет и эмбрионов CSCM-C (Fujifilm Irvine Scientific; США). От стадии морулы до стадии бластоцисты (E3,5) эмбрионы культивировали в покрытых минеральным маслом (Origio; Дания) каплях среды CSCM-C (Fujifilm Irvine Scientific; США) объемом 20 мкл по 2–3 эмбриона в капле.

### Эксперимент

В каждой чашке Петри со стеклянным дном (кат. № 200350; SPL Lifesciences, Корея) предварительно формировали по три капли со средой для культивирования, которые затем покрывали минеральным маслом. За день до эксперимента эмбрионы на стадии морулы рассаживали в подготовленные чашки Петри и переносили в инкубатор. В каждую каплю помещали по три эмбриона. Микрохирургию прозрачной оболочки эмбрионов осуществляли на стадии бластоцисты (~E3,5).

Эмбрионы в количестве 99 штук были разделены на две группы: экспериментальную (Э) — 63 штуки и группу параллельного контроля (ПК) — 36 штук. Оператор делал фотографию эмбриона в исходном состоянии, задавал траекторию движения лазерного луча для микродиссекции оболочки эмбриона, выполнял процедуру ВЛХ и делал финальный снимок эмбриона после процедуры. Общее время, затрачиваемое на один эмбрион, не превышало 1,5 мин. Вылупление эмбрионов происходило, как правило, на стадии E5, когда осуществлялась очередная фотосъемка эмбрионов.

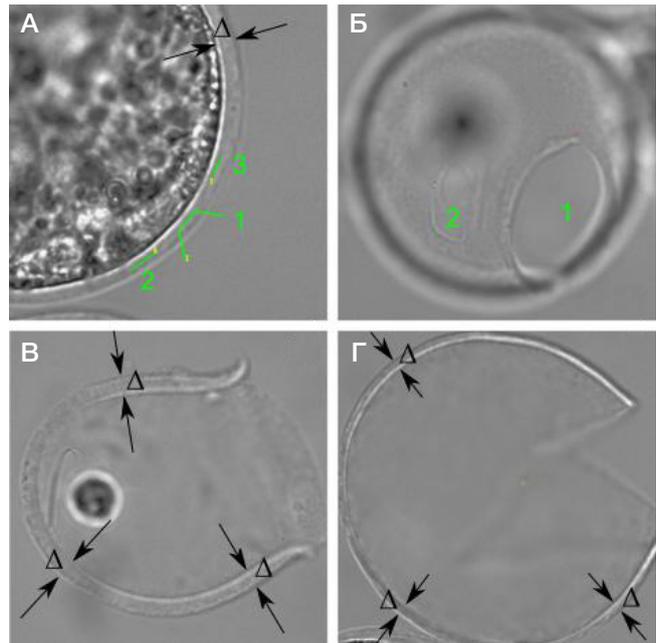
### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Dell; США), Microsoft Excel 2013 (Microsoft corporation; США). С использованием критериев Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка были проверены гипотезы о нормальности распределений исследуемых показателей. Поскольку представленные в работе данные имели распределения, отличные от нормального, то для их анализа использовали непараметрические критерии. В данном случае значимыми показателями служили медиана, квартили (25–75%) и вариация (минимальное и максимальное значения) исследуемой величины. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий); для сравнения двух зависимых групп использовали критерий Уилкоксона для связанных выборок. Критический уровень значимости для всех статистических критериев принимали равным 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 2А показан фрагмент оболочки эмбриона до воздействия лазерным излучением. Примитивы (зеленые линии 1–3) задавали траекторию движения лазерного луча. Лазерное воздействие вдоль ломанной линии 1 было необходимо для нарушения целостности оболочки эмбриона в рамках процедуры ВЛХ. Прорезание ZP осуществляли примерно на 80–90% ее толщины. Линии 2 и 3 были вспомогательными (для подтверждения, что эмбрион вылуплялся именно через искусственно сформированное отверстие (рис. 2Б)). Для каждого эмбриона экспериментальной группы проводили измерение толщины ZP на момент выполнения операции. Толщину оболочки  $\Delta$  измеряли в трех разных областях с угловым шагом ~90–120°. Аналогичные измерения толщины ZP эмбриона были выполнены на стадии вылупления эмбриона или после ее окончания как в экспериментальной группе (рис. 2В), так и в группе ПК (рис. 2Г).

Данные о толщине прозрачной оболочки эмбрионов экспериментальной и контрольной групп представлены на рис. 3. Как известно, в процессе вылупления в естественном цикле ZP подвергается растяжению. Так, нами было показано, что толщина блестящей оболочки демонстрирует статистически значимое уменьшение  $\Delta_{cp}$  с 6,21 мкм (E3,5) до 5,4 мкм (E5) для контрольной группы эмбрионов, не подвергнутых лазерному воздействию. Для экспериментальной группы подобного истончения прозрачной оболочки не обнаружено, и измеренные значения  $\Delta_{cp}$  составили 6,6 мкм (E3,5) и 6,2 мкм (E5). Проведенная статистическая обработка экспериментальных данных (с использованием U-критерия Манна–Уитни) подтвердила статистически значимое



**Рис. 2.** Фотографии эмбриона до проведения микрохирургии оболочки (А); прозрачной оболочки после вылупления (Б). 1 — отверстие в ZP после хетчинга blastocysty в результате формирования разреза по траектории 1 (на фрагменте а); 2 — результат реза по траектории 2 (на фрагменте а). Оболочка после вылупления эмбриона в экспериментальной группе (В) и группе ПК (Г)

различие значений толщины ZP (E5) в цикле естественного вылупления и после процедуры ВЛХ.

Еще одним интересным параметром является коэффициент истончения оболочки  $K = \Delta_{E5} / \Delta_{E3,5}$ , где  $\Delta_{E3,5}$  и  $\Delta_{E5}$  — толщина оболочки отдельно взятого эмбриона спустя 3,5 и 5 дней после оплодотворения соответственно. Его медианное значение для экспериментальной группы составляет  $K_{мед.э} = 0,95$ . Столбцы диаграммы (рис. 4А) правее линии  $K = 1$  означают, что толщина ZP на стадии вылупления превышала таковую на момент проведения операции микрохирургии. В отдельных случаях зафиксированная разница достигала 23%. Это может быть связано с тем, что в процессе вылупления blastocysta демонстрирует периодические изменения своего объема (экспандирование и коллапсирование), растягивая при этом блестящую оболочку [25]. При этом измерение толщины ZP на стадии микрохирургии (E3,5) пришлось на фазу растяжения. В случае контрольной группы оценку толщины оболочки также осуществляли у эмбрионов, достигших стадии blastocysty (E3,5). Как следует из рис. 4Б, ZP подавляющего большинства эмбрионов истончается в процессе вылупления. Доля эмбрионов, для которых  $K > 1$ , составляет менее 20% и по аналогии с экспериментальной группой может быть связана с измерением толщины блестящей оболочки blastocysty (E3,5) в момент экспандирования. Медианные значения коэффициента  $K_{мед.пк} = 0,84$  также свидетельствуют о большем истончении ZP у эмбрионов, вылупившихся в естественном цикле.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вылупление эмбриона из блестящей оболочки является важнейшим этапом, необходимым для его дальнейшей имплантации в полость матки. Процессу вылупления (хетчинга) предшествуют периодические фазы экспандирования и коллапсирования blastocysty.

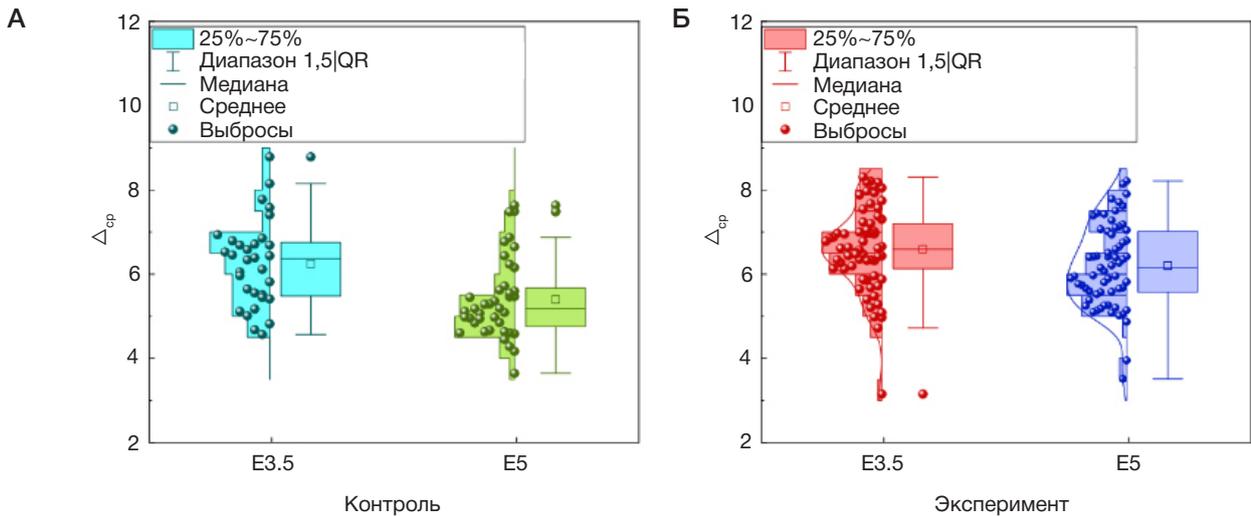


Рис. 3. Изменение толщины ZP в процессе развития эмбриона в контрольной группе (А), в экспериментальной группе (Б)

Изменение ее объема приводит к механическому воздействию на ZP, что вызывает ее растяжение и истончение. Под воздействием растягивающих напряжений и протеаз (например, трипсина), синтезируемых маткой и/или бластоцистой, происходит нарушение целостности ZP, что делает хетчинг бластоцисты возможным.

С точки зрения механики, наблюдаемые различия в экспериментальной и контрольной группах могут быть интерпретированы следующим образом. Предел прочности — это пороговая величина прикладываемого к образцу механического напряжения, превышение которой приводит к разрушению материала. Применительно к процессу вылупления, ZP эмбриона в фазе экспандирования бластоцисты испытывает постоянные растягивающие напряжения. Превышение ими порогового значения приводит к разрыву ZP и инициации процесса хетчинга. Существует большое количество исследований, целью которых является создание моделей, описывающих механические свойства оболочки. Применяемые подходы включают в себя описание ZP как среды, обладающей линейно-упругими, гиперупругими или вязко-гиперупругими свойствами (подробное изложение современного состояния в области аналитических и численных подходов можно найти в опубликованной недавно работе [26]).

Построение моделей механических свойств блестящей оболочки эмбриона мыши выходит за рамки настоящей

работы. Вместе с тем, полученные данные могут быть проанализированы с учетом имеющихся представлений о свойствах ZP. Анализ гистограмм на рис. 4 демонстрирует качественное согласие с имеющимися моделями. При увеличении диаметра бластоцисты происходит рост растягивающих напряжений в блестящей оболочке, ее радиус увеличивается, а толщина уменьшается. На сегодняшний день имеются литературные данные значений модуля Юнга (коэффициент пропорциональности между прикладываемым напряжением и деформацией среды) ZP млекопитающих; для ооцита и эмбриона мыши эти значения составляют 17,9 и 42,2 кПа соответственно [27]. Модуль Юнга характеризует свойства среды на линейном участке диаграммы деформация-напряжение вплоть до предела текучести, когда нагруженный эластично образец при растяжении удлиняется, но возвращается к своей изначальной форме и размеру при разгрузке. При превышении этого предела среда перестает демонстрировать упругие свойства и испытывает пластические деформации (не полностью возвращается к своему первоначальному состоянию). Значения коэффициента истончения  $K < 1$  на рис. 4б свидетельствуют о наличии пластических деформаций, сохраняющихся после прекращения действия растягивающих напряжений. По достижении пороговых значений напряжений (предела прочности) происходит разрыв оболочки и вылупление

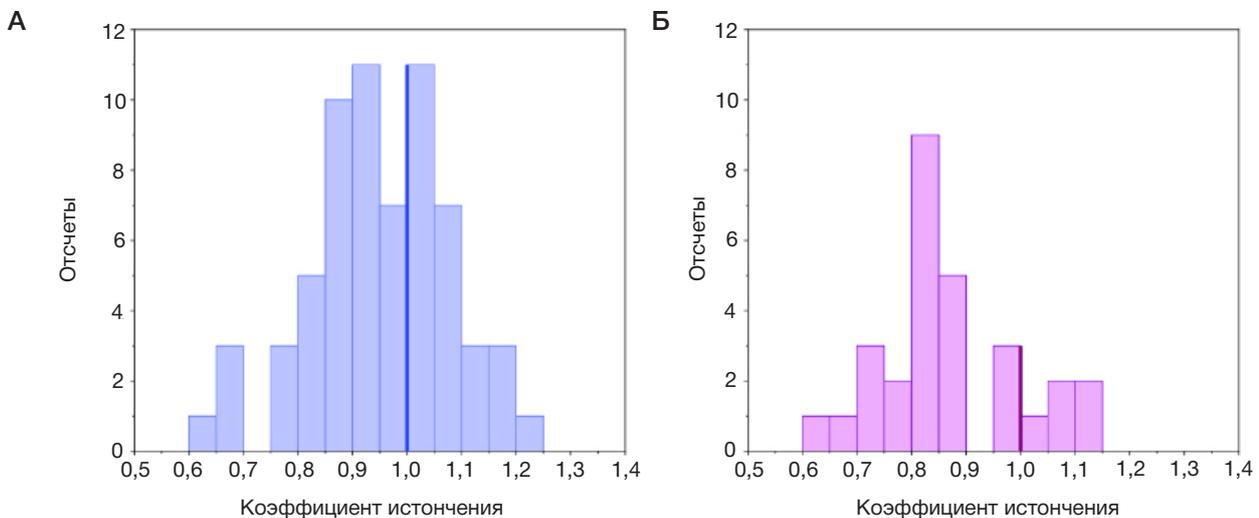


Рис. 4. Распределение коэффициента истончения ZP в экспериментальной (А) и контрольной (Б) группах

эмбриона. Нарушение целостности ZP в процедуре ВЛХ приводит к существенному снижению этого порога, о чем свидетельствуют средние значения толщины блестящей оболочки  $\Delta_{E5}$  и коэффициента истончения  $K$ , превышающие таковые в контрольной группе. В работе [25] высказывается предположение о причине снижения способности к имплантации: оно может быть обусловлено негативным влиянием толстой оболочки на экспансию бластоцисты. Данная гипотеза согласуется с теорией сопротивления материалов и необходимостью приложения большей силы на единицу поверхности для деформации более толстого слоя оболочки.

Воздействие процедур по криоконсервации на состояние блестящей оболочки ооцитов/эмбрионов изучено достаточно подробно, имеется множество свидетельств, указывающих на то, что в результате криоконсервации их блестящая оболочка становится более жесткой [22, 28]. Однако вопрос, касающийся того, как криоконсервация влияет на состояние и свойства блестящей оболочки на более поздних стадиях эмбрионального развития, требует дальнейшего изучения. Следующим логичным шагом в проведении эксперимента представляется замена объекта исследования на эмбрион, подвергшийся процедуре криоконсервации. Полученные в настоящей работе данные будут являться референсными при изучении истончения блестящей оболочки криоконсервированных эмбрионов, подвергнутых ВЛХ на стадии бластоцисты с помощью фемтосекундных лазерных импульсов.

## ВЫВОДЫ

В настоящей работе были проведены исследования толщины блестящей оболочки эмбрионов мыши как в цикле естественного вылупления (контрольная группа), так и после процедуры ВЛХ (экспериментальная группа). Минимальное термическое воздействие фемтосекундного лазерного излучения позволило осуществить микрохирургическую процедуру на поздней стадии преимплантационного развития — бластоцисте, до начала ее хетчинга. Измерение толщины ZP на стадии бластоцисты (E3,5) и на стадии вылупления (E5) позволило оценить коэффициент истончения каждой отдельно взятой оболочки. Проведенный статистический анализ выявил значимые различия в толщине оболочки между экспериментальными и контрольными группами на стадии вылупления бластоцисты — 5,4 и 6,2 мкм соответственно. Также отмечено, что в результате ВЛХ растягивание ZP эмбриона практически отсутствует — толщина ZP составляет 6,6 мкм (E3,5) и 6,2 мкм (E5), о чем свидетельствует и медианное значение коэффициента истончения. Считаем, что данное обстоятельство обусловлено снижением порогового значения растягивающих напряжений. Полученные экспериментальные данные послужат основой для сравнения при дальнейшем изучении свойств блестящей оболочки эмбрионов, подвергнутых криоконсервации, а также культивированных в средах различного состава.

## Литература

- Ricardo Loret de Mola J, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14 (6): 332–6. DOI: 10.1007/BF02765837.
- Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bio Essays.* 1991; 13 (11): 569–74. DOI: 10.1002/bies.950131105.
- Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol.* 2015; 108: 90–7. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.006.
- Dunbar BS. Ovarian Antigens and Infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1989; 21 (1): 28–31. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1989.tb00994.x.
- Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *Reproduction.* 1974; 41 (1): 97–105. DOI: 10.1530/jrf.0.0410097.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril.* 2012; 98 (1): 77–83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.015.
- Koifman M, Lahav-Baratz S, Shopen L, Idit B, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, et al. In Vitro Fertilization Outcomes Following Assisted Hatching of Embryos with Thick Zona Pellucida—A Prospective Randomized Study. *Adv Reprod Sci.* 2014; 2 (4): 76–82. DOI:10.4236/arsci.2014.24009.
- Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol.* 2009; 83 (1–2): 79–84. DOI: 10.1016/j.jri.2009.06.264.
- 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. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)82014-5.
- 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; 52 (5): 482–90.
- 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.
- Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Femtosecond laser is effective tool for zona pellucida engraving and tagging of preimplantation mammalian embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36 (6): 1251–61. DOI:10.1007/s10815-019-01424-x.
- Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Application of femtosecond laser microsurgery in assisted reproductive technologies for preimplantation embryo tagging. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (6): 2985–95. DOI: 10.1364/BOE.10.002985.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008; 14 (2): 159–77. DOI: 10.1093/humupd/dmm040.
- Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynecol Obstet.* 2005; 89 (3): 258–62. DOI: 10.1016/j.ijgo.2005.02.012.
- Lewis EI, Farhadifar R, Farland LV, J. Needleman D, Missmer SA, Racowsky C. Use of imaging software for assessment of the associations among zona pellucida thickness variation, assisted hatching, and implantation of day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34 (10): 1261–9. DOI: 10.1007/s10815-017-0978-3.
- Garside WT, de Mola JRL, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: Correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47 (1): 99–104. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<99::AID-MRD13>3.0.CO;2-V.
- Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R, Vicente JS. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Anim Reprod Sci.* 2012; 132 (1–2):

- 96–100. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.04.008.
19. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun.* 2016; 7 (1): 10809. DOI: 10.1038/ncomms10809.
  20. Andolfi L, Masiero E, Giolo E, Martinelli M, Luppi S, dal Zilio S, et al. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol.* 2016; 8 (8): 886–93. DOI: 10.1039/c6ib00044d.
  21. Priel E, Priel T, Szaingurten-Solodkin I, Wainstock T, Perets Y, Zeadna A, et al. Zona pellucida shear modulus, a possible novel non-invasive method to assist in embryo selection during in-vitro fertilization treatment. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-70739-y.
  22. Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015; 71 (2): 350–5. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.012.
  23. Ильина И. В., Овчинников А. В., Ситников Д. С., Ракитянский М. М., Агранат М. Б., Храмова Ю. В., Семенова М. Л. Применение фемтосекундных лазерных импульсов в биомедицинских клеточных технологиях. *ТВТ.* 2013; 51 (2): 198–204.
  24. Кириенко К. В., Апрышко В. П., Яковенко С. А. Zona pellucida: строение, функции, свойства (обзор литературы). *Проблемы репродукции.* 2019; 25 (3): 104–12. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.17116/repro201925031104>.
  25. Karimian K, Seydewitz R, Töpfer D, Böl M. Poro-viscoelastic behaviour of the zona pellucida: Impact of three-dimensional modelling on material characterisation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022; 131 (March). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2022.105211.
  26. Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC, Nelson BJ. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003; 2 (4): 279–86. DOI: 10.1109/TNB.2003.820273.
  27. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006; 131 (1): 53–61. DOI: 10.1530/rep.1.00878.

## References

1. Ricardo Loret de Mola J, Garside WT, Bucci J, Tureck RW, Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod Genet.* 1997; 14 (6): 332–6. DOI: 10.1007/BF02765837.
2. Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bio Essays.* 1991; 13 (11): 569–74. DOI: 10.1002/bies.950131105.
3. Gupta SK. Role of zona pellucida glycoproteins during fertilization in humans. *J Reprod Immunol.* 2015; 108: 90–7. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.006.
4. Dunbar BS. Ovarian Antigens and Infertility. *Am J Reprod Immunol.* 1989; 21 (1): 28–31. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1989.tb00994.x.
5. Trounson AO, Moore NW. The survival and development of sheep eggs following complete or partial removal of the zona pellucida. *Reproduction.* 1974; 41 (1): 97–105. DOI: 10.1530/jrf.0.0410097.
6. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Bashar S, Mandel R, Librach C. Is the zona pellucida thickness of human embryos influenced by women's age and hormonal levels? *Fertil Steril.* 2012; 98 (1): 77–83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.04.015.
7. Koifman M, Lahav-Baratz S, Shopen L, Idit B, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, et al. In Vitro Fertilization Outcomes Following Assisted Hatching of Embryos with Thick Zona Pellucida—A Prospective Randomized Study. *Adv Reprod Sci.* 2014; 2 (4): 76–82. DOI:10.4236/arsci.2014.24009.
8. Seshagiri PB, Sen Roy S, Sireesha G, Rao RP. Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *J Reprod Immunol.* 2009; 83 (1–2): 79–84. DOI: 10.1016/j.jri.2009.06.264.
9. 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. DOI: 10.1016/S0091-679X(06)82014-5.
10. 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 (6): 482–90. DOI: 10.1070/QEL18047
11. 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.
12. Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Femtosecond laser is effective tool for zona pellucida engraving and tagging of preimplantation mammalian embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2019; 36 (6): 1251–61. DOI:10.1007/s10815-019-01424-x.
13. Ilina IV, Khramova YV, Filatov MA, Sitnikov DS. Application of femtosecond laser microsurgery in assisted reproductive technologies for preimplantation embryo tagging. *Biomed Opt Express.* 2019; 10 (6): 2985–95. DOI: 10.1364/BOE.10.002985.
14. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update.* 2008; 14 (2): 159–77. DOI: 10.1093/humupd/dmm040.
15. Sun YP, Xu Y, Cao T, Su YC, Guo YH. Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization. *Int J Gynecol Obstet.* 2005; 89 (3): 258–62. DOI: 10.1016/j.ijgo.2005.02.012.
16. Lewis EI, Farhadifar R, Farland LV, J. Needleman D, Missmer SA, Racowsky C. Use of imaging software for assessment of the associations among zona pellucida thickness variation, assisted hatching, and implantation of day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2017; 34 (10): 1261–9. DOI: 10.1007/s10815-017-0978-3.
17. Garside WT, de Mola JRL, Bucci JA, Tureck RW, Heyner S. Sequential analysis of zona thickness during in vitro culture of human zygotes: Correlation with embryo quality, age, and implantation. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47 (1): 99–104. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<99::AID-MRD13>3.0.CO;2-V.
18. Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, Lavara R, Vicente JS. Influence of zona pellucida thickness on fertilization, embryo implantation and birth. *Anim Reprod Sci.* 2012; 132 (1–2): 96–100. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.04.008.
19. Yanez LZ, Han J, Behr BB, Pera RAR, Camarillo DB. Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nat Commun.* 2016; 7 (1): 10809. DOI: 10.1038/ncomms10809.
20. Andolfi L, Masiero E, Giolo E, Martinelli M, Luppi S, dal Zilio S, et al. Investigating the mechanical properties of zona pellucida of whole human oocytes by atomic force spectroscopy. *Integr Biol.* 2016; 8 (8): 886–93. DOI: 10.1039/c6ib00044d.
21. Priel E, Priel T, Szaingurten-Solodkin I, Wainstock T, Perets Y, Zeadna A, et al. Zona pellucida shear modulus, a possible novel non-invasive method to assist in embryo selection during in-vitro fertilization treatment. *Sci Rep.* 2020; 10 (1): 1–10. DOI: 10.1038/s41598-020-70739-y.
22. Choi JK, Yue T, Huang H, Zhao G, Zhang M, He X. The crucial role of zona pellucida in cryopreservation of oocytes by vitrification. *Cryobiology.* 2015; 71 (2): 350–5. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2015.08.012.
23. Ilina IV, Ovchinnikov AV, Sitnikov DS, Rakityansky MM, Agranat MB, Xramova YuV, Semenova ML. Primenenie femtosekundnykh lazernykh impul'sov v biomedicinskix kletochnykh tekhnologiyax. *TVT.* 2013; 51 (2): 198–204.
24. Kirienko KV, Apyrshko VP, Yakovenko SA. Zona pellucida: stroenie, funkci, svoystva (obzor literatury). *Problemy reprodukci.* 2019; 25 (3): 104–12. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.17116/repro201925031104>.
25. Karimian K, Seydewitz R, Töpfer D, Böl M. Poro-viscoelastic behaviour of the zona pellucida: Impact of three-dimensional

- modelling on material characterisation. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2022; 131 (March). DOI: 10.1016/j.jmbbm.2022.105211.
26. Sun Y, Wan KT, Roberts KP, Bischof JC, Nelson BJ. Mechanical property characterization of mouse zona pellucida. *IEEE Trans Nanobioscience.* 2003; 2 (4): 279–86. DOI: 10.1109/TNB.2003.820273.
27. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction.* 2006; 131 (1): 53–61. DOI: 10.1530/rep.1.00878.