

## ПРОБЛЕМЫ МИКРОХИРУРГИИ ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКИ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

© 2016 г. В.А. Никитин, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: vnikitin2001@rambler.ru

Поступила в редакцию 28.01.16 г.

Проведен детальный анализ общепринятых методов микрохирургии единичной клетки с точки зрения их соответствия задаче сохранения ее целостности, минимизирования возможных ее повреждений при различных операциях на эмбрионах и соматических клетках: при пересадке ядер с целью клонирования организмов, при получении монозиготных близнецов, при микроинъекции в клетку. Обсуждаются проблемы контакта клетки с микроинструментами, перфорация, как фактор повреждения при проникновении микроинструмента в клетку, влияние света на клетку, проблема удерживания клетки во время операции и в связи с этим влияние отрицательного давления на нее, ставится вопрос о времени нахождения клетки в микрокамере при условиях *in vitro*, затронут вопрос о влиянии масла, используемого в качестве заградительного барьера от испарения растворителя среды. Впервые ставится вопрос о влиянии физико-химического состава стекла, из которого сделаны микроинструменты, о влиянии температурного шока и о влиянии на клетку свежей питательной среды.

*Ключевые слова:* реконструкция клетки, клонирование, микрохирургия единичной клетки, микроинъекция, клеточная инженерия, повреждения клетки.

Почти все главные проблемы биологии приводят к необходимости изучения процессов, происходящих в отдельной клетке. Это позволяет подойти к решению ряда принципиальных вопросов биологии развития, молекулярной биологии, биофизики клетки. В настоящее время исследования, связанные с активным изменением клетки введением чужеродных генов, ядер или разделением клетки на жизнеспособные клеточные фрагменты – ядро и цитоплазму – и созданием на их основе новой клетки, выделились в самостоятельную область, получившую название «клеточная инженерия» или «реконструкция клеток».

Наибольший интерес вызывают проблемы, связанные с реконструкцией эмбриональных клеток млекопитающих, которая включает в себя задачу изучения механизмов реализации генетической информации, обеспечивает эффективный стратегический подход к получению животных с заданными свойствами (в том числе гибридных животных и межвидовых химер), клонированию, консервации генетических ресурсов [1–5].

Технологии микрохирургии клетки для пересадки ядер, разделения ранних предимплантационных эмбрионов, трансгенеза стали интенсивно развиваться в мире с конца 1960-х – начала 1970-х гг. [6,7]. Одним из самых важных

условий экспериментального развития этих исследований была возможность активно вмешиваться в функционирование клетки без нанесения ей значительных повреждений [8,9]. Тем не менее вплоть до настоящего времени вероятность успеха при различных вариантах микрохирургии одиночной клетки (в том числе в работах по эмбриональному клонированию) остается крайне невысокой. Можно заключить, что существует много факторов, влияющих на реализацию программы трансплантированного ядра – это в первую очередь эпигенетические процессы в ядре зрелой соматической клетки-донора, это и соотношение фаз клеточного цикла клетки-донора и клетки-акцептора, и качество ооцитов, и, наконец, сама технология микрооперации. Особо следует обозначить проблему индивидуальности (генетической и физиологической) каждой единичной клетки. Эта индивидуальность задается даже на уровне репликации ДНК с временной потерей около 200 пар оснований (теломер) по обоим концам молекулы и последующей, как правило, частичной достройкой ее в дочерней клетке. Большой проблемой сегодня является, например, выбор ранних эмбрионов для экстракорпорального оплодотворения. Эта проблема, однако, пока не имеет решения, и ее детальное рассмотрение выходит за рамки данной статьи.

Следует особо обратить внимание на то, что при обсуждении причин неудач почти совершенно не уделяется внимания тонкостям технологии клеточной микрохирургии и параметрам используемого оборудования, практически отсутствует подробное описание особенностей микрохирургической операции, хотя очевидно, что собственно сама операция на клетке – принципиально важная часть работы. Именно здесь есть основания надеяться найти подходы и методы, которые могут улучшить ситуацию в этой важной области.

В свое время мы клонировали лабораторную мышь [10], кролика [11], корову [12] и получили живые особи. Однако после выхода работ [13,14] о получении трансгенных мышей, в которых тщательно проанализированы патологии всех полученных различным способом особей, пришлось прийти к выводу о необходимости заниматься причинами повреждений эмбриональной клетки, приводящими к возникновению патологий. Цель настоящей работы – выявить и систематизировать факторы повреждений при работе с единичной клеткой, источники патологий потомства и предложить подходы, методы, технологии, которые могли бы позволить, хотя бы в какой-то степени, снизить возможность возникновения этих патологий. В связи с этим мы решились вынести на всеобщее обсуждение ряд проблем, связанных с особенностями работы с единичной клеткой, с сохранением целостности клеток, и предлагаем пути решения этих проблем.

Рассмотрим основные проблемы в инструментальной работе с единичной клеткой в процессе ее реконструкции, клонирования, микрохирургии, микроинъекции и других микроманипуляций с ней.

**Первая проблема** – контакты клетки с микроинструментами и поверхностью микрокамеры. Первое касание клетки – первое повреждение ее. Микрокапилляры, как и капилляры, имеют внутреннюю и внешнюю шероховатые поверхности. Отсюда все проблемы контакта органелл, хромосом и клеток с такой поверхностью. На рис. 1 представлено изображение, полученное с помощью атомного силового микроскопа, – поверхность покровного стекла (1) и поверхность вблизи кончика только что сделанной на пуллере микропипетки (фактически оплавленное стекло) (2).

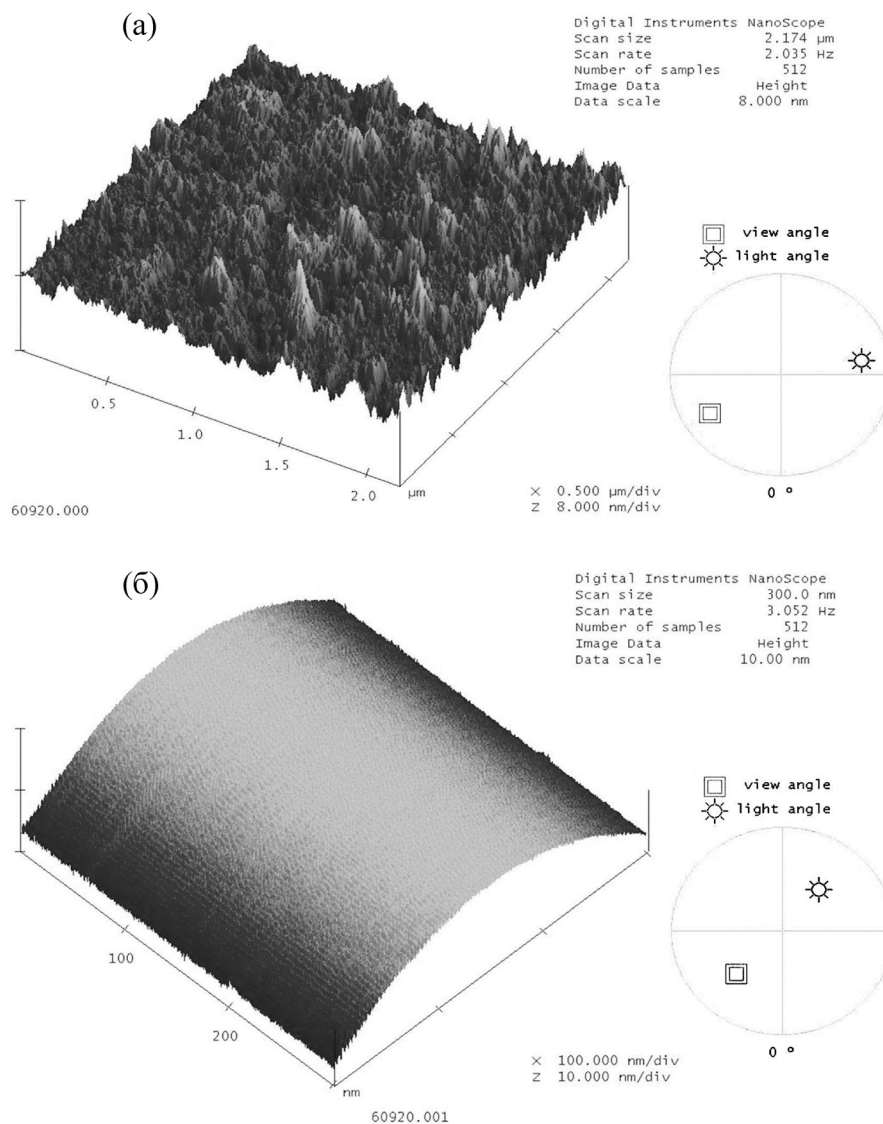
Микроинструменты практически всегда изготовлены из стекла. Самое очищенное стекло – кварцевое, но на практике оно всегда содержит примеси тяжелых металлов, в лучшем случае, в шестом или в девятом знаке. Непригодным для работы с клеткой считается стекло,

содержащее ионы свинца или других многовалентных ионов металлов. Другая особенность стекла – способность его со временем к выщелачиванию и вследствие этого – к образованию на его поверхности множества острых, иглоподобных кристаллов, которые видны в фазово-контрастном микроскопе [15]. Микроинструменты не должны наносить клетке значимых, непредусмотренных механических повреждений. Бедный и не всегда адаптивный инструментарий для микрохирургии должен постоянно совершенствоваться.

Наш собственный опыт и анализ литературных данных по различным видам микроманипуляций с клетками показывают, что очень важно постоянно расширять ассортимент микроинструментов и усовершенствовать их применительно к каждому виду работ в микроманипуляционной практике. Одному из авторов настоящей работы удалось значительно расширить набор известных микроинструментов, усовершенствовать и создать до 100 видов микроинструментария, которые находят применение в практике работ по клонированию, в близнецовых технологиях в животноводстве и в том числе при экстракорпоральном оплодотворении [16]. Разработка новых инструментальных средств и методов работы с ними, как правило, способствуют повышению эффективности микрохирургии и других микроманипуляционных работ с единичной клеткой.

В работе часто возможны механические вибрации микроинструмента, которые могут повредить целостность клетки или отдельной органеллы. Поскольку сетка напряжений направлена вдоль движения микроинструмента, может происходить значительная структурная перестройка мембраны, а также примембранного внутриклеточного и внеклеточного матрикса. Особенно опасны повреждения внеклеточного матрикса, имеющего открытый доступ в окружающую среду.

*Пути решения проблемы.* Проблема касания микроинструментом единичной клетки может быть отчасти решена переходом к использованию лазерной техники (лазерные пинцеты, лазерные скальпели и др.). Для стеклянных микроинструментов пока приходится ориентироваться на правильный выбор сорта и вида стекла, из которого их изготавливают. Что касается кристаллов на поверхности стекла, то, по нашим данным, даже свежееплавленное стекло уже имеет весьма шероховатую поверхность, от которой можно избавиться, по-видимому, только силиконизацией (покрытием поверхности стекла тонкой силиконовой пленкой при высокой температуре).



**Рис. 1.** Поверхность стекла в атомном силовом микроскопе. (а) – Поверхность покровного стекла, (б) – поверхность оплавленного стекла (вблизи кончика микропипетки).

При работе с единичной клеткой следует минимизировать воздействие и посторонних механических вибраций, воздействующих на микроинструмент. Для этой цели можно использовать антивибрационный стол и дополнительные консоли для кончика микроинструмента (жидкостной демпфер поперечных колебаний микроинструмента), например, из магнитной жидкости. Внешние механические колебания можно устранить использованием специальных антивибрационных столов и устройств, позволяющих работать с микроманипулятором дистанционно [17,18].

Существуют и другие источники колебаний – акустические: все тела и микроинструменты, в частности, имеют свои собственные колебания, которые могут входить в резонанс

с акустическими колебаниями. Однако практика такова, что о них мы не нашли упоминаний в обширной литературе по работе микроинструментами с клеткой.

**Вторая проблема** – деформации клетки или органеллы при контакте с микроинструментами приводят к внутриклеточным перестройкам и перестройкам внутри Микропипетка при внедрении в клетку деформирует цитоплазматическую мембрану, растягивает ее, увеличивает ее площадь (см. рис. 2).

Латеральное растяжение мембраны приводит к увеличению общей ее площади и, как следствие, к уменьшению ее толщины вместе с примембранным комплексом, в первую очередь, в области кончика микропипетки.

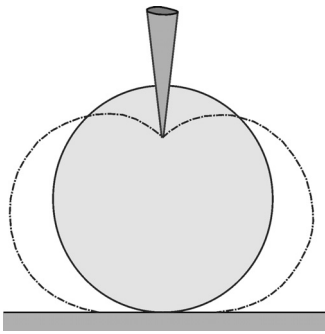


Рис. 2. Схема деформации раннего эмбриона.

Всякое растяжение мембраны приводит к появлению на ней дефектов, способствующих безвозвратной утечке цитоплазмы и ее содержимого.

Так как вектор силы при внедрении микропипетки в клетку направлен к ее центру, давление на клетку возрастает по мере перемещения микропипетки вплоть до момента ее прокола. При этом во время перемещения микропипетки увеличивается внутриклеточное гидростатическое давление.

С увеличением гидростатического давления возрастает градиент давления с окружающей средой и из клетки начинают выходить вода, ионы и другие компоненты цитоплазмы, вплоть до аминокислот и белков.

При удерживании клетки при помощи пипетки-микроприсоски происходит такая же ситуация, с тем лишь отличием, что, во-первых, присоска создает разность давлений по обе стороны мембраны локально, в месте контакта ее с клеткой. В случае всасывания части клетки в полость микроприсоски напряжение цитоплазматической мембраны увеличивается. Кроме этого, из-за отрицательного давления микроприсоски могут создаваться различные локальные градиенты давления по сравнению с градиентами, создаваемыми при помощи деформации клетки.

*Пути решения проблемы.* Необходимо создавать специальные инструменты и приспособления, не деформирующие клетку и ткани [19,20]. Искать способы повышения ригидности клеток. Иногда использовать влияние временного осмотического шока на клетку. Изучать возможности создавать переходы «гель-золь» в цитоплазме клетки и управлять этим процессом. Применять частотные пьезовибраторы для проникающих микроинструментов с тем, чтобы локально пробивать мембраны, *zona pellucida* или стенку клетки, не создавая деформацию.

**Третья проблема** – перфорация при проникновении микроинструмента в клетку приводит к самым распространенным и одним из самых серьезных повреждений ее при реконструкции. В рамках этой проблемы возникают две новых, ее сопровождающих. Первая – время «жизни» перфорации *zona pellucida*: чем дольше существует перфорация в зоне пеллюцида, тем больше вероятность инфицирования эмбриона, утечки содержимого перивителлинового пространства или его разбавления окружающей средой. Вторая – образование большого цитоплазматического тяжа при пересадке ядер. По последним данным, например, при аспирации более 7 пкл цитоплазмы из ооцита в процессе интрацитоплазматической инъекции спермы при проведении экстракорпорального оплодотворения развитие эмбриона *in vitro* нарушается на стадии бластоцисты [21].

*Пути решения проблемы.* Важно использовать микроинструменты, позволяющие клетке быстро репарировать перфорацию, или применять неинвазивные методы. И та, и другая задачи имеют решение. Первая – сделать специально заточенную микропипетку, делающую надрез в *zona pellucida* и мембране такой, чтобы после удаления микропипетки из эмбриона перфорация «захлопнулась». Мы решили ее созданием специального микроинструмента с особой заточкой кончика [19]. Микропипетка с такой заточкой образует в *zona pellucida* вначале щель, затем полукруглую щель с созданием «клапана», который закрывает перфорацию при выходе микропипетки из эмбриона и одновременно обрывает цитоплазматический тяж. Вторая задача решается при помощи наложения микролигатуры [22] или использования специальной микроиглы, разработанной совместно с белорусскими коллегами, «запечатывающей» половинки разделенного раннего эмбриона для получения монозиготных, генетически идентичных близнецов [23].

Способность цитоплазмы вытягиваться в нити достаточно детально была исследована при помощи метода микроманипуляции [24,25]. При введении микроинструмента вглубь цитоплазмы нити получают более короткими. Интересно отметить, например, когда происходит испарение растворителя среды, в которой находится клетка, повышается способность к вытягиванию нитей. Следовательно, всегда необходимо следить за осмотичностью среды.

**Четвертая проблема** – влияние на клетку и ее органеллы отрицательного давления в капиллярных системах, главным образом в микроинструментах. В них создаются градиенты давления и гидродинамический сдвиг. Сдвигом

здесь мы называем вид деформации жидкости в капилляре, вызванной градиентом скорости. Следует стремиться снизить и по возможности даже исключить деформацию клетки или органеллы в этих условиях. Нужны устройства, которые не давали бы возможности цитоплазматической мембране деформироваться при прокалывании. Эта задача решается, например, в случае предотвращения деформации клеток молочной железы при введении через ее протоки различных молекулярных конструкций, при помощи удерживающей присоски в виде «палец», не позволяющих деформироваться всем клеткам [20].

Воздействие отрицательных давлений на клетку для удерживания ее с помощью микроприсоски, т.е. с помощью аспирации, приводит к утечке из клетки внутриклеточного материала. Необходимы инструментальные средства, которые бы позволили исключить использование отрицательного давления, аспирационных методов, которые в настоящее время применяются практически постоянно при работе с клеткой.

В работе [26] было показано, что именно отрицательное давление, а не положительное, действует на механочувствительные каналы и активирует их, вопреки известному мнению о том, что активация механочувствительных каналов связана с натяжением мембраны. Кроме того, всегда следует иметь в виду, что мир капилляров является особым: с избыточной поверхностной энергией, сложной гидродинамикой и градиентами давления. Существенным в капиллярах является не только напряжение сдвига, взаимодействие вещества или органеллы со стенкой капилляра, но и отрицательное давление в просвете капилляра.

*Пути решения проблемы.* Необходимо стремиться не создавать отрицательное давление для клетки и ее отдельных органелл как замкнутых, изолированных от среды структур, для которых отрицательное давление вне клетки или ее органелл всегда дополнительно создает разность давлений. Для этого следует, прежде всего, элиминировать аспирационные процессы при всех манипуляциях с клеткой, в том числе при микрохирургии. Нужны инструментальные средства, которые бы вообще не использовали отрицательное давление. К таким средствам можно отнести новый микроинструмент, капсулу-держатель: она обеспечивает надежное удерживание клетки в полости капсулы, практически без использования отрицательного давления [19]. При комплементарном размере капсулы и клетки можно избежать деформации клетки.

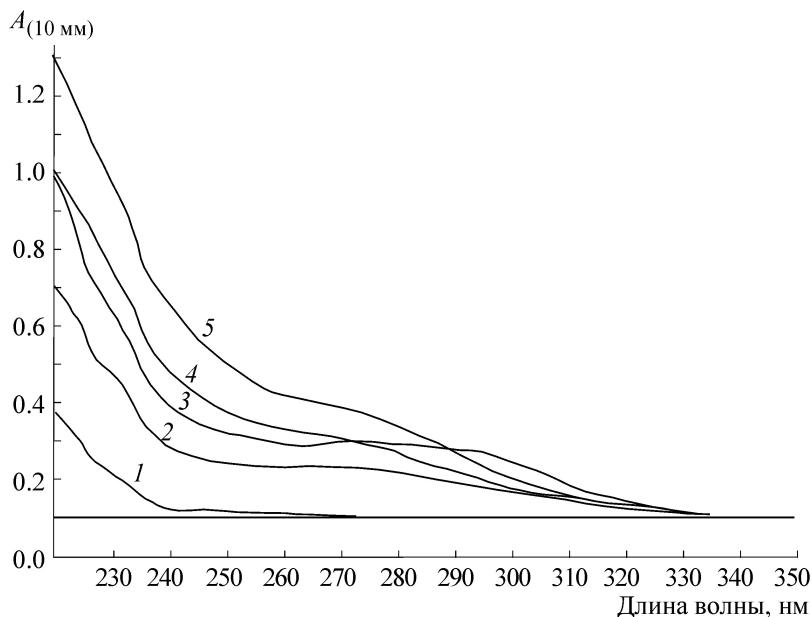
**Пятая проблема** – удерживание клетки во время операции. До сих пор используются микродержатели-присоски, оплавленные с торца и удерживающие клетку или эмбрион за счет отрицательного давления. Такой способ можно даже условно назвать «вампиром», так как из графиков (рис. 3) следует, что микроприсоска активно высасывает из клетки содержимое.

Нам долгое время не удавалось получить информацию о том, какие компоненты могут быть удалены из животной клетки во время ее удерживания на микроприсоске, так как эти клетки весьма малы и объем образцов для анализа был недостаточен. Только при работе с икрой аквариумной рыбы удалось снять спектры веществ, которые выходят из клетки при ее удерживании на микроприсоске (см. рис. 3).

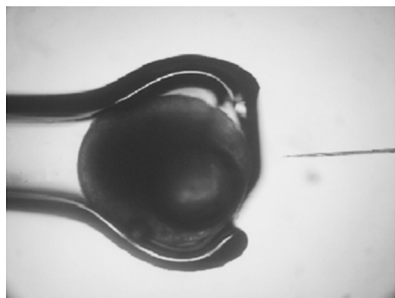
Как видно из рисунка, в контроле (среда, в которой находятся икринки) практически нет белка. В процессе реконструкции или микроинъекции клетки происходит удаление из нее и безвозвратная потеря таких компонентов, как аминокислоты и белки, что связано с большим риском для эмбриона и вообще неприемлемо, так как из него потом получают отдельный организм. Любая потеря внутриклеточных компонентов приведет к дисбалансу их в клетке. Это не приводит клетку к моментальной гибели, но изменения ее могут быть существенными.

*Пути решения проблемы* – следует применять только те методы удерживания клетки, которые не используют отрицательное давление при ее фиксации для проведения микрооперации. Как видно из рис. 3 (кривые 3 и 4), из икринки вышло значительное количество аминокислот, в то время как при удерживании клетки в течение тех же 15–20 с принципиально другим способом, без применения присоски, с помощью капсулы-держателя (рис. 4), белок в среде вообще не был обнаружен. Однако удерживание эмбриона таким способом в течение часа приводило к утечке содержимого из клетки (см. рис. 3, кривая 2). Это, скорее всего, свидетельствует о влиянии отрицательного давления, хотя и незначительного, создаваемого силами капилляра, на конце которого находится капсула-держатель (см. рис. 4). Это отрицательное давление следует компенсировать положительным давлением в процессе удерживания, чтобы вообще не допускать утечки из эмбриона.

Потеря икринкой белковых компонентов может быть причиной наблюдаемых уродств, ранней смертности, слабой жизнеспособности организмов, полученных после микрохирургического вмешательства, после даже просто, казалось бы, безобидных манипуляций: удержи-



**Рис. 3.** УФ-спектр поглощения веществ, обнаруженных в окружающей среде и в полости микроприсоски: 1 – контрольный образец, среда (вода), в которой находились икринки и был нерест, 2 – спектры веществ, вышедших из клетки в среду после удерживания ее в течение 1 ч капсулой-держателем, 3 и 4 – спектры веществ, вышедших из клетки в среду после удерживания ее классическим удерживающим присосом в течение 15–20 с, 5 – образец, полученный при проколе икринок.



**Рис. 4.** Икринка в капсуле-держателе.

вания присоской, введения микроиглы для микрохирургии или микроинъекций и т.п.

Помимо описанного выше удерживания клетки капсулой-держателем, безопасную фиксацию клеток можно осуществить при помощи тонкой пленки среды (микрокапельки), убрав микропипеткой излишки среды, протамин-сульфатом (1%); различного рода биологическими клеями, используемыми в медицине; с помощью микропресса для удерживания клеток по Фонбрюну [27]; при помощи узкого изогнутого шпателя, микропетель, крючков различной формы и т.п.

**Шестая проблема** – иногда не принимаемая во внимание – время нахождения клетки или органеллы в условиях *in vitro*, особенно в микрокамере для микроинъекции или микрохирур-

гии. В этой ситуации клетка находится в искусственных условиях, идет ее взаимодействие с питательной средой, должна налаживаться сбалансированность с осмотическими характеристиками питательной среды, которые меняются при испарении растворителя среды, изменении градиентов температуры, зависят от состава растворенных в среде газов (в частности,  $\text{CO}_2$  и  $\text{O}_2$ ) и др. Время пребывания клетки в условиях *in vitro*, изначально искусственных, всегда проблематично для нее.

*Пути решения проблемы* – в экспериментах с клеткой следует всегда придерживаться принципа – максимально сократить время операции и время пребывания объекта в микрокамере *in vitro*.

Для микрохирургии и микроинъекции эта проблема решается с помощью микрокамеры открытого типа [28] и использования целого комплекса приборов для прецизионных работ с микрообъектами (ПМЯ-1) [17,18]. Это сокращает время пребывания клетки в микрокамере для проведения простых операций до минимума (от десятков секунд до нескольких минут). При этом легко и, что следует особо отметить, за очень короткое время, всего за несколько секунд, решается проблема введения микроинструментов в микрокамеру, даже если их много. Использование камеры открытого типа полностью исключает поломку микроинструментов

при введении их, причем точно в то место, где находится клетка.

**Седьмая проблема** – одной из важных проблем, по нашему мнению, является попадание масла, которое используется в качестве защитного барьера от испарения растворителя среды (воды), во внутриклеточные структуры. Обычно на практике с испарением среды борются весьма просто – капли среды или микрокамеры заливают маслом. Масло также широко используют и при проведении экстракорпорального оплодотворения, полезность использования которого для этой технологии подробно описана в работе [29]. Однако в данной работе идет речь о полезности использования масла в экстракорпоральном оплодотворении при культивировании эмбрионов, до попадания масла внутрь клетки. Специальное парафиновое масло, которое используют здесь, в частности для предотвращения испарения воды из сред с клетками (эмбрионами), является тяжелой и лишней «нагрузкой» для клетки при инвазивных методах микрохирургии или микроинъекции. Загрязнение маслом микроинструментов до контакта с клеткой уже является потенциальным повреждающим фактором. Введение микроинструмента через *zona pellucida* и через цитоплазматическую мембрану сопровождается большим накоплением масла в области перфорации и внутри клетки. Последнее постепенно начинает латерально распределяться по поверхности мембраны и по *zona pellucida*. Дальнейшее внедрение в цитоплазму такого инструмента происходит сквозь липидный матрикс многочисленных внутриклеточных мембран, через густую сеть микротрубочек и микрофиламентов, оставляя, как уже упоминалось, внушительный масляный «трек» внутри клетки. Микроинструменты при контакте с маслом покрываются толстым его слоем и при введении такого инструмента в клетку оставляют «трек» из масла на всех внутриклеточных структурах (микрофиламентах, микротрубочках, мембранах). Неизбежный контакт масла с липидным матриксом мембран заслуживает особого внимания и его необходимо исключить при микрохирургии клеток. По нашим неопубликованным данным, мембраны после контакта с маслом меняют свои характеристики: модуль Юнга, удельную проводимость, удельную емкость, проницаемость.

*Пути решения проблемы.* Для сохранения чистоты поверхности микроинструмента его следует поместить в среду, в которой находятся клетки, и только затем осторожно покрыть эту среду маслом. В некоторых случаях нужны специальные микрокамеры, в которых не было бы контакта микроинструмента с маслом. При ра-

боте с клетками в открытых каплях среды или в микрокамерах открытого типа следует создать над каплями насыщенные пары воды [28].

Здесь необходимо либо искать дополнительные возможности предотвращения испарения среды, в которой находятся клетки, либо конструировать специальные микрокамеры, в которых не было бы контакта микроинструмента с маслом, например, такие, как микрокамера для серийных микроинъекций [30]. Следовательно, пути для предотвращения контакта масла с клеткой во время операции лежат либо в условиях, когда надо постоянно держать микроинструменты вне контакта с маслом, либо найти другой способ предотвратить испарение растворителя питательной среды, т.е. содержать среду, скажем, в парах насыщенного водяного пара, что позволит не использовать масло.

**Восьмая проблема** – не менее важной проблемой при работе с клеткой является влияние света, именно коротковолнового излучения. Оно может повлиять на целостность генетического аппарата клетки. По данным японских специалистов по экстракорпоральному оплодотворению, повредить геном могут даже лампы дневного света, и их заменяют лампами накаливания, причем в режиме неполного накала.

*Пути решения проблемы.* Оптимальным освещением для клеток является область 660 нм (красный участок спектра), а не 514,5 нм, как это указывалось раньше. Однако эта проблема до сих пор мало изучена и требует дополнительных исследований.

**Девятая проблема** – влияние физико-химического состава стекла, из которого сделаны микроинструменты и микрокамеры. Главный скрытый недостаток стекла – его растворимость, выщелачивание. При действии воды происходит гидролиз стекла, в результате которого определенное количество щелочи и других растворимых компонентов переходит в воду. По данным работы [31], в присутствии боросиликатных, алюмосиликатных, или «йенских» стекол, и ряда других не происходит кортикальная реакция. Это связано с тем, что в составе этих стекол есть окислы CaO, PbO, B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnO и некоторые другие, к которым клетки чрезвычайно чувствительны.

*Пути решения проблемы.* Следует избегать применения боросиликатных, алюмосиликатных или «йенских» стекол для изготовления микроинструментов, микрокамер для работы с клетками, и использовать только нейтральные стекла (натриевые, калиевые, молибденовые – дающие сплав с молибденом, ампульные и др.). Выбор химического состава стекла имеет большое значение для работы с живой клеткой.

Например, стеклянные капилляры, содержащие порядка 51% PbO, выпускаемые фирмой Harvard Apparatus (США) [32] для «патч-клампа», вообще непригодны для работы с клеткой.

**Десятая проблема** – влияние температурного шока (быстрое изменение температуры). На примере спермиев можно сделать предварительные выводы. Особенность температурного шока связана с влиянием не только на подвижность и выживаемость спермиев, но и на появление уродливых их форм. Медленное изменение температуры не создает этих форм, изменяется только подвижность спермиев, а быстрое изменение температуры затрагивает какие-то тонкие механизмы в клетке, которые способствуют созданию уродливых форм. Как может скорость изменения температуры влиять на образование этих форм спермиев? Напрашивается предположение, что для любых клеток, в том числе и для ранних эмбрионов, температурный шок может выступать в качестве повреждающего фактора. Известны белки теплового шока, но есть и белки холодового шока, которые в настоящее время интенсивно исследуются. Какая нагрузка лежит на них – вопрос не простой и не имеет пока четкого решения.

*Пути решения проблемы.* Необходимо не допускать возможности возникновения температурного шока при работе с клеткой. Температурные скачки и просто границы изменения температуры остаются пока за пределами внимания экспериментатора. Но если, скажем, вымывать ранние эмбрионы из яйцевода в среду, имеющую комнатную температуру, быстрый перепад температур от 36–37°C до 20–25°C может привести к температурному шоку и внести коррективы в состояние эмбрионов. Следовательно, не надо допускать больших скоростей снижения температуры и следует, к примеру, вымывание эмбрионов производить в среду, подогретую до 36–37°C.

**Одиннадцатая проблема** – влияние свежей среды тоже может быть шоковым для клетки, особенно если эта среда синтетическая.

Для ранних эмбрионов стандартные условия культивирования в средах являются субоптимальными, что может привести: во-первых, к замедленному развитию эмбрионов и блоку развития во время активации генома (условия культивирования оказывают прямое влияние на транскрипцию и трансляцию); во-вторых, к замедлению процессов метаболизма эмбрионов; в-третьих, к ухудшению выживаемости и уменьшению числа жизнеспособных эмбрионов [33].

*Пути решения проблемы.* В работе [34] было предложено «со-культивировать» ранние эмбрионы с различными типами соматических

клеток: эпителиальными клетками репродуктивного тракта, маточных труб, клеток гранулезы и др. «Со-культивирование» повышает отбор лучших эмбрионов, так как цитогенетически аномальные эмбрионы останавливают свое развитие на более ранних стадиях. Кроме того, культивирование эмбрионов с соматическими клетками улучшает качество эмбрионов (повышает процент эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, и количество клеток на бластоцисту [34]). Оно позволяет повысить эффективность криоконсервации таких эмбрионов, а также частоту имплантации, оптимизирует темпы клеточного деления и уменьшает процент фрагментации эмбрионов. Предположения, которые выдвигает автор, заслуживают особого внимания: во-первых, существующие синтетические среды даже с использованием различных добавок (сывороточный альбумин) рассматриваются как субоптимальные для предимплантационного эмбриогенеза; во-вторых, монослой клеток может создавать биохимические и биофизические условия, сходные с теми, что окружают предимплантационный эмбрион в маточных трубах и в матке; в-третьих, монослой клеток может секретировать «эмбриотрофические» факторы, способствующие более нормальному предимплантационному развитию эмбриона (например, показано, что в эмбрионах, культивировавшихся на монослое клеток, увеличивается экспрессия инсулиноподобных факторов роста и их рецепторов); в-четвертых, со-культивирование может снижать токсичность среды путем удаления солей тяжелых металлов и/или различных ингибиторов метаболизма. Показано, что клетки фидерного слоя позволяют утилизировать аммоний, который высвобождается при катаболизме эмбриона и оказывает токсический эффект на него. Важно отметить, что клетки монослоя также синтезируют гипотаурин, регулирующий редокс-потенциал и позволяющий избежать перекисного окисления липидов [34].

В свое время, когда мы подробно исследовали лаг-фазу периодической культуры дрожжей на предмет изучения состояния воды в клетке после лиофилизации методом ЯМР-спинового эха, отметили, очевидно, общеизвестный факт – с увеличением концентрации клеток в суспензии культуры может наступить такой момент, когда лаг-фаза не наблюдается, клетки сразу идут в рост. С уменьшением концентрации клеток, наблюдается лаг-фаза, и чем меньше клеток в суспензии, тем она продолжительней. Лаг-фаза – это период адаптации клеток к новым условиям обитания. Клетки начинают набухать и только затем происходит их деление. В этот период клетки обеспечивают себе го-



меостаз, благоприятные условия для дальнейшего роста. Однако эти же клетки в конце лаг-фазы, помещенные в свежую питательную среду, претерпевают опять лаг-фазу, адаптируются и готовятся к делению [35].

Рассмотренные проблемы далеко не исчерпывают тех задач, которые стоят перед экспериментатором. Изучение свойств клетки и новых неизвестных пока механизмов внутриклеточных процессов будут постоянно ставить новые проблемы.

Например, следовало бы обратить особое внимание на объемы вводимого в клетку или в отдельные ее органеллы материала. Здесь можно сослаться на протоколы Оксфордского университета, в которых дан совет вводить в мужской пронуклеус столько раствора с веществом, чтобы пронуклеус увеличился вдвое. Или – при этом вводить в пронуклеус порядка 500 копий генетического материала. Надо отметить, что в некоторых статьях советуют вводить в мужской пронуклеус до 1000 и даже 1500 копий. Что при этом происходит? Пронуклеус испытывает избыточное гидростатическое давление в момент микроинъекции, и при выходе микропипетки из пронуклеуса неизбежно происходит выход нуклеоплазмы в цитоплазму, где ДНК претерпевает уничтожение (элиминируется). В то же время для экспрессии, по данным Капечи, нужно всего несколько копий [36]. Следовательно, для введения нескольких копий генетического материала необходимо использовать минимальные объемы раствора, в котором находятся эти копии.

#### МОЖНО ЛИ РАССМОТРЕТЬ И УЧЕСТЬ ВСЕ ТРУДНОСТИ РАБОТЫ С ЕДИНИЧНОЙ КЛЕТКОЙ?

Положительный ответ проблематичен, так как главные трудности – это те, которые приходится решать каждый день, считая отдельные этапы работы обычной рутинной, испытанной веками. Недавно отмечалось столетие применения на практике микропипетки и микроиглы при работе с клеткой под микроскопом. Однако нет до сих пор ни одной работы по влиянию растворимости стекла, химического его состава, его выщелачивания на состояние живой клетки. До сих пор нет работ по влиянию ионов и окислов тяжелых металлов, имеющих в составе стекла, на поведение каналов мембраны. Как пример, можно привести упомянутое использование стеклянных капилляров для «патч-клампа» с составом до 51% PbO [32]. По-видимому, исторически так сложилось, стало какой-то традицией – не замечать, не обсуждать многие рутинные манипуляции с клеткой, ко-

торые в конечном счете способны приводить к повреждениям целостности клетки или ее органелл. Любое механическое соприкосновение клетки со стенкой капилляра, камеры или пробирки, касание микроинструментом или микропипеткой может нанести ей различной степени повреждения. При этом повреждается не только внеклеточный матрикс, но и окружение клетки, которое обеспечивает ей, так или иначе, равновесное состояние со средой. Даже небольшая деформация клетки приводит к повышению внутриклеточного давления, к смещению и перераспределению внутриклеточного материала, к нарушению взаимодействия между клеткой и внешней средой. Клетка, попав в свежую питательную среду, какой бы эта среда ни была сбалансированной и идеальной для данной клетки, вынуждена создать гомеостаз для себя, перераспределяя определенное количество внутриклеточного материала со средой. Особенно это хорошо просматривается в условиях лимита по некоторым компонентам несбалансированной среды, когда клетка пытается восполнить каким-то образом этот дефицит [37–39].

В заключение можно сказать, что назрела необходимость, наконец, сосредоточить внимание не только на описании дефектов и неудач клонирования, но также и на описании того, что собой представляют повреждения или почему они происходят в процессе работы, но и на том, что нужно предпринять, чтобы их устранить, избежать или совсем не допускать. Иными словами, речь идет о создании технологии микрохирургии клетки в полном объеме. Необходимо понять, что вопросы технологии микрохирургии клетки имеют особую, пока малоучитываемую важность для того, чтобы наши мечты о клонировании клеток, органов и здоровых особей могли стать реальностью.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дж. Гёрдон, *Регуляция функции генов в развитии животных* (Мир, М., 1977).
2. Л. В. Зеленин, А. А. Куш и И. А. Прудовский, *Реконструированная клетка* (Наука, М., 1982).
3. A. Ogura, K. Inoue, K. Takano, et al., *Mol. Reprod. Dev.* **57**, 55 (2000).
4. А. Мак-Ларен, *Химеры млекопитающих* (Мир, М., 1979).
5. А. А. Шкуматов, *Проблемы репродукции*, № 6, 1 (2001).
6. C. F. Graham, *Wistar Inst Symp Monogr.* **9**, 19 (1969).
7. T. P. Lin, *Science* **151** (3708), 353 (1966).
8. M. A. Di Berardino, R. G. McKinnell, and D. P. Wolf, *Differentiation* **71** (7), 398 (2003).

9. J. V. Gurdon and J. A. Byrne, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **100** (14), 8048 (2003).
10. Л. М. Чайлахян, Б. Н. Вепринцев, Т. А. Свиридова и В. А. Никитин, Биофизика **32** (5), 874 (1987).
11. Н. Г. Клецко, И. Л. Гольдман, В. Ф. Волынчук и В. А. Никитин, в сб. *Мат-лы 2-го Всесоюз. симп. по иммунологии воспроизведения* (ВАСХНИЛ, М., 1980).
12. Ф. И. Осташко, В. А. Никитин, Н. А. Гордиенко и др., в сб. *Мат-лы Республиканской науч.-практич. конф. «О широком использовании метода трансплантации эмбрионов в ускорении качественного совершенствования сельскохозяйственных животных»* (Госагропром, Львов, УССР, 1987).
13. Л. Е. Андреева и И. А. Серова, Онтогенез **23** (6), 637 (1992).
14. И. А. Серова, Л. Е. Андреева и Л. А. Семенова, в сб. *Мат-лы XV рабочего совещания «Консервация генетических ресурсов»* (Пушино, 1998), сс. 200–202.
15. В. А. Никитин, дис. ... канд. биол. наук (Пушино, 2008).
16. V. A. Nikitin, J. Med. Res. Sci. **2** (1), 177 (2012).
17. В. А. Никитин, Ю. А. Попов, В. Т. Ларин и др., А. с. № 1008688. Бюл. № 12, (1983).
18. Е. В. Межбурд, В. И. Горячев, В. А. Никитин и В. К. Утешев, А. с. № 1261789, Бюл. № 37, (1986).
19. В. А. Никитин, Цитология **49** (8), 631 (2007).
20. А. С. Соболев, А. А. Розенкранц и В. А. Никитин, Патент № 20252487, Приоритет изобретения (18.10.1993) г., Зарегистрировано в Гос. реестре изобретений (1994).
21. J. C. M. Dumoulin, E. Coonen, M. Bras, et al., Human Reproduction **16** (2), 306 (2001).
22. В. А. Никитин, И. Л. Гольдман, Н. Г. Клецко и В. Ф. Волынчук, *Методические рекомендации по изготовлению и применению микроинструментов для микроманипуляций с эмбрионами млекопитающих* (Изд-во ВИЖ, М., 1980).
23. В. Л. Кононенко, В. А. Никитин, С. В. Абраскова и В. И. Леткевич, А.с. № 1727821, Бюл. № 15, (1992).
24. E. Faure-Fremiet, Protoplasma **6**, 521 (1929).
25. B. D. Hoffman and J. C. Crocker, Annu. Rev. Biomed. Eng. **11**, 259 (2009).
26. А. В. Старушенко, А. Г. Мамин, Ю. А. Негуляев и Е. А. Ведерникова, Цитология **42** (7), 669 (2000).
27. П. Фонбрюн, *Техника микроманипуляций* (И.-Л., М., 1956).
28. V. A. Nikitin, P. A. Grigoriev, and M. G. Nikitina, J. Biol. Phys. Chem. **11** (2), 86 (2011).
29. Б. Дэйл и К. Элдер, *Экстракорпоральное оплодотворение* (МЕДпресс-информ, М., 2008).
30. В. А. Бондарев, В. А. Никитин, Ю. А. Попов и А. М. Хохлов, А. с. № 1595899, Бюл. № 36, (1990).
31. R. D. Alen and V. Hagstrum, Exp. Cell Res. **9**, 157 (1955).
32. *Harvard Apparatus*, Specialty Products for Bioresearch, p. M4, (2007/8).
33. *Гистология, эмбриология, цитология*, под ред. Э. Г. Улумбекова и Ю. А. Чельшева (2009).
34. П. А. Гоголевский, Проблемы репродукции **3** (4), 19 (1997).
35. В. А. Никитин, А. Н. Шкидченко и С. И. Аксенов, Микробиология **58** (5), 740 (1989).
36. M. R. Sarcocchi, Cell **22** (2, Pt 2), 479 (1980).
37. В. А. Никитин и А. Н. Шкидченко, Прикл. биохимия и микробиология, № 4, 495 (1975).
38. А. Н. Шкидченко и В. А. Никитин, Микробиол. журн. (Киев) **44** (5), 13 (1982).
39. А. Н. Шкидченко и В. А. Никитин, Микробиология **44** (4), 678 (1975).

## Single Cell Microsurgery, Its Problems and Possible Solutions

V.A. Nikitin and E.E. Fesenko

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

We present a detailed analysis of generally accepted methods of microsurgery of a single cell in terms of their compliance with the task of preserving its integrity, minimizing its possible damage while performing various microsurgery on embryos and somatic cells: during microsurgical nuclei transfer for cloning, preparation of monozygotic twins, microinjections into the cell. We discuss issues regarding contacts of the cell with microtools, perforation as a factor of cell damage when the microtool penetrates the cell, the influence of light on the cell, retention of the cell during microsurgery and in connection with this the influence of negative pressure on the cell. Our study raises the question as to how long single cells spend in a microchamber *in vitro*. This paper also investigates the impact of mineral oil which is used as a barrier against evaporation of a solvent of the medium. We focuses for the first time on the issue concerning the influence of physicochemical composition of the glass from which microtools are made and the impact of thermal shock and fresh culture medium on the living cell.

*Key words: reconstruction of cell, cloning, single cell microsurgery, microinjection, cell engineering, cell damage*