

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ**

**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(НИУ «БелГУ»)**

Институт инженерных технологий и естественных наук

Кафедра экологии, физиологии и биологической эволюции

**РАЗРАБОТКА МИКРОИНСТРУМЕНТА ДЛЯ УДЕРЖАНИЯ
СУСПЕНЗИОННОЙ КЛЕТКИ БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ
ОТРИЦАТЕЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ**

**Выпускная квалификационная работа бакалавра
очной формы обучения 4 курса группы 07001214
направление подготовки 06.03.01. Биология
Афанасьева Андрея Юрьевича**

Научный руководитель:
к.б.н., доц. Надеждин С.В.

БЕЛГОРОД 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	3
ГЛАВА 1. Обзор литературы	5
1.1.Микрохирургические методы клеточной инженерии и технология.....	5
1.2.Микроинструментыдля микрохирургии и микроманипуляций с клетками	20
1.3. Материалы и оборудование для изготовления микроинструментов.....	29
ГЛАВА 2. Материал и методы исследования.....	47
ГЛАВА3. Результаты исследований и их обсуждение	52
Выводы.....	56
Список использованной литературы.....	57
Приложения.....	64

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех семейных пар в России 15-20% страдают от бесплодия. В группе бесплодных супружеских, только в 35% случаев, причиной невозможности зачать ребенка является женское бесплодие, в 50% случаях – мужское. Темп прироста женщин с диагнозом бесплодие составляет 10-11% ежегодно. Ежегодно диагноз мужское бесплодие устанавливается нескольким десяткам тыс. мужчинам. Темп роста составляет 13-15%. Экстракорпоральное оплодотворение или ЭКО, относится к методам вспомогательных репродуктивных технологий и является, на сегодняшний день, самым эффективным методом лечения бесплодия. В технологиях ЭКО основным инструментом являются стеклянные микрокапилляры, которые используют для проведения различных манипуляций с ооцитами, сперматозоидами и яйцеклетками.

На сегодняшний день в сфере вспомогательных репродуктивных технологий человека используются такие микрокапилляры как: удерживающий, микропипетки ИКСИ, холдинг микропипетки, микропипетки для химического хэтчинга, микропипетки PZD, для дедунации, для биопсии полярного тела, биопсии бластомера, для стволовых клеток, микропипетки PiezoDrill, пастеровские пипетки.

Наиболее сложной манипуляцией с клетками является ее удержание в неподвижном состоянии с минимальным воздействием как, на саму клетку, так и на ее содержимое. Применяемый в настоящее время микрокапилляр-удерживающий не позволяет обеспечить оптимальных условий для проведения микроманипуляций со суспензионной клеткой, отмечается деформация клетки во время инъекции и утечка ее содержимого входе присасывания ее за счет задания отрицательного давления внутри удерживающего микрокапилляра.

Цель работы – разработать микрокапилляр усовершенствованной геометрии для удерживания суспензионной клетки без применения отрицательного давления.

Для достижения поставленной цели требуется решение следующих задач:

- определить наиболее подходящие параметры заготовки для изготовления микрокапилляра;
- установить оптимальные параметры для изготовления микрокапилляра с использованием пуллера;
- разработать и апробировать технологическую схему для изготовления микрокапилляра при помощи микрокузницы и гриндера;
- произвести манипуляции с клетками разработанным микрокапилляром.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Микрохирургические методы клеточной инженерии и технологии

Микрохирургия клетки – метод в ходе которого происходит оперативное вмешательство с использованием оптических приборов, специальных инструментов.

В настоящее время различные инвертированные, световые и другие микроскопы обеспечивают прекрасное освещение операционного поля благодаря галогеновым лампам и волоконным светодиодам. Степень оптического увеличения может меняться автоматически. Множество насадок и сменных узлов делают микроскоп применимым в любой сфере хирургии, а кино-, теле- и фотоприставки дают возможность документировать ход операции. Микрохирургические инструменты разнообразны и специально предназначены для различных манипуляций. К ним относятся микроскальпели, лезвиедержатели, алмазные скальпели, микрохирургические ножницы, пинцеты для удержания тканей, завязывания нитей, микроиглодержатели с пружинными рукоятками, микрососудистые зажимы, различные виды крючков, бужей, специальные ранорасширители.

В настоящее время огромное внимание направлено на развитие методов клеточной инженерии, которые позволяют активно участвовать в развитии клеток, органов, тканей. Технологии клеточной инженерии включают методы пересадки ядер, деления эмбрионов для получения монозиготных близнецов, методы микроинъекции. Эти методы стали неотъемлемым инструментом биотехнологии и их развитие становится актуальным в сельском хозяйстве и в медицине. Создание животных-биореакторов для улучшения качества молока (Dobrovolsky et al., 1993, Эрнст и др., 1995; Sobolev et al., 1998), клонирование в сочетании с технологией трансгенеза (Kuhholzer, Prather, 2000), ксенотрансплантация, в последнее время и с помощью стволовых клеток (Illmensee, 2001, 2002; Hochedlinger,

Jaenisch, 2003), начинают занимать прочное положение, представляя, помимо научного, большое народно-хозяйственное значение.

В конце 1960-х годов в Институте биофизики АН СССР в Пущине была создана лаборатория сохранения исчезающих видов животных под руководством профессора Б.Н. Вепринцева, который, был инициатором развития в нашей стране микроманипуляционных методов и техники для исследования клеток (Вепринцев и др., 1980). Работы по созданию приборов проводились в сотрудничестве со специальным конструкторским бюро в Пущине (Институт биологического приборостроения РАН), с коллективом инженеров, возглавляемым А.М. Хохловым. В тот момент были предложены идеи различных устройств, приборов и оборудования для исследований, требующих новых подходов и новых методов, создавали их эскизы и макеты, а они разрабатывали инженерные решения и воплощали их в реальность.

В это время в Дубровицах в Институте животноводства под началом академика РАСХН Л.К. Эрнста началось строительство специального здания для работы с ранними эмбрионами животных. Молекулярные генетики школы академика А.А. Баева приняли активное участие в совместной с нами работе по микроинъекции генетического материала в единичную клетку (Земскова, Никитин и др., 1983).

В таких науках как клеточная и геновая инженерия, генетика, биология развития производят различные манипуляции по введению различных веществ и органелл в живую клетку. Эти действия применяются для изучения влияния генов на наследственность, исследования вопросов дифференцировки и развития клеток и тканей, взаимодействия ядра и цитоплазмы, проведения тонких операций на клетках, пересадки ядер с целью получения клонов, в том числе из стволовых клеток (Wilmut et al., 1997; Шкуматов, 2001; Illmensee, 2002; Di Berardino et al., 2003; Gurdon, Byrne, 2003; Hochedlinger, Jaenisch, 2003).

Существуют различные классификации методов проникновения в клетку. Их предлагают в целях систематизации, и для того чтобы помочь

экспериментаторам выбрать тот способ введения, который может быть наиболее пригоден для решения конкретных задач. Классификация по Селис (Celis, 1984) делит методы микроинъекции на три типа в зависимости от способа доставки макромолекул в различные клетки: прямая микроинъекция стеклянными микропипетками, доставка веществ с помощью переносчиков и перенос веществ за счет создания условий переноса. Риджуэй (1991), характеризует методы введения генетического материала в клетки млекопитающих, делит эти методы на четыре типа:

1. Трансфекция введением ДНК в клетки в форме, облегчающей прохождение через клеточную мембрану: микроэлектрофорез, электропорация. Са-фосфатный метод и обработка поликатионами (Graham, Van der Eb, 1973; Ocho et al., 1981; Neumann et al., 1982; Sussman, Milman, 1984; Gopal, 1985).

2. Слияние клеток-мишеней с ДНК, упакованной в «тени» эритроцитов или липосомы (Furusawa et al., 1974; Loyter et al., 1975; Krieger et al., 1978; Schaefer-Ridder et al., 1982). Высокий уровень трансфекции достигнут при непосредственной микроинъекции в ядро клетки в ставших классическими работах (Diacumakos, 1973; Caprecchi, 1980; Graessmann et al., 1980).

3. Этот тип методов, широко используется для трансгенеза (Hanahan, 1985; Ornitz et al., 1985; Niemann et al., 2005; Smith, Mo-hun, 2005).

4. Микроинъекции генов (Риджуэй, 1991) — это использование рекомбинантных вирусов (Van der Putten et al., 1985), что, несмотря на ряд ограничений и недостатков метода, применяется во многих исследованиях. В недавнем обзоре (Stephens, Pepperkok, 2001) авторы делят множество способов пересечения плазменной мембраны на три класса: прямая микроинъекция, которые производятся при помощи стеклянных капилляров, перенос молекул с помощью переносчиков и пермеабиллизация плазменной мембраны с использованием химических веществ, биологических токсинов или электрических импульсов. В последнем, 4-м, издании «Молекулярной биологии клетки» (Alberts et al., 2002) методы

введения веществ или органелл в клетку разделены на четыре группы: прямая микроинъекция с помощью микропипетки, метод электропорации, метод с использованием переносчиков вещества («теней» эритроцитов, липосом и др.) и биолистинг с использованием «генетического ружья». Несмотря на возрастающий интерес к неинъекционным методам, ни один из них не стал пока широко распространенным.

Ниже перечислены различные методы введения вещества в клетку, все эти методы координально отличаются друг от друга техникой своей реализации. Каждый из приведенных ниже методов имеет как минусы так и плюсы в отношении выживания клетки после проведения манипуляции по введению различных веществ:

1. Прямая микроинъекция (микроманипуляционные методы): микроинъекция под давлением через стеклянные микропипетки (Viigipuu, Kallio, 2004, Yamamoto et al., 1982). Прокол клеток микроиглой, проходящей через раствор инъецируемого материала (Lo, 1983). Микроинъекция в сочетании с микроэлектрофорезом (Bowman, Tedeschi, 1980). Микроэлектрофорез (Александров, 1983; Первис, 1983). Введение липидов и связанных с липидами молекул в цитоплазму без проникновения кончика микропипетки в клетку («slam» — simple lipid-assisted microinjection), введение макромолекул с помощью стеклянной микропипетки с наружным диаметром 0.2 мкм в иммобилизованные (прикрепленные к субстрату) кроветворные клетки спинного мозга (Davis et al., 2000).

2. Биологическая баллистика (биолистика): высокоскоростной механической пробой клетки (Klein et al., 1992). Биолистическая трансфекция при помощи частиц золота, ускоренных под действием электрического поля (Bridgman et al., 2003).

3. Перфорационные: электропорация (Hibbitt et al., 2006). Обработка клеток ультразвуком (Nozaki et al., 2003). Перфорация плазматической мембраны при помощи фильтров. Соскабливание клеток с субстрата в присутствии экзогенного материала (Fechheimer et al., 1987).

Центрифугирование клеток в среде с ДНК в сочетании с электропорацией. Осмотическая перфорация плазматической мембраны (Lieber et al., 1987). Пробой клетки лазерным микролучом.

4. Опосредованное введение: а) действие физических факторов: электрослияние кариопласта клетки-донора с энуклеированной клеткой-реципиентом, термослияние клеток, электроакустическое слияние клеток, слияние клеток после γ -облучения, слияние клеток после облучения их поверхности инфракрасным лазером (Чайлахян и др., 1987); б) действие химических и биологических факторов: слияние клеток и микроклеток-доноров с клетками-реципиентами с помощью политэтиленгликоля (ПЭГ), фитогемагглютинаина, ПЭГ/ДМСО копреципитация, Са-фосфатный метод, Sr-фосфатный метод, использование порообразующего токсина – стрептолизина-О (Miller et al., 2000); в) действие биологических факторов: слияние клеток и микроклеток-доноров с клетками-реципиентами с помощью инактивированного вируса Сендай, использование «теней» эритроцитов, использование липосом, перенос генов включением их в клетки бактериальных протопластов, перенос генов с изолированными хромосомами, метод Тэн-Окаямы ДЭАЭ-декстрановый метод, спонтанное поглощение нуклеиновых кислот в присутствии криопротекторов и многоатомных спиртов, перенос ДНК в ядра клеток млекопитающих с помощью агробактерий (Walev et al., 2001).

5. Трансфекция с помощью «векторных систем»: использование вирусов, доставка сегментированной чужеродной ДНК в эмбриональные клетки с помощью сперматозоидов после совместной инкубации, рецепторопосредованный эндоцитоз молекулярных конструкций, использование моноклональных антител, доставка веществ в лизосомы макрофагов при помощи Protozoa для молекулярной терапии (Pittoggi et al., 2006).

На сегодняшний день существует множество новых и усовершенствованных методов, микроинструментов для манипуляций с

клетками. Эти инструменты используются в различных операциях по пересадки органелл, удержанию клетки и др. Все опыты проводились на лабораторных мышах, а также на кроликах и коровах, для их репродуктивного клонирования. Разработанные нами методы направлены, прежде всего, на снижение повреждений клетки и ее органелл в сложных условиях микрохирургии под контролем микроскопа.

Разработан новый метод микроинъекции при помощи стеклянных микроигл для осуществления доставки макромолекул, включая белки и большие трансгенные ДНК в ядро кровяных клеток предшественников (рис. 1). Временная фиксация клеток к чашке, покрытой межклеточным веществом, позволила осуществить быструю и последовательную инъекцию макромолекул в ядро клеток CD34+, CD 34+/CD38- и CD34+/CD38-/Thy-1^{lo} (человеческие клетки пуповинной крови).

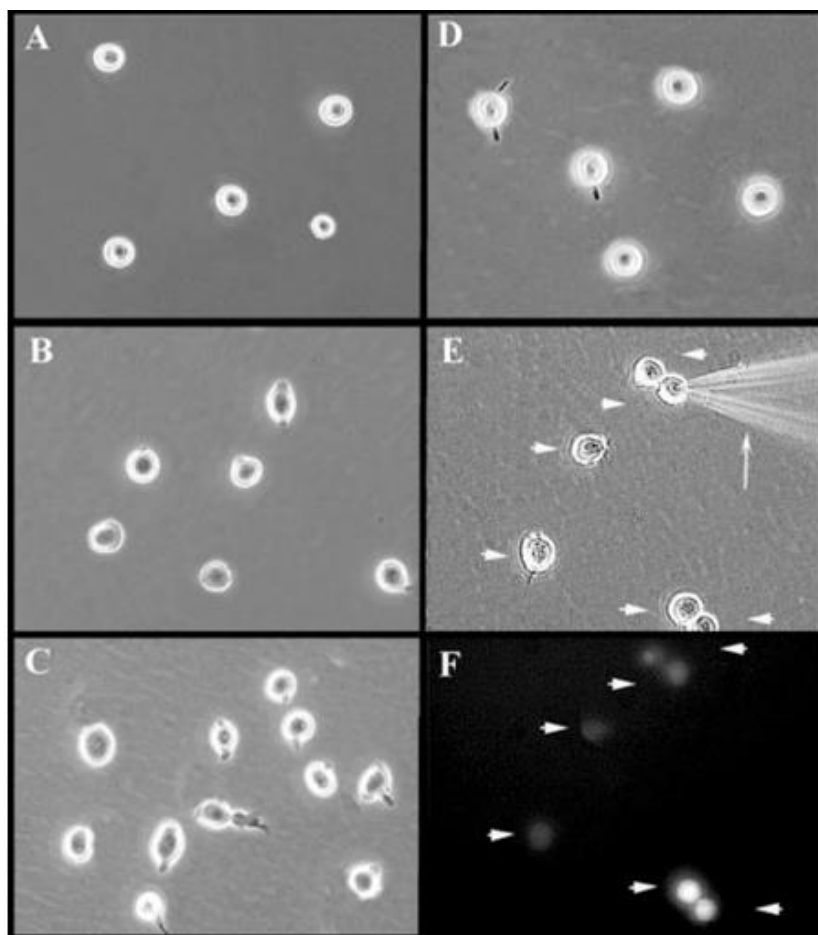


Рис. 1. Микрофотографии прикрепленных и инжесктированных CD341 клеток

Обозначены методы фиксации и разделения клеток, которые не оказывали неблагоприятного эффекта на жизнеспособность клеток, функции клеток-предшественников (способность к образованию колоний) или функции стволовых клеток (способность к восстановлению). Данные исследования отмечают, что при помощи стеклянных микроигл доставка макромолекул примитивным гемапоэтическим клеткам является существенным методом, необходимым для клеточной биологии, а также является многообещающей для клеточной генной терапии. При переносе флюоресцентных декстранов в клетки отмечалось длительное существование и пролиферация клеток (CD34+, CD 34+/CD38-), а также сохранение их способности генерировать клетки предшественники.

Для данных манипуляций используются специальные инструменты: инъекционные иглы изготавливали из боросиликатных стеклянных заготовок (рис. 2) длиной 10 см с наружным и внутренним диаметром, равным 1,2/0,94 мм.

Из заготовок при помощи Пуллера (P-97, Sutter) изготавливали микроиглы с различным наружным диаметром наконечника от 0,17 до 0,25 мкм. Наиболее успешные микроинъекции осуществляются при помощи микроигл с минимальным значением наружного диаметра наконечника (Brian R. Davis etc., 2000).

При введении ДНК с помощью стеклянных микрокапилляров вируса простого герпеса в ядро ЛМТК- клетки были лишены тимидин-киназной активности, 50-100% клеток проявляли ТК активность. Напротив, никакой ТК активности не было при введении ДНК в цитоплазму клетки. С помощью микроинъекций частота преобразования была относительно нечувствительной к концентрации ДНК.

Микроинструменты: стеклянные заготовки (Omega Dot Tubing, 1,2 mm внутренний диаметр, W.P. Instruments), изготавливали на Пуллере P-97 (Sutter). Получали капилляры с диаметром наконечника от 0,1 до 0,5 мкм (Mario R. Capocchi., 1980).

Успешный перенос эмбриона является важным этапом из всего объёма работы, направленной на достижение живорождения из эмбрионов, полученных *in vitro* (вспомогательные репродуктивные технологии). Генетические патологии эмбриона, восприимчивость и сокращение матки, кровь, слизь или бактериальное заражение поверхностью кончика капилляра могут влиять на результат переноса эмбриона. В исследовании сравнивали две методики переноса эмбрионов мыши. По стандартной методике стенку фаллопиевой трубы прокалывали иглой (толщиной 30), а введённую Пастеровскую пипетку с эмбрионом и средой помещали в отверстие. По новой методике, эмбрионы, помещённые в модифицированный стеклянный микрокапилляр с минимальным содержанием среды, переносили непосредственно в фаллопиевую трубу с помощью ручного микропоршневого насоса (рис. 2). Жизнеспособность эмбрионов оценивали, исходя из процента рождённых здоровых особей. Использование новой методики способствовало повышению уровня рождаемости за счёт предотвращения потерь эмбрионов из фаллопиевой трубы, что сохраняло время и способствовало простому переносу эмбрионов в минимальном количестве среды.



Рис. 2. Ручной поршневой насос (CellTram Oil), используемый для переноса эмбрионов мышей

Для проведения исследования изготавливали модифицированные стеклянные микрокапилляры. При помощи их производился перенос эмбрионов. Микрокапилляры (Kwik-fil, боросиликатное стекло, наружный диаметр 1 мм, внутренний - 800 мкм). Для промывания эти стеклянные заготовки помещали в дистиллированную, которую меняли 4 раза в течение 24 часов. Затем заготовки помещали в воду Milli-Q на 24 часа и сушили в термостате (180-200°C в течение 1-2 часов). При помощи Пуллера Р-97 (Sutter, CA) получали микрокапилляры с внутренним диаметром 150-200 мкм. Далее при помощи Гриндера EG-400 заготовки шлифовали под углом 45° и с помощью Микрокузницы MF-900 изготавливали спайки на острие капилляра (Ali Sarvari, etc., 2013).

В статье обсуждается, как изготавливать необходимые микроинъекционные иглы из стеклянных заготовок капилляров. Информация направлена, в основном, на получение инъекционных микроигл, используемых для Р-элемент промежуточного преобразования зародышевой линии у Дрозофилы меланогастер. Кроме того, эти иглы можно использовать для различных других инъекций, таких как РНК-вмешательство, гомологичный рекомбинантный мутагенез, временная регуляция гена, доставка лекарств, перенос цитоплазмических факторов. Используя стандартный инъекционный микрокапилляр мы установили корреляцию выживаемости инфицированных зародышей Дрозофил при помощи эффективности трансформации и структурных характеристик плазмид.

Иглы изготавливали с помощью Пуллера Р-87 (Sutter). Используемые заготовки — 1 мм (наружный диаметр), 0,058 (внутренний диаметр) (BioTechniques, 2002).

Одна из проблем заключалась в условиях проведения микрохирургических операций на клетке. Разработчики сделали комплексный подход к проведению микрохирургии клетки с созданием эргономичного операционного блока, разделенного на функциональные зоны,

нашедший свое частичное воплощение в приборе для микрохирургии яйцеклетки (ПМЯ-1).

Классическая схема рабочего места микрохирурга – это линейное расположение приборов, что очень усложняет работу, так как приходится при этом переходить от одного прибора к другому. Необходимо было уйти от такой схемы. С этой целью был создан операционный блок, разделенный на функциональные зоны. Благодаря этому проведение микрохирургии как одним микрохирургом, так и с участием помощников, специализированных на отдельных приемах и методах, стало значительно более эффективным. Появилась возможность сократить время операции, повторять циклы, стандартизовать проведение различных этапов микроопераций и в результате свести к минимуму травмирование эмбрионов и их потерю.

Комплекс окружает микрохирурга с трех сторон и имеет три функционально связанных между собой ламинарных бокса, три зоны работы (рис. 1): (I – зона приготовления объекта исследования (приготовление препаратов клеток подстереомикроскопом и помещение их в микрокамеры для исследований); II – зона изготовления микроинструментов (микрокузница) – для изготовления микроинструментов в стерильных и беспылевых условиях, прибор для вытяжки капилляров, пуллер и газовая горелка); III зона – микроскоп с микроманипуляторами, антивибрационный стол, система жизнеобеспечения клетки и приборы для измерений различных физико-химических параметров. Боксы необходимы для создания стерильных и беспылевых условий, и к ним подается стерильный воздух. Общий вид полного комплекса ПМЯ-1 представлен на рисунке 3.

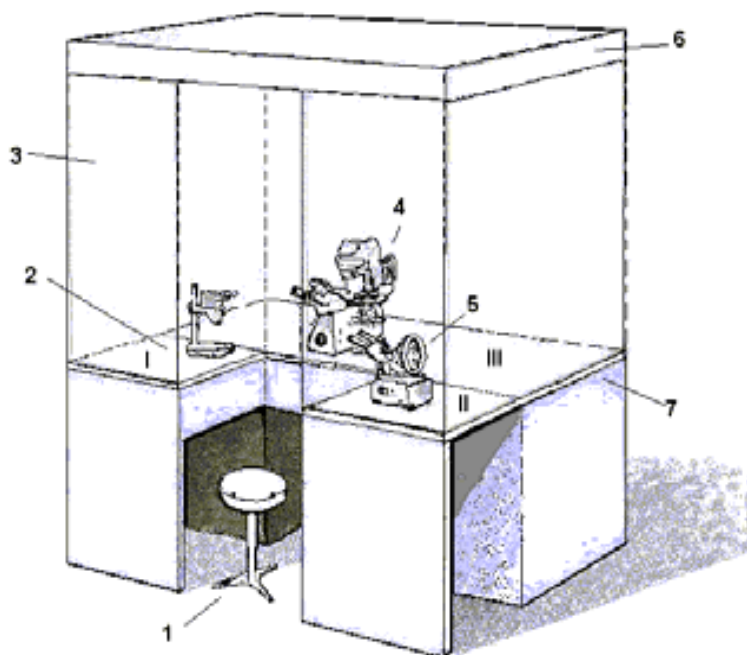


Рис.3. Комплекс ПМЯ-1

Остановимся на описании некоторых новых приборов, вошедших в комплекс ПМЯ-1, и методов работы с их помощью на единичных клетках, прежде всего на эмбрионах млекопитающих. Следует заметить, что при работе на млекопитающих всегда есть дефицит эмбрионов и потери их крайне нежелательны. По общепринятому методу микроинструменты для операций вводят с помощью микроманипулятора или нескольких микроманипуляторов с противоположной стороны от удерживающего клетку микроинструмента, укрепленного на другом микроманипуляторе. Это весьма непросто. Так, для проведения пересадки ядер таким способом надо одному экспериментатору манипулировать не менее как 28 ручками микроманипуляторов и микроинъекторов. Кроме того, если клетка недостаточно ригидна (упруга), проколоть ее микроинструментом непросто и это может привести к снижению ее жизнеспособности и иногда к ее потере. Обычно проводят пересадку ядер по следующей схеме: клетку закрепляют с помощью микроприсоски-держателя и отдельно вводят внутрь нее различные микроинструменты. При таком способе удерживания клетки

невозможно избежать значительных ее деформаций и повреждений (Никитин, Фесенко, 2006).

На зарубежном рынке существует множество компаний которые предоставляют различные устройства для манипуляций с клетками, такие как, Research Instruments и др.

Компания Eppendorf выпускает Адаптеры микроскопов для микроманипуляторов (рис 4). Гибкость использования предоставит вам всю необходимую свободу. С помощью различных адаптеров для микроскопа вы сможете приспособить ваше устройство для клеточных манипуляций к выбранному микроскопу. Системы микроманипуляции Eppendorf совместимы с большинством инструментов основных производителей микроскопов. Адаптеры для микроскопов Eppendorf позволяют без труда устанавливать микроманипуляторы TransferMan 4r или InjectMan™ 4 на все традиционные инвертированные микроскопы производства компаний Leica, Nikon, Olympus и Zeiss (<https://online-shop.eppendorf.ru>).



Рис. 4. Адаптеры микроскопов для микроманипуляторов

Новые электронные микроманипуляторы компании Eppendorf, TransferMan 4r и InjectMan 4, сочетают наглядную пользовательскую оболочку с беспрецедентным контролем движения. Их комплексные усовершенствованные функции в значительной степени могут облегчить и

ускорить рабочий процесс. В сочетании с полным ассортиментом продуктов Eppendorf для манипуляций с клетками, эти манипуляторы предоставляют идеальную платформу для разнообразных микроманипуляционных техник. Таким же образом, новая модель TransferMan 4m является идеальным инструментом для выполнения ответственных работ в области ЭКО.

Целью фирмы Eppendorf является предоставление самых лучших решений для работы в области манипуляций с клетками. Eppendorf предлагает широкий спектр рабочих станций для специальных областей применения (рис 5). Наши системы для манипуляций с клетками совместимы с универсальными инструментами ведущих производителей микроскопов, обеспечивая тем самым гибкость адаптации к микроманипуляционной системе вашего микроскопа. Успешная микроманипуляция с клетками требует точности, надежности и быстрой обработки образцов.



Рис. 5. Установка для проведение микроманипуляций компании Eppendorf

Компания Research Instruments предлагает другую вариацию комплекса для проведения манипуляций с клетками. Комплекс RI IMSI, (рис. 6) который включает в себя камеру высокой чувствительности, монитор медицинского класса и универсальное программное обеспечение визуализации. Работа с

Modulation Optics Inc., RI обеспечивает уникальную, высокочувствительную оптическую систему с 60-кратным увеличением исходного изображения с высоким разрешением. Монитор предлагает хорошую глубину цвета и точность, которая превосходит стандартные мониторы ПК и идеально подходит для воспроизведения точно тонких деталей движущихся изображений сперматозоидов. Большой сенсор камеры имеет пиксели высокой чувствительности для яркой, высокой контрастности изображений. Количество пикселей идеально подходит для разрешения оптики и позволяет плавное воспроизведение видео со скоростью 15 кадров в секунду. RI IMSI™ поставляется с простым в использовании RI программным обеспечением – единственное приложение, которое нужно для ICSI и IMSI. Захват, запись, с интуитивным масштабированием и панорамированием (www.research-instruments.com).

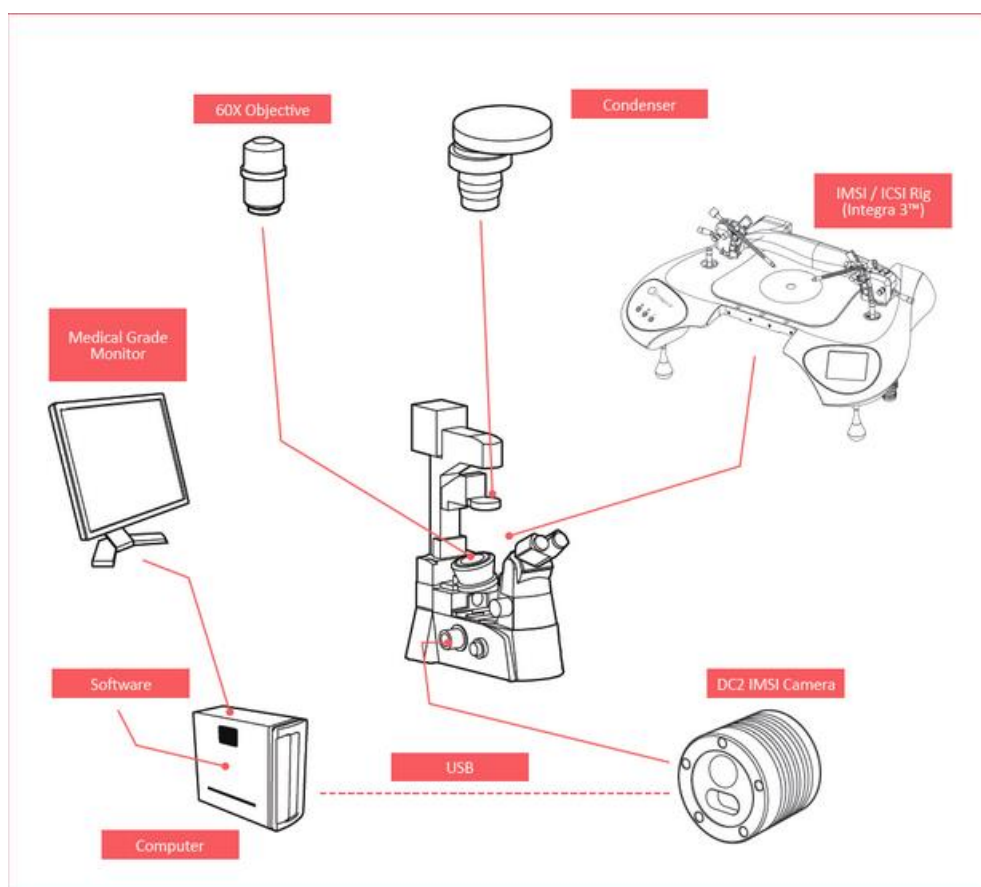


Рис. 6. Комплекс RI IMSI

Микроманипуляции требуют микроскопических инструментов всевозможных форм и размеров. Необходимы микроиглы, микропипетки, микроскальпели, микропетли, микроэлектроды, а также разнообразные приспособления, с помощью которых можно удерживать объект во время различных манипуляций: шпатели, присосы и другие фиксирующие инструменты (рис. 7).

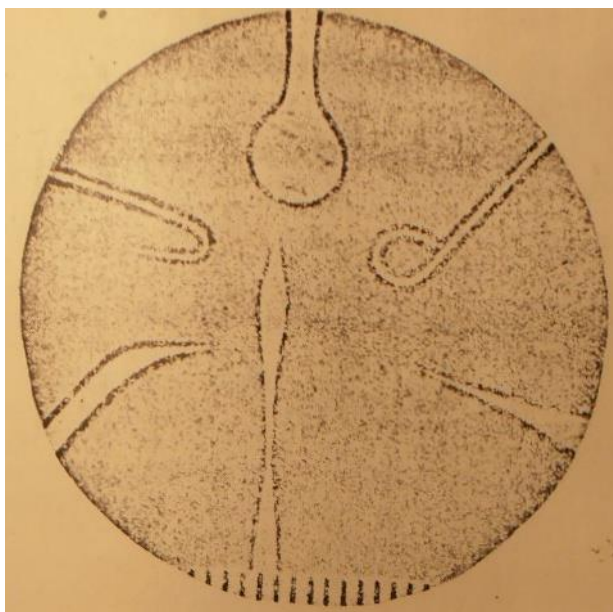


Рис. 7. Инструменты, используемые в манипуляциях с клетками

Так как микроскопические объекты могут сильно отличаться друг от друга по величине, то и размеры применяемых при работе микроинструментов также должны быть различными. Вначале микроиглы и микропипетки изготовляли из стеклянных трубок или палочек, определенный участок которых нагревали над пламенем газовой микрогорелки, и затем вручную растягивали. После проверки оттянутых концов на микроскопе обычно приходилось браковать большую часть изготовленных «вслепую» игл и пипеток и для получения более или менее хороших результатов снова и снова повторять эти операции. Затем, в случае надобности (например, для изготовления микропипеток), оттянутые концы отрезали и придавали имнеобходимый для манипуляций изгиб. Ясно, что полученные этим методом инструменты не могут быть ни одинаковыми, ни точными. Однако

для их изготовления требовались большая сноровка, прах тика, терпение и время.

Так, для фиксации эмбрионов используются удерживающие микрокапилляры с наружным диаметром приблизительно равным 30 мкм. Введение сперматозоидов осуществляют при помощи микрокапилляров для ИКСИ с внутренним диаметром наконечника 30 мкм.

Ооциты фиксировали удерживающими капиллярами с внутренним диаметром 5 мкм. В статье, посвящённой работе с клетками лошадей, процедуру ИКСИ выполняли с использованием инъекционных капилляров (ICSI Pipette Kit 2, Hunter Scientific Ltd, Saffron Walden). Для фиксации ооцитов использовали удерживающий микрокапилляр того же производителя (ICSI Pipette kit 3, Hunter Scientific Ltd). В исследовании, проведённом на клетках свиней, были использованы инъекционные капилляры с внутренним диаметром 6-7 мкм. Ооциты фиксировали с помощью удерживающих капилляров. Сегодня иностранные компании производят различные типы микрокапилляров.

1.2 Микроинструменты для микрохирургии и микроманипуляций с клетками

В настоящее время интенсивная работа продолжается с целью улучшения технологии восстановления клеток, и после этого всего организма. На уровне отдельной клетки можно изменить свои биохимические процессы, его физиологии и морфологии, его генетический статус. Микрохирургия из одной клетки, заменив ее элементы, введение чужеродного генетического материала делает эту область медицины, сельского хозяйства, очень актуальной. Появление в руках микрохирурга одной клетки и новых микроинструментов, которые имеют возможность активного вмешательства в функционирование клетки, не вызывая значительного ущерба ему, изменили экспериментальную биологию.

Клеточная инженерия решает широкий спектр задач, широко используя микрохирургические методы и подходы, которые включают микроинъекции в клетку и ее органеллы - для ядерной передачи и передачи отдельных хромосом, трансгеноза, разделив ранних предимплантационных эмбрионов для двойников и т.д. Микроинструментов для микрохирургии отдельных клеток, микроскопические вещи, сопоставимые по размерам с клеткой или ее органеллами; микроинструментов сделанных на микрокузнице (рис. 8). На рисунке показана схема микропипетки, которая может служить в качестве заготовки (основы) для многих микроинструментов.

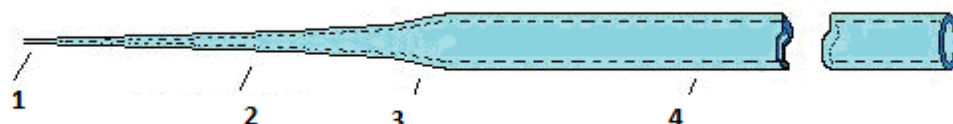


Рис. 8. Схема микропипетки — заготовка для изготовления многих микроинструментов (1 – наконечник, 2 – коническая часть, 3 – плечо, 4 – тело микрокапилляра.)

Основные характеристики. 1.Конус — участок пипетки, начинающийся от её кончика, на протяжении которого внутренний диаметр увеличивается плавно (рис. 9) Чем плавнее увеличивается внутренний диаметр пипетки, тем подвижнее её кончик. Эмбриологи, которые набирают в микроинъекционную пипетку сразу несколько сперматозоидов, предпочитают длинный конус для лёгкой фиксации сперматозоида в определенной позиции. Конус создается в самом начале процесса изготовления пипетки.

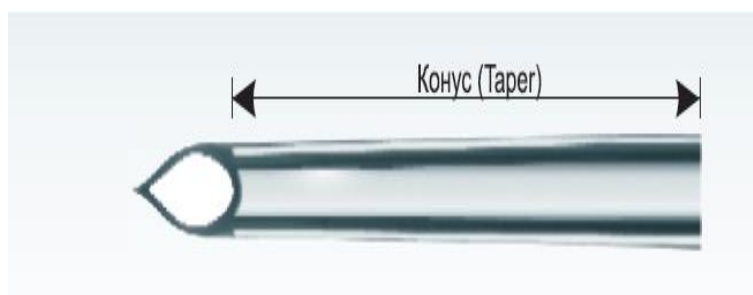


Рис. 9. Конус

2.Скос кончика иглы — создается путем специальной заточки пипетки. На срезе скошенный кончик имеет овальную форму до момента добавления спайка (шипа) (рис 10).

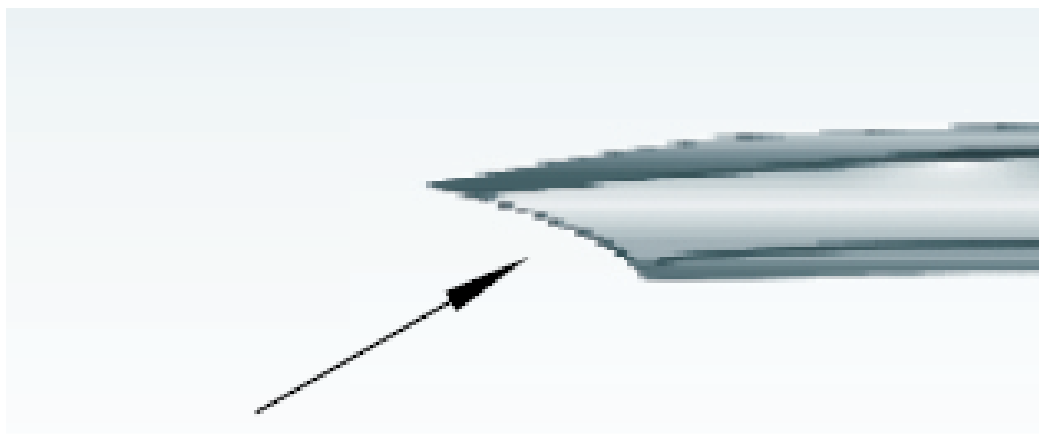


Рис. 10. Скос кончика иглы

3.Шип, спайк — острый конец ИКСИ пипетки (рис. 11). Спайк формируется путем прикосновения кончика иглы к горячему стеклянному шарик. Эмбриологи, смотря на пипетку сбоку, не могут различить спайк на скосе. Однако, специалисты компании Numagen регулярно проверяют длину скоса иглы со спайком на соответствие спецификации.

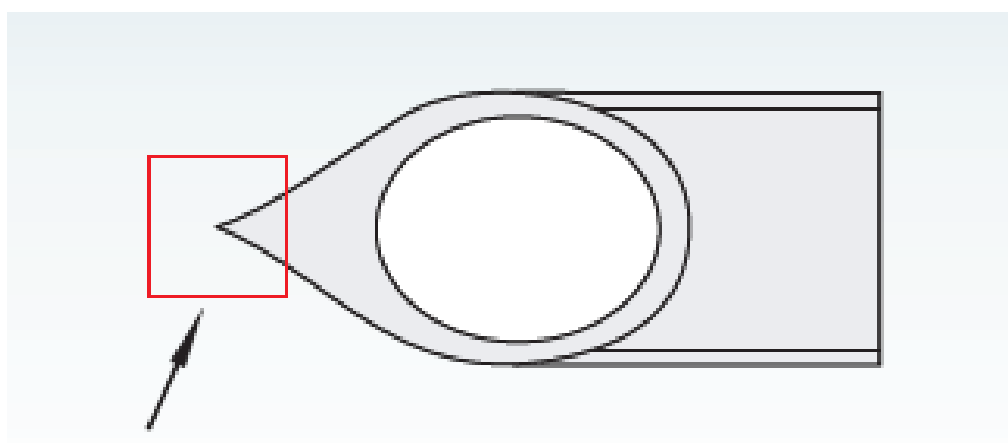


Рис. 11. Спайк

4.Угол пипетки — выбор величины угла зависит от предпочтений эмбриолога (рис.12). Наличие угла позволяет пипетке находиться параллельно дну чашки. Numagen предлагает широкий выбор пипеток,

имеющих различные углы: 15° , 20° , 25° , 30° , 35° , 40° , 45° . Изготовление угла является завершающим этапом в производстве пипеток.

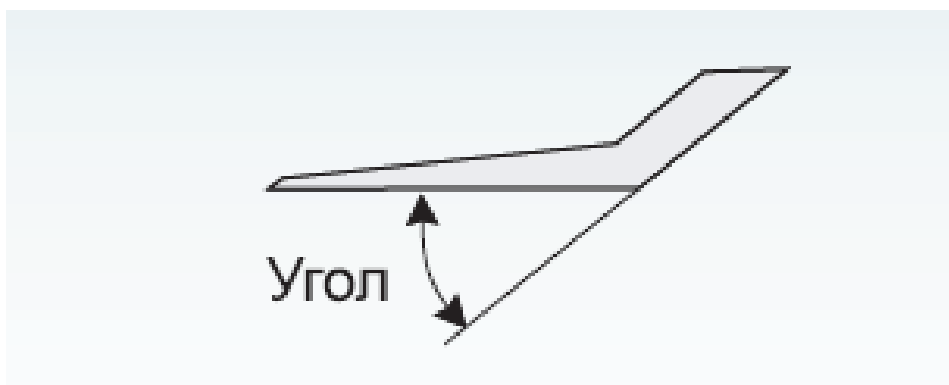


Рис. 12. Угол пипетки

5. Длина плеча — расстояние между кончиком и углом пипетки (рис. 13). Пипетки Numagen имеют стандартную длину плеча 0,5 мм. Длина плеча может быть изменена в зависимости от предпочтений эмбриологов (например на 1.0 мм). Длинное плечо предпочитают эмбриологи, набирающие в пипетку для микроинъекции сразу несколько сперматозоидов. Короткое плечо обеспечивает большую устойчивость кончика пипетки при прокалывании.

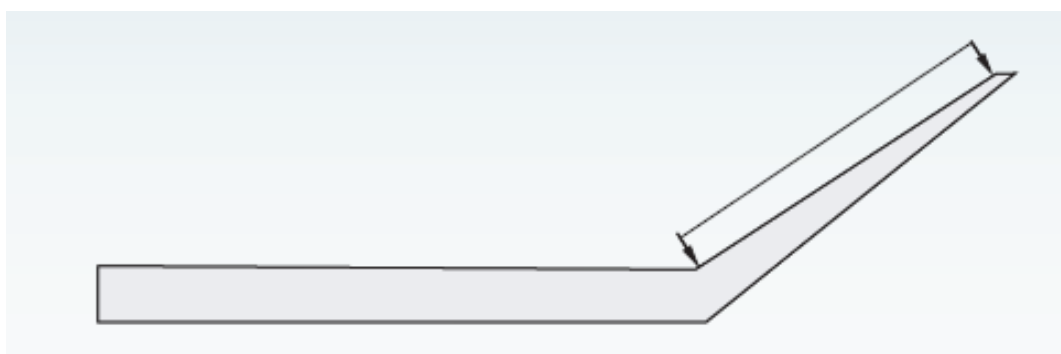


Рис. 13. Длина плеча

6. Внутренний диаметр — измеряется на небольшом расстоянии от кончика пипетки (рис. 14). Стандартно пипетки для ИКСИ имеют внутренний диаметр 5-6 мкм, инъекционные пипетки МІС-6 - 4-5 мкм. Большой внутренний диаметр имеют пипетки для работы с незрелыми формами сперматозоидов и клетками животных, например МІС-8 и МІС-9.

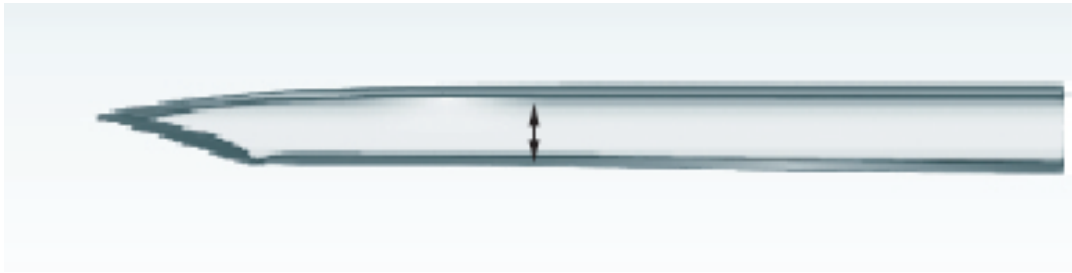


Рис. 14. Внутренний диаметр капилляра

Микроинструменты для микроманипуляций над клеткой могут быть распределены на несколько групп в соответствии с их функциями: фиксация и хранение; микроинструменты вспомогательные и специального назначения. Такое распределение удобно с практической точки зрения, поскольку это позволяет сделать правильный выбор из целого ряда микроинструмента. Это значительно уменьшает время операции и позволяет сделать это с минимальным ущербом для клеток.

Изучение мирового рынка микрокапилляров, применяемых в ЭКО, показало, что все существующие на данный момент стеклянные микрокапилляры являются аналогами и имеют ряд вариаций общих характеристик для всех типов микрокапилляров. Во многих зарубежных публикациях упоминается использование стеклянных микрокапилляров при выполнении процедур ЭКО.

В настоящее время для реализации клеточных и вспомогательных репродуктивных технологий применяют следующие микроинструменты: удерживающий, микропипетки ИКСИ, холдинг микропипетки, микропипетки для химического хэтчинга, микропипетки PZD, для дедунации, для биопсии полярного тела, биопсии blastомера, для стволовых клеток, микропипетки PiezoDrill, пастеровские пипетки.

Микропипетки для ИКСИ (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида) используются для отбора и инъекции сперматозоида непосредственно в ооцит (рис. 15). Внутренний диаметр от 5 до 8 мкм.



Рис. 15. Микропипетка ИКСИ (компания Origio)

Холдинг микропипетки используются для удержания в определенном положении ооцита или эмбриона (рис. 16). Холдинг микропипетки имеют плоский, гладкий, отполированный край и характеризуются большой величиной отношения внешнего диаметра к внутреннему диаметру для обеспечения максимального контроля над удерживаемым объектом. Внутренний диаметр от 15 до 30 мкм.

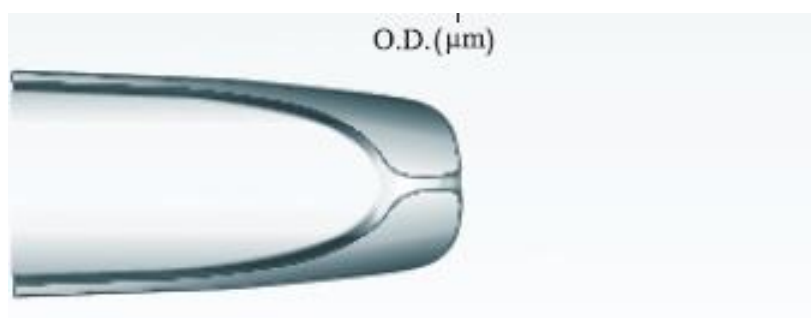


Рис. 16. Холдинг микропипетка (компания Origio)

Микропипетки для вспомогательного химического хэтчинга применяются для создания отверстия в зоне пеллюцида с помощью кислого раствора Тироде. Микропипетки имеют тупой, слегка отполированный конец (рис. 17). Внутренний диаметр от 8 до 12 мкм.



Рис. 17 Микропипетка для химического хэтчинга (компания Origio)

Микропипетки PZD применяются для механического хэтчинга. Имеют вытянутый длинный тонкий конусообразный конец (рис. 18).

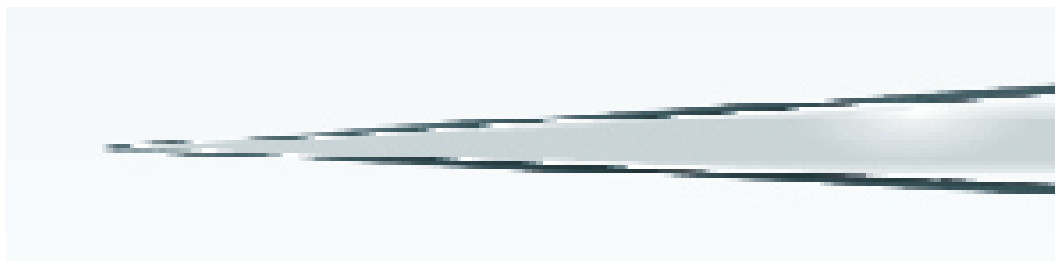


Рис. 18. PZDмикропипетка (компания Origio)

Микропипетки для денудации используются для удаления кумулюсного комплекса, окружающего ооцит (рис. 19). Внутренний диаметр от 120 до 250 мкм.



Рис. 19. Микропипетки для денудации (компания Origio)

Микропипетки для биопсии полярного тела применяются для аспирации полярного тела ооцита при проведении предимплантационной генетической диагностики. Возможен выбор пипетки с плоским (рис.20.1) и полированным концом, со скошенным и полированным концом (рис. 20.2) или со скошенным концом со спайком (рис.20.3). Внутренний диаметр от 13 до 15 мкм.



Рис. 20.1. С плоским концом (компания Origio)



Рис. 20.2. С полированным концом (компания Origio)



Рис. 20.3. Со скошенным концом со спайком (компания Origio)

Микропипетки для биопсии blastomera используются для извлечения blastomera для последующего проведения предимплантационной генетической диагностики. Существуют две вариации данного микроинструмента: с плоским и полированным (рис 21.1) или скошенным и полированным (рис.21.2) кончиком. Внутренний диаметр от 28 до 42 мкм.



Рис. 21.1. С плоским и полированным концом (компания Origio)



Рис. 21.2. Со скошенным и полированным концом (компания Origio)

Микропипетки для стволовых клеток используются для инъекции эмбриональных стволовых клеток в бластоцисты (рис. 22). Микропипетки имеют скошенный конец и спайк для более простого проникновения в бластоцисту. Внутренний диаметр от 15 до 26 мкм.



Рис. 22. Микропипетка для стволовых клеток (компания Origio)

Микропипетки PiezoDrill созданы специально для piezo-манипулятора (рис. 23). Применяются для ИКСИ в ветеринарии и для создания трансгенных животных. Имеют внутренний диаметр от 5 до 20 мкм.

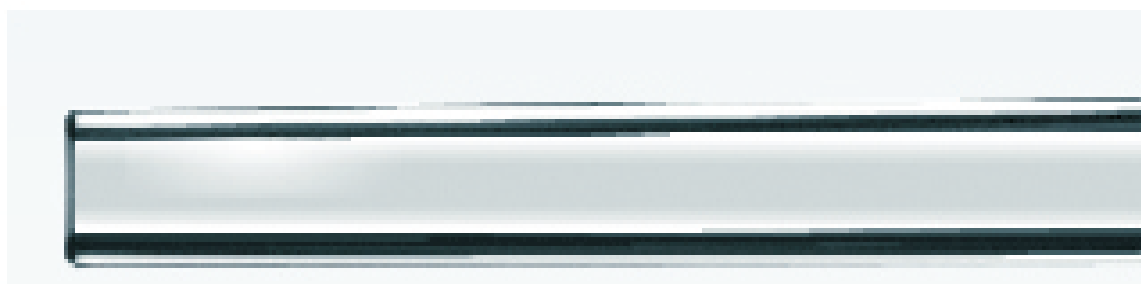


Рис. 23. Микропипетки PiezoDrill (компания Origio)

Пастеровские пипетки (рис. 24) разработаны для использования в лабораториях ВРТ и имеют множество вариантов применения. Изготавливаются из боросиликатного стекла. Имеют длину от 14.6 до 22.9 см.



Рис. 24. Пастеровские пипетки (компания Origio)

Таким образом, для манипуляций с клетками используют различные типы микрокапилляров.

1.3 Материалы и оборудование для изготовления микроинструментов

Для работы с микроскопическими объектами, какими являются клетки, необходимы тонкие, механически прочные и химически стойкие микроинструменты. Размеры таких микроинструментов, как правило, должны быть небольшими, чтобы не наносить клеткам больших повреждений. Особенно это относится к проникающим в клетку микроинструментам. Большинство из них имеют внутреннее отверстие для проведения различных операций на клетке: микроинъекций, микроэкстракций и др. Следовательно, изначально заготовки, из которых изготавливают микроинструменты, разделяют на полые и сплошные. Сплошные заготовки (не имеющие внутреннего просвета) служат для

изготовления микроигл, микроскальпелей, микрошпателей и пр. В качестве исходных форм таких заготовок могут служить круглые палочки из стекла, плоские полоски стекла, а также различные пластмассы, например кусочки полиэтилена различного диаметра (Никитин, 1986).

Кварцевое стекло получают плавлением кремнезёмистого сырья высокой чистоты. Это стекло состоит из диоксида кремния SiO_2 и является самым термостойким стеклом: коэффициент его линейного расширения в пределах 0 - 1000°C составляет всего 6×10^{-7} . Исходя из этих характеристик раскаленное кварцевое стекло, опущенное в холодную воду, не растрескивается. Температура размягчения кварцевого стекла, при которой достигается динамическая вязкость 10^7 Пуаз (10 Па/с) равна 1250 °C. При температуре в 1500-1600 °C кварцевое стекло приобретает свойство полной вязкости, и во время этого из него можно делать различные изделия. Известно два сорта кварцевого стекла: прозрачный кварц и молочно-матовый. Мутность последнего вызвана обилием мельчайших пузырьков воздуха, которые при плавке стекла не могут быть удалены из-за высокой вязкости расплава. Изделия из мутного кварцевого стекла обладают почти такими же свойствами, как и изделия из прозрачного кварца, за исключением оптических свойств и большей газовой проницаемости.

Кварцевое стекло следует тщательно предохранять от всяких загрязнений, даже таких как жирные следы от рук. Перед нагреванием кварцевого стекла имеющиеся на нем непрозрачные пятна снимают при помощи разбавленной фтороводородной кислоты, а жировые – этанолом или ацетоном.

Кварцевое стекло устойчиво в среде всех кислот, кроме HF и H_3PO_4 . На него не действуют до 1200°C Cl_2 и HCl, до 250 °C сухой F_2 . Нейтральные водные растворы NaF и SiF_4 разрушают кварцевое стекло при нагревании. Оно совершенно непригодно для работ с водными растворами и расплавами гидроксидов щелочных металлов. Кварцевое стекло при высокой температуре сохраняет свои электроизоляционные свойства. Его удельное

электрическое сопротивление при 1000 °С равно $10^6 \text{ Ом}\cdot\text{см}$ (<http://www.diam.ru>).

Кварцевое стекло так же используется в изготовлении трубок (рис. 25) для микроинструментов и так же имеют широкое применение в биологических и химических лабораториях.

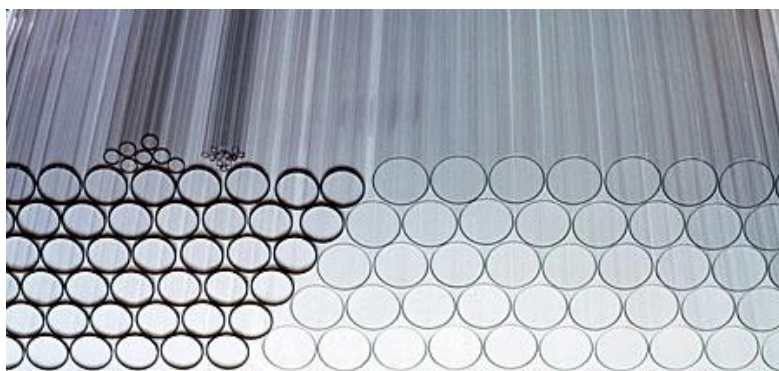


Рис. 25. Трубки, изготовленные из кварцевого стекла

Алюмосиликатные стекла характеризуются высокой температурой размягчения (680-750 °С), электроизоляционными свойствами, повышенной термостойкостью (150-200 °С). Однако эти стекла имеют более низкую, чем боросиликатные, кислотостойкость, обусловленную пониженным содержанием SiO_2 и соотношением $\text{SiO}_2: \text{Al}_2\text{O}_3$. Сочетание свойств стекол предопределяет специальные области их применения: в качестве трубок в аппаратуре для химического анализа, толстостенных стеклянных труб, ламп высокого давления, жаростойкой кухонной посуды и т.д. (<http://poliformdetal.com>).

Боросиликатное стекло – тип стекла с кварцем и трехокиси бора как главные формирующие стакан элементы. Боросиликатные стекла известны тем, что они имели очень низко коэффициенты теплового расширения ($\sim 3 \times 10^{-6} / ^\circ\text{C}$ в 20 °С), делая их стойкими к тепловому шоку, больше, чем какой-либо другой общий стакан (рис. 26).



Рис. 26. Стакан из боросиликатного стекла

Такой стакан – меньше подвергается тепловому напряжению и обычно используется для строительства бутылок реактива. Боросиликатное стекло продается под такими торговыми марками как Simax, Borcam, Borosil, Suprax, Kimax, Heatex, Пирекс, Endural, Schott или Refmex (<http://ru.knowledgr.com>).

Боросиликатные стекла с высоким содержанием SiO_2 , низким – щелочного металла и значительным – оксида бора B_2O_3 называются боросиликатными (рис. 27).



Рис. 27. Трубки из боросиликатного стекла

Борный ангидрид действует как флюс для кремнезема, так что содержание щелочного металла в шихте может быть резко уменьшено без чрезмерного повышения температуры расплавления. В 1915 фирма Корнинг гласс уоркс начала производить первые боросиликатные стекла под торговым названием «Пирекс». Стекло марки «Пирекс» является боросиликатным стеклом с содержанием не менее 80% SiO_2 , 12-13% B_2O_3 , 3-4% Na_2O и 1-2% Al_2O_3 . В зависимости от конкретного состава стойкость к термоудару таких стекол в 2–5 раз выше, чем у известковых или свинцовых. Они обычно намного превосходят другие стекла по химической стойкости и имеют свойства, полезные для применения в электротехнике.

Температура размягчения стекла «Пирекс» до динамической вязкости в 10^{11} пуаз (10^{10} Пас) составляет 580-590 °С. Тем не менее стекло пригодно для работ при температурах до 800 °С, но без избыточного давления. При использовании вакуума температуру изделий из стекла «Пирекс» не следует поднимать выше 650 °С. В отличие от кварцевого стекло «Пирекс» до 600 °С практически непроницаемо для H_2 , He , O_2 и N_2 . Фтороводородная и нагретая фосфорная кислоты, так же как и водные растворы (даже 5%-ные) КОН и NaOH, а тем более их расплавы, разрушают стекло «Пирекс».

Основные физико-химические свойства стекла, которые следует учитывать при выборе для изготовления микроинструментов: температура плавления, плотность, упругость, хрупкость, твердость, вязкость, поверхностное натяжение и растворимость (табл. 1). При работе с клеткой особое внимание следует уделять еще одному важному свойству стекла – влиянию состава стекла и действию отдельных его компонентов на клетку, например токсичности, связанной с действием ионов тяжелых металлов.

Таблица 1.

Общие физико-химические свойства стекла.

В начале размягчения	$4,5 \cdot 10^7$
При спекании	10^9
при отжиге	$10^{13} - 4 \cdot 10^{14}$
Поверхностное натяжение, дин/см	220 1 380
Плотность, г/см ³	Плотность, г/см ³
Силикатное	2,2 - 2,5
Оптическое стекло	до 7
Модуль упругости, кг/мм	4800 - 8300
Прочность, кг/мм ² :	Прочность, кг/мм ² :
При сжатии	50-200
При изгибе	10 - 25*
При растяжении	3,5 - 10**
Твердость (по шкале Мооса)	5-7
Микротвердость, кг/мм ²	480 - 1000
Удельная теплоемкость, кал/г*град	0,08 - 0,25
Коэфф, термического расширения	$5 \cdot 10^{-7} - 200 \cdot 10^{-7}$
Термостойкость, °С :	Термостойкость, °С
Обыкновенного силикатного	80 - 90
Боросиликатного	200 - 250
Кварцевого	до 1000
Коэффициент преломления	1.48 - 1,53

Плотность – отношение массы стекла при данной температуре к его объему, зависит от состава стекла (чем больше содержание тяжелых металлов, тем стекло плотнее), от характера термической обработки и колеблется в пределах от 2 до 6 (г/см³). Плотность – постоянная величина, зная ее, можно судить о составе стекла. Наименьшей плотностью обладает кварцевое стекло – от 2 до 2,1 (г/см³), боросиликатное стекло имеет плотность 2,23 г/см³, наибольшей – оптические стекла с высоким содержанием окислов свинца – до 6 (г/см³).

Следующим свойством стекла является прочность. Прочностью называется способность материала сопротивляться внутренним напряжениям, возникающим в результате действия внешних нагрузок.

Прочность характеризуется пределом прочности. Предел прочности на сжатие для различных видов стекла колеблется от 50 до 200 кгс/мм². На прочность стекла оказывает влияние его химический состав. Так, окислы CaO и B₂O₃ значительно повышают прочность, PbO и Al₂O₃ в меньшей степени, MgO, ZnO и Fe₂O₃ почти не изменяют ее. Из механических свойств стекла прочность и растяжение является одним из важнейших. Объясняется это тем, что стекло работает на растяжение хуже, чем на сжатие. Обычно прочность стекла на растяжение составляет 3,5–10 кгс/мм², т. е. в 15–20 раз меньше, чем на сжатие. Химический состав влияет на прочность стекла при растяжении примерно так же, как и на прочность при сжатии.

Твердость стекла, как и многие другие свойства, зависит от примесей. По шкале Мооса она составляет 6–7 ед, что находится между твердостью апатита и кварца. Твердость различных видов стекла зависит от его химического состава. Наибольшую твердость имеет стекло с повышенным содержанием кремнезема – кварцевое и боросиликатное. Увеличение содержания щелочных окислов и окислов свинца снижает твердость; наименьшей твердостью обладает свинцовый хрусталь.

Хрупкость – свойство стекла разрушаться под действием ударной нагрузки без пластической деформации. Сопротивление стекла удару зависит не только от его толщины, но и от формы изделия, наименее устойчивы к удару изделия плоской формы. Для повышения прочности к удару в состав стекла вводят окислы магния, алюминия и борный ангидрид. Неоднородность стекломассы, наличие дефектов (камней, кристаллизации и других) резко повышают хрупкость. Сопротивление стекла удару увеличивается при его отжиге. В области относительно низких температур (ниже температуры плавления) стекло разрушается от механического воздействия без заметной пластической деформации и, таким образом, относится к идеально хрупким материалам (наряду с алмазом и кварцем). Данное свойство может быть отражено удельной ударной вязкостью. Как и в предыдущих случаях, изменение химического состава позволяет

регулировать и это свойство: например, введение брома повышает прочность на удар почти вдвое. Для силикатных стекол ударная вязкость составляет от 1,5 до 2 кН/м, что в 100 раз уступает железу. На хрупкость, стекло влияют однородность, конфигурация и толщина изделий: чем меньше посторонних включений в стекле, чем более оно однородно, тем выше его хрупкость. Хрупкость стекол практически не зависит от состава. При увеличении в составе стекол B_2O_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , ZrO_2 , MgO хрупкость незначительно понижается.

Термостойкость стекла характеризуется его способностью выдерживать, не разрушаясь, резкие изменения температуры и является важным показателем качества стекла. Зависит от теплопроводности, коэффициента термического расширения и толщины стекла, формы и размеров изделия, обработки поверхности, состава стекла, дефектов. Термостойкость тем выше, чем выше теплопроводность и ниже коэффициент термического расширения, и теплоемкость стекла. Толстостенное стекло менее термостойко, чем тонкое. Наиболее термостойко стекло с повышенным содержанием кремнезема, титана и бора. Низкую термостойкость имеет стекло с высоким содержанием окислов натрия, кальция и свинца. Хрусталь менее термостоек, чем обычное стекло. Термостойкость обыкновенного стекла колеблется в пределах $90-250^{\circ}C$., а кварцевого: $800-1000^{\circ}C$. Отжиг в специальных печах повышает термостойкость в 2,5–3 раза.

Тепловое расширение – это увеличение линейных размеров тела при его нагревании. Коэффициент линейного теплового расширения стекол колеблется от $5 \cdot 10^{-7}$ до $200 \cdot 10^{-7}$. Самый низкий коэффициент линейного расширения имеет кварцевое стекло – $5,8 \cdot 10^{-7}$. Величина коэффициента термического расширения стекла в значительной степени зависит от его химического состава. Наиболее сильно на термическое расширение стекол влияют щелочные окислы: чем больше содержание их в стекле, тем больше коэффициент термического расширения. Тугоплавкие окислы типа SiO_2 ,

Al_2O_3 , MgO , а также V_2O_3 , как правило, понижают коэффициент термического расширения.

Упругость – способность тела возвращаться к своей первоначальной форме после устранения усилий, вызвавших деформацию тела. Упругость характеризуется модулем упругости. Модуль упругости – величина, равная отношению напряжения к вызванной им упругой относительной деформации. Различают модуль упругости при осевом растяжении – сжатии (модуль Юнга, или модуль нормальной упругости) и модуль сдвига, характеризующий сопротивление тела сдвигу или сколу и равный отношению касательного напряжения к углу сдвига. В зависимости от химического состава модуль нормальной упругости стекол колеблется в пределах $4,8 \times 10^4 \dots 8,3 \times 10^4$, модуль сдвига – $2 \times 10^4 \text{--} 4,5 \times 10^4$ МПа. У кварцевого стекла модуль упругости составляет $71,4 \times 10^3$ МПа. Модули упругости и сдвига несколько повышаются при замене SiO_2 на CaO , V_2O_3 , Al_2O_3 , MgO , BaO , ZnO , PbO (<http://www.dia-m.ru>).

Обработка полых капилляров отличается от обработки сплошных заготовок продолжительностью и методами изготовления. Так, многие микроинструменты из сплошного стекла изготавливают контактным способом, то есть непосредственным прикосновением нити накаливания к заготовке, тогда как микроинструменты из полых капилляров большей частью изготавливают на некотором расстоянии от нити накаливания. Кроме того, использование сплошных заготовок требует, как правило, более мощных нитей накаливания.

Как и в каждой технологии производства при обработке стекла имеются некоторые проблемы. Во-первых, это недостаточно развитая эргономика операционного цикла, что чаще всего является причиной слишком большой длительности всех видов операций (от момента выделения эмбрионов до их имплантации животным-реципиентам проходит до 2-х -4-х и более часов), что может привести к повреждению целостности клеточных структур. Помимо этого, не всегда профессионально используются

стеклянные микрокамеры и микроинструменты. Так, например, известно, что кортикальная реакция не происходит у эмбрионов, находящихся в капиллярах, сделанных из «Пирекса» или «Йенского» стекла (Методы биологии, 1987). Однако весьма часто именно эти стекла на практике обычно применяются для изготовления микроинструментов при проведении операций на клетках.

Для работы с микропипетками необходимо различное оборудование, такое как пуллер, который предназначен для изготовления заготовок, микрокузница, и микрогриндер.

Пуллер предназначен для разрыва стеклянных заготовок из различного вида стекла. Инструменты для производства микропипеток (пуллеры) предназначены для изготовления в лабораторных условиях микропипеток и микроэлектродов из стеклянных капилляров путём вытягивания. В операционной системе пуллера установлены различные режимы по изготовлению заготовок для микроинструментов. В некоторых пуллерах установлена функция по изменению параметров при которых будет происходить разрыв заготовок. Пуллер имеет нагревательный элемент при помощи которого происходит нагрев заготовки, а при помощи создаваемого давления на концах держателей стекло будет плавиться и растягиваться и в конце концов разорвется. Существует различные виды пуллеров, различных компаний.

Пуллеры производства Narishige (Япония): Puller (рис. 28). Вертикальный пуллер с двумя режимами работы. Может производить длинные, тонкие микропипетки для инъекций и твёрдые микроэлектроды для патч-клампа. Предназначен для работы с капиллярами из боросиликатного стекла диаметром от 1 до 1.5 мм.



Рис. 28. Пуллер PC-10 компании Narishige

PN-31 Puller (рис. 29) Пуллер для производства длинных и тонких микроигл из боросиликатных капилляров диаметром от 1 до 1.2 мм.



Рис.29. Пуллер PN-31 компании Narishige

PE-22 Puller (рис. 30). Для изготовления многоканальных электродов, трубок из толстого стекла и иных специальных микроинструментов. Предназначен для работы с капиллярами диаметром от 2 до 6 мм. Возможно изготовление особо длинных микропипеток для введения в нервные центры или многоканальных микропипеток из 3–7 заготовок диаметром 1 мм. Параметры нагрева и силы магнита устанавливаются и отображаются на двух светодиодных цифровых индикаторах.



Рис. 30. Пуллер PE-22 компании Narishige

Пуллеры компании The Sutter Instrument: Пуллер P-2000 (рис. 31) компании Саттер для микропипеток представляет значительный шаг вперед в технологии изготовления микропипеток, исследований оптоволокну и подсказок нанобрызг. Инструмент P-2000 компании Саттер объединяет основанный на лазере источник тепла CO₂ с технологией, полученной из нашего обширного опыта с обычным пуллером. Эта система предлагает возможности, непревзойденные другим пуллерами.



Рис. 31. Пуллер P 2000 компании Sutter Instrument

Инструмент Р-97 (рис. 32) Саттер горящего типа / микропипетка типа Брауна. Пуллер идеален для изготовления микропипеток, пипеток участка и игл для микроинъекций. Сохраняя многие особенности более ранних моделей, Инструмент Р-97 предлагает улучшения механического, электронного и проектирования программного обеспечения. Результат — лучший контроль процесса натяжения и более высокая степень воспроизводимости. Инструмент Р-97 объединяет доказанную механическую систему с искусственным, программируемым диспетчером микропроцессора. Этот программируемый контроль параметров натяжения позволяет исследователю проектировать применение определенные пипетки из широкого спектра стеклянных составов и размеров.



Рис. 32. Пуллер Р-97 компании Sutter Instrument

Принцип работы микрокузницы основан на манипулировании нитью накаливания под микроскопом вблизи оттянутого до небольших размеров кончика стеклянной заготовки. В качестве стеклянной заготовки в основном используют оттянутые стеклянные капилляры или стержни диаметром 1:2 мм. Поперечные размеры и длину ствола заготовки подбирают такими, чтобы ее можно было надежно закрепить в держателе микроманипулятора. Профиль стеклянной заготовки может иметь самую различную форму

(круглую, квадратную, прямоугольную или треугольную) Собственно микроинструмент изготавливают, обычно на самом кончике оттянутой заготовки. Все операции при изготовлении микроинструментов на микрокузнице производят нитью накаливания, температуру которой регулируют электрическим током. Стекло заготовки при этом, как правило, остается неподвижной и должна постоянно находиться в поле зрения микроскопа.

Стекло заготовки в температурной зоне нагрева нити накаливания размягчают или плавят, в зависимости от температуры и расстояния между стеклянной заготовкой и нитью. Размягченное стекло при этом можно деформировать, формовать (ковать) нитью накаливания или любым вспомогательным инструментом (металлической иглой, скальпелем, проволочкой и др.). При сильном расплавлении стекла заготовки происходит оплавление капилляра или стержня, сужение внутреннего просвета капилляра и даже его запаивание под действием сил поверхностного натяжения.

Фонбрюн отмечает семь основных операций, которые можно производить на микрокузнице: отрыв стеклянных нитей или капилляров, плавление на расстоянии, плавление контактное (при непосредственном контакте нити накаливания со стеклом), микроковка, микровыдувание (образование микрошариков), вытягивание нити из стекла на расстоянии и контактное вытягивание нити (Фонбрюн, 1951).

На современной микрокузнице производства СКВ БП АН СССР (Специальное конструкторское бюро биологического приборостроения АН СССР) возможны и другие весьма важные операции, а именно: полуавтоматическое изготовление микропипеток, микроигл и тонких нитей, механическая заточка и шлифовка, обработка микроинструментов с торца под контролем микроскопа и др. Кроме того, на ней предусмотрено вращение стеклянной заготовки в процессе изготовления микроинструментов и быстрая смена различных форм нитей накаливания (рис. 33).



Рис. 33. Микрокузница П52.959.005

В отличие от обычных стеклодувных работ нить накаливания на микрокузнице делают подвижной по следующей причине. Линейные размеры нити накаливания меняются в зависимости от силы тока. Если использовать большое увеличение микроскопа, кончик разогреваемой или охлаждающейся нити будет выходить из поля зрения. Для того чтобы контролировать процесс изготовления микроинструмента, пришлось бы перемещать микроскоп, а стеклянную заготовку постоянно удерживать на определенном расстоянии от нити накаливания. Поэтому целесообразно устанавливать стеклянную заготовку неподвижно, а манипулировать только нитью накаливания.

Нить накаливания перемещают по трем взаимно перпендикулярным направлениям в непосредственной близости от стеклянной заготовки. Движение в горизонтальном и вертикальном направлениях осуществляют при помощи микрометрической подачи, а движение вдоль оптической оси микроскопа производят при помощи кремальерного механизма. Микрометрическое перемещение нити накаливания позволяет чрезвычайно точно манипулировать ею вблизи стеклянной заготовки в процессе изготовления микроинструментов.

С помощью микрокузницы можно не только изготавливать микроинструменты из стекла, но и делать различные сложные приспособления малых размеров, контролировать их в процессе изготовления, проводить их монтаж и сборку. Одни только основные операции, которые можно производить на микрокузнице: разрезание, ковка, сварка, спаивание, сверление, заточка, полировка, закалка, отжиг и др., ставят ее в исключительное положение в производстве сверхминиатюрных деталей и устройств.

Микрокузница Фонбрюна проста в работе. Стекланную заготовку перемещают относительно нити накаливания вручную в момент установки ее в тиски и затем механически при помощи поворотного круга, позволяющего вращать заготовку в плоскости, перпендикулярной оптической оси микроскопа. Ток накала регулируют при помощи реостата, помещенного в корпусе микрокузницы. Микроскоп имеет объектив с большим рабочим расстоянием (30 мм) и позволяет просматривать поле зрения диаметром около 3 мм. На микрокузнице предусмотрена регулируемая подача воздуха в зону нагрева нити накаливания при помощи воздушного нагнетательного насоса. На рис. 34 представлен общий вид микрокузницы Фонбрюна, детальное описание которой можно найти в его работах (Фонбрюн, 1951).

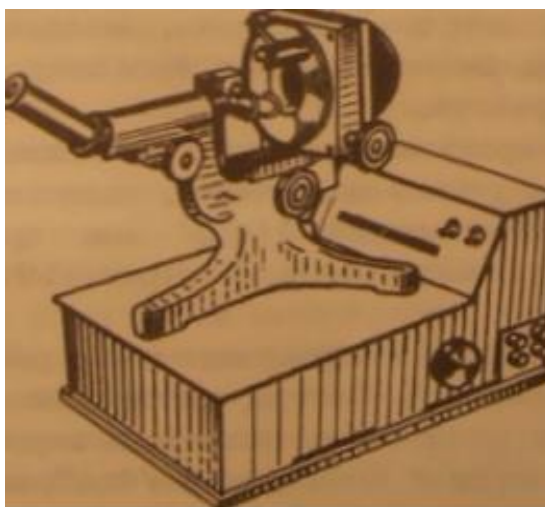


Рис. 34. Микрокузница Фонбрюна

Микрокузница фирмы Карл-Цейсс имеет свои преимущества по сравнению с микрокузницей Фонбрюна (рис. 35). Бинокулярный микроскоп снабжен прекрасной оптикой и дает прямое изображение. Заготовку можно рассматривать одновременно в падающем свете и в отраженном на просвет за счет осветителя падающего типа и отражающего экрана, размещенного за нитью накаливания. Кроме того, заготовку можно наклонять на любой угол от $+60^\circ$ до -30° в фокальной плоскости микроскопа.

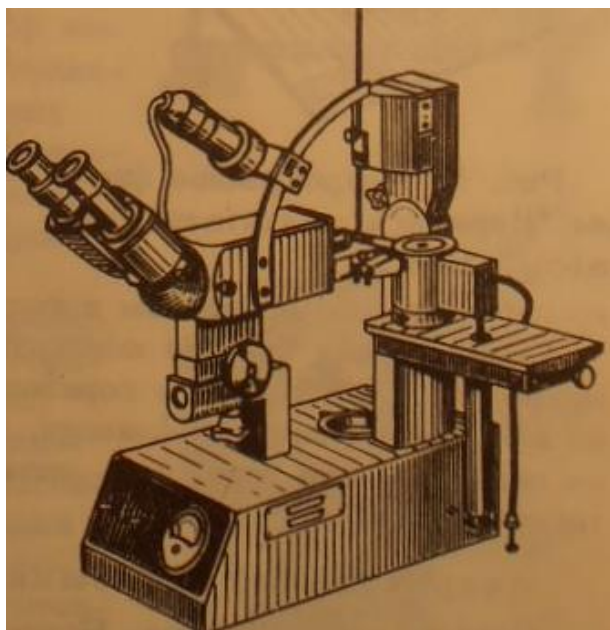


Рис. 35 . Микрокузница фирмы Карл-Цейсс

Микроманипулятор скольжения типа ММ-1 позволяет выводить плоскость нити накаливания как в строго горизонтальное положение, так и под небольшим углом к оптической оси микроскопа. Кремальерный механизм продольного перемещения стеклянной заготовки позволяет быстро устанавливать ее кончик в зоне нагрева нити накаливания. На микрокузнице имеется специальное режущее приспособление для отрезания стеклянных нитей, управляемое фототросиком.

Работа при различных температурных режимах нити накаливания значительно облегчается благодаря амперметру, по относительным показаниям которого можно быстро установить необходимую температуру.

К микроузнице придается газовая микрогорелка, дающая узкое пламя. Высоту пламени можно регулировать в пределах от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров.

Микрогриндер используется для заточки стеклянных заготовок под различными углами. EG-401 Microgrinder имеет станок для работы с пипетками диаметром от 1 до 1.5 мм. Перемещение пипетки вверх/вниз в диапазоне 47 мм. Перемещение микроскопа X 7 мм, Y 30 мм, Z 8 мм. Имеет окуляры 10x увеличением, и объективы 3x. Скорость вращения алмазного шлифовального круга в диапазоне от 150 до 2 000 об./мин.

Другая же разновидность микрогриндера EG-45 Microgrinder (рис. 36) так же имеет станок для работы с пипетками диаметром от 1 до 1.5 мм.



Рис. 36. Микрогриндер EG-45 компании Narishige.

Возможность перемещения пипетки вверх/вниз в диапазоне 47 мм. Скорость вращения алмазного шлифовального круга в диапазоне от 150 до 2 000 об./мин.

ВЫВОДЫ

1. Для изготовления микроинструмента необходимо использовать заготовки из боросиликатного стекла с н.д. 1.0 мм, а в.д. 0.50 мм.
2. В ходе испытаний были отобраны оптимальные параметры для изготовления микроинструмента на пуллере (секрет производства, ноу-хау).
3. Разработан и изготовлены опытные образцы микроинструментов (секрет производства, ноу-хау).
4. Изготовленный микроинструмент позволяет удерживать и перемещать клетки в питательной среде без использования отрицательного давления.

Список использованной литературы

1. Александров А. А.. Метод электрофореза в физиологии // Наука. 1983. 148 с.
2. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов (Экспериментальные и теоретические предпосылки получения живых животных из клеток, несущих генетическую информацию) // ОНТИ НЦБИ Пущино. 1980. С. 12-14.
3. Дерзонов В.А. Химико-лабораторное стекло. 2014. URL: <http://poliformdetal.com> (дата обращения: 23.04.16).
4. Димьянов К.В. Адапторы микроскопов для манипуляций // Ependorf. 2010. URL: <https://online-shop.eppendorf.ru/RU-ru/Manipuljacji-s-kletkami> (дата обращения: 23.04.16).
5. Земскова М.Ю., Никитин В.А., Бендукидзе К.А. Микроинъекция ДНК в ядра соматических клеток // В кн.: “2-е Всесоюзное совещание по генетике соматических клеток в культуре”, М., Изд-во атомной энергии АН СССР. 1983. 95 с.
6. Кумагин Р.А. Пуллер пипеток // Биотехнологии 2009. URL: <http://www.biotechnologies.ru/catalog> (дата обращения: 19.04.16).
7. Купревич И.С. Физико-химические свойства стекла // Стекло. 2008. URL: <http://ru.knowledgr.com> (дата обращения: 23.04.16).
8. Насонов Д.Н. Виды и свойства стекла. 2006. URL: <http://www.diam.ru/page> (дата обращения: 20.04.16).
9. Никитин В.А., Фесенко Е.Е. Биофизические аспекты реконструкции единичной клетки методами клеточной инженерии // Биофизика. 2006. 51(8). С. 673-678.
10. Первис Р. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза. Пер. с англ. М.: Мир. 1983. 208 с.
11. Риджуэй Э. А. Дж. Векторы экспрессии млекопитающих. // В кн.: Сельскохозяйственная биотехнология: векторные системы

- молекулярного клонирования. М.: ВО Агропром издат. 1991. С. 438-464.
12. Седов А.Б. Микрокузница MF-900 // Научный парк СПбГУ. 2016. URL: <http://researchpark.spbu.ru/rmkt-eq-rus/138-equipment-rmkt-dlya-raboty-s-kletochnimi-kulturami> (дата обращения: 23.04.16).
13. Филипова С.А. Биология клетки. 2012. URL: <http://www.ependorf.com>. (дата обращения: 15.04.16).
14. Фонбрюн П. Методы микроманипуляций. 1951. С. 89-96.
15. Чайлахян Л. М., Вепринцев Б. Н., Свиридова Т. А., Никитин В. А. Электростимулируемое слияние клеток в клеточной инженерии. Биофизика. 32. 1987. С. 874-887.
16. Эрнст Л., Гольдман И., Зиновьева Н. // Доклады РАН. 1995. С. 555-558.
17. Шкуматов А.А. Клонирование: прошлое, настоящее... будущее? Проблемы репродукции. 6. 2001. С. 1-16.
18. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. // Molecular biology of the cell. 4th ed. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>. (дата обращения: 17.04.2016).
19. Bowman C., Tedeschi H. Electrophoretic injection of a fluorescent dye into giant mitochondria and mitoplasts // Science. 209. 1980. P. 1251-1252.
20. Brian R. Davis, Judith Yannariello-Brown, Nicole L. Prokopishyn, Zhongjun Luo, Mark R. Smith, Jue Wang, N. D. Victor Carsrud and David B. Brown. Glass needle – mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells. // BLOOD, 2000 - Vol 95, P. 33-43.
21. Bridgman P.C., Brown M. E, Balan I. Biolistic transfection // Methods Cell Biol. 71. 2003. P. 353-368.
22. Caprecchi M. R. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells // Cell. 22 (2, Pt 2). 1980. 479-488.
23. Celis J. E. Microinjection of somatic cells with micropipettes: comparison with other transfer techniques // Biochem. J. 233. 1984. P. 281-291.

24. Clinical IMSI // Research Instruments. 2012. URL: <http://www.research-instruments.com/ri-imsi> (дата обращения: 15.04.16).
25. Cheng W.M., An L., Zhu Y.B., Liu J.H., Gao H.M., Li X.H., Zheng S.J., Cheng D.B., Tian J.H. Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatic structural integrity and developmental competence of in vitro matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs // Society of Reproduction and Fertility. 2009. - Vol. 137. P. 633-643.
26. Davis B. R., Yannariello-Brown J., Prokopishyn N. L., Luo Z, Smith M.R., Wang J., Carsrud N. D., Brown D. B.. Glass needle-mediated microinjection of macromolecules and transgenes into primary human blood stem/progenitor cells // Blood. 95. 2000. P. 437-444.
27. David F.B. Miller, Stacy L. Holtzman, and Thomas C. Kaufman. // Customized Microinjection Glass Capillary Needles for P-Element Transformations in *Drosophila melanogaster*. // BioTechniques. 2002. P. 366-375.
28. Dobrovolsky V.N., Lagutin O.V., Vinogradova T.V., Frolova I.S., Kuznetsov V.P., Larionov O.A. Human gamma-interferon expression in the mammary gland of transgenic mice. FEBS Lett., 1993. P 181-184.
29. Diacumakos E. G. Methods for micromanipulation of human somatic cells in culture // Methods Cell Biol. 7. 1973. P 287-311.
30. Di Berardino M. A., McKinnell R. G., Wolf D.P. The golden anniversary of cloning: a celebratory essay // Differentiation. 71. 2003. P.398-401.
31. Illmensee K. Cloning in reproductive medicine. J. Assist // Reprod. Genet. 2001. P. 451-467.
32. Illmensee K. Biotechnology in reproductive medicine // Differentiation. 2002. P. 167-173.
33. Furusawa M., Nishimura T, Yamaizumi M., Okada Y.. Injection of foreign substances into single cells by cell fusion // Nature. 249. 1974. P. 449-450.
34. Gopal T. V. Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures // Mol.

- Cell. Biol. 5. 1985. P. 1188-1190.
35. Graham F. L., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology*. 52. 1973. P. 456-467.
36. Graessmann A., Graessmann M., Mueller C. Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen // *Methods Enzymol.* 65. 1980. P. 816-825.
37. Gurdon J. B., Byrne J. A. The first half-century of nuclear transplantation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1000. 2003. P. 8048-8052.
38. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes // *Nature*. 315. 1985. P. 115-122.
39. Hibbitt O., Coward K, Kubota H, Prathalingham N., Holt W., Kohri K, Parrington J. In vivo gene transfer by electroporation allows expression of a fluorescent transgene in hamster testis and epididymal sperm and has adverse effects upon testicular integrity or sperm quality // *Biol. Reprod.* 74. 2006. P. 95-101.
40. Hochedlinger K., Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy // *N. Engl. J. Med.* 2003. P. 275-286.
41. Klein T. M, Arentzen R, Lewis P. A., Fitzpatrick-McElligott S. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment // *Biotechnology*. (N. Y.). 10. 1992. P. 286-291.
42. Kimura Y., Yamagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse // *Biology of Reproduction*. 1995. - Vol. 52. P. 709-720.
43. Krieger M., Brown M. S., Faust J. R., Goldstein J. L. Replacement of endogenous cholesteryl esters of low density lipoprotein with exogenous cholesteryl linoleate // Reconstitution of a biologically active lipoprotein particle. *J. Biol. Chem.* 253. 1978. P. 4093-4101.
44. Kuhholzer B., Prather R. S. Advances in livestock nuclear transfer // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 2000. P. 240-245.
45. Lieber M. R., Hesse J. E., Nickol J.M., Felsenfeld G. The mechanism of osmotic transfection of avian embryonic erythrocytes: analysis of a system

- for studying developmental gene expression // *J. Cell Biol.* 105. 1987. P. 1055-1065.
46. Loyter A, Zakai N., Kulka R. G.. «Ultramicroinjection» of macromolecules or small particles into animal cells. A new technique based on virus-induced cell fusion // *J. Cell. Biol.* 1975. P. 292-304.
47. Lo C. W. Transformation by iontophoretic microinjection of DNA: multiple integrations without tandem insertions // *Mol. Cell. Biol.* 3. 1983. P. 1803-1814.
48. Machaty Z., Paldi A., Csaki T., Varga Z., Kiss I., Barandi Z., Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos // *Journal of Reproduction and Fertility.* 1993. -Vol. 98. P. 467-470.
49. Malov D., Микропипетки ORIGIO Humagen. 2011. URL: <http://www.origio.ru> (дата обращения: 19.04.16).
50. Mario R. Capocchi. High Efficiency Transformation by Direct Microinjection of DNA into Cultured Mammalian Cells. Vol. 22. 1980. P. 479-488.
51. Miller C. R., Clapp P. J., O'Brien D. F. Visible light-induced destabilization of endocytosed liposomes // *FEBS Lett.* 467. 2000. P. 52-56.
52. Mohammad Mehdi Naderi, Mohammad Reza Sadeghi and Mohammad Mehdi Akhondi. A Technique for Facile and Precise Transfer of Mouse Embryos. // *Avicenna J Med Biotech.* 2013. P. 62-65.
53. Neumann E, Schaefer-Ridder M., Wang Y, Hofschneider P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields // *EMBO J.* 11. 1992. P. 841-845.
54. Niemann H., Kues W., Carnwath J.W. Transgenic farm animals: present and future // *Rev. Sci. Tech.* 24. 2005. P. 285-298.
55. Nozaki T., Ogawa R., Feril L. B., Jr., Kagiya G., Fuse H, Kondo T. Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification // *J. Gene Med.* 5. 2003. P. 1046-1055.
56. Ocho M., Nakai S., Tasaka K., Watanabe S., Oda T.. Microinjection of

- nucleic acids into cultured mammalian cells by electrophoresis // *Acta Med. Okayama*. 35. 1981. P. 381-384.
57. Ornitz D. M., Pamiter R. D., Hammer R.E., Brinster R.L., Swift G. H., MacDonald R. J.. Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice // *Nature*. 13. 1985. P. 600-602.
58. *Pipette cookbook*». Rev. F. One Digital Drive, Novato, CA 94949 415-883-0128. 2010. P. 40-45. URL: <http://www.sutter.com>. (дата обращения: 17.04.2016).
59. Pittoggi C., Beraldi R., Sciamanna I., Barberi L., Giordano R., Magnano A. R., Torosantucci L, Pescarmona E., Spadafora C.. Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA // *Mol. Reprod. Develop.* 73. 2006. P. 1239-1246.
60. Sussman D. J., Milman G. Short-term, high-efficiency expression of transfected DNA // *Mol. Cell. Biol.* 4. 1984. P. 1641-1643.
61. Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider P. H. Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene // *Science*. 215. 1982. P. 166-168.
62. Smith S. J., Mohum T. J. Frog transgenesis made simple // *Nat. Methods*. 2. 2005. P. 897-898.
63. Stephens D. J, Pepperkok R. The many ways to cross the plasma membrane // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98. 2001. P. 4295-4298
64. Tharasanit T., Colleoni S., Lazzari G., Colenbrander B., Galli C., Stont T.A.E. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes // *Reproduction*. 2006. - Vol. 132. P. 759-769.
65. Van der Putten H., Botteri F. M., Miller A. D., Rosenfeld M. G., Fan H., Evans R. M., Verma I. M.. Efficient insertion of genes into the mouse germ line via retroviral vectors // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 82. 1985. P. 6148-6152.

66. Viigipuu K., Kallio P. Microinjection of living adherent cells by using a semi-automatic microinjection system // *Altern. Lab. Anim.* 32. 2004. P. 417-423.
67. Walev I., Bhakdi S.C., Hofmann F., Djonder N., Valeva A., Aktories K., Bhakdi S. Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98. 2001. P. 3185-3190.
68. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S.. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // *Nature.* 385.1997. P. 810-813.
69. Wharton T. Puller PC-10 // NARISHIGE Group. 2009. URL: <http://products.narishige-group.com> (дата обращения: 24.04.16).
70. Wharton T. Microforge MF-900 // NARISHIGE Group. 2009. URL: <http://products.narishige-group.com> (дата обращения: 23.04.16).
71. Xihe L., Morris L.H-A., Allen W.R. Effects of different activation treatments on fertilization of horse oocytes by intracytoplasmic sperm injection // *Journal of Reproduction and Fertility.* Vol. 119. 2000. P. 253-260.
72. Yamamoto F., Furusawa M., Furusawa I., Obinata M. The «pricking» method. A new efficient technique for mechanically introducing foreign DNA into the nuclei of culture cells // *Exp. Cell Res.* 1982. P. 79-84.

ПРИЛОЖЕНИЯ



Срок действия свидетельства на ноу-хау прекращается в результате:
- прекращения действия мер, предпринимаемых правообладателем по сохранению информации в конфиденциальном режиме;
- в момент раскрытия информации третьим лицом независимо от способа получения им этой информации.

Рис. 1 Свидетельство о регистрации в качестве ноу-хау результат интеллектуальной деятельности