

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАПАЗОНА НЕИНВАЗИВНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ЛАЗЕРНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ БЛИЖНЕГО ИНФРАКРАСНОГО СПЕКТРА ДЛЯ НАНОХИРУРГИИ ООЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

DOI: 10.17691/stm2017.9.1.02  
 УДК 576.31:618.1/4.001.6:577.29  
 Поступила 9.08.2016 г.



**А.А. Осыченко**, аспирант<sup>1</sup>;

**У.А. Точило**, студент биологического факультета<sup>2</sup>;

**А.А. Астафьев**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник<sup>1</sup>;

**А.Д. Залесский**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник<sup>1</sup>; доцент<sup>3</sup>;

**А.М. Шахов**, к.ф.-м.н., младший научный сотрудник<sup>1</sup>;

**А.С. Кривохарченко**, к.б.н., научный сотрудник<sup>1</sup>;

**В.А. Надточенко**, д.х.н., профессор, зам. директора по научной работе<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, 119991, ул. Косыгина, 4;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские Горы, 1/12;

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская область, 141701, Институтский пер., 9

**Цель исследования** — определить интервал неинвазивного воздействия фемтосекундных лазерных импульсов ближнего инфракрасного диапазона для внутриклеточной нанохирургии ооцитов млекопитающих и оценить способность ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* в зависимости от энергии импульса и суммарной дозы падающего излучения.

**Материалы и методы.** В работе использовали преовуляторные ооциты мыши на стадии зародышевого пузырька. Воздействие осуществляли излучением фемтосекундного лазера с длиной волны 780 нм в двух режимах: 1) одиночный импульс длительностью 30 фс, энергия импульса — 100 нДж; 2) цуги фемтосекундных импульсов длительностью 100 фс, частота следования импульсов — 80 МГц (время между импульсами — 12,5 нс), энергия импульса — 0,5–2 нДж, длительность всего цуга составляла от 15 до 60 мс. Излучение фокусировали объективом микроскопа  $\times 60$  с числовой апертурой 0,7. Ооциты культивировали до стадии метафазы второго деления мейоза, достижение этой стадии использовали в качестве показателя инвазивности воздействия. Данную стадию определяли по образованию направительного тельца и метафазной пластинки.

**Результаты.** Определен порог инвазивности для режима облучения одиночными фемтосекундными импульсами. В режиме работы 30 фс, 100 нДж происходит разрыв цитоплазматической мембраны и разрушение клетки.

Воздействие на цитоплазму и ядро ооцитов цугами фемтосекундных импульсов не приводит к повреждению образцов. Измерена частота образования парогазовых пузырьков после воздействия лазерным излучением на цитоплазму и хроматин ядра. Энергия импульса 1 нДж является порогом образования пузырьков в цитоплазме, 2 нДж — в ядре. Воздействие в режиме фемтосекундных импульсов длительностью 100 фс с частотой повторения 80 МГц в исследованном диапазоне энергий импульса и длительностей цуга не влияет на способность ооцитов к развитию до стадии метафазы II.

**Заключение.** В диапазоне энергии импульса, не более чем в два раза превышающей энергию порога образования парогазовых пузырьков, и суммарной экспозиции воздействия фемтосекундная лазерная нанохирургия может рассматриваться как малоинвазивный метод внутриклеточной хирургии.

**Ключевые слова:** внутриклеточная хирургия; лазерная хирургия; фемтосекундный лазер; преовуляторные ооциты.

**Как цитировать:** Osychenko A.A., Tochilo U.A., Astafiev A.A., Zalessky A.D., Shakhov A.M., Krivokharchenko A.S., Nadtochenko V.A. Determining the range of noninvasive near-infrared femtosecond laser pulses for mammalian oocyte nanosurgery. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(1): 21–27, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.1.02>

**Для контактов:** Осыченко Алина Анатольевна, e-mail: [alina.chemphys@gmail.com](mailto:alina.chemphys@gmail.com)

## Determining the Range of Noninvasive Near-Infrared Femtosecond Laser Pulses for Mammalian Oocyte Nanosurgery

A.A. Osychenko, PhD Student<sup>1</sup>;  
 U.A. Tochilo, Student, Faculty of Biology<sup>2</sup>;  
 A.A. Astafiev, PhD, Senior Researcher<sup>1</sup>;  
 A.D. Zalesky, PhD, Senior Researcher<sup>1</sup>; Associate Professor<sup>3</sup>;  
 A.M. Shakhov, PhD, Junior Researcher<sup>1</sup>;  
 A.S. Krivokharchenko, PhD, Researcher<sup>1</sup>;  
 V.A. Nadtochenko, DSc, Professor, Deputy Director on Scientific Work<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Semenov Institute of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, 4 Kosygina St., Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, 1/12 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

<sup>3</sup>Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 9 Institutskiy per., Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russian Federation

**The aim of the investigation** was to determine a noninvasive range of near-infrared femtosecond laser pulse exposure for mouse oocyte intracellular nanosurgery and to estimate oocyte developmental competence *in vitro* depending on pulse energy and total exposure time.

**Materials and Methods.** The model object was a preovulatory germinal vesicle mouse oocyte. Femtosecond laser radiation with a central wavelength of 780 nm was utilized in two modes: 1) single pulses with 30 fs duration and pulse energy up to 100 nJ; 2) trains of pulses with 100 fs duration, 80 MHz repetition rate (12.5 ns between pulses) and pulse energy from 0.5 to 2 nJ; total duration of the pulse trains ranged from 15 to 60 ms. Radiation was focused by a microscope objective lens (60×, 0.7 NA). Oocytes were cultured to the metaphase of the second meiotic division, which was used as invasiveness criteria. This stage was detected by polar bodies and metaphase plate formation.

**Results.** The threshold of invasiveness was determined for a single femtosecond pulse exposure. Cytoplasmic membrane rupture and cell disruption occurred under the exposure of a single 30 fs pulse with 100 nJ energy. The cytoplasm and nucleus exposure to femtosecond pulse trains did not induce permanent damage to the oocytes. The rate of gas-vapor bubble formation was measured after the action of pulse trains on the cytoplasm and nucleus chromatin of mammalian oocytes. The pulse energy of 1 nJ is a threshold value for bubble formation in the cytoplasm, and 2 nJ in the nucleus. Exposure to laser pulse trains with 80 MHz repetition rate and 100 fs duration didn't change oocyte ability to achieve metaphase II stage within the studied range of pulse energies and pulse train durations.

**Conclusion.** Surgery with femtosecond pulse trains at 80 MHz repetition rate and pulse energy not more than twice as high as the threshold of cavitation or vapor bubble formation does not affect oocyte development to the metaphase II stage. Femtosecond laser nanosurgery can be regarded as a minimally invasive method of intracellular surgery within the investigated range of pulse energies and exposure times.

**Key words:** intracellular surgery; laser surgery; femtosecond laser; preovulatory oocytes.

Нанохирургические операции клеток и эмбрионов с использованием фемтосекундных лазеров с длиной волны генерации в ближнем инфракрасном диапазоне — актуальное направление современной биофотоники. Ближний инфракрасный диапазон находится в области прозрачности биоткани: его не поглощает ни вода, ни органические вещества клетки (белки, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы) [1]. Высокая локализация воздействия фемтосекундного импульса в области перетяжки лазерного пучка (в объеме порядка десяти фемтолитров) позволяет проводить операции внутри клетки/эмбриона на отдельных органеллах, не затрагивая окружающую

среду клетки и не повреждая внешнюю мембрану [1–3]. Нелинейно-оптическое поглощение энергии лазерного импульса веществом клетки достигается при относительно низких энергиях фемтосекундного импульса, так как высокая плотность мощности света, необходимая для нелинейно-оптического взаимодействия, обеспечивается за счет малой длительности импульса и острой фокусировки объективом микроскопа. Низкая энергия импульса позволяет избежать значительного теплового стресса. Таким образом, сфокусированный фемтосекундный лазер может использоваться как уникальный скальпель, позволяющий с субмикронной точностью проводить

операции внутри клетки/эмбриона, не повреждая при этом внешних мембран объекта [1–4].

Поглощение энергии фемтосекундного лазерного импульса сопровождается ионизацией и диссоциацией молекул вещества клетки, что может вызывать образование токсичных для клетки продуктов [4]. Также поглощение фемтосекундного лазерного импульса приводит к генерации в веществе акустических или ударных волн, распространяющихся из области перетяжки лазерного пучка, которые могут вызывать кавитацию — образование полых пузырьков в жидкой среде. При высокой интенсивности лазерного излучения на частоте 80 МГц в фокальной области может происходить сильный нагрев жидкости, приводящий к ее кипению и образованию парогазовых пузырьков. Свыше определенного уровня энергии лазерного импульса данные процессы могут приводить к повреждениям структуры клетки. Влияние таких неблагоприятных факторов на жизнедеятельность и способность к развитию клетки или эмбриона мало изучено.

**Цель исследования** — определить интервал неинвазивного воздействия фемтосекундных лазерных импульсов ближнего инфракрасного диапазона, остротфокусированных в цитоплазму или в хроматин зародышевого пузырька ооцитов млекопитающих, оценить способность ооцитов к дальнейшему развитию *in vitro* в зависимости от энергии импульса и суммарной дозы падающего излучения.

**Материалы и методы.** В качестве модельной системы служат преовуляторные ооциты мыши, выделенные на стадии зародышевого пузырька.

**Подготовка ооцитов.** Для получения ооцитов использовали самок мышей гибридной линии F1 (CBA/C57Bl) в возрасте от 1,5 до 2,5 мес. Протокол выделения ооцитов описан в работе [3].

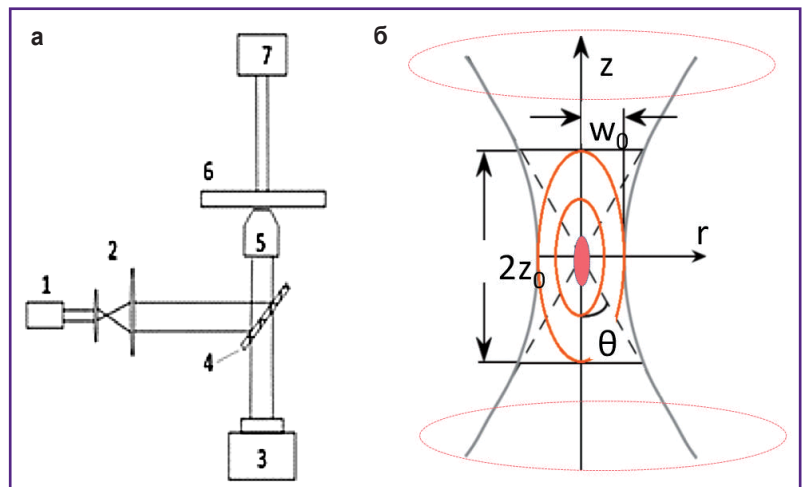
Работа проведена в полном соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), и одобрена Этическим комитетом Института химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук.

Очищенные от кумулюсных клеток ооциты помещали в каплю среды M2 (M7167; Sigma-Aldrich, США) объемом 50 мкл на покровном стекле. Также готовилась контрольная группа ооцитов (без лазерного воздействия). Время, затрачиваемое на манипуляции с образцом при облучении лазером, не превышало 1 мин. После проведения манипуляций ооциты отмывали в среде M2, культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>, 37°C)

в среде для *in vitro* созревания. Среду готовили на основе среды DMEM (C420; «ПанЭко», Россия), добавляя туда 15% фетальной бычьей сыворотки (I31966-021; Gibco, США), антибиотик гентамицин (G1272; Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,5 МЕ/мл и гормон PMSG — 1 МЕ/мл (A036A02; Intervet, Германия) [5]. Наблюдение за развитием проводили на следующий день, через 18 ч после операции.

**Схема установки.** Воздействие осуществляли излучением фемтосекундного лазера с длиной волны 780 нм в двух режимах: 1) одиночный импульс длительностью 30 фс, энергия импульса 100 нДж; 2) цуги фемтосекундных импульсов длительностью 100 фс, частота следования импульсов — 80 МГц (время между импульсами — 12,5 нс), энергия импульса — 0,5–2 нДж; длительность всего цуга составляла от 15 до 60 мс. Принципиальная схема фемтосекундного лазерного скальпеля представлена на рис. 1. Подробно схема установки описана ранее [3].

Излучение лазера фокусировали объективом ×60 с числовой апертурой NA=0,7. Параметры пятна в фокальной плоскости: перетяжка лазерного пучка  $w_0 = 0,61\lambda/NA = 0,68$  мкм; параметр Рэля  $z_0 = kw_0^2/2 = 1,86$  мкм ( $k = 2\pi/\lambda_0$  — волновое число). Энергию лазерных импульсов варьировали с помощью поляризационного аттенюатора. Дозу излучения лазера 80 МГц меняли путем изменения длительности цуга импульсов при открывании механического прерывателя лазерного пучка. Излучение фемтосекундного лазера фокусировали либо в случайно выбранную точку цитоплазмы, либо в область хроматина в зародышевом пузырьке (ядре). На каждую пару параметров воздействия (длительность цуга импульсов и энергия одно-



**Рис. 1.** Принципиальная схема фемтосекундного лазерного скальпеля: а — оптическая схема: 1 — фемтосекундный титан-сапфировый лазер; 2 — телескоп — расширитель лазерного пучка; 3 — источник освещения; 4 — дихроичное зеркало; 5 — объектив микроскопа; 6 — предметный столик; 7 — видеокамера; б — перетяжка лазерного пучка: параметр Рэля —  $z_0$  и радиус перетяжки  $w_0$ ; огибающая, показанная сплошной линией, соответствует уровню  $1/e \approx 1/2,71828$  напряженности светового поля Е

го импульса) приходилось по 10 ооцитов. Лазерное воздействие на объект повторяли пятикратно, таким образом, на 10 образцов приходилось 50 цугов импульсов, а суммарная экспозиция воздействия равнялась 5 цугам. При повторном воздействии пятно фокусировки перемещали по цитоплазме или ядру ооцита случайным образом. Изменение морфологии объекта после лазерного воздействия регистрировали в формате видеофайла с помощью камеры DCC1545M (Thorlabs, США).

**Локализация флюоресценции.** Выделение полярных телец, свидетельствующих о завершении созревания ооцита, и образование метафазных пластинок выявляли методами светлого поля и флюоресцентной микроскопии. Ооциты окрашивали флюоресцентным красителем Hoechst 33342 (B2261; Sigma-Aldrich, США), который связывается с ДНК. Изображения получали при помощи микроскопа «Биомед 4 ПР ЛЮМ» («Биомед», Россия) и камеры Ximea xiD MD061CU-SY (Ximea, Словакия).

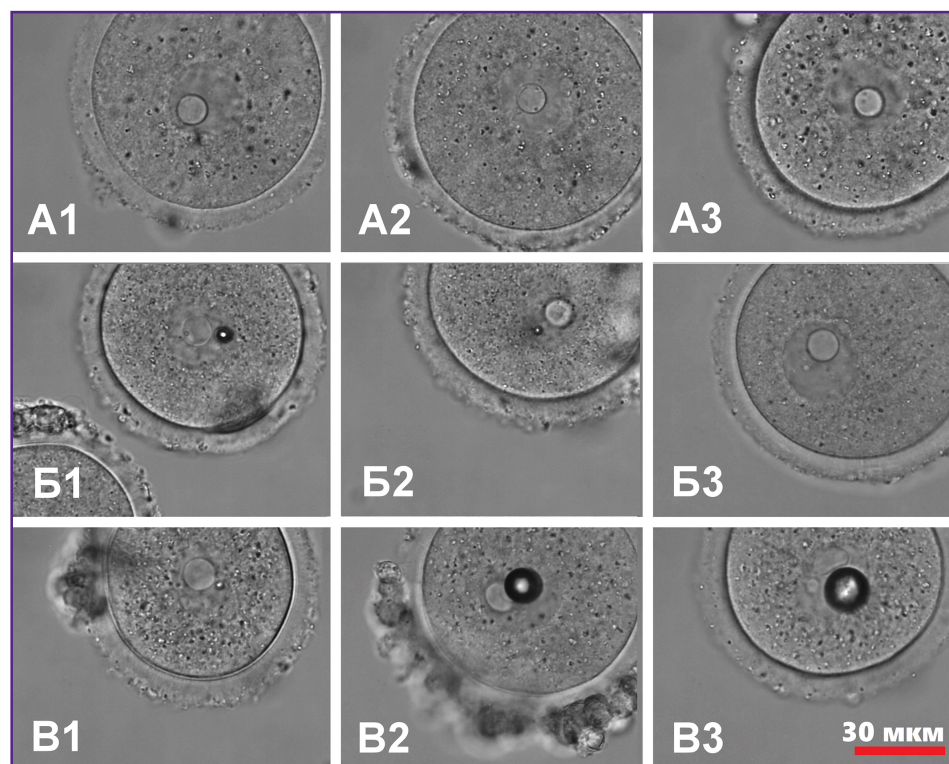
**Статистическая обработка данных.** Для оценки достоверности различия между опытными и контрольной группами использовали точный критерий Фишера, который наилучшим образом подходит для небольших выборок и не приближенно оценивает вероятность, а точно ее рассчитывает.

**Результаты.** При воздействии лазерным импульсом на ядро (рис. 2) или цитоплазму (рис. 3) могут образовываться парогазовые и кавитационные пузырьки. Образование пузырька носит случайный характер. Частота образования пузырька как функция

энергии импульса и длительности цуга импульсов при использовании лазера с частотой следования импульсов 80 МГц представлена в табл. 1. Различные области ооцита — ядро и цитоплазма — обладают различным порогом образования парогазового пузырька. Было подсчитано, сколько парогазовых пузырьков образуется на эти 50 цугов импульсов при воздействии в ядро и цитоплазму. Оказалось, что в цитоплазме при тех же параметрах воздействия вероятность образования парогазовых пузырьков существенно выше.

Воздействие на цитоплазму или ядро одиночным импульсом более 100 нДж приводит к генерации скачка давления в центре лазерной перетяжки, волна давления достигает плазматической мембраны клетки и разрывает ее. Наблюдается вытекание цитоплазмы (рис. 4). Разрыв мембраны, индуцированный интенсивным лазерным импульсом внутри ооцита, приводит к гибели клетки и далее рассматриваться не будет.

После фемтосекундного лазерного воздействия цугами импульсов 80 МГц ооциты способны к развитию *in vitro* до стадии метафазы II. Образование полярного тельца регистрировали через 18 ч культивирования. Критерием достижения стадии метафазы II являлись отделение полярного тельца и образование метафазной пластинки, присутствие которых регистрировали по флюоресценции красителя Hoechst 33342 (рис. 5). В каждой группе производили подсчет ооцитов, достигших стадии метафазы II (табл. 2). Точный тест Фишера не обнаружил статистически



**Рис. 2.** Кадры из видеозаписей с образованием парогазовых пузырьков при фокусировке лазера в ядро: A1 — энергия импульса 0,5 нДж, длительность цуга импульсов 15 мс; A2 — 0,5 нДж, 30 мс; A3 — 0,5 нДж, 60 мс; B1 — 1 нДж, 15 мс; B2 — 1 нДж, 30 мс; B3 — 1 нДж, 60 мс; B1 — 2 нДж, 15 мс; B2 — 2 нДж, 30 мс; B3 — 2 нДж, 60 мс

**Рис. 3.** Кадры из видеозаписей с образованием парогозовых пузырьков при фокусировке лазера в цитоплазму: *A1* — энергия импульса 0,5 нДж, длительность цуга импульсов 15 мс; *A2* — 0,5 нДж, 30 мс; *A3* — 0,5 нДж, 60 мс; *B1* — 1 нДж, 15 мс; *B2* — 1 нДж, 30 мс; *B3* — 1 нДж, 60 мс; *V1* — 2 нДж, 15 мс; *V2* — 2 нДж, 30 мс; *V3* — 2 нДж, 60 мс

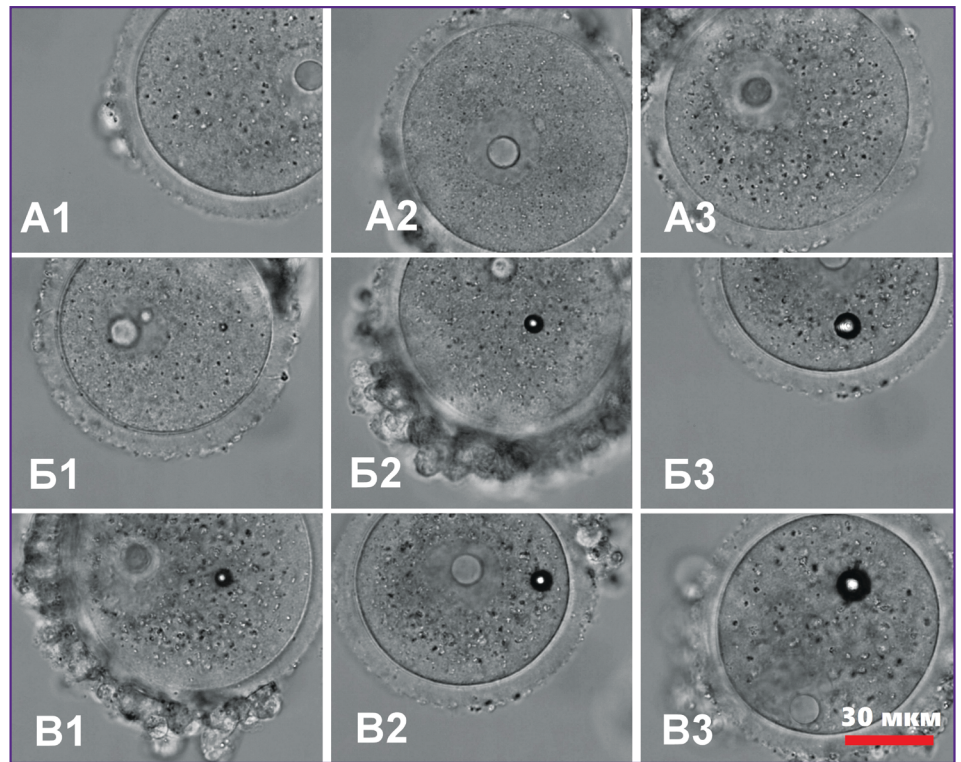
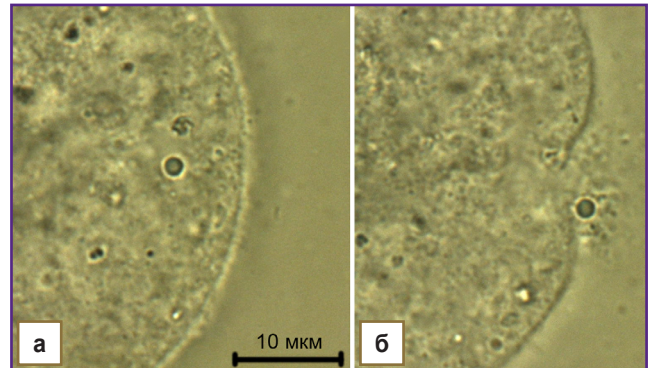


Таблица 1

**Частота образования парогозовых пузырьков в ядре и цитоплазме преовуляторных ооцитов мыши при разных параметрах воздействия**

Энергия импульса, нДж/Длительность цуга импульсов, мс	Число событий образования пузырька на количество испытаний лазерным воздействием (50 цугов)	
	Воздействие в ядро	Воздействие в цитоплазму
0,5/15	0	0
0,5/30	0	0
0,5/60	0	0
1/15	4	15
1/30	3	15
1/60	5	30
2/15	3	13
2/30	6	30
2/60	10	32



**Рис. 4.** Кадры из видеозаписи с разрывом цитоплазматической мембраны ооцита в результате возникновения кавитационного пузыря после воздействия одиночного импульса с энергией 100 нДж на цитоплазму: *а* — кадр до лазерного воздействия; *б* — кадр после лазерного воздействия через 20 с

**Рис. 5.** Ооцит на стадии метафазы II: *а* — изображение в проходящем свете; *б* — флюоресцентное изображение (видно свечение метафазной пластинки сверху и полярного тельца справа)

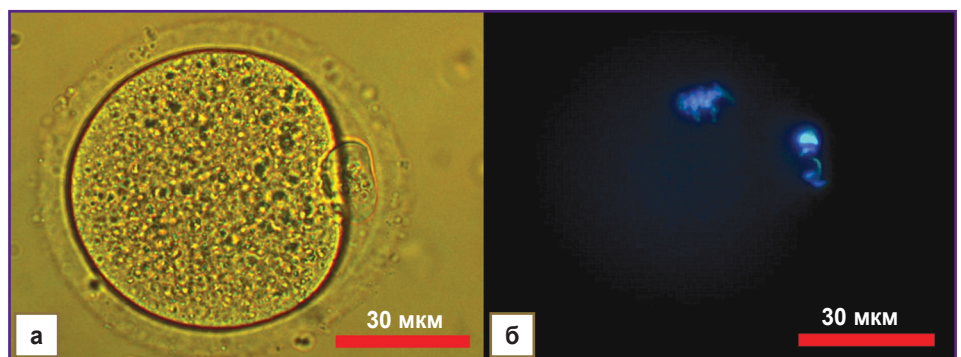


Таблица 2

Развитие преовуляторных ооцитов до стадии метафазы II после фемтосекундного лазерного воздействия в различные области клетки: ядро и цитоплазму

Энергия импульса, нДж/Длительность цуга импульсов, мс	Количество ооцитов, достигших стадии метафазы II/Количество ооцитов в группе (процент ооцитов на стадии метафазы II от общего количества); p (точный тест Фишера)	
	Воздействие в ядро	Воздействие в цитоплазму
0,5/15	8/20 (40%); 0,99	14/30 (47%); 0,66
0,5/30	9/20 (45%); 0,80	11/30 (37%); 0,82
0,5/60	10/28 (36%); 0,82	15/30 (50%); 0,39
1/15	7/30 (23%); 0,11	7/20 (35%); 0,79
1/30	7/30 (23%); 0,11	9/30 (30%); 0,37
1/60	7/21 (33%); 0,62	16/40 (40%); 0,99
2/15	14/30 (47%); 0,66	15/30 (50%); 0,39
2/30	10/30 (33%); 0,65	10/30 (33%); 0,65
2/60	14/30 (47%); 0,66	10/20 (50%); 0,45
Контроль	31/77 (40%)	

значимого различия значений между опытными и контрольной группами в способности к достижению метафазы II ( $p=0,05$ ).

**Обсуждение.** Парогазовый пузырек образуется в области фокусировки лазерного пятна внутри ооцита, т.е. в области максимальной интенсивности лазерного излучения. Отсутствие выраженной зависимости вероятности образования пузырька от длительности цуга импульсов при постоянной энергии импульса указывает на то, что при действии последовательности импульсов накопление центров окраски, способных поглощать излучение на длине волны 780 нм, несущественно в условиях проведенных опытов [1–4]. Исходя из данных табл. 1, порог образования пузырьков (вероятность события близка к 50%) в цитоплазме ниже, чем в ядре. В цитоплазме порог образования пузырька близок к энергии импульса 1 нДж, в ядре этот порог близок к 2 нДж. Понижение порога может быть обусловлено либо более низким потенциалом ионизации вещества цитоплазмы, либо высокой концентрацией различных органелл в цитоплазме.

Органеллы цитоплазмы можно рассматривать как диэлектрические шарики с диаметром от 1 до 5 мкм в воде. В ближнем поле органелл происходит усиление интенсивности электромагнитного поля лазерного импульса. Используя нашу методику расчета интенсивности напряженности поля [6, 7], получили оценку коэффициента усиления интенсивности поля, который оказался близок 5, а размер зоны ближнего поля — менее 0,5 мкм. Усиление интенсивности в ближнем поле органелл может способствовать пробое цитоплазмы сфокусированным лазерным импульсом с образованием пузырька. При энергиях фемтосекундного импульса от 0,5 до 2 нДж интенсивность

лазерного света в перетяжке составляет от  $3,4 \cdot 10^{11}$  до  $13,6 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup> соответственно. Порог образования пузырьков в цитоплазме близок к плотности мощности  $6 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup>. Порог пробоя воды фемтосекундным импульсом лежит в диапазоне от  $6,6$  до  $9,0 \cdot 10^{12}$  Вт/см<sup>2</sup> [8], т.е. на порядок выше, чем наблюдается в данной работе.

Длина волны 780 нм, которая используется в нашей работе, находится в области прозрачности биологической ткани, линейное поглощение ооцитом света в этом диапазоне пренебрежимо мало [1–4]. Поглощение энергии фемтосекундных импульсов, приводящее к образованию кавитационного пузырька, обусловлено нелинейными оптическими эффектами. В области пузырька может происходить фотоионизация вещества ооцита и образование плазмы низкой плотности [4]. При ионизации органических молекул ооцита должны образовываться радикалы и электроны. Эти промежуточные вещества реагируют с кислородом, и конечным продуктом являются молекулы активных форм кислорода (АФК) [1, 4].

Образование молекул АФК происходит в объеме ионизации, который соответствует объему перетяжки лазерного пучка, и оценивается как  $5,4 \cdot 10^{-12}$  см<sup>3</sup>. Объем ооцита при диаметре 70 мкм составляет примерно  $1,8 \cdot 10^{-7}$  см<sup>3</sup>, концентрация ионизированных молекул в объеме перетяжки —  $10^{20}$  см<sup>-3</sup>. Чтобы подсчитать среднюю концентрацию АФК после единичного импульса по ооциту, нужно объем перетяжки умножить на концентрацию ионов в перетяжке и поделить на объем ооцита. Таким образом, средняя концентрация АФК на ооцит получается  $1,6 \cdot 10^{-6}$  М. Отсутствие достоверного различия между опытными и контрольной группами в способности к достижению метафазы II ( $p>0,05$ ) после лазерного воздействия указывает на то, что образование молекул АФК после пятикратного воздействия на ооцит не понижает его способности к созреванию до метафазы II.

Таким образом, фемтосекундное лазерное излучение ближнего инфракрасного диапазона 780 нм в окне прозрачности биологической ткани позволяет проводить микрохирургические операции внутри ооцита без разрушения цитоплазматической мембраны и блестящей оболочки. Разрезание материала клетки фемтосекундным лазером с частотой следования импульсов 80 МГц сопровождается образованием кавитационных и парогазовых пузырьков. Порог образования пузырьков при фокусировке в цитоплазму близок  $6 \cdot 10^{11}$  Вт/см<sup>2</sup>, при фокусировке в хроматин ядра — приблизительно в два раза выше. Воздействие на материал клетки цугами импульсов длительностью до 60 мс с энергией импульса ниже порога образования пузырька не связано с формированием центров окраски в клет-

ке. Проведение операций в таких условиях не сказывается на развитии ооцита до стадии метафазы II.

**Заключение.** Определен интервал неинвазивного воздействия фемтосекундных лазерных импульсов ближнего инфракрасного диапазона. Использование одиночных фемтосекундных импульсов исследуемой энергии приводит к разрушению образца. Воздействие цугами фемтосекундных импульсов не влияет на целостность ооцитов и способность к дальнейшему развитию *in vitro*. В исследованном диапазоне энергии импульса и суммарной экспозиции воздействия фемтосекундная лазерная нанохирургия может рассматриваться как малоинвазивный метод внутриклеточной хирургии.

**Финансирование исследования.** Работа поддержана субсидией Министерства образования и науки, соглашение 14.604.21.0058 (уникальный номер-идентификатор RFMEFI60414X0058).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Литература/References

1. Надточенко В.А., Мельников М.Я. Лазерная нанохирургия клеток и эмбрионов. В кн.: Синтез, строение и свойства металл/полупроводник содержащих наноструктурированных композитов. Под ред. Трахтенберг Л.И., Мельникова М.Я. М: Техносфера; 2016; с. 441–473. Nadtochenko V.A., Mel'nikov M.Ya. Lazernaya nanokhirurgiya kletok i embrionov. V kn.: *Sintez, stroenie i svoystva metall/poluprovodnik sodержashchikh nanostrukturirovannykh kompozitov* [Laser nanosurgery of the cells and embryos. In: Synthesis, structure and properties of metal/semiconductor-containing nanostructured composites]. Pod red. Trakhtenberg L.I., Mel'nikova M.Ya. [Trakhtenberg L.I., Mel'nikov M.Ya. (editors)]. Moscow: Tekhnosfera; 2016; p. 441–473.
2. Nuzzo V., Maxwell I., Chung S., Mazur E., Heisterkamp A. Subcellular surgery and nanoneurosurgery using femtosecond laser pulses. In: *Biophotonics: spectroscopy, imaging, sensing, and manipulation*. DiBartolo B., Collins J. (editors). Springer; 2011; p. 203–218, [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9977-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9977-8_9).
3. Osychenko A.A., Zaleskii A.D., Krivokharchenko A.S., Zhakhbazyan A.K., Ryabova A.V., Nadtochenko V.A. Fusion of blastomeres in mouse embryos under the action of femtosecond laser radiation. Efficiency of blastocyst formation and embryo development. *Quantum Electronics* 2015; 45(5): 498–502, <https://doi.org/10.1070/qe2015v045n05abeh015767>.
4. Vogel A., Noack J., Hüttman G., Paltauf G. Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Applied Physics B* 2005; 81(8): 1015–1047, <https://doi.org/10.1007/s00340-005-2036-6>.
5. Shishova K.V., Khodarovich Y.M., Lavrentyeva E.A., Zatsepina O.V. High-resolution microscopy of active ribosomal genes and key members of the rRNA processing machinery inside nucleolus-like bodies of fully-grown mouse oocytes. *Experimental Cell Research* 2015; 337(2): 208–218, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.07.024>.
6. Shakhov A.M., Astafiev A.A., Plutenko D.O., Sarkisov O.M., Shushin A.I., Nadtochenko V.A. Femtosecond optical trap-assisted nanopatterning through microspheres by a single Ti:Sapphire oscillator. *The Journal of Physical Chemistry C* 2015; 119(22): 12562–12571, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b00478>.
7. Astaf'ev A.A., Shakhov A.M., Sarkisov O.M., Nadtochenko V.A. Microstructuring of polymer films by femtosecond pulses through optically trapped polystyrene microspheres. *Quantum Electronics* 2013; 43(4): 361–364, <https://doi.org/10.1070/qe2013v043n04abeh015114>.
8. Sarpe C., Köhler J., Winkler T., Wollenhaupt M., Baumert T. Real-time observation of transient electron density in water irradiated with tailored femtosecond laser pulses. *New Journal of Physics* 2012; 14(7): 075021, <https://doi.org/10.1088/1367-2630/14/7/075021>.