



Міністерство освіти і науки України

**ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет енергетики, робототехніки та
комп'ютерних технологій**

**Кафедра електромеханіки, робототехніки,
біомедичної інженерії та електротехніки**

**НОВІ МЕТОДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ МІКРОМАНІПУЛЯЦІЙ
З КЛІТИНАМИ ТВАРИН В ПРОЦЕСАХ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

**Методичні вказівки
для самостійного вивчення дисципліни**

**для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»**

**Харків
2023**

Міністерство освіти і науки України
ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет енергетики, робототехніки та комп'ютерних технологій
Кафедра електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії та
електротехніки

НОВІ МЕТОДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ МІКРОМАНІПУЛЯЦІЙ
З КЛІТИНАМИ ТВАРИН В ПРОЦЕСАХ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

Методичні вказівки
для самостійного вивчення дисципліни

для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та
(заочної) форми навчання, спеціальності
163 «Біомедична інженерія»

Затверджено
рішенням науково-методичної
ради факультету ЕРКТ
Протокол № 2 від 17 листопада 2022 р.

Харків
2023

УДК 591.3:577.21:636.082

Схвалено
на засіданні кафедри електромеханіки, робототехніки, біомедичної інженерії
та електротехніки
протокол № 1
від 31 серпня 2022 р.

Рецензент:

О.М. Мороз, д-р тех. наук, проф. кафедри електропостачання та енергетичного менеджменту, Державний біотехнологічний університет.

Нові методи та інструменти для мікрomanipуляцій з клітинами тварин в процесах клітинної інженерії : методичні вказівки для самостійного вивчення дисципліни для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної (заочної) форми навч., спец. 163 «Біомедична інженерія» / Державний біотехнологічний університет; уклад.: В.О. Шигимага. – Харків : [б. в.], 2023.– 32 с.

Методичні вказівки з дисципліни "Основи біоінженерних методів в тваринництві". Видання включає тему для самостійного засвоєння здобувачами. Матеріал розкриває принципи роботи деяких нових методів та інструментів для мікрохірургії клітин тварин, проблеми та особливості застосування в процесах клітинної інженерії.

Видання призначене здобувачам першого (бакалаврського) рівня вищої освіти денної та (заочної) форми навчання, спеціальності 163 «Біомедична інженерія».

Відповідальний за випуск: В.О. Шигимага, д. т. н., проф.

© Шигимага В.О., 2023

© ДБТУ, 2023

Самостійна робота № 2

Нові методи та інструменти для мікроманіпуляцій з клітинами тварин в процесах клітинної інженерії

1. Мета роботи: засвоїти сутність та технології запровадження нових методів і інструментів для мікроманіпуляцій з клітинами тварин в процесі клітинної інженерії, отримати уявлення про фізичні принципи роботи нових інструментів, за допомогою яких проводяться основні клітинно-інженерні мікроманіпуляції.

2. Введення. Загальні відомості. Визначення.

Клітинна інженерія є найбільш перспективною і гармонійно розвивається областю біотехнології. Саме з клітинною інженерією пов'язані вражаючі успіхи в різних областях науки і виробничої діяльності: в медицині, фармакології, виробництві харчових продуктів, сільському господарстві, зокрема, в тваринництві. Методи клітинної інженерії отримали останнім часом надзвичайно широке поширення також практично у всіх областях сучасної біології. Неможливо уявити собі молекулярно-біологічну лабораторію або сучасне біотехнологічне підприємство, де не використовувалися б, наприклад, клітинні культури. Клітинна інженерія і гібридна технологія, як невід'ємна її частина, є однією з провідних областей діяльності в сучасній біотехнології.

Клітинна інженерія-галузь науки, завданням якої є створення клітин нового типу на основі їх гібридизації, реконструкції та культивування. "Клітинна", тому що маніпуляції здійснюються з окремими клітинами, а "інженерія", тому що конструюються нові клітини на основі їх гібридизації, реконструкції та культивування. При гібридизації штучно об'єднують цілі клітини з утворенням гібридного геному. Реконструкція пов'язана зі створенням життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин (ядра,

цитоплазми, хромосом та ін.). Культивування забезпечує нормальний розвиток реконструйованих клітин *in vitro* в спеціальних поживних середовищах.

За допомогою клітинної інженерії вдається з'єднувати геноми далеких видів (що належать навіть різним царствам). Наприклад, показана принципова можливість злиття соматичних клітин тварин з клітинами рослин. Вивчення гібридних клітин дозволяє вирішувати багато теоретичні проблеми біомедицини: з'ясовувати взаємні впливи ядра і цитоплазми, механізми диференціювання і регуляції клітинного розмноження, перетворення нормальної клітини в ракову і ін. Клітинна інженерія широко застосовується в промисловій біотехнології, наприклад, шляхом використання гібридом для отримання моноклональних антитіл.

Переваги клітинної інженерії: забезпечує можливість експериментувати з клітинами, а не з цілими організмами, а також отримувати з реконструйованих клітин тканини, органи і організми з заданими властивостями. Наприклад, кісткову тканину і кістки вирощують зі стовбурових клітин, виділених з кісткового мозку.

Початок стрімкого розвитку клітинної інженерії відносять до 60-х років ХХ ст., коли були створені перші гібридні клітини (Б. Ефруссі, Г. Харріс, П. Карлсон) і перші методи конструювання клітин нового типу.

Основні методи сучасної клітинної інженерії:

- * гібридизація клітин-поєднання соматичних клітин різних тканин або організмів для отримання нових комбінацій генетичних ознак;

- * культивування клітин (тканин) - виділення і перенесення клітин з організму в поживні середовища для отримання культури клітин. Клітинні культури-це генетично однорідні популяції клітин, що ростуть в постійних умовах живильного середовища.

- * злиття різних клітин між собою або з органоїдами - об'єднання ембріонів на ранніх стадіях розвитку для створення химерних організмів; злиття ядер соматичних або ембріональних клітин з клітинами, позбавленими власного ядра для клонування організмів.

* мікроманіпуляції з клітинами-виконання мікрохірургічних операцій для створення нових клітинних конструкцій (розрізи, Витяг, висічення, поділ і т.п.).

Однією з найважливіших сфер клітинної інженерії є роботи зі стовбуровими клітинами. В даний час ведуться великомасштабні дослідження по стовбурових клітинах, що дозволить в найближчому майбутньому отримати чисті лінії, і, як наслідок, з'явиться можливість якісного прориву в терапевтичному клонуванні з метою отримання органів і тканин тварин для трансплантації.

Таким чином, клітинна інженерія, як наукова галузь, займається конструюванням клітин із заданими властивостями і включає біотехнологічні методи, інструменти і процеси з використанням біологічних систем: живих клітин і їх органел.

У сучасній практиці клітинної інженерії далеко не завжди визначається генетичний статус ембріона. Це пов'язано з тим, що відбір клітинного матеріалу ембріона для проведення генетичної діагностики трудомісткий і пов'язаний з впровадженням всередину клітини. Тому основна частина ембріонів, наприклад, для цілей трансплантації оцінюється тільки за морфологічними критеріями якості. При впровадженні біотехнології дозрівання ооцитів *in vitro*, тобто при культивуванні, може виникнути необхідність проводити генетичний аналіз кожного отриманого поза організмом ембріона. Для цього потрібні нові, більш ефективні і менш травматичні методи мікрохірургії ембріонів. В даний час розроблені такі методи мікрохірургії живих клітин за допомогою маніпуляторів з мікроінструментом або лазерного променя (під мікроскопом).

Мікрохірургія є важливою складовою роботи зі статевими клітинами - ооцитами, а також ранніми ембріонами, і широко застосовується як в практиці біотехнології тваринництва, наприклад, в трансплантації, так і в експериментальних дослідженнях з ембріології (біології розвитку). Різні види мікрохірургічних маніпуляцій можна виробляти на ембріонах від стадії зиготи до стадії бластоцисти. В експериментальній ембріології мікрохірургія застосовується як для введення клітин в порожнину бластоцисти, так і для

відбору внутрішньої клітинної маси бластоцисти з метою отримання ембріональних стовбурових клітин, а також для введення генетичних конструкцій в пронуклеуси. І в практиці, і в дослідницьких лабораторіях для здійснення всіх цих процедур використовують мікроманіпулятори, і у всіх випадках ембріон повинен бути закріплений в спеціальному мікроінструменті – в присосці, навіть в тих випадках, коли процедура біопсії відбувається із застосуванням лазерного скальпеля.

В останні роки активно розвивається нова технологія мікроманіпуляції з одиничними клітинами-система "оптичний скальпель-пінцет", що дозволяє проводити мікрохірургічні процедури безконтактно. Це відкриває нові перспективи для мікрохірургії ембріонів тварин, як з метою проведення ранньої генетичної діагностики, так і для прецизійного виділення клітин при проведенні фундаментальних наукових досліджень. Зокрема, технологія лазерної безконтактною мікрохірургії може бути також застосована при відборі клітинного матеріалу культивованих фолікулів (з ооцитами). Лазерні технології знаходять все більше застосування в різних областях клітинної інженерії та мікробіології і можуть бути використані для вирішення великого числа завдань.

Таким чином, розвиток методу лазерної мікрохірургії, в тому числі і для застосування його в області мікрохірургії ембріонів тварин є перспективним напрямком.

3. Визначення, методи, інструменти, клітини, технології

Мікрохірургія - розділ сучасної оперативної хірургії, що включає хірургічні втручання на малих анатомічних структурах, в тому числі і клітинах, з використанням оптичних засобів (мікроскопів) і мікрохірургічного інструменту.

Мікроманіпуляція - мікрохірургічна операція на клітині, що проводиться під мікроскопом механічно за допомогою спеціальних мікрохірургічних інструментів або безконтактно (див. нижче).

Мікроінструменти(основні): ін'єкційна мікропіпетка, мікроголка,

аспіраційна мікропіпетка і мікроприсоска для фіксації клітини.

Фолікул - структурний елемент яєчника жіночої особини (*folliculus ovaricus*), що складається з яйцеклітини, оточеної шаром епітеліальних клітин і двома шарами сполучної тканини.

Ооцит - жіноча статеві клітина, що бере участь в розмноженні, незріла яйцеклітина. Клітини кумулюсні, іноді звані променистим вінцем (*corona radiata*), являють собою спеціалізовані гранульозні клітини, безпосередньо примикають до ооциту, рис. 1.

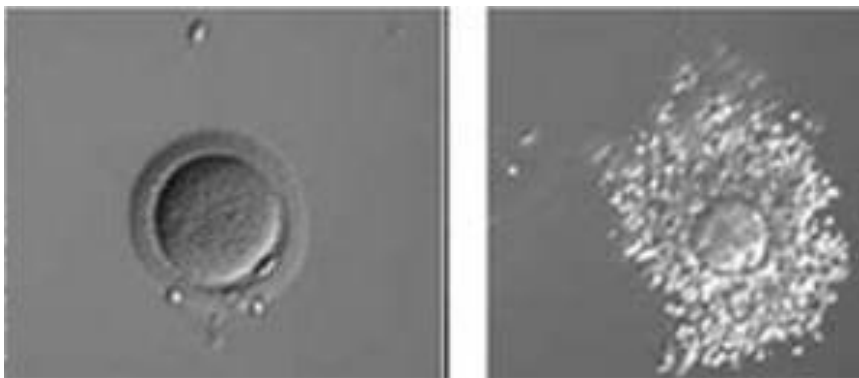


Рис. 1. Ооцит зрілий (зліва) і ооцит-кумулюсний комплекс (праворуч).

Ембріон (грец. έμβρυον) або зародок – рання стадія розвитку тварини, коли він ще знаходиться в яйцеводі або в матці жіночої особини, рис. 2.

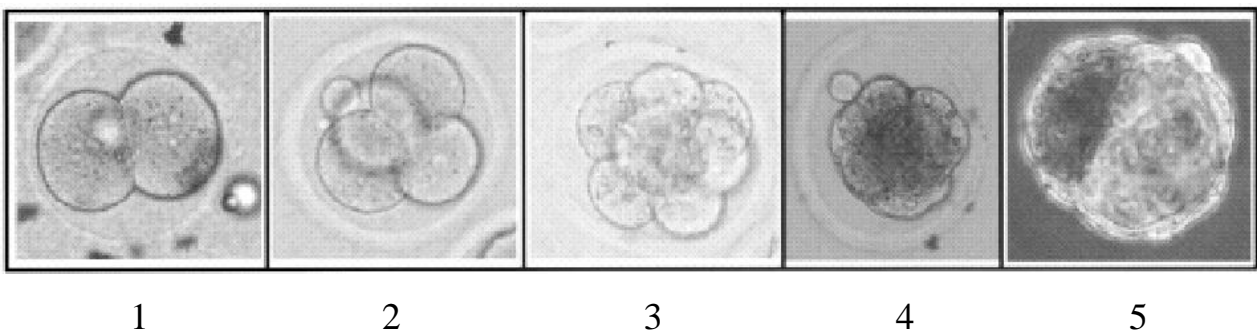


Рис. 2. Ембріони миші: 1 – 2-х клітинний, 2 – 4-х клітинний, 3 – 8 – ми клітинний, 4-морула, 5-бластоциста.

Розвиток способів культивування поза організмом (*in vitro*) фолікулів, ооцит-кумулюсних комплексів і ембріонів тварин передбачає подальше використання різних технологій маніпулювання з ними. Мікроманіпуляції проводять з різними клітинами під мікроскопом традиційно за допомогою спеціальних скляних мікрохірургічних інструментів. Однак в даному матеріалі розглянуті тільки нові досягнення в цьому напрямку. Вони реалізовані на основі лазерів різного типу, які замінюють традиційні механічні мікроінструменти і дозволяють проводити мікроманіпуляції безконтактно з мінімальним травматичним впливом на живу клітину.

Лазерна мікрохірургія ооцитів і ембріонів.

Можливість використання лазерних технологій в клітинній інженерії та біології розвитку була показана ще кілька десятиліть тому (1965 р.). Перші експерименти в цій галузі були поставлені на ранніх ембріонах ссавців. В даний час лазерні технології широко застосовуються для маніпулювання з цими біооб'єктами. Так, ці технології використовують для руйнування прозорої оболонки (*zona pellucida*) ооцитів, яке передує введенню сперматозоїда в цитоплазму, для здійснення допоміжної денудації (звільнення від *zona pellucida*) і для проведення біопсії трофектодерми бластоцисти. Подібні лазерні мікроманіпуляції виконуються і при пересадці ядер і введенні ембріональних стовбурових клітин в мишачий ембріон на стадії восьми клітин. В останні роки технологія лазерного скальпеля, розроблена в основному на ембріональних об'єктах, знаходить все більше застосування в клітинній інженерії.

Мембранна хірургія.

Мікрохірургічні операції проводяться зазвичай на ембріонах 0,5-3,5 діб розвитку безконтактним методом за допомогою лазерної установки з двома функціями "лазерний скальпель" і "оптичний пінцет". Для цього використовується спеціально розроблений програмно-апаратний комплекс для маніпулювання і імпульсного лазерного впливу на різні біологічні об'єкти.

Функціональна схема апаратно-програмного комплексу лазерної мікрохірургії показана нижче на рис. 3.

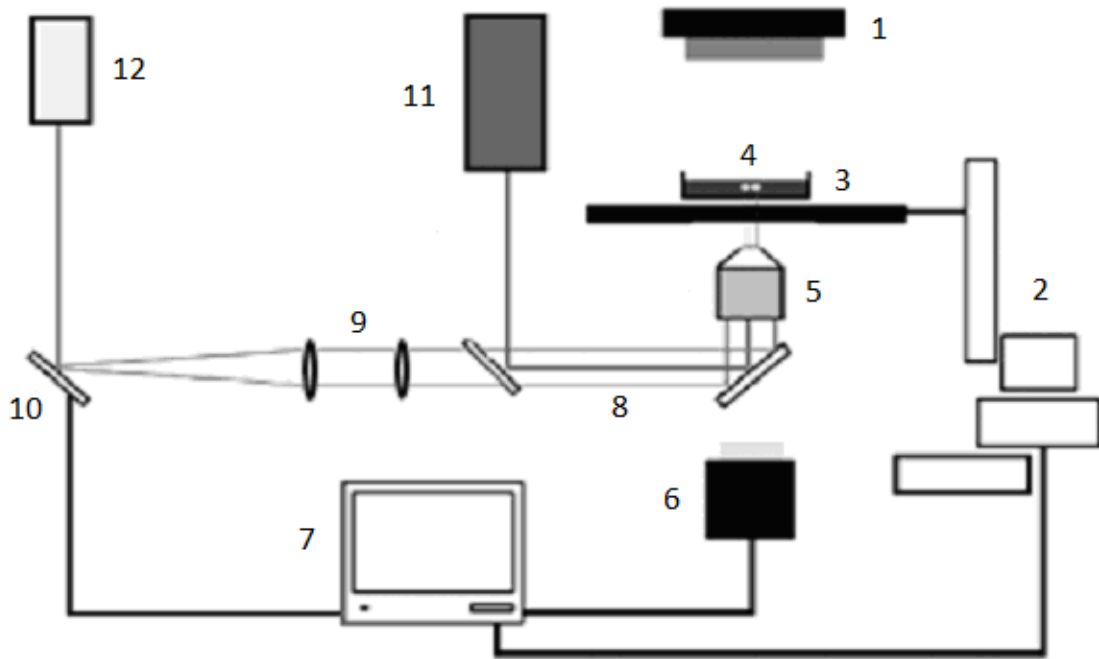


Рис. 3. Апаратно-програмний комплекс лазерної мікросіургії.

1-освітлювальна система інвертованого мікроскопа; 2 – крокові двигуни, що переміщують столик мікроскопа по X, Y, Z осях; 3 – чашка Петрі з клітинами; 4 – пара захоплених в оптичну пастку об'єктів; 5 – об'єктив мікроскопа; 6 – цифрова камера; 7 – комп'ютер, керуючий кроковими двигунами, фазовим модулятором і камерою; 8 – дзеркала; 9 – зорова труба; 10 – оптичний фазовий модулятор; 11 – лазер – оптичний скальпель; 12 – лазер – оптичний пінцет.

Даний комплекс дозволяє реалізувати широкий спектр мікроманіпуляцій: прецизійне руйнування внутрішньоклітинних елементів, перфорація (створення пор) мембран клітин для злиття, трансфекція (перенесення), ін'єкція в клітини об'єктів нанорозмірної величини і т.д. Фемтосекундні лазерні імпульси дозволяють мінімізувати негативні впливи випромінювання на біологічну структуру живих клітин.

Оптичний пінцет (уловлювач) для маніпулювання з клітинами реалізований на базі безперервного випромінювання ітербієвого волоконного

лазера і фемтосекундного імпульсно-періодичного лазера, що генерує імпульси тривалістю 100 фс на довжині хвилі 1,240 мкм з частотою повторення 80 МГц і середньою потужністю 200 мВт.

В якості оптичного лазерного скальпеля використовується фемтосекундна волоконна лазерна система з випромінюванням на довжині хвилі 1,028 мкм, частотою повторення 10 кГц, тривалістю імпульсів менше 300 фс і енергією більше 100 мкДж.

Підготовка ембріонів до опромінення.

Послідовність процесу така. Ембріони 0,5 - 3,5 діб під контролем бінокулярного мікроскопа поміщаються в краплю середовища для маніпуляцій, нанесену на дно 30-ти мм пластикової чашки Петрі, рис. 4.

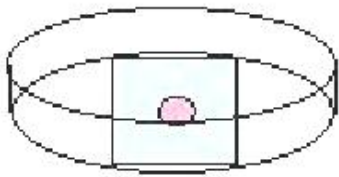


Рис. 4. Чашка для проведення експерименту. А - схематичне зображення чашки; Б - фото чашки.

Зверху нашаровується мінеральне масло, збалансоване з середовищем, в обсязі, достатньому для повного покриття нанесеної краплі середовища (захист від випаровування краплі). Підготовлена чашка ставиться на предметний столик мікроскопа. Потім проводиться пошук ембріонів, розміщених в краплі, і вони встановлюються по центру поля зору. Після цього ембріони піддаються впливу лазерного випромінювання.

Розглянемо приклади виконання процедури лазерної мікрохірургії. Застосування цієї технології реалізовано в досліджах, в ході яких

фемтосекундним лазером наносилися мікронадрези по коротких і довгих осях клітини, рис. 5.

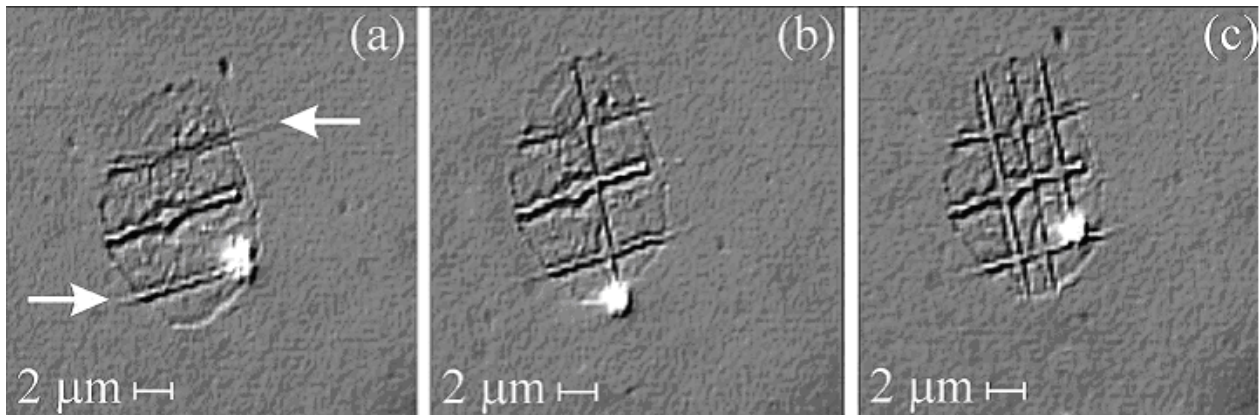


Рис. 5. Мікронадрези на мембрані клітини, зроблені за допомогою фемтосекундного лазера; біла точка на знімках – сфокусований лазерний пучок.

Було показано, що як під час, так і після мікрооперації клітини зберігали морфологічну цілісність без будь-яких ознак загибелі.

Лазерну мікрохірургію можна застосовувати і для виділення окремих клітин. Лазерну мікрохірургію також використовували для вивчення морфогенезу у безхребетних і для дослідження регенерації нейронів (аксонотомія - перерізка). При вивченні регенерації використовували титан-сапфіровий фемтосекундний лазер, причому перерізання аксонів проводили безпосередньо в організмі піддослідної тварини.

У всіх цих роботах показана висока виживаність клітин і ембріонів після лазерних мікрохірургічних процедур, хоча їх і піддавали досить сильному енергетичному впливу.

Біопсія трофктодерми.

Процедура проводиться на ембріонах 3,5 діб розвитку. Для цього мікроскоп фокусується на *zona pellucida* і серією імпульсів лазера створюється отвір на стороні, протилежній внутрішній клітинній масі (ВКМ). Далі відбувається денудація. Після того, як невелика кількість клітин трофктодерми

виявилося зовні *zona pellucida*, в режимі "лазерний скальпель" декількома імпульсами відсікається це скупчення клітин. Потім в режимі "оптичний пінцет" захоплюється отриманий біоптат і відноситься в сторону від ембріона, рис. 6.

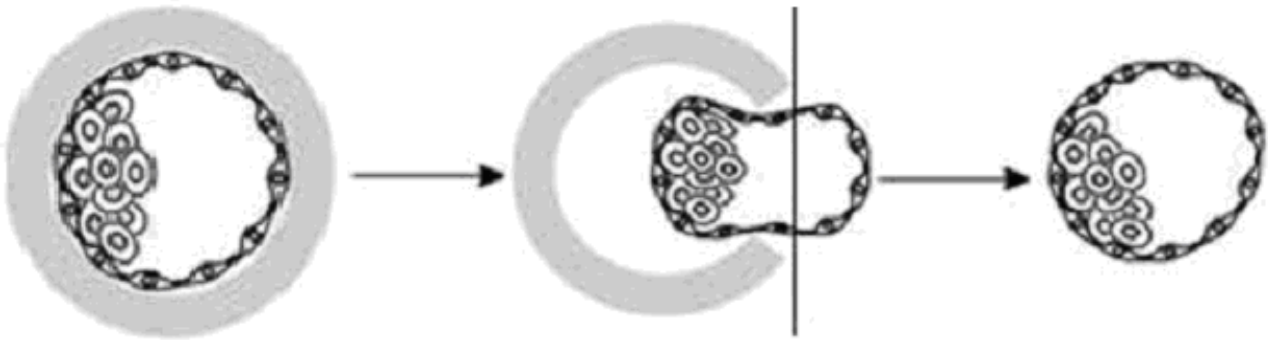


Рис. 6. Схема експерименту з біопсії трофктодерми. Лінією відзначено місце впливу лазерних імпульсів.

Після завершення процедури біопсії ембріони поміщаються в чотирилуночковий планшет в середу для культивування. На наступний день оцінюється життєздатність ембріонів за відсотком бластоцист, що пройшли денудацію, а також при фарбуванні бластоцист прижиттєвими флуоресцентними барвниками.

Фотопорація і трансфекція.

При роботі на ембріонах *Danio rerio* фемтосекундні лазерні імпульси застосовувалися для швидкого пропалювання бластомера з метою здійснення адресної доставки флуоресцентних зондів і доставки плазмідної ДНК. Сфокусований на поверхні бластомера лазерний промінь проходить через оболонки ембріона, не пошкоджуючи їх фатально, так як зона лазерного проколу мінімальна, рис. 7.

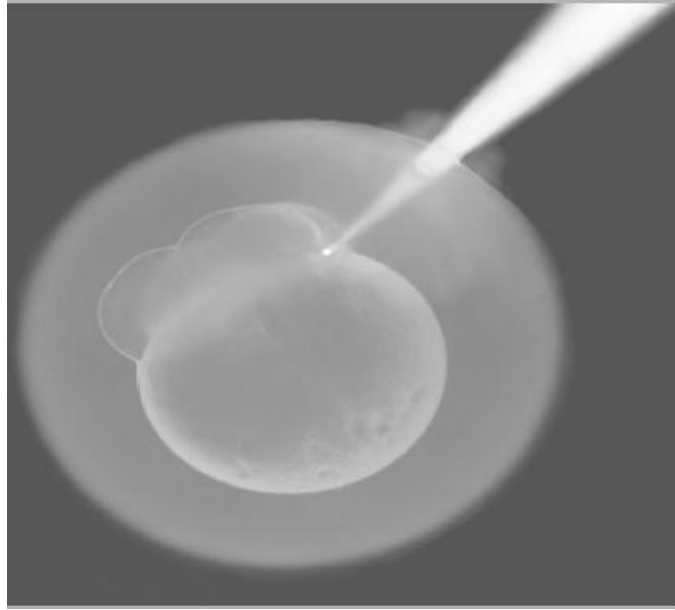


Рис. 7. Лазерна хірургія на живих ембріонах *Danio rerio*: лазерний промінь пронизує хоріон і фокусується на кордоні бластомерів і жовтка.

Група шотландських вчених кілька років тому (2007 р) провела експерименти з лазерної трансфекції (переносу) соматичних клітин яєчника китайського хом'ячка в культурі *in vitro*. Для фотопорації (створення пор) мембрани вони використовували лазерний пучок, сфокусований через об'єктив інвертованого мікроскопа на мембрані клітини. У цій роботі використаний фемтосекундний титан-сапфіровий лазер з довжиною хвилі випромінювання 800 нм. Через пору, що утворилася в результаті фотопорації, в клітину проникає чужорідна ДНК. Для цього в моношарову культуру клітин яєчника хом'ячка додавали генетичну конструкцію, що містить ген зеленого флуоресцентного білка (pEGFP). Далі клітини опромінювали лазером від 10 до 250 мс при потужності від 50 до 225 мВт, двічі промивали середовищем для культивування і повертали чашку в інкубатор. Через 48 годин після процедури фотопорації за допомогою флуоресцентного мікроскопа виявляли експресію (впровадження) гена GFP за наявності зеленого світіння. Ефективність трансфекції розраховували шляхом ділення кількості клітин, в яких спостерігали експресію

GFP через 48 годин після опромінення, на загальне число опромінених клітин в нульовий момент часу. Всього трансфікованими виявилися 36-50% клітин і морфологія всіх клітин з експресією GFP відповідала нормі.

У зв'язку з тим, що мікрохірургічний вплив взагалі, і процедура біопсії зокрема, має на увазі вплив як на прозору оболонку ембріона, так і на самі клітини, необхідно встановити режим лазерного впливу для трьох різних пошкоджень: мембрани, цитоплазми і оболонки ембріона. При цьому зручно використовувати моделювання процесу. Наприклад, в якості моделі впливу лазера на мембрану клітин можна взяти бластомери 2-х клітинного ембріона миші, рис. 8.

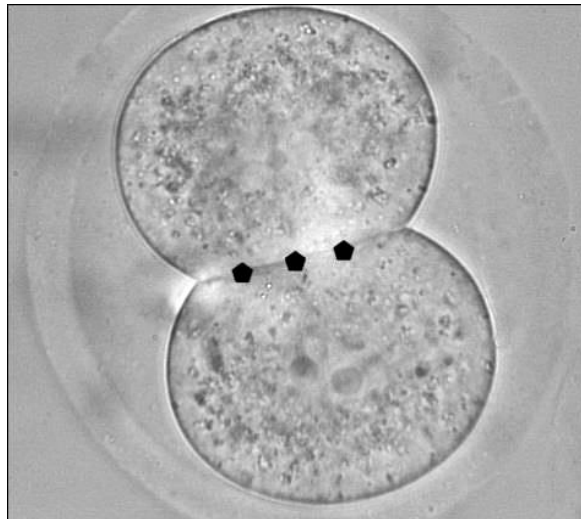


Рис. 8. Двоклітинний ембріон миші. Точками відзначені місця фокусування імпульсів лазера.

Передбачається, що вплив сфокусованого лазерного променя по лінії контакту бластомерів призведе до оборотного пробоя мембран і подальшого злиття двох бластомерів в один. Імпульси лазерного променя необхідно фокусувати точно по лінії контакту бластомерів, рис. 8.

Оптичний пінцет.

Маніпуляції з одиночною клітиною мають величезне значення в різних областях біомедицини: ембріології, мікробіології, біології стовбурових клітин,

тканинної інженерії, регенеративної медицини. Для цих цілей були розроблені різні прилади і технології безконтактної маніпуляції з клітиною, серед яких одним їх найважливіших є оптичний пінцет (пастка). Вперше технологію оптичного пінцета продемонстрував А. Ashkin в 1970 р. стосовно мікроскопічних діелектричних частинок. Він також був першим, хто показав можливість використання подібних пасток для біологічних об'єктів (1992, 1997pp.).

Згодом оптичний пінцет використовували для молекулярних і клітинних досліджень. Так з його допомогою вивчали різні білки: моторні (кінезини, динеїни), джгутикові та ін. Крім того, вивчалися також конформації білка, білок-білкові взаємодії і ДНК-білкові взаємодії.

Принцип роботи оптичного пінцета

Оптичний пінцет використовує сфокусований лазерний промінь для захоплення мікроскопічних нейтральних (незаряджених) об'єктів, таких як дрібні діелектричні сфери, які взаємодіють з електричним полем світловою хвилею, за рахунок індукованого на сфері дипольного моменту. В результаті взаємодії цього диполя з електричним полем електромагнітної хвилі, об'єкт переміщується уздовж градієнта електричного поля. Крім градієнтної сили, на об'єкт також діє сила, викликана тиском (відображенням) світла від його поверхні. Ця сила штовхає сферу у напрямку пучка світла. Однак якщо промінь світла сильно сфокусований, величина градієнта поля може бути більше величини тиску світла.

Більш детальний аналіз процесу переміщення об'єкта в лазерному промені був проведений ще творцями методу. Процес переміщення заснований на трьох механізмах, в залежності від розміру частинки. З теорії розсіювання світла відомо, що механізм розсіювання визначається співвідношенням розмірів частинки і довжини світлової хвилі. Якщо розмір розсіює частинки набагато менше довжини хвилі світла, то має місце розсіювання Релея. Якщо світло розсіюється на частинках (пил, дим, водні Краплі) розміром більше, ніж довжина хвилі, то це розсіювання Мі. Зокрема, розсіювання Мі пояснює білий

або сірий колір хмар. У тому випадку, якщо розмір частинок можна порівняти з довжиною хвилі лазера, то має місце третій механізм – переміщення частинки по градієнту електричного поля хвилі. На основі аналізу цих взаємодій лазерного променя з частинками була розроблена концепція оптичного пінцета, рис. 9.

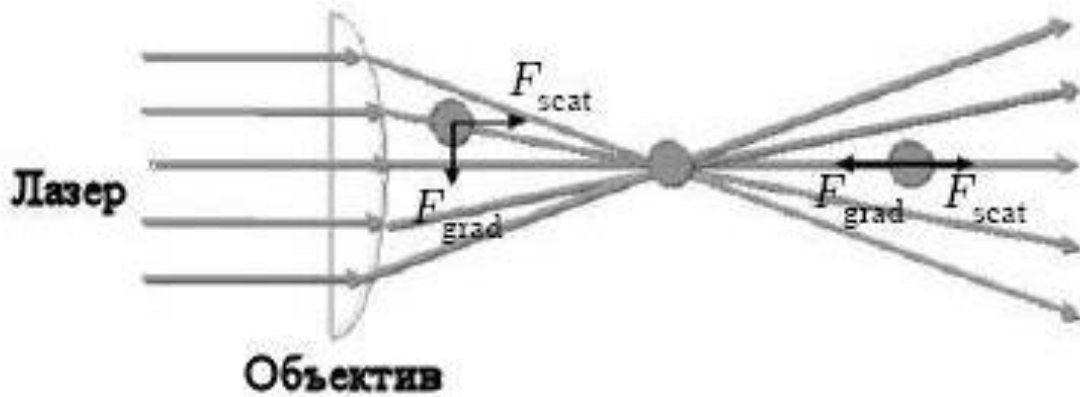


Рис. 9. Схема роботи оптичного пінцета. F_{scat} – сила, тиск світлового потоку; F_{grad} – градієнтна сила. Рівнодіюча цих сил переміщує частинку до центру пастки (пінцета).

На рис. 9 зображені сили, що діють на частку, що знаходиться в оптичній пастці. Світло лазера проходить через лінзу об'єктива мікроскопа і фокусується в одній точці. Коли об'єкт знаходиться поза фокусом пастки, змінюється момент імпульсу і рівнодіюча сила повертає частинку назад до центру пастки. Якщо частка знаходиться в центрі пастки, то окремі пучки світла заломлюються однаково, в результаті чого рівнодіюча сила дорівнює нулю. Однак, як правило, клітина в пастці обертається. Для стабілізації обертання використовують не один, а кілька променів.

Великий інтерес представляє також маніпуляції з клітинами з використанням оптичної системи з мультиловушкою. Для формування мультиловушки оптичний пінцет налаштовують таким чином, щоб можна було захоплювати в пастку кілька частинок одночасно. Проходячи через роздільник, лазерний пучок роздвоюється, потім знову збирається перед тим, як увійти в

об'єктив мікроскопа.

Також були розроблені технології, що дозволяють створювати контрольовані множинні пучки. Серед них можна назвати VCSEL (поверхнево-випромінюючий лазер з вертикальним резонатором) — напівпровідниковий лазер, що випромінює світло в напрямку, перпендикулярному поверхні кристала, на відміну від звичайних лазерних діодів, випромінюючих в площині, паралельній поверхні. Кілька лазерів даного типу об'єднують разом таким чином, що кожен лазер фокусується окремо і грає роль окремої пастки.

Застосування системи оптичного маніпулювання до одиничних клітин. Оптичний пінцет найчастіше застосовують для активного маніпулювання біологічними об'єктами (найчастіше з одиничними живими клітинами), а також для їх позиціонування, сортування і модифікації. Оптичний пінцет використаний для утримування клітин в статичному середовищі або в потоці рідини при вирішенні завдання по вимірюванню обсягу одиничної ізольованої клітини нирки в умовах осмотичного шоку і для феноменологічного аналізу водного транспорту. Так, при проведенні таких досліджень нефроцит підтримувався оптичним пінцетом в підвішеному стані і не стикався ні з підкладкою, ні з іншими клітинами, що виключало вплив на нього навколишніх об'єктів. Коли клітина знаходиться в оптичній пастці, її поверхня нагрівається пучком світла, що призводить до зміни інтенсивності і напрямку відбиття променів, тому можна скласти діаграму по відображенню світла від одиничної клітини в оптичній пастці. Її використовують для ідентифікації різних внутрішньоклітинних структур, поділу живих і мертвих клітин, а також для поділу клітин, що відрізняються за розміром, формою, морфології і коефіцієнту заломлення.

Спільно із застосуванням оптичної пастки використовується також метод спектрометрії для отримання необхідної інформації про стан клітини. Так, наприклад, ще в 2005 р. в Китаї група вчених застосувала цю методику для ідентифікації та диференціації 6-и видів бактерій в різних умовах проживання. У медичних цілях дану технологію застосовували для того, щоб розрізнити

здорові і модифіковані лімфоцити, а також ракові і здорові клітини.

Інша група вчених використовувала одночасно оптичний пінцет і метод спектрометрії для кількісної оцінки ферментативних процесів всередині одиночної дріжджової клітини в режимі реального часу.

Комбінування мікро-спектроскопії з оптичним пінцетом і мікрофлюїдної (мікропотоки) системою відкриває широкі можливості для вивчення *in vitro* моніторингу клітинної відповіді на вплив різних хімічних речовин. Так, в одиничну клітину можна ввести тестований фармакологічний розчин і виміряти зміни фізичних і хімічних показників клітинних компонентів.

Переміщення клітин. Оптичний пінцет дозволяє безконтактно пересувати клітини в рідкому середовищі, що є надзвичайно зручним при роботі в стерильних умовах. Так, оптичний пінцет застосовували для створення груп нейронів шляхом пересування окремих клітин. Одну групу нейронів культивували в чашці з адгезивним ("прилипаючим") покриттям, іншу - з менш адгезивним. Нейрони з другої групи захоплювали пінцетом і переносили до нейронів з першої групи, щоб у клітин була можливість взаємодіяти один з одним. Наприклад, якщо клітини-палички сітківки поміщали в групу клітин, що містять як клітини-колбочки сітківки, так і мультиполярні нейрони, то спостерігали інгібування (пригнічення) росту нейронів перенесеними клітинами-паличками. При цьому оптичне маніпулювання не впливало на здатність нейронів прикріплюватися до субстрату, крім того органели, ядро і цитоплазматичні структури клітин, що побували в оптичній пастці, не були пошкоджені.

Велика кількість робіт з дослідження роботи оптичного пінцета і його впливу на живі об'єкти було проведено на бактеріях. Були сконструйовані мікрокамери для культивування та аналізу, які з'єднані між собою вузьким каналом, через який транспортували одну бактерію, *E. coli*, захоплену лазерним пінцетом. Після того, як в камері для аналізу *E. coli* ділилася на дві дочірні клітини, одну з них захоплювали в пастку і переносили в камеру культивування для подальшого зростання і розвитку. Ця техніка дозволяє порівнювати

генетично ідентичні клітини в середовищі без забруднюючих речовин, що може допомогти в дослідженні таких явищ, як нерівний поділ. Такий підхід лежить в основі нового методу для спостереження клітинної відповіді на різні позаклітинні умови в режимі реального часу без видалення з поля зору мікроскопа.

Сортування клітин. В даний час для сортування клітин широко використовують метод проточної цитофлуориметрії, коли клітини відбираються із загальної маси за характером флуоресцентного сигналу. Такий метод називається активним сортуванням, так як необхідно приєднання маркерів флуоресценції до клітин. У той же час сортування клітин можливе і за допомогою оптичного пінцета, як з використанням флуоресцентних маркерів, так і на основі морфологічних особливостей клітин. Вперше це було продемонстровано в 1987 р. Використаний відхиляє пучок для поділу клітин і рушійний пучок для підтримки руху клітин. Інший варіант для поділу клітин являє собою Y-образні канали, рис. 10.

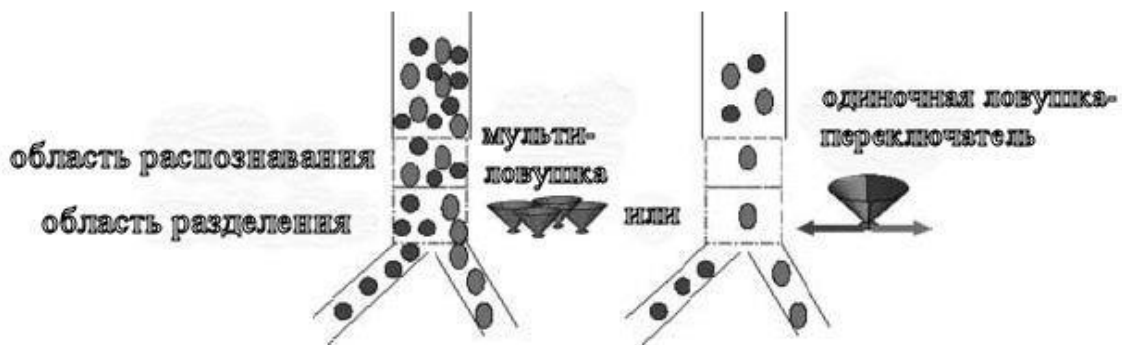


Рис. 10. Застосування оптичного пінцета для сортування клітин.

Клітини аналізуються в області розпізнавання, а потім сортуються в області поділу за допомогою мультизахватів або одиночних пасток-перемикачів. Фактично, оптичний пінцет відбирає потрібні клітини, поміщає їх в спеціальні резервуари, а всі інші клітини проходять повз.

Можна використовувати лазери і для сортування клітин: ближній

інфрачервоний лазер для оптичного перемикання і лазер, що випромінює у видимому спектрі, для розпізнавання і вимірювання флуоресценції. Клітини, що впливають із зразка, за допомогою гідродинамічного фокусування збираються у вузьку струмінь. Спочатку вона проходить через аналітичну область, а потім через область оптичного перемикання. Клітина розпізнається за типом флуоресцентного сигналу і сфокусованим лазерним пучком перенаправляється у відповідний канал, інші клітини йдуть через інший канал.

Розроблено й інші методи активного сортування клітин, наприклад, ідентифікація клітин за допомогою відео-мікроскопії та їх перерозподіл за допомогою оптичного пінцета. Також в даний час розроблені методи пасивного сортування клітин, тобто без застосування маркерів. Відбір клітин в цих випадках йде за розміром, формою, коефіцієнтом відображення, або за всіма цими параметрами одночасно. Так, було продемонстровано поділ еритроцитів і лімфоцитів, засноване на відмінностях у формі.

Збірка і організація клітинних асоціацій. Оптичний пінцет може бути використаний для складання і організації клітин, тобто з групи клітин можна сформувати складну структуру. У цьому випадку оптична пастка використовується для захоплення об'єкта, який, у свою чергу, може захоплювати інші об'єкти. Так, мікросфера діаметром 5 мкм була першою захоплена в пастку, а потім використовувалася в якості направляючої для захоплення і маніпулювання з іншими сферами меншого діаметру, 2 мкм. Структура з мікросфер, зібрана таким чином, залишалася стабільною навіть при русі по каналу діаметром 100 мкм.

Дана технологія дозволяє переміщати частинки по різних осях і реорганізовувати їх в тривимірні структури. Крім мікросфер така техніка застосовувалася і для побудови тривимірної структури з клітин бактерії *E. coli*. Клітини поміщали в желатин в строго певні місця. Після вимкнення лазера отримана тривимірна структура залишалася стабільною протягом декількох днів. Застосування цієї техніки може бути корисним при вивченні впливу розташування, кількості та близькості сусідніх клітин на клітинну

диференціацію, а здатність клітин утворювати життєздатні стабільні тривимірні структури відкриває широкі можливості для тканинної інженерії.

Оптичні напрямні. Оптичний пінцет був застосований для активації росту нейронів у певному напрямку в культурі *in vitro*. Лазерне випромінювання (800-900 нм) фокусували на краї зростаючої клітини, активізуючи процеси росту. Такий оптичний напрямок росту здійснюється завдяки впливу пучка світла на мономер актину, в результаті якого утворюються центри полімеризації, а полімеризація веде до спрямованого росту нейронів в заданому дослідником напрямку.

Комбінування оптичного пінцета і лазерного скальпеля. Найбільш широкі перспективи в експериментальній ембріології мають прилади, що поєднують оптичний пінцет з лазером, який буде робити мікророзріз. Це дозволяє виділяти клітини з групи, органели, елементи цитоскелету, окремі хромосоми з клітин. Отримання клітинних гібридів в клітинній інженерії також можливо із застосуванням оптичного пінцета і лазерного скальпеля. Клітини захоплюються в пастки, приводяться у взаємодію, а потім в місці їх контакту роблять розріз декількома лазерними імпульсами. Така система відкриває широкі можливості для проведення мікрохірургічних процедур на клітинному рівні.

Проблеми застосування оптичного пінцета.

Поглинання лазерного випромінювання клітинними структурами може привести до пошкоджень, так як в оптичному пінцеті використовується енергія високої інтенсивності. При роботі з біологічними об'єктами важлива також і довжина хвилі випромінювання. В даний час досить добре вивчено вплив ближнього інфрачервоного випромінювання (790 – 1064 нм) на живі об'єкти і показано, що близьке по довжині хвилі випромінювання може надавати на клітини абсолютно різну дію. Так, для клітин китайського хом'ячка мінімальне пошкодження було зареєстровано при довжині хвилі 930 нм, а максимальне – при 970 нм. Для клітин *E. coli* мінімальне пошкодження було при 830 нм, а максимальне – при 870 нм. Дослідним шляхом було показано, що в анаеробних умовах рівень пошкодження найбільш низький і, отже, кисень відіграє провідну

роль в цьому процесі. Однак і випромінювання на довжинах хвиль менше 800 нм може завдати серйозної шкоди біоб'єкту. При дослідженні побічних ефектів впливу оптичного пінцета на клітини шляхом зміни потужності лазера, часу опромінення і довжини хвилі були виявлені цікаві ефекти. Експерименти ставили на трансгенних *C. elegans* (черви-нематоди), яких використовували в якості біосенсорів, чутливих до різних зовнішніх стресуючих факторів. Клітини піддавали дії оптичного пінцета при довжинах хвиль від 700 до 850 нм на час від 30 до 240 с. Активацію експресії гена спостерігали з найбільшою частотою при 760 нм, коли дія обумовлена фотохімічними процесами і при довжині хвилі понад 800 нм, коли збиток наносився з-за фототермічних процесів.

Термічний вплив на клітини можна легко зареєструвати по підвищенню температури. При використанні 100 мВт оптичного пінцета (довжина хвилі випромінювання 1064 нм) спостерігали підвищення температури на 1-2°C при проведенні експериментів на сперматозоїдах, клітинах яєчника хом'ячка і ліпосомах, підвищення температури склало 10, 11,5 і 14,5°C/Вт відповідно, що говорить про необхідність зниження сумарної енергії впливу, щоб уникнути перегріву клітин.

Для того щоб зменшити теплове пошкодження об'єкта при застосуванні оптичного пінцета при роботі з небіологічними об'єктами для зменшення нагрівання, рекомендовано використовувати важку воду замість звичайної. Однак для живих систем необхідно шукати інші підходи. Так, в установках використовують різні лазери і перевіряють їх властивості. Наприклад, замість твердотілого лазера, який в якості активного середовища використовує алюмо-ітрієвий гранат з добавками неодиму в якості джерела випромінювання можна застосовувати лазер на фториді ітрію-літію з легуванням неодимом або титан-сапфіровий лазер. Інший підхід для мінімізації шкідливого впливу лазера-уникати прямого впливу випромінювання на клітини. Наприклад, щоб уникнути прямого контакту між фотонами і клітинами, до останніх можна приєднати одну або кілька частинок, з якими безпосередньо буде взаємодіяти лазер.

Біопсія ооцитів і ранніх ембріонів.

Біопсія – метод дослідження, при якому проводиться прижиттєвий відбір клітин з організму і подальше їх мікроскопічне дослідження. У різних дослідженнях активно застосовують цей метод для проведення подальшої генетичної діагностики, яка дозволяє виявити у ембріона наявність хромосомних відхилень і ін. Для цього відбір клітинного матеріалу проводять на різних стадіях ембріонального розвитку: на стадії зиготи, дроблення і бластоцисти. Теоретично, відбір клітин можна проводити на будь-якій стадії раннього розвитку: від стадії двох клітин до стадії бластоцисти. На більш ранній стадії (зигота – запліднений ооцит) для проведення аналізу можна взяти тільки редукційні (полярні) тільця.

Найбільш важливою перевагою проведення біопсії на стадії зиготи є те, що обидва полярних тільця – поза-ембріональний матеріал і, таким чином, не беруть участь у розвитку майбутнього ембріона. Видалення полярних тілець не впливає ні на успішне запліднення, ні на кількість ембріонів, що приступають до дроблення, тобто експериментально на мишачої моделі показано, що полярні тільця не вносять ніякого внеску в розвиток ембріона. Найбільш важливим негативом біопсії полярного тільця є те, що даним способом можна досліджувати тільки внесок материнського генома в розвиток ембріона. У тому випадку, коли необхідно оцінити ще й внесок батьківського геному, проводять біопсію бластомера на стадії дроблення. Для цього дуже важливо правильно вибрати стадію, на якій слід проводити біопсію. Так, наприклад, експериментально встановлено, що якщо проводити відбір клітинного матеріалу на стадії двох і або чотирьох клітин, то розмір внутрішньої клітинної маси (ВКМ) на стадії бластоцисти пропорційно зменшується. Отже, на цих стадіях не рекомендується проводити біопсію.

Найбільш підходящою стадією для біопсії бластомера у ембріонів є 8 клітин, коли ембріон ще не компактизований. На більш пізній стадії клітини стають поляризованими на мембранному і на цитоплазматичному рівні. Ембріони ссавців добре переносять видалення однієї або двох клітин на стадії

8-ми клітин, видалення ж більшого числа клітин може привести до порушення формування ВКМ і загибелі ембріона.

Крім стадії дроблення біопсію можна проводити і на більш пізніх стадіях. Найбільш важливою перевагою цієї процедури перед біопсією на більш ранніх стадіях є можливість відбору більшого числа клітин. Однак стадія морули не підходить для біопсії, так як ембріон вже компактизован. Крім того, на стадії морули клітини вже втратили тотипотентність і неможливо з'ясувати, які з них увійдуть до складу зародкового матеріалу, а які будуть складати позазародишеві тканини. Стадія бластоцисти є більш перспективною для проведення біопсії, так як на даному етапі розвитку ембріона можна чітко розрізнити зародкові і позазародишеві тканини (трофектодерму і ВКМ). Таким чином, можна видалити частину клітин трофектодерми без ризику заподіяти шкоду майбутньому організму, так як ВКМ залишається недоторканою.

Процедура біопсії складається з двох послідовних етапів: 1) Отримання отвору (перфорування) в *zona pellucida* (ZP); 2) Витяг клітинного матеріалу. Отвір в ZP можна отримати трьома способами: механічно (часткове розсічення або поздовжнє розрізання ZP), хімічно (з використанням кислого розчину Тироде) і за допомогою лазера. Всі три способи можуть бути використані для проведення біопсії на будь-якій стадії розвитку. Так склалося, що біопсія полярного тільця найчастіше пов'язана з механічним способом отримання отвору в прозорій оболонці. У разі проведення біопсії ембріона на стадії дроблення для перфорування ZP найчастіше використовують хімічний або лазерний метод. Для здійснення біопсії на стадії бластоцисти використовують всі три можливих способи перфорування ZP.

При проведенні біопсії редуційного тільця і бластомера відбір матеріалу здійснюють за допомогою скляної голки для біопсії. При цьому може бути використаний як механічний спосіб, так і лазерні технології, рис. 11.

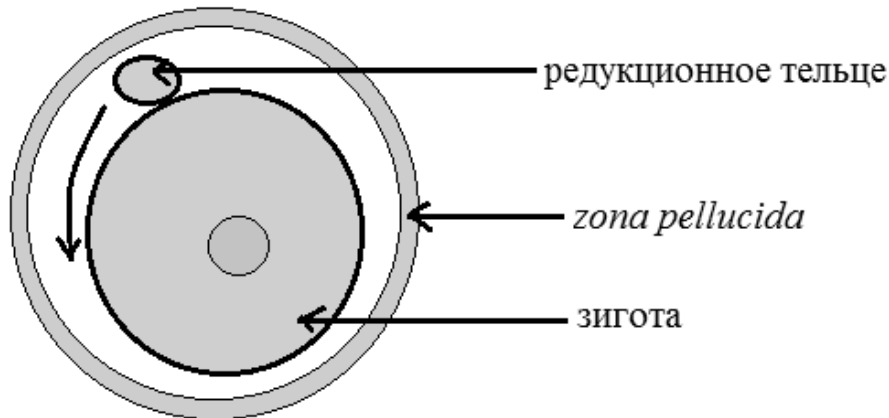


Рис. 11. Схема переміщення редукційного тільця під *zona pellucida* за допомогою оптичного пінцета. Стрілкою вказано напрямок переміщення редукційного тільця.

При вдалій біопсії редукційне тільце, захоплене лазерним пінцетом, виходить за межі ZP через отвір в ній. Однак інтерес представляють і причини невдач проведення цієї мікрохірургічної операції. В окремих випадках редукційне тільце пошкоджувалося малими частинками зруйнованої ZP і втрачало цілісність. Також успіх процедури багато в чому залежав від того, наскільки сильно редукційне тільце затиснуто між ембріоном і ZP. Після перших невдач перед проведенням процедури ми стали оцінювати перспективність ембріона по можливості переміщення редукційного тільця під ZP за допомогою оптичного пінцета. Для цього на початку процедури, ще до локального пошкодження ZP проводилося захоплення РТ оптичним пінцетом для перевірки його мобільності.

Таким чином, розглянуті вище оптичні методи, інструменти і прийоми виконання мікрохірургічних маніпуляцій з клітинами дозволяють вивести процеси клітинної інженерії на якісно новий і більш безпечний рівень.

Завдання для самоконтролю.

1. Мікроманіпуляції з клітинами: дайте визначення, приведіть приклади.
2. Вкажіть значення клітинної інженерії в біотехнології.
3. Приведіть визначення клітинної інженерії.
4. Вкажіть основні методи клітинної інженерії.
5. Вкажіть переваги клітинної інженерії.
6. Дайте визначення поняттям: мікрохірургія, мікроманіпуляція.
7. Поясніть принцип роботи оптичного пінцета.
8. Поясніть принцип роботи оптичного скальпеля.
9. Розкажіть про технології безконтактної маніпуляції з клітинами.
10. Розкажіть про технології переміщення та сортування клітин.
11. Розкажіть про лазерні технології фотопорації та трансфекції.
12. Розкажіть про методи збірки і організації клітинних асоціацій.

Контрольні питання.

1. У чому полягає метод мікрохірургії клітини?
2. Для чого можна застосовувати лазерну мікрохірургію?
3. Які існують мікроманіпуляції в клітинній інженерії?
4. Що таке лазерний скальпель і як він працює?
5. Як працює оптичний пінцет?
6. Які ви знаєте методи клітинної інженерії?
7. Які маніпуляції можна проводити з ембріонами?
8. Які методи лазерних мікроманіпуляцій з клітинами існують?
9. На якій стадії розвитку ембріонів можна застосовувати лазерну мікрохірургію?
10. Які мікроінструменти використовують для маніпуляцій з клітинами?
11. Що таке біопсія ооцитів і ранніх ембріонів?
12. На яких стадіях можна проводити біопсію ембріонів?

13. Що таке лазерна фотопорація та трансфекція?
14. Які існують проблеми застосування оптичного пінцета?
15. В яких технологіях застосовують оптичний пінцет?

Рекомендована література.

1. Храмова Ю.В. Новые экспериментальные подходы к изучению фолликулогенеза *in vitro* и манипуляциям с предимплантационными эмбрионами млекопитающих: дисс. канд. биол. наук. – М. – 2015. – 137 с.
2. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. – Л.: «Наука». - 1988.
3. Манк М. Биология развития млекопитающих. Методы. – М.: Мир. 1990.
4. Дыбан А.П., Пучков В.Ф., Баранов В.С., Самошкина Н.А., Чеботарь Н.А. Лабораторные млекопитающие: мышь *Mus musculus*, крыса *Rattus norvegicus*, кролик *Oryctolagus cuniculus*, хомячок *Cricetus griseus*. / Объекты биологии развития. – М.: «Наука». -1975.- С.505-566.
5. Кожухарь В. Г. Первичные половые клетки млекопитающих и человека. Происхождение, идентификация, миграция. //Цитология. -2011.- № 3. - Т. 53. - С.211–220.
6. 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. // Теплофизика высоких температур. - 2013. - Т. 51. - № 2. - С.198–204.
7. Enger J, Goksör M, Ramser K, Hagberg P, Hanstorp D. Optical tweezers applied to a microfluidic system. //Lab Chip. -2004.- V.4. - No 3.- P.196-200.
8. Dholakia K. and Reece P. Optical micromanipulation takes hold. // Nano Today. -2006.- V.1. - P.18-27.
9. Fällman E, Axner O. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. Appl Opt. -1997.- V.36. - P.2107-13.
10. Karamenyan A.V., Shakhbazyan A.K., Sviridova-Chailakhyan T.A., Krivokharchenko A.S., Chiou A.E., Chailakhyan L.M. Use of Picosecond Infrared Laser for Micromanipulation of Early Mammalian Embryos. // Molecular Reproduction & Development. -2009.- V.76. - P.975–983.
11. Il'ina I. V., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A. V., Agranat M.B., Khramova Y. V., Semenova M.L. Noncontact microsurgery and micromanipulation of living cells with combined system femtosecond laser scalpel-optical tweezers. //Proceedings of

SPIE. - 2012. - P. 84270–84278.

12. <https://zen.yandex.ru/media/nplus1/kak-uchenye-prevratili-lazer-v-skalpel-i-pincet-5d5b1d1178125e00ad83542b>

Додаткова література.

1. Воробьева, О.А. Факторы роста, новые регуляторы репродукции //Цитология.- 1989.- Т.31. -№ 10.-С.1139-1157.

2. Практикум по эмбриологии: пособие для студентов университетов под редакцией В.А.Голиченкова и М.Л.Семеновой. –М.: Издательский центр «Академия». - 2004.

3. Дыбан А.П., Баранов В.С. Оогенез млекопитающих. / Современные проблемы оогенеза под редакцией Детлаф Т.А. – М.: «Наука». - 1977.

4. Понятов А. Манипулируя светом // Наука и жизнь. — 2018. — № 12. — С. 2—9.

5. Kawata S., Sugiura T. Movement of micrometer-sized particles in the evanescent field of a laser beam // Opt. Lett. 17, 772 (1992).

6.https://www.youtube.com/watch?time_continue=253&v=KsizXnAaFok&feature=emb_logo

7. <https://nplus1.ru/material/2018/10/02/laser-nobel>

8. https://in-science.ru/library/article_post/opticheskiye-pintsety

**НОВІ МЕТОДИ ТА ІНСТРУМЕНТИ ДЛЯ МІКРОМАНІПУЛЯЦІЙ
З КЛІТИНАМИ ТВАРИН В ПРОЦЕСАХ КЛІТИННОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

**Методичні вказівки
для самостійного вивчення дисципліни**

ШИГИМАГА Віктор Олександрович

Формат 60x84/16. Гарнітура Times New Roman
Папір для цифрового друку. Друк ризографічний.

Ум. друк. арк. 1,55

Наклад 100 пр.

Державний біотехнологічний університет
61002, м. Харків, вул. Алчевських, 44