

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

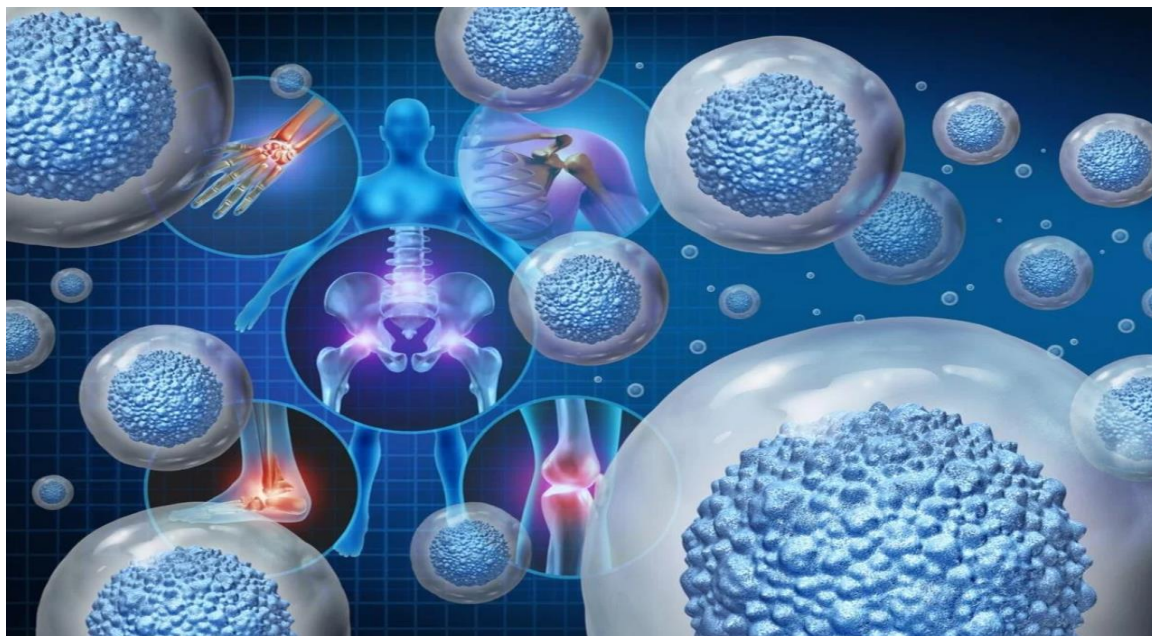
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Курс лекцій

для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти



УДК 579.2:57.085
К90

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “25” вересня 2025 р., протокол №1.

Укладач:

О. І. Юлевич – доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцентка

Рецензенти:

О. І. Каратєєва – в.о. зав. кафедри біотехнології та біоінженерії, доцентка с.-г. наук, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

ВСТУП	4
1. Застосування культур клітин у різних галузях біології, медицини та сільського господарства	6
2. Обладнання та живильні середовища для роботи з клітинними культурами	17
3. Основні методи культивування клітин поза організмом	31
4. Характерні особливості клітин в культурі	42
5. Історія створення культур клітин рослин	54
6. Методи створення клітинних культур рослин	62
7. Особливості культивування клітинних суспензій	75
8. Методи клонального розмноження рослин	88
9. Історія культивування тваринних клітин	100
10. Введення клітин у культуру. Системи культивування клітин	106
11. Гібридизація тваринних клітин	126
12. Кріоконсервація. Отримання клітинних ліній для кріоконсервації	139
13. Культури клітин людини	152
14. Технологія «орган-на-чіпі»	161
Перелік літератури	173

В наш час культивування клітин є найбільш перспективною областю біотехнології, що гармонійно розвивається. Саме з клітинною інженерією пов'язані успіхи у різних галузях науки, медицини, фармакології, виробництва та сільського господарства. Застосування клітинних культур дозволяє подолати багато проблем біоетики, пов'язані із застосуванням тварин у наукових дослідженнях. Культури клітин та тканин, виділені з природного матеріалу, широко використовуються при промисловому виробництві біологічно активних речовин та лікарських препаратів. На культурах клітин одержують різноманітні вакцини. Нині вирішується питання великомасштабного виробництва моноклональних антитіл з урахуванням гібридомних культур.

Основними напрямками використання клітинної культури є генетика, імунологія, біохімія, молекулярна біологія, біотехнологія та генна інженерія, вірусологія та трансформація клітин, фармакологія та токсикологія, визначення механізмів росту та диференціювання, та багато іншого.

Методи культивування клітинних культур набули останнім часом надзвичайно широкого поширення практично у всіх галузях сучасної біології. Неможливо уявити молекулярно-біологічну лабораторію або сучасне біотехнологічне підприємство, де не використовувалися б тканинні культури. Клітинна інженерія та гібридомна технологія, як невід'ємна її частина, є однією з провідних галузей людської діяльності. Культивування клітинних культур – це технологічні процеси з використанням біологічних систем: живих організмів та компонентів живої клітини.

В даний час ведуться великомасштабні дослідження по стовбурових клітинах, що дозволить у найближчому майбутньому отримати їх чисті лінії, і, як наслідок, якісний прорив у лікуванні нейродегенеративних захворювань, онкологічних захворювань, підніме на новий рівень трансплантологію та хірургію.

Отримання біологічно активних речовин рослинного походження, таких як токсини, гербіциди, регулятори росту, алкалоїди, стероїди, терпеноїди, що

мають медичне застосування,— це неповний перелік можливостей культивування клітин.

Розвиток сучасної клітинної інженерії при отриманні полімерів дозволить сподіватися на швидке вирішення багатьох проблем, що стоять перед сучасною медициною. В даний час розроблено методики мікрохірургії живих клітин за допомогою маніпуляторів або лазерного променя.

Однак багато питань ще належить вирішити. Серед них такі як: створення оптимальних поживних середовищ для різних типів клітин; пошук засобів впливу на диференціювання та проліферацію клітин; можливість спільного культивування різних типів клітин з метою отримання більш життєздатної культури, функціонально повноцінної *in vivo*, здатної повністю замінити втрачену нативну тканину.

Застосування культур клітин у різних галузях біології, медицини та сільського господарства

Культури клітин – метод збереження у життєздатному стані клітин тварин чи рослин. Культури клітин *in vitro* є генетично однорідною популяцією, у зв'язку з чим активно використовуються в генетиці, імунології, біотехнології, вірусології для вирішення цілого кола експериментальних завдань: з'ясування причин та механізмів клітинної загибелі та переродження, отримання фармацевтичних препаратів, у тому числі високоспецифічних антитіл (імуноглобулінів), тестування нових ліків, вивчення токсичних властивостей різних субстанцій та багато іншого.

Клітинні культури з кожним роком знаходять все більше застосування в найрізноманітніших галузях біології, медицини та сільського господарства. Їх використовують при вирішенні таких загальнобіологічних проблем, як з'ясування механізмів диференціювання та проліферації, взаємодії клітин із середовищем, адаптації, старіння, біологічної рухливості, злоякісної трансформації та багатьох інших.

Важлива роль відводиться клітинним культурам у біотехнології під час виробництва вакцин та біологічно активних речовин. Вони є вихідним матеріалом для створення клітин-продуцентів, що використовуються з метою підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин та для виведення нових сортів рослин. Культури клітин застосовуються для діагностики та лікування спадкових захворювань, як тестоб'єктів при випробуванні нових фармакологічних речовин, а також для збереження генофонду видів тварин і рослин, що зникають.

Напрями застосування культивованих рослинних тканин та клітин

Вирощування рослинних тканин або окремих клітин на штучних живильних середовищах має не тільки теоретичне, а й велике практичне значення. Саме це й призвело до інтенсивного розвитку цього напрямку у біотехнології.

Культура клітин є відносно простою та зручною моделлю для вивчення механізмів експресії геному, біогенезу клітинних органел, міжклітинних контактів та інших теоретичних проблем біології клітини. Використовуючи соматичну гібридизацію протопластів, можна вирішувати такі фундаментальні проблеми як біогенез клітинної стінки та її роль у функціонуванні клітини, отримувати гібриди клітин та вирощувати з них цілі рослини.

Отже, можна виділити кілька напрямків практичного використання культур клітин.

Перше, засноване на здатності ізольованих рослинних тканин та клітин продукувати у середу біологічно цінні речовини, які можуть знаходити застосування в медицині, парфумерії, косметології. Застосування засноване на тому, що клітини лікарських рослин, що ростуть у культурі, зберігають, а в деяких випадках і збільшують здатність до біосинтезу біологічно активних речовин: алкалоїдів, стероїдів, ефірних масел, глікозидів та ін. На основі цих клітинних технологій вже отримують такі медичні препарати як діосгенін (культура клітин діоскореї), айлюмін (клітини раувольфії зміїної), тонізуючі речовини (клітини женьшеню) та інші.

Цей напрямок дозволяє отримувати практично необмежену кількість цінних біологічних речовин, використовуючи рідкісні рослини, кількість яких у природі обмежена, або використовувати в культурі унікальні тропічні рослини.

Другий напрямок практичного використання культури рослинних тканин пов'язано з отриманням безвірусного посадкового матеріалу. В даний час дуже поширені різноманітні вірусні інфекції овочевих, декоративних, плодово-ягідних і технічних культур. Це призводить не тільки до втрати врожаю, але зрештою і до втрати високопродуктивних сортів. Необхідно пам'ятати, що посадковий матеріал, отриманий від інфікованих вірусом рослин, завжди заражений вірусами, і позбутися них практично неможливо.

Сьогодні одним із найбільш ефективних способів боротьби з вірусними інфекціями рослин є використання культури меристем та подальше мікроклональне розмноження. Це засноване на тому, що наймолодші частини

стебла і особливо меристема кінчика стебла, не містять вірусних частинок, тоді як решта рослини може бути інфікована. А це означає, що якщо від хворої рослини взяти маленький шматочок стебла і отримати з цих клітин нову рослину, то така рослина буде вільною від вірусів і може використовуватися як посадковий матеріал.

Третій напрямок практичного використання культур рослинних клітин – це селекційні роботи, т. е. роботи, створені задля отримання нових генетичних форм. Вона заснована насамперед на соматичній гібридизації, тобто злитті соматичних клітин різних видів рослин, що дозволяє отримувати гібриди з новими властивостями. Цей підхід дозволяє отримати рослини, що швидко ростуть, стійкі до різних несприятливих факторів середовища (посуха, засолення, низька і висока температура).

В ізолюванні протопласти можна внести окремі чужорідні даного виду гени, т. е. забезпечити отримання рослин із новими властивостями.

В даний час у селекційній роботі використовується і культивування ізолюваних пильовиків та сім'япочок. Це дає можливість отримувати гаплоїдні клітини і надалі їх злиття з іншим типом таких же гаплоїдних клітин дозволяє отримувати гібриди.

Отже, культура тканин та клітин рослин має декілька перспективних практичних напрямів, а успіх їх застосування залежить від фундаментальних розробок оптимізації управління фізіологічними процесами. Це стосується насамперед розмноження клітин у культурі, процесу диференціювання та регенерації дорослих рослин. Найбільш складною є регенерація рослин з окремих клітин, і насамперед злакових рослин.

Напрями застосування культивованих тваринних тканин та клітин

Використання культивованих клітин тварин і людини широко почало розвиватися у 1950-х рр., спочатку особливо інтенсивно для вірусологічних і токсикологічних досліджень. Нині створено величезну кількість банків клітин людини і тварин, без яких не може існувати сучасна медицина. Подальше

удосконалення і розвиток клітинних технологій і їх застосування у медицині – один із пріоритетів сучасної науки. Сьогодні тут виділяють наступні напрями:

- *цитотехнології* – клітинні технології, наприклад, вирощування гібридом клітин, що утворюються в результаті злиття В-лімфоцитів і ракових клітин меланоми для отримання моноклональних антитіл; це важливо для імунології, дозволяючи отримувати клітини, що виробляють специфічні антитіла для важких захворювань людини, тварин та рослин, оскільки відкрило можливості для створення діагностичних інструментів для цих захворювань. Не менш важливим тут є і створення штучних органів, зокрема шляхом 3D-друку (друк органів на 3D принтері або біопринтинг-технологія вирощування здорових і живих органів замість пошкоджених або відсутніх); надруковані органи кращі за протези і трансплантовані частини тіла. Їхні можливості ідентичні рідним і вони не відкидаються імунною системою, якщо створені з клітин пацієнта;

- *гістотехнології* – тканинні технології – наприклад, вирощування шкіри, органів для трансплантації, тощо. Тут також можливим є застосування біодруку, зокрема для створення людських тканин, шкіри, кровоносних судин та внутрішніх органів. Слід також відмітити про створення лабораторного м'яса, наприклад нещодавно компанія Aleph Farms за допомогою 3D-біопринтингу надрукувала із клітин корів яловичий стейк, подібні продукти вже з'являються у продажу;

- *ембріотехнології* – зародкові технології – наприклад, пересаджування ембріональних стовбурових клітин пуповинної крові для лікування променевої хвороби чи репродуктивна технологія екстракорпорального запліднення тощо.

В окремий розділ клітинної інженерії (клітинних технологій), який сьогодні особливо бурхливо розвивається, можна виділити модифікацію та *налаштування стовбурових клітин*. Значна частина останніх досліджень терапії стовбуровими клітинами відноситься до вищезгаданих методів клітинної інженерії.

На сучасному етапі розвитку наукомістких виробництв методи культури клітин є найбільш поширеними в усіх галузях біотехнології і особливого

значення набувають вони у виробництві біологічно активних речовин із живих клітин різного походження для харчової, хімічної, фармацевтичної промисловості, для медицини і ветеринарії, зокрема препаратів для специфічної профілактики і лікування поширених вірусних захворювань людини і тварин.

Перевага використання культур клітин при отриманні таких препаратів полягає у тому, що клітини тварин, на відміну від прокаріотичних (мікробних, генетично модифікованих клітин) здатні здійснювати посттрансляційну модифікацію білків і таким чином синтезувати білки, ідентичні природнім. Більш того, при виробництві інактивованих чи атенуйованих противірусних вакцин, культура клітин є єдиним джерелом одержання біомаси вірусів.

Метод культури клітин (метод «експлантації» клітин) є одним із ключових методів клітинної біології, який вивчає особливості проліферації, диференціювання, міграції, метаболічної активності, біохімічних та молекулярно-біологічних механізмів старіння та загибелі окремої клітини та популяції генетично однотипових клітин, для яких підтримуються всі їх властивості в штучно створених умовах з дотриманням всіх необхідних правил асептики.

Техніка культури тканин вперше була запропонована ще на початку минулого століття з метою вивчення властивостей клітин тварин, вільних від впливу системного мікрооточення, характерного для багатоклітинних організмів як за норми так і патологічних станів. На початкових етапах ця технологія базувалась на роботі із недиспергованими тканинами. Першим клонуваним штамом був L929, який було отримано із мишиних L-клітин капілярним методом. В 1950-х роках для аналізу вірусних бляшок Дюльбекко описав метод отримання моношарових культур з використанням трипсину, який на сьогодні широко використовується в практиці культивування клітин. Перша постійна клітинна лінія людини HeLa була отримана та клонована групою авторів з використанням опроміненого фідерного шару клітин. На 50-ті роки минулого століття припадає бум розвитку клітинних технологій: розробка правил роботи з культурами клітин, налагодження технологій по випуску необхідного

обладнання (ламінарних боксів, вуглекислотних інкубаторів, інвертованих мікроскопів, приладів для кріоконсервації клітин), а також штучних середовищ з рост-стимулюючими факторами та стерильного пластикового посуду для інкубації клітин.

Найбільш суттєвими здобутками, отриманими на основі культивованих клітин є *гібридна технологія* – отримання моноклональних антитіл та їх використання для діагностики та лікування найпоширеніших захворювань різної етіології, технології штучного запліднення та репродуктивної медицини, технології, пов'язані із отриманням та застосуванням стовбурових клітин. Таким чином, культури клітин можуть бути використані в наступних дослідженнях: вивчення внутрішньоклітинних процесів – реплікація та транскрипція ДНК, синтез білку та енергетичний обмін, метаболізм лікарських препаратів; дослідження внутрішньоклітинного та мембранного транспорту речовин; взаємодія з трофічними субстратами. Важливими аспектами є дослідження механізмів інфікування клітин, цитотоксичний вплив, ліганд-рецепторна взаємодія.

Також з використанням культивованих клітин актуальним є вивчення міжклітинної взаємодії, морфогенезу, паракринного та аутокринного впливу, кінетики клітинної проліферації, для чого використовуються як однотипові клітини так і моделі співкультивування різних типів клітин.

Органотипові моделі культивованих клітин знаходять своє застосування в регенаторній медицині та трансплантології, в тому числі за патологічних станів. Утворення та секреція клітинних продуктів, створення біореакторів та отримання кінцевих продуктів, технології виробництва та отримання цільових біологічно-активних продуктів є невід'ємним напрямком сучасного біовиробництва.

Переваги культури клітин полягають у можливості точного контролю фізико-хімічного оточення (рН, температура, осмотичний та парціальний тиск, вміст кисню та вуглекислоти), а також біохімічних та фізіологічних умов, що сприяє повторюваності та відновлюваності результатів, механізації та

сертифікації проведення досліджень, економії реагентів та терміну виконання певних робіт.

Культура клітин дуже часто замінює або доповнює існуючі моделі з використанням тварин. Часто використання культури клітин є зручнішим і дешевшим у порівнянні з традиційними експериментальними моделями з використанням тварин. Культура клітин з достатньою достовірністю може репрезентувати процеси які відбуваються у певному типі клітин організму.

В деяких випадках культура клітин є незамінною, як приклад, у випадку синтезу химерних білків, які потребують певних посттрансляційних, наприклад глікозилювання. Зростання масштабів використання рекомбінантних терапевтичних протеїнів в клінічній практиці, перетворення антитіл на потужний дослідницький інструмент, поступова відмова від тваринних моделей та сучасні досягнення у дослідженнях стовбурових клітин роблять культивування клітин повсякденною практикою у багатьох лабораторіях, та спонукає науковців до більш детального розуміння клітинних процесів які впливають на вирощування клітин в штучних умовах. На сучасному етапі розвитку культивування клітин постає питання не лише про виділення та підтримання життєдіяльності певних клітин, але про можливість маніпулювання та зміни клітини у культурі для наукових чи практичних потреб як то: створення рекомбінантних чи трансгенних клітинних ліній, модифікація клітин у лініях задля штучного контролю клітинної проліферації, підвищення клітинної виживаності, зменшення супутніх метаболічних продуктів (лактат, аміак тощо), збільшення продуктивності, регуляція посттрансляційних модифікацій тощо.

Оптимізація процесу культивування відбувається за рахунок декількох взаємопов'язаних факторів таких як: покращення середовищ та параметрів культивування (концентрація CO_2 , глюкози, факторів росту тощо) а також модифікації клітин за допомогою включення чи виключення певних генів.

Крім того вивчення морфологічних та кінетичних маркерів ліній клітин необхідне для коректного підтримання культури, та вчасного реагування на будь-які зміни в стані культури клітин. Відомо що за певних обставин культура

клітин може втратити притаманні їй властивості або загинути і, таким чином, призвести до некоректної інтерпретації результатів експерименту, втраті цінних наробок та часу.

Останнім часом дуже великі надії покладають на стовбурові клітини які мають високий потенціал до використання в медичних, генетичних, прикладних, та фундаментальних, дослідженнях. Висока проліферативна, та диференційна здатність стовбурових клітин робить їх надзвичайно привабливим об'єктом для розробок у галузі фармакології, персональної та регенеративної медицини.

Оскільки клітини в культурі легко доступні для різних біохімічних маніпуляцій, при роботі з ними токсиканти, ліки, гормони та ін. можуть бути введені в культуральне середовище в заданій концентрації і протягом заданого періоду. Кількість цих речовин може бути на порядок менше, ніж при експериментах на тварині, що є важливою перевагою при роботі з дорогими реактивами. Зникає також небезпека того, що речовина, що досліджується, метаболізується печінкою, запасється м'язами або екскретується нирками. При використанні клітинних культур, як правило, буває неважко встановити, що за певної концентрації речовина, що додається в культуру, знаходиться в контакті з клітинами протягом даного періоду часу. Це забезпечує отримання реальних значень швидкості поглинання чи розпаду досліджуваних речовин.

Очевидні переваги роботи з генетично однорідними клітинами та тканинами в контрольованих умовах поза організмом у порівнянні з проведенням дослідів на цілих організмах роблять цей метод одним з найбільш універсальних у медико-біологічних дослідженнях. Клітинні культури використовуються для вивчення закономірностей проліферації та контрольованої загибелі.

Застосування культури клітин у медицині.

Відновлення тканин та органів

Клітинна інженерія перевертає уявлення про медицину, використовуючи власні клітини пацієнтів для регенерації пошкоджених тканин та органів.

Наприклад, у випадках пошкодження серцевої тканини після інфаркту, культивування клітин дозволяє вирощувати нові клітини серцевої м'язової тканини з власних клітин пацієнта.

Це сприяє поліпшенню функції серця та зниженню ризику ускладнень.

Такі методи також використовуються для відновлення тканин шкіри після опіків чи травм або навіть для пересадки нових органів, що зростають з клітин донора.

Відновлюючи тканини та органи за допомогою культивування клітин, медицина відкриває нові можливості для лікування навіть найскладніших захворювань та пошкоджень.

Трансплантація клітин та органів

У культивуванні клітин регенеративна медицина стоїть на передовому фронті, надаючи надію на відновлення тканин та органів.

Трансплантація клітин та органів є одним із найбільш цікавих аспектів цієї галузі.

Зокрема, у випадках серцевих захворювань, де традиційні методи лікування неефективні, клітинна терапія виявляється перспективною.

Дослідження показують, що трансплантація кардіоміоцитів (клітин, що складають серцевий м'яз) може покращити функції серця та навіть попередити серцеві напади.

Також, розробка методів трансплантації клітин для лікування ниркової недостатності дозволяє пацієнтам, які потребують довготривалого діалізу, отримати можливість повернутися до нормального життя.

Вирощування штучних нирок або трансплантація клітин, які регенерують пошкоджені тканини, можуть значно полегшити їх страждання та покращити якість життя.

Ці інноваційні методи не лише проливають світло на майбутнє медицини, але також дають надію на те, що хворі люди зможуть знову насолоджуватися повним життям, без обмежень, які накладають на них хронічні хвороби.

Ракові захворювання

Лікування ракових захворювань за допомогою культивування клітин відкриває безмежні можливості для боротьби з цією смертельною хворобою.

Одним із передових методів є CAR-т клітинна терапія.

У цій техніці власні імунні клітини пацієнта модифікуються так, щоб вони могли розпізнавати та атакувати ракові клітини.

Так, CAR-T клітинна терапія вже змінила парадигму лікування лейкемії.

У 2017 році FDA схвалило перший CAR-T препарат для лікування деяких форм лейкемії у дітей та молодих дорослих.

Цей метод лікування показує вражаючі результати, використовуючи власні клітини пацієнта для ефективного знищення ракових клітин, що збільшує шанси на виживання і покращує якість життя хворих.

Нейродегенеративні захворювання

Культивування клітин відкриває нові перспективи у лікуванні нейродегенеративних захворювань, таких як хвороба Паркінсона та хвороба Альцгеймера.

Зокрема, дослідники змогли створити імплантати, які містять допамінергічні нейрони для лікування Паркінсона.

Ці імплантати можуть відновлювати втрачену функцію мозку та полегшувати симптоми хвороби, такі як тривожність та рухові порушення.

Також, застосування створених з клітин штабків мозкових тканин може забезпечити важливі інсайти у механізми розвитку хвороби Альцгеймера та відкрити двері до розробки нових методів лікування.

Такі досягнення відкривають надію на те, що культивування клітин може стати ключем до подолання цих нейродегенеративних захворювань, які становлять серйозний виклик для сучасної медицини.

Хронічні захворювання

Культивування клітин відкриває нові перспективи для лікування хронічних захворювань, які досі були важкими або неможливими для контролю.

Одним із прикладів є застосування клітинної терапії у лікуванні хронічного захворювання серця.

Дослідження показали, що культивовані клітини можуть бути використані для реконструкції пошкоджених серцевих тканин, покращуючи їх функцію та запобігаючи подальшому загибелі тканин.

Ще одним важливим напрямком є використання клітинної терапії для лікування хронічних захворювань легенів, таких як хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ).

Дослідження показали, що культивовані клітини можуть бути успішно використані для регенерації та відновлення пошкоджених тканин легенів, що дозволяє пацієнтам з ХОХЛ отримувати значне полегшення від симптомів та покращення якості життя.

Крім того, культивування клітин відкриває нові можливості для лікування хронічних захворювань шкіри, таких як діабетичні виразки.

Дослідження показали, що застосування стовбурових клітин або інженерних тканин може сприяти швидшому загоєнню виразок, зменшуючи ризик інфекцій та ускладнень.

Отже, застосування культивування клітин в лікуванні хронічних захворювань відкриває нові перспективи для покращення якості життя та тривалості життя пацієнтів, ведучи до істотних змін у медичній практиці.

Лекція 2

Обладнання та живильні середовища для роботи з клітинними культурами

Устаткування для очищення води

Якість води, що використовується для приготування живильних середовищ або для миття культурального посуду, має важливе значення. Донедавна така вода готувалась шляхом простої та дворазової дистиляції питної

води. В даний час поряд із традиційними широко застосовування отримали методи очищення води шляхом використання фізико-хімічних процесів зворотного осмосу, іонного обміну та мембранної фільтрації. Водопровідна вода, яка використовується як вихідна і пройшла в цих установках через очищення зворотним осмосом, надходить на фільтри з активованого вугілля, з них - на колонки з іонообмінними смолами і потім - на мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм. При необхідності вода додатково піддається впливу потужного потоку УФ-опромінення.

Для очищення води подібним способом найчастіше застосовують установки типу ОВ-1 (очищення води), що складаються з двох конструктивно самостійних частин, що допускають незалежне використання, - ОВ-2 і ОВ-3. Установка ОВ-2 здійснює приготування загальнолабораторної води, перевершує за якістю очищення дистильовану воду. Установка ОВ-3 призначена для отримання придатної для приготування живильних середовищ надчистої із загальнолабораторної або дистильованої води.

Прилади та апарати для миття та стерилізації посуду

Прилади та апарати для миття та стерилізації посуду забезпечують виконання всіх етапів технологічного процесу: попередню стерилізацію посуду, що надходить з досліду, насиченою водяною парою в парових стерилізаторах (автоклавах); попереднє замочування у водних розчинах хімічних реагентів (5% розчин гіпохлориту натрію, 3% розчин перекису водню і т. д.); полоскання після замочування холодною або трохи нагрітою водою; миття гарячим розчином детергенту з низьким піноутворенням; вторинне полоскання гарячою водою; фінішне полоскання дистильованої або загальнолабораторною водою; сушіння в сушильних шафах з примусовим продуванням гарячим повітрям; упаковку та фінішну стерилізацію у парових чи повітряних стерилізаторах.

Оптимальним варіантом для миття посуду є використання автоматичних мийних машин (Forma Scientific, Miele, Hotpack-Heinicke або вітчизняних машин типу РЗ-АММ).

Прилади для дозування, розведення та пробовідбору

У практиці робіт із клітинними культурами постійно виникає необхідність масового дозування, пробовідбору чи розведення біологічно активних рідин. Для цього використовуються автоматичні або напівавтоматичні пристрої, які називаються в різних джерелах дозатори-дилютори, автоматичні піпетки тощо.

Однією з основних вимог до таких приладів є відсутність контакту між дозованим розчином і частинами конструкції дозатора. Даним вимогам відповідають напівавтоматичні та автоматичні шприцеві дозатори, які проводять розведення або дозування одночасно двома каналами і можуть працювати як в автоматичному, так і напівавтоматичному режимах.

Автоматичний шприцевий дозатор типу «Дозатрон-4», що найчастіше застосовується, призначений для автоматичного дозування рідин в імунологічні планшети з мікрокуветами. Об'єм одиничної дози встановлюється залежно від цілей експерименту.

Піпетки лабораторні типу ПЛ-01, дозатори піпеткові типу КДП-1 та П1 виробляють напівавтоматичне дозування біологічно активних рідин. Піпетки лабораторні ПЛ-01 поставляються у наборах із 3 моделей. Величина дози задається користувачем у певному діапазоні (2-20 мкл, 20-200 мкл, 200-1000 мкл). Комплект дозаторів-піпетковий КДП-1 включає 8 моделей, кожна з яких забезпечує видачу 2 фіксованих за обсягом доз (від 5 до 1000 мкл). Комплект дозаторів П1 включає 5 моделей налаштованих на 1 фіксовану дозу (від 20 до 500 мкл). Всі зазначені типи пристроїв передбачають використання змінних наконечників, які можуть бути піддані парової стерилізації і повторно використовуватися.

Описані вище прилади дозволяють роботу з рідинами, нагрітими до 40°C і мають в'язкість, близьку до в'язкості води. Тим самим не забезпечується дозування поживних середовищ на основі агару, які для надання їм малої в'язкості повинні бути нагріті до температури не менше 60°C. У цьому разі використовуються прилади типу «Агар-1». Цей апарат для розливу живильних середовищ, що складається з перистальтичного насоса-дозатора та розливного механізму, забезпечує автоматичне одночасне заповнення протягом 1 хв 16

скляних чашок Петрі діаметром 100 мм, що знаходяться у спеціальних планшетах. Стерильні умови в апараті підтримуються шляхом УФ-опромінення його внутрішнього обсягу

В експериментах також застосовуються пристрої малої лабораторної техніки, які не є за своєю суттю дозаторами, але здатні полегшити цей процес. Це так звані прилади Pipet-Aid (фірми Flow, Bellco, Cole-Parmer та інші), призначені для пробовідбору та видачі дози при роботі з піпетками Пастера та будь-якими градуйованими піпетками ємністю до 75 мл. Піпетка вставляється в спеціальний утримувач, з'єднаний з малогабаритним вакуумним насосом, що знаходиться безпосередньо у тримачі, або автономно. Управління роботою приладу здійснюється натисканням кнопок, розміщених на утримувачі.

Пристрої для приготування живильних середовищ

Одним з головних вимог до рідких поживних середовищ для клітинних культур є їх стерильність, що досягається в ряді випадків і так званою стерилізуючою фільтрацією, що звільняє живильні середовища від домішкових частинок, бактерій та колоїдів.

Слід розрізняти мікро- та ультрафільтрацію середовищ. При мікрофільтрації рідини видаляються частинки домішок і бактерій розмірами від 0,25 до 10 мкм. Ультрафільтрація призводить до вилучення з розчину дуже дрібних частинок та колоїдів, а також молекул розчинених речовин з молекулярними масами від 1 тис. до 1 млн.

Процес мікрофільтрації здійснюється пропусканням рідини через мембранні чи глибинні фільтри. Ряд недоліків, властивих глибинним фільтрам, що виготовляються з вати, скловолокна, азбесту, порцеляни та інших матеріалів (наприклад, можливість зростання мікроорганізмів у масі фільтра, поглинання значних кількостей рідин, що фільтруються), роблять кращим використання при очищенні поживних середовищ мембранних фільтрів, які мають розміру та позбавлені перерахованих вище недоліків.

Мембранні фільтри виготовляються з різних полімерів, у тому числі що дозволяють стерилізацію (фторопласт, полівінілдендифторид, ефіри целюлози)

та забезпечують хімічну стійкість до компонентів живильних середовищ. Для стерилізуючої фільтрації живильних середовищ найчастіше використовуються мембранні фільтри діаметром 0,2-0,22 мкм. Для очищення поживних середовищ придатні мембранні фільтри, вироблені фірмами Millipore, Sartorius, Schleier-Shull, та інші.

У загальному випадку установка для стерилізуючої фільтрації складається з системи створення надлишкового тиску на рідину, що фільтрується, стерильного тримача фільтра, фільтруючої мембрани, трубопроводів і судин для розміщення фільтрованої рідини і фільтрату.

Для забезпечення руху рідини через фільтр до неї необхідно додати певний тиск ззовні. Подібний тиск може бути створений відцентровими силами, вакуумом на виході установки, але найчастіше для цієї мети використовується подача нейтрального газу (наприклад, азоту) під певним тиском у посудину із середовищем, що підлягає очищенню. Величина надлишкового тиску залежить від розміру пір та площі мембрани.

Приміщення для роботи з культурами клітин

Стерилізація живильних середовищ, як і решта маніпуляцій при роботі з клітинними культурами, проводиться в боксових приміщеннях або в ламінар-боксах.

Боксове приміщення являє собою ізольовану кімнату з несорбуючими пілпокриттями, що миються, що має передбоксник і забезпечену необхідним загальним і спеціальним освітленням, системами припливної і витяжної вентиляції, холодним і гарячим водопостачанням, а також підведенням газів і стисненого повітря.

Альтернативою боксовим приміщенням, що потребує менших витрат на обладнання, є ламінар-бокси, або стерильні робочі місця. В цьому випадку в будь-якому приміщенні може бути створений локальний стерильний об'єм, необхідний для роботи, що створює біологічний захист користувачів. Технічно завдання вирішується шляхом постійного обдування місця проведення робіт ламінарним потоком. Працюючи із свідомо непатогенними матеріалами потік

знепиленого повітря з робочої зони виходить у навколишній простір. У разі роботи з потенційно патогенним матеріалом повітря перед виходом із робочої зони додатково фільтрується, можливість обдування оператора при цьому виключено. Залежно від пристрою ламінар-боксу потік знепиленого повітря в робочій зоні може бути горизонтальним, вертикальним або похилим.

Ламінар-бокс з горизонтальним потоком знепиленого повітря типу УОБГ (установка знепилювання біологічна з горизонтальним потоком) забезпечує очищення повітря, що подається в робочу зону, шляхом фільтрації на фільтрах грубого і тонкого очищення, вбудованих в прилад (у міру забруднення грубий фільтр промивається, тонкий прилад має вбудовані джерела освітлення, УФ-опромінення (для стерилізації робочої зони у перервах між використанням боксу) та регулятор швидкості повітряного потоку.

Ламінар-бокс для робіт з потенційно патогенними культурами має деякі відмінності. У приладі забезпечується рециркуляція повітряного потоку, що полягає в тому, що повітря з робочого об'єму потрапляє на спеціальний фільтр тонкого очищення, звідки частина його виходить в навколишній простір, а решта потоку повторно проходить через фільтр тонкого очищення і знову надходить у робочий об'єм. Цим досягається неможливість винесення оброблюваного матеріалу до приміщення. Можливість попадання повітря, що виходить, на оператора запобігається створенням зони підсмоктування на відкритій стороні робочого об'єму боксу. Прилад має вбудовані джерела світла та УФ опромінення, стільницю з нержавіючої сталі. Передня частина робочого об'єму закрыта прозорим склом, що переміщується по висоті. Бокс забезпечений системою регулювання швидкості потоку повітря та індикаторами забруднення фільтра тонкого очищення.

Перераховані вище типи ламінар-боксів призначені для розміщення в будь-яких виробничих приміщеннях, що мають припливну вентиляцію з грубим попереднім очищенням повітря.

Устаткування культуральних лабораторій

Лабораторні термостати для культивування клітин повинні відповідати низці спеціальних вимог: 1) забезпечувати високу стабільність підтримання заданої температури; 2) створювати мінімальний градієнт температури за корисним об'ємом; 3) мати систему швидкого відновлення температури після короткочасного відкривання корисного об'єму; 4) внутрішній обсяг має виготовлятися з біологічно пасивних матеріалів, т. е. які не впливають на життєдіяльність клітин і стійких до впливу компонентів живильних середовищ.

Матеріали та покриття внутрішніх та зовнішніх частин конструкції термостату повинні дозволити деконтамінацію водними розчинами спирту ректифікату та стерилізацію УФ опроміненням.

За своєю конструкцією лабораторні термостати поділяються на рідинні та повітряні. У рідинних термостатах корисний об'єм оточений ємністю, наповненою дистильованою водою, яку власне нагрівають. Повітряні термостати мають корисний об'єм, що безпосередньо контактує з електронагрівальними елементами. Рідкі термостати забезпечують малі значення температурного градієнта в камері, але мають дуже велику теплову інерцію і тому тривалий час входження в робочий режим. Удосконалені форми повітряних термостатів, які раніше поступалися рідинним по ряду основних параметрів, тепер становлять початкову частину моделей, що серійно випускаються.

CO₂-інкубатори. Необхідність підтримки постійної величини рН у живильному середовищі та її мінімального випаровування в період інкубації клітин призвела до розробки спеціальних приладів, аналогічних до описаних вище термостатів. Головною відмінністю є наявність систем створення та підтримки певного складу газового середовища в корисному обсязі та високої відносної вологості у ньому. Це звані вуглекислотні інкубатори, що випускаються фірмами «Heraeus», «Hotpack», «Flow».

Газове середовище в камерах CO₂-інкубатора містить підвищену концентрацію кисню та вуглекислого газу, а в більшості випадків лише вуглекислого газу. Величина концентрації задається умовами культивування та підтримується автоматично. В автоматичних CO₂-інкубаторах заданий склад

газового середовища підтримується дозованим надходженням потрібного газу в потік очищеного від пилу зовнішнього повітря, що подається у внутрішній об'єм приладу. Іншим різновидом інкубаторів є звані газо-проточні інкубатори типу ГПІ-1, де подача необхідних газів проводиться безперервно, а точний відсотковий вміст досягається зміною швидкості потоки.

Аератори. Для забезпечення аерації культурального середовища – постачання киснем – використовують повітря, а також повітря, збагачене киснем, рідше – чистий кисень. Процеси, які протікають без доступу кисню (анаеробні), залежать від газоподібних субстратів і вимагають відведення газоподібних продуктів життєдіяльності. Аератори – основний приклад функціонуючих систем газопостачання та газовідведення.

Лабораторні струшувачі

Велике значення в оснащенні лабораторії, призначеної для культивування клітин, мають прилади, що забезпечують примусове перемішування живильних середовищ з вміщеними клітинними культурами, забезпечуючи кращий газообмін і тим самим підвищуючи ефективність культивування. Більшість моделей струшувачів дозволяє перемішування в одному режимі – обертальному чи зворотно-поступальному. Хоча найсучасніші моделі (фірма «Infors») є універсальними, тобто працюють у різних режимах перемішування. Ролерні установки – апарати, що дозволяють успішно застосовувати один із загальноприйнятих методів культивування клітин – вирощування їх у циліндричних судинах з боросилікатного скла з невеликою кількістю живильного середовища, що обертаються в горизонтальному положенні зі швидкістю 8 оборотів/хв, забезпечуючи постійне перемішування живильного середовища та керування. Для підвищення ефективності масового культивування установки забезпечені системою, яка дає можливість замінювати живильне середовище та видаляти супернатант без зупинки обертання. Для цього судини постачаються спеціальними перфузійними пробками, в яких центральна частина обертається незалежно від периферійної. У цю частину пробки вводяться трубки для зміни живильного середовища, видалення

супернатанту та введення інокулята. До складу цієї системи також входять перистальтичні насоси та блок автоматики, що регулює їхню роботу.

Лабораторні ферментери. Це комплекси приладів та апаратів для масового суспензійного чи глибинного культивування клітинних та бактеріальних культур. У лабораторній практиці ферментери використовуються для ведення науково-дослідних робіт або відпрацювання технології масового культивування (пілотні біореактори).

У загальному випадку ферментер складається з культиваційної судини, насосів та сполучних трубопроводів (для подачі живильного середовища, газів, інокуляту та відбору продукту), вимірювальних приладів та регуляторів, що керують температурою середовища в посудині, її рН, окислювально-відновним потенціалом та іншими параметрами.

У лабораторній практиці найчастіше застосовують ферментери з ємністю судин від 1 до 20 л, для відпрацювання технологій – від 30 до 400 л. У всіх випадках живильним середовищем заповнюється трохи більше 75% обсягу судини (рис. 1).

Частини ферментерів, що контактують з живильним середовищем (судини, з'єднувальні трубопроводи, насоси та ін.), виготовляються з біологічно пасивних, хімічно стійких матеріалів, що дозволяють здійснювати стерилізацію насиченою водяною парою (якісна нержавіюча сталь, фторопласт, боросилікатне скло, силіконова гума).



Рис. 1. Лабораторні ферментери різної ємності

Судини ферментерів мають циліндричну (рідше конічну) форму. У них розміщені датчики температури, рН, кисню, і навіть система для аерації живильного середовища, що здійснюється за рахунок барботування газів (подача газів знизу через барботер) через живильне середовище чи поєднанням продувки газів з механічним перемішуванням середовища.

При використанні механічних мішалок їх з'єднання з приводним двигуном здійснюється за допомогою магнітних муфт, що знижує ризик забруднення живильного середовища. Крім механічного та пневматичного перемішування використовуються також системи циркуляційного (гідродинамічного) перемішування спрямованим струмом рідини по замкненому колу за допомогою насосів.

Більшість культур, що перемішуються і аеруються, під час зростання утворюють досить багато піни. Утворення на поверхні середовища культивування шару з бульбашок пов'язане з наявністю в середовищі поверхнево-активних речовин (ПАР), до яких належать продукти розпаду жирів - мила, а також білки. ПАР включають як полярні іонні, так і неполярні сполуки. Заряджені групи мають спорідненість до водної фази, а нейтральні виштовхуються у повітряну фазу, де, вбудовуючись у стінки газових бульбашок, збільшують час їхнього життя.

Помірне піноутворення сприяє зростанню багатьох аеробних мікроорганізмів (пінний шар – кисневий коктейль). Особлива увага приділяється боротьбі з надлишковим піноутворенням, оскільки якщо не перешкоджати цьому, піна змочує фільтри для стерилізації повітря, що призводить до контамінації культури сторонньою мікрофлорою, зменшення корисного об'єму біореактора, а також виходу піни назовні. Контроль піноутворення здійснюється шляхом введення у посудину спеціального датчика. Для боротьби з надлишковим піноутворенням використовується механічне та хімічне піногасіння. При механічному піногасінні лопаті піногасника розміщуються на

валу мішалки. При хімічному піногасінні в кришці судини передбачається спеціальне введення для реагенту гасіння. Хімічні піногасники дешевші, їх застосовують іноді за необхідності придушення піноутворення. Однак при додаванні цих речовин може змінюватися склад живильного середовища. Піногасні речовини рослинного (кукурудзяна, рицинова, соєва, соняшникова олія, олія з насіння бавовнику та інші) та тваринного (свинячий, яловичий, баранячий, китовий та інші жири) походження можуть служити мікроорганізмам джерелом вуглецю та енергії і, отже, стимулювати їх активний розвиток. Однак відомі випадки, коли природні піногасники мали негативний вплив на метаболізм клітини. А такі неметаболізовані піногасники, як силікони, у високій концентрації токсичні. Тому піногасники, які є поверхнево-активними речовинами, слід використовувати тільки в дуже низьких концентраціях і після ретельної перевірки. Піногасники додають безпосередньо в середу перед стерилізацією або ферментер через спеціальний ввід.

Культуральний посуд. Основна частина асортименту спеціального культурального посуду призначена для зростання клітин у моношарі, що визначає особливі вимоги до властивостей поверхні та матеріалу виробів як зі скла, так і із пластику. Для культивування клітин зазвичай використовують флакони, колби, матраци, чашки Петрі, плати, ролерні судини, пробірки, піпетки і т.д.

Посуд зі скла

Хоча останніми роками широко застосовується пластиковий посуд одноразового використання, посуд зі скла не втратив свого значення завдяки низці безперечних переваг: хороші адгезійні властивості поверхні, що сприяють прикріпленню клітин; багаторазовість використання; біологічна інертність скла низьки складів; термостійкість та інші. Крім того, в експериментах з контрольованим рівнем кисню необхідно користуватися саме скляним посудом, тому що в пластику кисень може розчинятися. Крім цього, з пластику можуть екстрагуватися водорозчинні органічні сполуки.

Для скляного лабораторного та культурального посуду на практиці в основному застосовуються два типи – багатолужне та малолужне боросилікатне скло типу «Пірекс». Лужне силікатне скло має недостатню термостійкість і хімічну стійкість до води, кислот і лугів. Алюмоборосилікатне малолужне скло типу «Пірекс» характеризується високою стійкістю до води, стійкістю до лужних розчинів і до всіх кислот, за винятком плавикової фтористоводневої і гарячої фосфорної. Крім того, скло типу «Пірекс» має хороші оптичні властивості.

Існує також група макропористого скла, яке не використовується для виготовлення посуду, але застосовуються при культивуванні клітин як мікроносії.

Однак успіх в експерименті забезпечується не лише якістю скла, а й ступенем підготовки лабораторного посуду. Посуд для культивування має бути чистим фізично, хімічно та бактеріологічно.

Пластиковий посуд

Починаючи з 1965 р. все більше застосування в лабораторній практиці знаходить пластиковий посуд одноразового використання. При роботі з культурами клітин пластиковий посуд в окремих випадках більш придатний через характерні особливості деяких клітинних ліній. Такий посуд простий у використанні, тому що випускається в стерильному, готовому до роботи вигляді. Стерилізація проводиться у процесі виготовлення фізичними (опромінення УФ світлом або гамма-променями) або хімічними (гази – окис етилену, рідини – етиловий спирт, розчин пергідролю) способами. Пластиковий посуд виробляється у двох модифікаціях: для культивування мікроорганізмів та для культивування клітин.

Такий поділ викликаний тим, що клітини, що культивуються (йдеться про моношарове культивування) на відміну від бактеріальних клітин знаходяться в безпосередньому контакті з поверхнею судини, яка є для них субстратом. Клітини осідають на цій поверхні, прикріплюються та розпластуються. Для поліпшення адгезійних властивостей поверхні з полістиролу піддають її спеціальній обробці, в той час як біологічний посуд не обробляється.

Таким чином, однією з перших умов успішного культивування клітин є хороший субстрат, тобто посуд, що забезпечує максимальну адгезію, розпластування і, отже, зростання.

Субстрати для культивування біооб'єктів

Принципи складання поживних середовищ

Усі живі клітини потребують екзогенних джерел живлення, які у поживних середовищах. Поживне середовище забезпечує життєдіяльність, зростання та розвиток біооб'єктів.

Перш ніж розпочинати роботи з культивування різних типів клітин, необхідно точно знати їх поживні потреби та залежності.

Постійним компонентом живильних середовищ є вода, якої потребують всі живі клітини. Поживні речовини утворюють у воді істинні (мінеральні солі, цукру, амінокислоти, карбонові кислоти, спирти, альдегіди) або колоїдні (білки, ліпіди, неорганічні сполуки) розчини. Деякі компоненти живильних середовищ, що знаходяться в твердому агрегатному стані, можуть утворювати придонний осад, або рівномірно розподілятися по всьому об'єму у вигляді суспензії, або плавати на поверхні розчину (частки вугілля). Рідкі вуглеводні при внесенні у воду утворюють фракцію, що не змішується.

У живильному середовищі повинні бути присутніми всі елементи, необхідні для побудови компонентів живих клітин у доступній для засвоєння формі. У великій кількості клітин необхідні макроелементи: вуглець, азот, кисень, водень, фосфор, сірка, калій, кальцій, магній. Постачання клітин киснем та воднем здійснюється за рахунок води. Вуглець є складовою всіх органічних сполук і його джерела численні і різноманітні: найчастіше цукор, багатоатомні спирти та органічні кислоти. Як азотистий субстрат для виготовлення поживних середовищ служать в основному білки тваринного та рослинного походження.

Крім макроелементів, клітини у незначних кількостях потребують також і деяких мікроелементах: натрій, марганець, нікель, кобальт, хлор, цинк, мідь, кремній, молібден, бір, ванадій і деякі інші.

Крім основних пластичних та енергетичних компонентів, живильні середовища можуть містити і так звані фактори зростання. Це органічні сполуки (вітаміни, амінокислоти, пуринові та піримідинові основи та ін.), яких потребують ауксотрофні клітини і які вони синтезувати не в змозі. Відсутність таких речовин призводить до порушення обмінних процесів та припинення зростання клітин.

Як необхідні компоненти живильних середовищ можуть виступати гази: добре (NH_3 , H_2S), помірно (CO_2) або погано (N_2 , O_2 , H_2 , CH_4) розчинні у воді.

Поживні середовища можуть мати невизначений склад, тобто включати біогенні добавки (рослинного, тваринного або мікробного походження), наприклад м'ясний екстракт, дріжджовий екстракт, кукурудзяне борошно, морські водорості і т. д. Такі живильні середовища називаються натуральними. Застосовують також середовища, виготовлені з суто хімічних сполук у заздалегідь визначених співвідношеннях. Це звані синтетичні середовища. Застосування знаходять і напівсинтетичні живильні середовища, що поєднують у своєму складі компоненти як натуральних, так і синтетичних середовищ.

Середовища даних типів мають як переваги, і недоліки. З економічної точки зору найдоцільніше використання природної, дешевшої сировини, ніж речовин у чистому вигляді, отриманих хімічним шляхом. Однак тільки застосування середовищ строго певного складу дозволяє точно реєструвати і регулювати процеси, що протікають в культуральному середовищі, домагаючись їх оптимізації. Компромісним підходом є використання напівсинтетичних середовищ, до складу яких разом із сполуками відомої хімічної природи входять біогенні добавки.

Лекція 3

Основні методи культивування клітин поза організмом

Методи традиційної біотехнології, що засновані на культивуванні клітинних культур, знаходять все більше розповсюдження в різних областях сучасних досліджень. На відміну від мікроорганізмів, культури клітин вищих організмів являються порівняно новими об'єктами, однак на даний час існує можливість культивування клітин практично всіх тканин і органів людини, тварин і рослин.

Культивування клітинних культур стає основою сучасних наукоємних технологій, наприклад в генній інженерії – застосування моноклональних

антитіл, отриманих методами гібридомної технології, біотехнології – отримання біологічно активних речовин, вакцин, діагностиків, клітин-продуцентів; у медицині – замісна клітинна терапія.

Актуальність даної проблематики полягає в знаходженні оптимальних умов для культивування клітин, що в значній мірі визначається здатністю клітин розмножуватися на поверхні субстрату або в суспензійній культурі. Проблема забезпечення оптимальних умов для культивування клітин тварин, рослин і людини поза організмом ще далека від вирішення.

Щоб показати здатність клітин рости і ділитися в культурі, потрібно було опанувати низку підходів та методик.

1. Методики отримання клітин, вільних від екзогенних прокаріотів та грибів.
2. Методики розробки середовища, у яких зростання «вирізаних із тканини» чи ізольованих клітин не придушується.
3. Методики спостереження за клітинами у поступовій динаміці розвитку.
4. Методики безперервного культивування культур клітин *in vitro* та підтримки їх вільними від інших біологічних агентів.

Наукову основу для розробки цих методик становить уявлення про клітину як основний структурний елемент живих організмів тваринного та рослинного походження. Ідея про те, що клітини тканин тварин можна виділити з організму і потім створити умови для зростання та відтворення їх *in vitro* виникла на базі концепції, що належить Клоду Бернару. Він припустив, що не тільки живі організми здатні зберігати сталість внутрішніх умов, незалежно від змін у навколишньому середовищі. Клітина поза організмом тварини теж прагнутиме підтримувати свої внутрішні умови. Якщо відмінності між внутрішніми та зовнішніми умовами будуть незначними, то висока ймовірність зростання та поділу клітини. Таке розуміння явища призводить до необхідності розробки середовищ, здатних підтримувати та стимулювати зростання клітин поза організмом.

Спосіб вирощування, характер, середовище, методи управління і контролю в значній степені залежать від типу вирощуваних клітин. Тут можна розглядати

два основні напрямки досліджень: біотехнологія культивування клітин тварин і людини та біотехнологія культивування клітин рослин.

Розвиток біотехнології культивування клітин тварин і людини відбувається в двох основних напрямках: культивування культур клітин та культивування культур органів і тканин (органні культури).

Системи культивування тваринних клітин і тканин можуть бути моношаровими, коли клітини розвиваються на поверхні скла, пластика або поверхні спеціальних носіїв та суспензійними – клітини ростуть вільно (подібно до мікроорганізмів) в суспензії.

Для крупномасштабного культивування характерним є отримання суспензійних культур, для якого необхідна промислова апаратура, що відповідає вимогам раціональності конструкції, забезпеченню інтенсивного перемішування середовища та створення делікатних умов культивування. Створення таких умов має дещо проблемний характер, оскільки, незважаючи на те, що для культивування тваринних клітин використовують ті ж технічні засоби, що і для культивування мікроорганізмів, необхідним постає відсутність механічних пошкоджень клітин, які є менш міцними, ніж мікроорганізми. Внутрішня поверхня реактора повинна бути гладкою, а механічна мішалка не повинна створювати сильне турбулентне середовище. Крім того, більшість клітин потребують розвиненої поверхні для свого росту.

Слід також відмітити деякі особливості культивування рослинних клітин. Культури клітин рослин, як правило, вирощуються у вигляді суспензії в рідкому поживному середовищі, або калюсної культури на твердій поживній основі. Культивування недиференційованих клітин і калюсу вимагає дотримання певного балансу гормонів зростання рослин ауксинів і цитокинінів. Проте промислове виробництво більшості з цих культур, за винятком, наприклад, продуцентів шиконіна, поки що економічно не вигідне. Потрібне подальше удосконалення технології культивування клітин і підвищення їх продуктивності.

Метод культивування клітин, тканин та органів рослин *in vitro* передбачає експлантацію об'єкту, ізольованого від рослинного організму, на

живильне середовище певного складу, його культивування у визначених умовах оточуючого середовища та отримання цільових продуктів культивування як то калюсна тканина, соматичні зародки, суспензія рослинних клітин, суспензія протопластів, рослини-регенеранти тощо. Управління процесами морфогенезу, диференціації, дедиференціації, росту та розвитку у експлантованих об'єктах, культивованих клітинах та тканинах здійснюється через варіювання якісного та кількісного складу компонентів живильних середовищ, зокрема, фітогормонів, вітамінів, вуглеводів, а також різноманітних технік експлантації і трансплантації, умов культивування. Основні принципи культивування рослинних об'єктів *in vitro* спрямовані на забезпечення їх всім необхідним для росту та розвитку, створення і підтримання асептичних умов культивування.

Об'єктами культивування in vitro залежно від поставленої мети та задач можуть бути:

- цілі рослинні організми, наприклад, у вигляді зародків, невеликих рослин;
- ізольовані органи, такі як корені, сім'ядолі, гіпокотилі, пиляки, сім'язачатки, стебла, квітки, пуп'янки, листки, насіння, плоди, – цілісні або подрібнені на сегменти;
- ізольовані тканини, наприклад, флоема, ендосперм, калюсна тканина;
- ізольовані клітини;
- ізольовані протопласти.

В основі культивування рослинних клітин лежить властивість тотипотентності, завдяки якій соматичні клітини рослини здатні повністю реалізовувати спадкову інформацію, тобто забезпечити розвиток всієї рослини, оскільки на відміну від тваринної, рослинна клітина менш вимоглива до умов культивування.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калюс. *Калюсна тканина* – один із видів клітинного поділу, яка виникає в результаті неорганізованої проліферації диференційованих клітин органів рослини. Вона

захищає місце поранення, може накопичувати поживні речовини для анатомічної регенерації або регенерації втраченого органу.

Процесу утворення калюсу передують дедиференціація тканин експланта, в результаті якої втрачається структура, характерна для перебігу специфічних функцій в рослині, і повернення до стану клітин, що діляться. Якщо експлант є фрагментом органу, то він в своєму складі має епідермальні клітини, клітини камбію, судинної системи, серцевину і первинну паренхіму. Переважно діляться клітини камбію та серцевинної паренхіми.

Різне походження тканин калюсних клітин є однією з причин гетерогенності калюсної тканини, оскільки деякі функціональні особливості початкових клітин передаються у ряді клітинних поколінь як стійкі модифікації (рис. 2).

Виділяють два типи культивованих рослинних калюсних клітин: нормальні і пухлинні.

Нормальні клітини в культурі можуть існувати в двох видах: у вигляді суспензії на рідкому поживному середовищі і на поверхні твердого поживного середовища у вигляді калюсу.

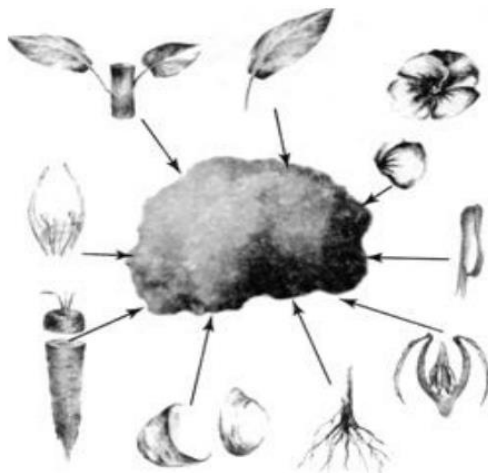


Рис. 2. Типи клітин і тканин, з яких можна отримати калюс

Поверхнєве культивування проводиться в напіврідкому агаризованому середовищі, на дисках з поліуретану, на містках з фільтрувального паперу, напівзанурених в рідке поживне середовище. Придатні для цих цілей і вата,

оброблена поживним середовищем, які зверху покриваються фільтрувальним папером, фольгою.

Пухлинні клітини морфологічно мало відрізняються від калюсних. Фізіологічною відмінністю є гормонезалежність пухлинних клітин. Завдяки цій властивості вони діляться і ростуть на поживних середовищах без фітогормонів та позбавлені здатності започаткувати нормально організовані структури (коріння, пагони) в процесі органогенезу, іноді утворюють тератоми (потворні органоподібні структури), подальший розвиток яких неможливий.

Калюсна тканина, що вирощується поверхневим способом, є аморфною масою тонкостінних паренхімних клітин, що не має чіткої анатомічної структури.

Суспензійні культури – окремі клітини або групи клітин, що зависло вирощуються в рідкому середовищі і є відносно гомогенною популяцією клітин, яку легко піддавати впливу хімічних речовин.

Клітинну суспензію отримують, поміщаючи калюсну тканину в колбу із рідким поживним середовищем. Суспензія перемішується в колбі на гойдалці, зі швидкістю 100-120 об/хвилину. При першому перенесенні на свіже середовище видаляють крупні шматочки початкового калюсу і крупні агрегати, фільтруючи через 1-2 шару марлі, нейлонові сита, шприц з відповідним отвором. Для ініціалізації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої маси калюсної культури на 60-100 мл рідкого поживного середовища. Для кожної лінії культури клітин існує мінімальний об'єм інокулята, при меншому розмірі якого культура не росте.

Для глибинного культивування рослинних клітин розроблені два види систем культивування: відкрита і закрита.

Для *закритої системи* характерний періодичний режим вирощування. Клітинна маса (інокулят) переноситься в певний об'єм середовища. Система закрита по всіх параметрах, окрім газів, до кінця вирощування. Періодично подається свіже поживне середовище, а стара віддаляється в тому ж об'ємі.

Клітини залишаються в системі протягом всього циклу вирощування. Це найбільш вивчене і поширене культивування.

Відкриті (проточні) культури характеризуються надходженням свіжого поживного середовища, при якому видаляється не тільки старе поживне середовище, але і частина виробленої клітинної маси.

Відмінна особливість суспензійних культур клітини рослин – висока щільність, необхідна для нормального росту. Тому важливим, при культивуванні клітин рослин, є збільшення її в'язкості та створення умов для росту біомаси, яке призводить до адгезії (прилипання клітин один до одного, на поверхнях культуральної ємності).

Періодичне, або накопичувальне, культивування – це найпростіший спосіб вирощування клітин поки є традиційним.

Інший метод «годуєчого шару» полягає в тому, що використовують суспензію клітин того ж виду, що і певна клітина близького виду. Клітинна суспензія повинна знаходитися в ранній експоненціальній фазі росту.

Індукція подвоєнь окремих клітин можлива при застосуванні дуже багатого поживного середовища (середовища Као і Михайлюка). При цьому об'єм середовища, в яке переносять клітини, повинен бути мінімальним (мікрокраплі об'ємом до 20 мкл).

Всі ці способи культивування дозволяють клітині «відчувати» фактор кондиціонування (речовина, що стимулює ділення окремих клітин). Він або виробляється в достатній кількості клітинами «годуєчого шару», «тканини-няньки», або міститься в суспензії, де раніше культивувалися клітини, або розбавляється у великому об'ємі середовища.

Таким чином, фактор, що викликає ділення клітин, виробляється самими клітинами, але в невеликій кількості. Збільшувати число клітин, що його виробляють можна до тих пір, поки він не розбавляється у великих об'ємах поживного середовища, або ж зменшувати його об'єм, в якому вирощуватиметься клітина, змусивши її ділитися.

Окремі клітини культивують для отримання клонів, вивчення їх генетичної і фізіологічної мінливості або стабільності. Зазвичай, в такі клітини вводять маркерні гени, які дозволяють запроваджувати селекційні методи виведення нових сортів сільськогосподарських культур.

Протопласти є унікальною моделлю для вивчення фундаментальних фізіологічних проблем у рослин.

Існують два способи культивування протопластів: метод рідких крапель (суспензію протопластів у вигляді крапель поміщають на пластикові чашки Петрі) і метод платування (суспензію протопластів наливають в пластикові чашки Петрі).

На проліферацію клітин, що виникли із протопластів впливає: видова специфічність і фізіологічний стан початкової тканини рослини; спосіб і умови виділення протопластів; щільність висіву протопластів; склад поживного середовища.

Новим підходом, спрямованим на збільшення виходу вторинних метаболітів, є іммобілізація клітин і тканин рослин. Існує 2 типи систем культивування іммобілізованих клітин:

- система культури із плоскою основою, клітини вирощуються в горизонтально розташованій ємкості;
- система колоночної культури, де клітини вирощуються у вертикальній ємкості.

В обох системах рідке середовище циркулює навколо фізично нерухомих клітин. Не дивлячись на переваги іммобілізації клітин на плоскій основі, їх промислове культивування має істотний недолік: горизонтальна конструкція апарату створює незручності при роботі і вимагає великої площі. Ці недоліки усуваються системою колоночної культури. При її використанні зростає число клітин, на які подається середовище, що збільшує «зону подачі», де відбувається накопичення значної кількості вторинних метаболітів.

За результатами досліджень рекомендовані загальні підходи до культивування клітин на основі отриманих результатів:

- клітини повинні вирощуватися фізично стаціонарно, в тісному контакті одна з одною, щоб стимулювався розвиток фізичних і хімічних градієнтів, забезпечуючи часткове диференціювання культури. Деякі види рослин необхідно культивувати при освітленні і індукувати утворення хлоропластів, щоб забезпечити рівень метаболізму, близький до клітин інтактної рослини;

- склад поживного середовища і рівень кисню необхідно регулювати для уповільнення росту культури. Рекомендується використовувати регулятори росту для імітації процесів диференціації, що відбуваються *in vivo*.

- клітини необхідно забезпечувати попередниками, але в низьких концентраціях. Попередники повинні бути максимально близькі в ланцюжку перетворень до початкового продукту;

- бажано використовувати клітини, які секретують необхідні метаболіти в поживне середовище або клітини, у яких таку секрецію можна індукувати.

Відповідно до цілей і завдань експериментальної роботи можна виділити **два напрями культивування клітин тварин:**

- культури клітин;
- культури органів та тканин (органні культури).

Культури клітин позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістіотипічну архітектуру та пов'язані з нею біохімічні ознаки та зазвичай не досягають рівноважного стану за відсутності спеціальних умов. Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує отримання великої маси клітин, потім їх ідентифікують (за фенотиповими ознаками шляхом вирощування в селективному середовищі генотипове), поділяють на ідентичні паралелі і, якщо це необхідно, зберігають. Динамічні властивості клітин, що культивуються, часто важко контролювати, також важко реконструювати *in vitro* деякі клітинні взаємодії, що спостерігаються *in vivo*. У зв'язку з цим деякі дослідники вважають за краще використовувати клітинні системи, що зберігають структурну цілісність вихідної тканини.

Застосовують такі *системи культивування клітин*.

1. Непроточні культури – тип культур, у якому клітини вводять у фіксований обсяг середовища. У міру зростання клітин відбувається використання поживних речовин та накопичення метаболітів, тому середовище має періодично змінюватися, що призводить до зміни клітинного метаболізму, званого ще й фізіологічним диференціюванням. Згодом, внаслідок виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Усі системи непроточних культур характеризуються накопиченням відходів у тій чи іншій формі та мінливістю зовнішніх умов.

2. Проточні культури забезпечують справжні гомеостатичні умови без зміни концентрації поживних речовин та метаболітів, а також кількості клітин. Гомеостаз обумовлений постійним входженням середовища у культуру та одночасним видаленням рівного обсягу середовища з клітинами. Такі системи придатні для суспензійних культур та моношарових культур на мікроносіях.

Напрямки культивування клітин тварин можна розглядати як суспензійні культури та моношарові культури.

Суспензійні культури краще з точки зору збільшення виходу клітин.

Для нарощування клітинної маси зручніше використовувати не моношарові, а суспензійні культури. Як правило, клітини, що відокремилися від субстрату, на якому вони росли, нездатні до зростання суспензії і швидко деградують. Але якщо деякі клітини культивувати у флаконі (2 об/хв), що не дає можливості прикріплення клітин до поверхні, в середовищі, що містить метилцелюлозу, що запобігає агрегації клітин, можна отримати життєздатні суспензійні клітинні штами. Іноді цього досить для отримання суспензійної культури, але зазвичай потрібні спеціальні судини для культивування суспензій і використання середовища з дефіцитом іонів кальцію і магнію.

Моношарове культивування клітин, або моношарова культура, – це техніка, яка використовується в клітинній біології для вирощування клітин в одному шарі на поверхні культуральної посудини. Це означає, що клітини ростуть, прикріплюючись до субстрату, а не утворюючи тривимірні скупчення.

Основними моментами моношарового культивування є:

- прикріплення до поверхні: клітини прикріплюються до певної поверхні (наприклад, пластику, скла, або обробленого желатином) і розмножуються, утворюючи один шар клітин.
- умови культивування: клітини ростуть в контрольованому середовищі, яке забезпечує необхідні поживні речовини, фактори росту та відповідні умови для їх виживання та розмноження (температура, рН, газовий склад).
- переваги: моношарова культура забезпечує стабільні умови для клітин, що полегшує їх дослідження та маніпуляції. Вона також дозволяє легко контролювати кількість клітин та їхню поведінку.
- обмеження: не всі клітини можуть культивуватися у моношарі, оскільки деякі клітини потребують тривимірного середовища для нормального росту та функціонування
- застосування: моношарова культура використовується для вивчення клітинної біології, тестування лікарських препаратів, виробництва біологічних продуктів (наприклад, вакцин, моноклональних антитіл), а також у регенеративній медицині.

Існує багато різних різновидів способу культивування на мікроносіях.

Розглянемо три основні напрями:

1. Культивування у плоских флаконах (матрацах).
2. Культивування в бутлях, що обертаються, коли в кожен момент часу 15-20% поверхні пляшки покрито живильним середовищем, а клітини знаходяться поперемінно то в середовищі, то в повітрі.
3. Культивування в колонках на мікроносіях, в якості яких виступають щільно упаковані скляні намисто діаметром 35 мм, що не зміщуються, стопка пластин та ін., а живильне середовище омиває їх, протікаючи зверху вниз.

Клітини можуть зростати на дрібних сферичних носіях. У такому разі вони можуть розглядатися як клітинні суспензії та для їх вирощування можуть застосовуватися процеси та апарати, розроблені для суспензійних культур. Таке культивування використовується в промисловості для одержання вакцин та

інтерферону у ферментерах об'ємом до 1000 л. У цьому культивуванні використовуються первинні культури клітин.

На жаль, успішне вирощування клітин людини виходить лише у ферментерах лабораторного типу (об'єм реакторів до 20 л).

Хоча велика кількість клітин тварин взагалі не виживають у суспензійних культурах, для збереження життєздатності їм необхідне утворення міжклітинних контактів (наприклад, культури клітин людини VJ-88, МЯС-5), суспензійні культури більш технологічні та використовують для нарощування клітинної маси.

Лекція 4

Характерні особливості клітин в культурі

Клітини рослин

Методи культивування ізольованих фрагментів рослин ґрунтуються на дослідженні важливої властивості рослинної клітини – тотипотентності.

Тотипотентність (лат. Totus – весь, potentia – сила) – це властивість клітини реалізувати генетичну інформацію, що забезпечує її диференціювання та розвиток до цілого організму.

Тотипотентність мають запліднені яйцеклітина тваринних організмів. Що стосується диференційованих клітин, то у тварин тотипотентність властива лише деяким клітинам кишковопорожнинних. Так, соматичні клітини гідри дають початок новому організму. У вищих тварин навіть на ранніх етапах ембріогенезу, з початком спеціалізації клітин, тотипотентність не реалізується. Однак клітини, ізольовані з ембріонів ссавців, в умовах культивування здатні зберігати плюрипотентність – здатність диференціюватися у всі типи клітин як власне зародка, так і екстраембріональних тканин. Такі клітини отримали назву

ембріональних стовбурових клітин, з ними пов'язують вирішення проблеми пересадки тканин.

У рослин у природних умовах тотипотентність можуть виявляти і спеціалізовані клітини. Приклад тому – вегетативне розмноження, зокрема спостереження внаслідок розвитку рослин із клітин листя бегонії, каланхое та інших.

Тотипотентність у рослин реалізується при загоєнні ран; на рановій поверхні рослин в результаті неорганізованої проліферації клітин відбувається розвиток калюсу (лат. *Callus* – мозоль, товста шкіра).

Калюс сприяє загоєнню ран. Однак багато однодомних рослин втратили здатність до утворення калюсу та вегетативного розмноження.

В експериментальних умовах *in vitro* при вирощуванні фрагментів тканин, органів (експлантів) або клітин на штучних живильних середовищах можлива реалізація супресованої (пригніченої) *in vivo* тотипотентності. Це здійснюється під дією регуляторів росту та розвитку фітогормонів. Реалізація супресованої *in vivo* тотипотентності найлегше здійснюється як при культивуванні меристематичних клітин, ізольованих з кінчиків коренів та бруньок та використання складних за складом культуральних середовищ, так і при культивуванні калюсу. Ці підходи були успішно реалізовані в 30-ті роки у роботах американського дослідника Філіпа Уайта та французького дослідника Роже Готре, яких прийнято вважати родоначальниками сучасних методів культивування ізольованих органів та тканин рослин.

Калюсна культура – це неорганізована тканина, що проліфілює, що складається з дедиференційованих клітин. Надалі вони спеціалізуються як калюсні, тобто, стають таким чином диференційованими. Калюс може утворюватися як на ізольованих шматочків тканини (експлантів) *in vitro*, так і на рослині при ураженні.

Перехід клітини *in vitro* з диференційованого стану до дедиференціювання та активних клітинних поділів обумовлений зміною активності генів. Активування одних генів та репресування інших призводить до зміни в

білковому складі клітин. У калюсних клітинах з'являються специфічні білки і одночасно зникають білки, характерне для фотосинтезуючих клітин листа.

Калюсна клітина має свій цикл розвитку та повторює розвиток будь-якої клітини, включаючи розподіл, розтягування та диференціювання, після чого настає старіння та відмирання клітини.

Щоб не сталося старіння, втрати можливості до поділу та відмирання калюсних клітин, первинний калюс, що виникає на експлантах, через 4-6 тижнів переносять на свіже живильне середовище. Цю операцію називають пасеруванням. При регулярному пасеруванні здатність до поділу може підтримуватися протягом десятків років.

Особливості калюсних клітин. Калюсні клітини *in vitro* зберігають багато фізіолого-біохімічних властивостей нормальних клітин. Калюсні клітини зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів. Морозостійкість та здатність до загартовування (закалювання) притаманні калюсним клітинам, отриманим з морозостійких рослин.

Загальним у калюсних і пористих клітин є стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засолення.

Калюсні клітини мають окремі властивості, що відрізняють їх від нормальних. В них з'являються специфічні білки і зменшується кількість білків, притаманних фотосинтезуючим клітинам листя, або вони зовсім зникають. Калюсні клітини відрізняються великою генетичною гетерогенністю та фізіологічною асинхронністю.

В результаті виходу з-під контролю організму зростання калюсних клітин відбувається неорганізовано, асинхронно, і є необмеженим. При пересадках на свіже живильне середовище культура калюсної тканини моркви, отримана Р. Готрі понад 60 років тому, досі зростає в колекції.

Клітинний цикл у калюсних клітин більш тривалий, ніж у рослин, що ростуть у відкритому ґрунті.

Особливістю калюсних клітин є гетерогенність за віком: одночасно присутні в калюсній тканині клітини молоді та старі.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калюсних клітин. Вони споживають менше кисню проти нормальними. Це свідчить про зсув співвідношення між диханням і бродінням у бік посилення бродіння, тобто. зниження ефекту Пастера. Під ефектом Пастера розуміють пригнічення бродіння диханням у присутності кисню.

Генетика калюсних клітин. Клітини калюсної тканини мають виражену генетичну гетерогенність. Генетична неоднорідність калюсних клітин виявляється насамперед у різній щільності, тобто. калюсні клітини відрізняються за кількістю хромосом. Генетично стабільними *in vitro* є меристематичні тканини.

У калюсних і суспензійних культурах зустрічаються клітини, які мають диплоїдний набір хромосом, властивий вихідній рослині, поліплоїдні клітини, що містять 3,4,5 і більше хромосомних наборів. Поряд із поліплоїдією в культурі калюсних тканин можна нерідко спостерігати анеуплоїдію (зростання або зменшення хромосомного набору на кілька хромосом). Чим довше культивують калюсні клітини, тим більше вони різняться за плоїдністю.

Крім зміни плоїдності, культивування клітин та тканин рослин *in vitro* викликає появу у клітинах хромосомних аберацій. Останні позначаються на біологічних особливостях тканин, що культивуються, змінюючи їх зовнішній вигляд, обмін речовин, швидкість росту.

Генетична різноманітність калюсних клітин дозволяє використовувати їх для клітинних селекцій на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів та на підвищену продуктивність.

Ізольований протопласт – це частина клітини, яка залишається після видалення клітинної стінки, здійсненої, як правило, ферментативним способом.

Для проведення ферментативного способу ізоляції цитопластів використовують препарати целюлаз і пектиназ, одержуваних з різних грибів – *Myrothecium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* та ін. і з травного соку равлики *Helix pomatia*.

Залежно від походження рослини та взятої для ізоляції протопластів тканини підбирається вид ферментів, їх комбінація та концентрація. Для виділення протопластів використовують різні тканини рослини, а також калюсні та суспензійні культури. З метою отримання великої кількості однотипних протопластів у дводольних використовують мезофіли молодого листа. Щільність протопластів має бути оптимальною для кожної культури. Суспензію протопластів переносять у чашки Петрі з рідким або агаризованим середовищем. Культивування проводять при $t = 26-28^{\circ}\text{C}$ у темряві або при розсіяному світлі. Клітинні колонії, що утворилися, переносять на поверхню агаризованого середовища і культивують на світлі.

Для культивування протопластів можуть бути використані модифікації середовищ Мурасіге або Гамборга (В-5) з додаванням комплексу вітамінів та фітогормоном. Перш ніж протопласти синтезують клітинну стінку, у середовищі необхідно забезпечити відповідний рівень осмотичного тиску для підтримки стабільності протопластів. Як осмотики використовують цукри: глюкозу, манітол, сорбіт, ксилозу, сахарозу або їх різні поєднання. Після регенерації клітинної стінки та розвитку клітинних колоній осмотики із середовища виключають. Інший важливий фактор успішного культивування протопластів – щільність їхнього посіву, яка може становити 10^4-10^5 протопластів в 1 мл середовища.

Використання культури протопластів. Відсутність клітинної стінки у протопластів зумовлює їх властивості, відмінні від цілих клітин. Завдяки тому, що протопласти здатні поглинати макромолекули та органели, їх використовують як реципієнти при трансформації, а також в експериментах з клітинної селекції та мутагенезу. Ізольовані протопласти є джерелом виділення непошкоджених і функціонально активних субклітинних і цитоплазматичних структур і органел (хлоропластів, ядер, хромосом). Здатність протопластів зливатись один з одним знайшла застосування для отримання соматичних гібридів.

Аналіз результатів багаторічного вивчення фізіологічних і біохімічних особливостей культури тканин багатьох видів і окремих генотипів рослин, динаміки генетичної структури клітинних популяцій культивованих клітин і тканин рослин, ролі і особливості дії добору у процесі адаптації клітин до умов вирощування *in vitro*, особливостей еволюції клітинних популяцій *in vitro* за їх тривалого вирощування у пасивованій культурі дозволив нам зробити наступні узагальнення:

- культура клітин *in vitro* є штучно створеною динамічною біологічною системою – клітинною популяцією, яка розвивається (еволюціонує) у результаті дії основних рушійних факторів еволюції – мінливості, спадковості, добору і дрейфа генів (генотипів); взаємодія цих процесів зумовлює біологічні особливості кожної конкретної клітинної популяції (клітинної лінії, штаму), що вирощується (культивується) у конкретних умовах;

- процес адаптації клітин до умов тривалого культивування *in vitro* складний і багатоступеневий, на різних етапах існування культури *in vitro* (дедиференціювання клітин та їхньої наступної проліферації, перших пасажів *in vitro*, тривалого пасивування) спостерігаються різні типи і рівні мінливості, діють різні типи природного добору – дестабілізувальний, рухальний (спрямований), або, переважно, стабілізувальний;

- індукція процесів дедиференціювання і наступної проліферації соматичних клітин передбачає перепрограмування їхнього геному, «ювенілізацію» його стану, перехід клітинного геному із «спеціалізованого» у стан, характерний для стовбурових клітин;

- у процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* можливо виділити три періоди: первинної популяції ізольованих клітин, становлення штаму, сформованого штаму; поділ на періоди визначається типом, напрямком і жорсткістю «природного» добору, що діє у клітинній популяції;

- для клітинних популяцій сформованих (адаптованих до росту в умовах *in vitro*) штамів характерною є наявність фізіологічного і генетичного гомеостазу, які зумовлені переважною дією стабілізувального добору;

- сформовані штами і клітинні лінії являються генетично гетерогенними клітинними популяціями; розмах мінливості за низкою ознак у культурі клітин і тканин деяких видів рослин (їхніх окремих генотипів) може перевищувати міжвидову мінливість у природі;

- значна частина реорганізацій геному культивованих клітин являється каналізованою: мінливість, що спостерігається в культурі *in vitro*, часто подібна до природної мінливості рослин споріднених видів; зміни зазнають переважно ті послідовності ДНК, які визначають природні міжвидові відмінності; окремі (перебудовані в культурі *in vitro*) послідовності нагадують послідовності, властиві геномам інтактних рослин близьких видів у природі; домінування в генетично гетерогенних популяціях каналізованих змін може свідчити про адаптивність саме таких змін геному;

- генетичний поліморфізм культивованих клітин, отриманих від однієї рослини (одного генотипу), очевидно може відображувати (відновлювати) значну частину як внутрішньопопуляційного, так і міжпопуляційного поліморфізму, властивого даному виду рослин;

- подібність геномних змін, що спостерігаються в процесі адаптації клітин до умов росту *in vitro* і геномної мінливості у природі, у тому числі у процесі видоутворення, свідчать про можливість застосування закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова до культури клітин; це дозволяє прогнозувати особливості геномної мінливості *in vitro*;

- подібність геномної, зокрема хромосомної, еволюції клітинних популяцій і змін, що лежать в основі видоутворення, має безумовно важливе значення для розуміння деяких закономірностей еволюційного процесу і дає можливість моделювати його на клітинному рівні *in vitro*;

- частина геномних змін, що виникли у культивованих клітинах, не виявляється у рослинах-регенерантах; клітини з глибоко реорганізованим геномом не можуть регенерувати життєздатних рослин, це зменшує реальність надій на отримання соматоклональних варіантів із властивостями, раніше

невідомими селекціонерам; перш за все це стосується видів рослин з простими (не поліплоїдними та/або не гібридними) геномами;

- встановлення особливостей і виявлення основних факторів і рушійних сил геномної мінливості і еволюції клітинних популяцій *in vitro* дозволяє певною мірою регулювати не тільки генетичну структуру клітинних популяцій, а і функціонування їхнього геному, зокрема біосинтез вторинних метаболітів; завдяки цьому створено високопродуктивні клітинні лінії і штами рідкісних і особливо цінних лікарських рослин – альтернативне джерело екологічно чистої сировини для фармацевтичної, косметичної, харчо-смакової промисловості.

Узагальнення викладених вище даних дозволяє зробити наступне припущення: будь-яка соматична клітина рослини з живим (функціонально активним) ядром при її ізоляції і подальшому вирощуванні в умовах культури *in vitro* у результаті процесів дедиференціювання і «сомаклональної» мінливості (остання відбувається у рамках закону гомологічних рядів у спадковій мінливості М. І. Вавилова) може відновити у своїх нащадках, у тому числі серед рослин-регенерантів, генетичний поліморфізм (або, щонайменше, його частину), властивий цьому виду, а можливо, навіть і роду рослин. Ця особливість культивованих клітин, як соматичних, так і генеративних, відкриває нові горизонти як у клітинній біології і теорії еволюції, так і в різних напрямках прикладних досліджень, у тому числі для збереження і відновлення природного поліморфізму, культивуючи клітини і тканини в умовах *in vitro*.

Клітини тварин

Техніка культури еукаріотичних клітин тварин була розроблена для вивчення властивостей живих клітин, вільних від системних впливів, що виникають *in vivo*. Р.Я. Фрешні (2010) пропонує наступну класифікацію понять, що належать до визначення «культура тканини».

КУЛЬТУРА ТКАНИНИ – метод тривалого збереження та вирощування у спеціальних живильних середовищах клітин, тканин, невеликих органів або їх частин, виділених з організму людини, тварин та рослин	
Отримують без руйнування тканини	Отримують при руйнуванні тканини

ОРГАННА КУЛЬТУРА – це структура недезагрегованої тканини, яка зберігає повністю або частково всі особливості тканини в живому організмі	КЛІТИННА КУЛЬТУРА – це культура, отримана в результаті руйнування до одиничних клітин (ферментативного, механічного, хімічного) вихідної тканини.
	ГІСТОТИПОВА КУЛЬТУРА – 3-мірна структура, штучно сформована дослідником з однієї клітинної культури.
	ОРГАНОТИПОВА КУЛЬТУРА – 3-мірна структура, штучно сформована дослідником з кількох клітинних культур.

Поняття клітинної лінії

Джерелами клітин для клітинних ліній можуть бути різні тканини, проте виділяють дві основні групи, що відрізняються проліферативним потенціалом: первинні та стовбурові клітини.

Первинні клітини – це зрілі клітини певної тканини. Первинні клітини є диференційованими клітинами, що не діляться, або з вкрай низьким проліферативним потенціалом. При культивуванні таких клітин *in vitro* можливим є прояв тенденції деяких типів клітин до дедиференціювання при їх культивації, внаслідок якої клітини втрачають відповідний фенотип.

Стовбурові клітини – недиференційовані клітини, здатні ділитися, самооновлюватись та диференціюватися в один або більше типів спеціалізованих клітин. Розрізняють постнатальні стовбурові клітини та ембріональні стовбурові клітини (рис. 3).

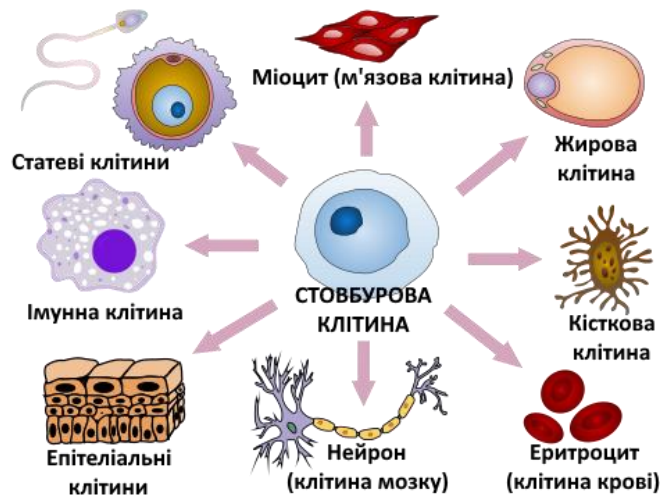


Рис. 3. Стовбурова клітина як попередник диференційованих клітин

Ембріональні стовбурові клітини утворюють внутрішню клітинну масу, або ембріобласт, на ранній стадії розвитку ембріона. Вони є плюрипотентними та не експресують HLA (human leucocyte antigens), тобто не виробляють антигени тканинної сумісності.

Постнатальні стовбурові клітини (стволові клітини дорослого організму) – це частина клітин, що утворилися в результаті диференціювання клітин ембріона, які залишилися не до кінця диференційованими. Раніше вважалося, що ці клітини мають лише «ліга диференціювання» (*термін в контексті біології стосується процесу, в якому клітини розвиваються, щоб стати спеціалізованими, тобто набувати певні характеристики та функції (монопотентність). В загальному, диференціювання клітин – це процес, внаслідок якого клітини набувають відмінностей у структурі та функції, що дозволяє їм виконувати різні ролі в багатоклітинному організмі*), але в даний час відомо, що вони можуть виявляти значний ступінь пластичності. Стовбурові клітини дорослого організму можна поділити на три основні групи: гемопоетичні (кровотворні), мультипотентні мезенхімальні (стромальні) та тканеспецифічні прогеніторні клітини (*це стовбурові клітини, які вже детерміновані на диференціювання в певний тип клітин і мають стійкі біомаркери для їх ідентифікації. Вони відрізняються від плюрипотентних стовбурових клітин тим, що їх напрямок диференціювання вже визначено*).

Найбільш універсальним типом дорослих стовбурових клітин та найбільш використовуваними у дослідженнях та практичних застосуваннях є

мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), здатні диференціюватися у клітини кількох типів: жирові, кісткові та хрящові. На процес та напрямок диференціювання МСК впливають склад середовища культивування, а також фізичні фактори.

Виділяють три основні типи культур тканин методом формування (створення) культур *in vitro*. В експлантній та клітинній культурах клітинна проліферація підвищена, тому є можливість подальшого «розвитку» – формування клітинних ліній, що складаються з клітин одного (переважного) виду.

Клітинна лінія – це сукупність клітин, отримана з первинної культури шляхом збільшення кількості клітин після декількох генерацій з переважанням клітин або ліній диференціювання з високим темпом росту та високою однорідністю клітинної популяції.

Еволюція будь-якої клітинної лінії включає кілька етапів:

1. Виділення клітин із зразка тканини. Методом первинного експлантату – міграцією клітин із фрагмента тканини та прикріплення їх до відповідного субстрату. Методом дезагрегації тканини (механічним, ферментативним чи комплексним). До ферментів, що використовуються для дезагрегації тканини, відносяться неочищені препарати трипсину, колагенази, еластазу, проназу, диспазу та інші, які використовують або окремо, або в комбінації. Для кожного типу тканини та клітин, що виділяються, існують спеціальні протоколи виділення.

Основні типи культури тканин за методом створення

Тип	Метод формування	Особливості	Можливість формування постійних клітинних культур
Органна культура	Культивування цілих шматочків тканини на межі розділу середовищ рідина (поживне середовище) - газ	Збережено структурно-функціональні характеристики тканини,	Відсутня

		гістологічні міжклітинні взаємодії	
Експлантна культура	Культивування цілісних шматочків тканини на межі розділу середовищ рідини (поживне середовище) – поверхня щільного субстрату для активації міграції клітин із тканини на поверхню субстрату	Характеристики тканини не зберігаються, виділяються мігруючі клітини (швидко проліферуючі)	Присутня
Клітинна культура	Механічне або ферментативне руйнування тканини до суспензії клітин, які потім поміщаються на щільну підкладку (адгезивні культури) або рідку фазу культурального середовища (суспензійні культури)	Характеристики тканини не зберігаються, виділяються всі клітини, із загальної маси яких обирається необхідний тип (шляхом вибору ферменту, наступних маніпуляцій)	Присутня

2. Формування первинної культури. Відбувається міграція клітин із експлантату, адгезія клітин зруйнованої тканини; клітинна проліферація.

Первинна культура різноманітна, у її складі – практично всі типи клітин дезагрегованої тканини.

3. Перша субкультура клітинної лінії. Як тільки первинна культура пересіяна (спасажирована) в інший культуральний флакон – вона називається клітинною лінією. Субкультивування (пасаж) – процес пересівання культури або її частини в інший культуральний флакон із заміною середовища культивування.

4. Підтримка клітинної лінії (пасаж). Повторюється певну кількість разів через 3-10 днів. При веденні культури вкрай важливо записувати номер пасажу – кількість разів, культуру було пересіяно. Генерація – кількість подвоєння клітин, яку зазнала культура. У разі непроліферуючої (слабопроліферуючої) культури заміна середовища також необхідна.

5. Старіння чи трансформація. Старіння – генетично детермінована подія, що призводить до загибелі клітин після певної кількості подвоєнь (генерацій).

Більшість нормальних клітин мають кінцевий термін життя тривалістю 20-100 генерацій. З клітинним старінням пов'язане поняття «Межа або ліміт Хейфліка» (Hayflick limit) – межа кількості поділів соматичних клітин, які помирають приблизно після 50 поділів і виявляють ознаки старіння при наближенні до цього кордону. Для більшості людських клітин межа Хейфліка становить 52 поділи.

Деякі клітинні лінії можуть давати початок постійним (іморталізованим) клітинним лініям. Зміна в культурі, що призводить до виникнення іморталізованої клітинної лінії, називають трансформацією, – вона виникає спонтанно або індукується хімічно або вірусом. Постійні клітинні лінії зазвичай анеуплоїдні та мають хромосомний набір між диплоїдним і тетраплоїдним є варіації в хромосомному наборі і складі між клітинами однієї популяції (анеуплоїдія). До властивостей постійних клітинних ліній належать також зниження потреби у сироватці, зменшення обмеження зростання клітинної щільністю, зростання у напіврідкому середовищі.

Для досліджень у певних галузях краще застосовувати постійні клітинні лінії, які ретельно характеризуються та використовуються в дослідженнях даного типу певний часовий проміжок, що підвищує достовірність та порівнянність результатів для дослідників у всьому світі.

Лекція 5

Історія створення культур клітин рослин

Ідея про можливість культивування клітин поза організмом – *in vitro* – була висловлена стосовно клітин рослин. Однак вперше в культуру було введено клітини тварин. Дослідникам довго не вдавалося культивувати рослинні клітини на штучних живильних середовищах. Перших успіхів у цій області досягли у 30-х роках ХХ століття, а бурхливого розвитку новий напрямок досліджень набув у 60-70-х роках того ж століття. В історії розвитку цього методу можна виділити декілька періодів.

Період з 1892 по 1902 – перші роботи в області розвитку методу культури

ізолюваних тканин рослин. Найбільш ранні роботи по ізолюванню культур належать Блоцішевському (1876), Брауну і Морісу (1892), Бонне, Саксу (1893). У цих дослідженнях зародки вичленяли з насіння і вирощували в штучних умовах.

Цей період також пов'язаний з іменами трьох видатних німецьких вчених: Х. Фьохтінга, К. Рехінгера та Г. Габерландта. Не отримавши експериментальних успіхів, ці дослідники висунули ряд ідей та гіпотез, які були реалізовані значно пізніше.

Першим дослідником, який зайнявся встановленням мінімального розміру експлантів, був Карл Рехінгер (1893). Він вирощував тонкі зрізи кореня буряків, кульбаби, сегменти стебла тополі на піску із застосуванням водопровідної води, без стерильних умов і спостерігав процес калусоутворення. Зменшуючи розмір експлантата, він визначив мінімальний розмір фрагмента, здатного утворювати калус. Ці дослідження показали, що каллус утворюється при товщині зрізу не менше 1,5 мм.

Х. Фьохтінг, вивчаючи явище полярності у рослин, пробував вирощувати *in vitro* невеличкі шматочки рослинних тканин. Він показав, що полярність властива навіть самим маленьким фрагментам тканини і припустив, що вона є властивістю самої рослинної клітини. Х. Фехтінг провів ряд експериментів, які доводять тотипотентність клітини.

Г. Габерландт вперше висловив ідею про можливість культивування *in vitro* ізолюваних клітин рослин та запропонував гіпотезу про тотипотентність будь-якої живої рослинної клітини, яка згодом була підтверджена експериментально. Однак його власні спроби та спроби ряду вчених, у тому числі і його учнів, які взяли з нього приклад, культивувати на штучному живильному середовищі групи клітин палісадної паренхіми листка, епідерму традесканції були невдалими. Розрахунок Г. Габерландта на те, що хлорофілоносні клітини паренхіми забезпечать себе органічними речовинами за рахунок фотосинтезу був помилковим, що призвело до втрати інтересу до культивування тканин і клітин рослин. Проте вони все ж поклали початок пошуку адекватних поживних сумішей та умов, необхідних для підтримки росту

органів, тканин і клітин рослин. Повністю диференційовані тканини, клітини яких втратили ембріональну активність, не росли і не давали новоутворень *in vitro*, а способу їх дедиференціації Г. Габерландт не знайшов, фітогормони у той час ще були невідомі.

Габерланд також висунув гіпотезу про тотипотентність будь якої живої клітини рослини, Деякі вчені на підставі отриманих негативних результатів засумнівалися й в гіпотезі тотипотентності рослинних клітин.

Період з 1902 по 1922 роки характеризується багаточисельними спробами підібрати оптимальне живильне середовище і умови сприятливі для культивування *in vitro* ізольованих органів, тканин і клітин рослин.

У цей період були отримані перші результати по культивуванню тканин тварин на живильних середовищах з додаванням сироваток. Однак спроби виростити ізольовані тканини рослин на середовищах з додаванням екстрактів рослинних тканин були невдалими. Помилкою всіх цих досліджень було те, що всі вчені використовували високо спеціалізовані рослинні тканини. У 1921 французький вчений Мольяр культивував сегменти кореня і гіпокотилля молодих пагонів редьки. Вони були здатні до росту в умовах культури, але при цьому не відбувалося формування нових тканин.

Саме вдалий вибір об'єкту визначив успіхи В. Робінса і Котте , які у 1922 році одночасно і незалежно один від одного показали можливість культивування на штучному живильному середовищі меристеми кінчика кореня томатів та кукурудзи. Ці досліді можна вважати початком застосування методу культури ізольованих органів рослин.

Період з 1932 по 1939 роки починається з робіт американського дослідника Ф.Уайта та французького Р.Готре. Успіх цих дослідників обумовили вдалий вибір об'єктів дослідження і ретельний підбір складу живильного середовища для культивування. Вони повторили дослід В.Роббінса і Котте і показали, що ізольовані корені можуть рости у культурі необмежено довго, якщо їх кінчики періодично пересаджувати на свіже живильне середовище. Здатність до необмеженого росту при субкультивуванні була продемонстрована пізніше цими

ж авторами для калюсної тканини камбіального та паренхімного походження, а також для тканин рослинних пухлин. Це відкриття дало новий поштовх у роботі по культурі рослинних тканин. Таку ж здатність спостерігав Ф. Уайт для клітин пухлинного походження. Результати чужих і власних експериментів Уайт узагальнив у монографії «Культура рослинних тканин», яка була перекладена на російську мову і видана в СРСР в 1949 році. У ній він виділяє кілька періодів в історії розвитку методу культури клітин, тканин і органів рослин:

1834 – 1900 рр. – Створення та розробка клітинної теорії.

1900 – 1922 рр. – Сформульована ідея культури тканин.

1922 – 1934 рр. – Безуспішні пошуки методів, що забезпечують тривале культивування тканин.

1934 – 1939 рр. – Детальна розробка техніки культури рослинних тканин.

У період з 1940 по 1960 рр. збільшилась кількість видів рослин, тканини яких вирощували *in vitro*. Їх список становив 142 види. Тривало пересаджувані культури успішно отримували із різних органів і тканин рослини. Були розроблені склади живильних середовищ, вивчено значення макро- і мікроелементів для підтримання нормальної ростової активності тканини. Виявлена потреба культур у вітамінах і стимуляторах росту. Оцінено значення натуральних екстрактів типу ендосперму кокосового горіха, каштана, кукурудзи та інших рослин для підтримання неорганізованого клітинного росту і стимуляції процесів органогенезу і соматичного ембріогенезу у культурі калюсних тканин і клітинних суспензій. Саме у роботі з культурою тканин у 1955 році відкрито новий клас фітогормонів – цитокініни і показано їх значення для поділу клітин *in vitro* та індукції стеблового морфогенезу. Вивченням цих питань займалися такі вчені, як Р. Хеллер, І. Ніч, Ф. Скуг, Ф. Стевард, Р.Г. Бутенко.

В цей період розроблено метод отримання і вирощування великих мас клітинних суспензій та метод культивування окремої, виділеної із суспензії клітини, поділ якої індукується за допомогою тканини-няньки.

Період з 1960 по 1975 рр. Найважливішою подією цього періоду була розробка Е.К. Кокінгом методу отримання ізольованих протопластів із тканини

кореня і плодів томатів шляхом обробки їх сумішшю пектолітичних та целюлітичних ферментів. У 1971 р. Такебе і його співробітники, обробляючи клітки листа тютюну для розчинення клітинних стінок сполученням целюлази і пектинази, домоглися успіху в одержанні протопластів. Протопласти культивували в середовищі, у якій вони могли поділятися і формувати калюс, здатний до регенерації з утворенням цілої рослини.

Ці перші експерименти, проведені на протопластах тютюну, показали, що більш 90% усіх протоклонів, тобто клонів, отриманих з протопластів, подібні з батьківськими лініями, як по фенотипу, так і по генотипу.

Таким чином, протопласти тютюну дозволили перебороти звичайну мінливість, характерну для інших способів одержання клонів. Виявлена стабільність була підтверджена і на деяких інших видах рослин.

Пізніше І.Такебе із співробітниками підібрали умови культивування ізольованих протопластів, за яких вони утворюють нову клітинну стінку, діляться і дають початок клітинним лініям, здатним у ряді випадків до морфогенезу. Вперше отримано і вивчено рослини-регенеранти тютюну, які були соматональними варіантами вихідної форми.

Одночасно ізольовані протопласти які ще не утворили клітинну стінку, були використані для розробки методів гібридизації соматичних клітин шляхом злиття протопластів з допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) і введення в них вірусної РНК, клітинних органел, клітин бактерій.

Перший нестатевий гібрид вищих рослин був отриманий у 1972 р. при злитті ізольованих протопластів двох видів тютюну: *Nicotiana glauca* і *Nicotiana langsdorfii*.

У 1974 р. Дж. Мельхерсом був введений у практику термін «соматична гібридизація», що означає процес злиття протопластів соматичних клітин. При соматичній гібридизації розвиваються гібриди, що поєднують геном обох клітин.

Соматична гібридизація має важливі особливості:

по-перше, цьому процесові доступні практично будь-які схрещування, *по-друге*, злиття протопластів сприяє об'єднанню цитоплазматичних генів батьківських клітин, чого не буває при схрещуванні полових клітин.

Перші соматичні гібриди були використані як моделі для вивчення поведінки ядерного та цитоплазматичного геномів партнерів у гібридних клітинних лініях і у потомстві соматичних гібридів рослин.

У цей же період французьким вченим Ж.Морелем розроблено метод культури меристем, який дозволяє отримувати безвірусні рослини. За допомогою цього методу оздоровлені рослини розмножуються з високим коефіцієнтом.

Період з 1976 року і до сьогодні. У 1978 р. було зроблено успішне злиття протопластів картоплі і томатів. Отримані рослини «помато» представляють не тільки науковий, але і практичний інтерес, оскільки вони утворюють бульби і плоди. У наш час на початку 2019 року повідомляло видання «Агробізнес сьогодні», в Англії презентували диво-овоч помідофель або тоματοкартоплю – суміш помідора і картоплі, і його почали успішно вирощувати в Україні, адже в Україні обидві культури мають гарні умови для непоганої урожайності й до того ж тоματοкартопля не потребує додаткової спеціальної агротехніки.

На масовий ринок у вигляді саджанців рослину презентувала у Великобританії компанія Thompson & Morgan. Продукт отримав назву TomTato. Його творці запевняють, що з кожного куща TomTato можна зняти близько 500 помідорів чері та до двох кілограм бульб білої картоплі.

На відміну від томатів картопля належить до видів, що важко піддаються генетичному поліпшенню. Фактори стійкості до хвороб, скомбіновані в одному сорті томатів, при застосуванні методу злиття протопластів можуть бути перенесені в сорт картоплі в ході однієї операції. Аналогічна робота, проведена з використанням звичайних селекційних прийомів, зайняла б близько 20 років.

В даний час отримано багато міжвидових, міжродинних гібридів, значну частину, яких не можна вважати нормальними рослинами. Виникаючі аномалії – результат хромосомної незбалансованості.

У 1983 розроблено метод електролізу ізольованих протопластів і методи селекції гібридних клітин. З використанням ізольованих протопластів і векторів, створених на основі *Ti*- та *Ri*-плазмід *Agrobacterium tumefaciens* і *A. rhizogenes* розроблено ефективний спосіб перенесення генів для дводольних рослин. Розроблено метод балістичної трансформації або мікробомбардування, який ефективно застосовується і для однодольних рослин.

Методи мутагенезу і клітинної селекції, отримання соматоклональних варіантів застосовують для створення нових форм і сортів сільськогосподарських рослин.

Методи скринінгу біохімічних мутантів привели до появи більш продуктивних і пристосованих до умов культивування клітинних штамів, які використовуються у промисловості.

Рослини, отримані в результаті розмноження вегетативним шляхом (клони), звичайно схожі на батьківську рослину, але не всі клони генетично однакові. Іноді виникають клони, що істотно відрізняються від вихідної форми. Їх називають соматичними варіантами, соматоклонами або «спортами», і з'являються вони в результаті генетичних змін у клітинах меристеми, що дають початок усій новій рослині або його частини.

Соматоклональна мінливість – прекрасне джерело генетичної різноманітності, що може використовуватися при створенні генетично змінених організмів з новими властивостями. Відзначено випадки появи соматоклональних варіантів, що сполучають ознаки, що неможливо або важко з'єднати в одному генотипі традиційним селекційним шляхом.

Так, з соматоклональних варіантів, що виникли в калусній культурі рису, були виділені рослини, що сполучили скоростиглість і «довгі зерна». На їхній основі за короткий термін був створений новий сорт рису. У ряді випадків розмноження сортів привело до створення нових сортів. Наприклад, апельсини «Навель», персики-нектарини.

Таким чином, мінливість протоклонів, що спостерігається за відсутність мутагенів, досить важлива для селекції: завдяки їй селекціонери одержують багатий вихідний матеріал.

В Україні експериментальні роботи по культивуванню тканин рослин започатковані 1949 рок в Інституті фізіології рослин АН УРСР. Тут у керованим професором Ф.Л.Калініним відділі росту і розвитку проведено роботи по вивченню фізико-хімічних і біохімічних механізмів пухлинної трансформації рослинних клітин, мікроклональному розмноженню та ін.

Активний розвиток різних напрямків біотехнології рослин припадає на 70-80 роки. У цей період в Інституті ботаніки імені М.Г.Холодного під керівництвом академіка К.М.Ситника проводяться оригінальні роботи з гібридизації протопластів та клітинної селекції.

Сьогодні теоретичні і практичні аспекти біотехнології вирішуються в ряді наукових та вищих навчальних закладів. Серед них – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Інститут фізіології рослин та генетики НАН України, Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Інститут картоплярства УААН, Інститут садівництва УААН, Інститут цукрових буряків УААН, Державний Нікітський ботанічний сад та інші. Українськими вченими охоплене широке коло досліджень, які мають вагоме значення для розвитку вітчизняної та світової біотехнології.

Лекція 6

Методи створення клітинних культур рослин

Основним типом культивованої рослинної клітини є калюсна. Значно рідше культивують клітини пухлин рослин різного походження. Культури пухлинних клітин незалежно від способу культивування на рівні морфології мало відрізняються від культур калюсних клітин. Значною фізіологічною відмінністю між ними є гормонезалежність пухлинних клітин, що дозволяє їм ділитися та рости на живильних середовищах без добавок фітогормонів або їх аналогів. Однак пухлинні клітини позбавлені здатності давати початок нормально організованим структурам. У деяких випадках вони здатні утворювати *тератоми* (потворні органоподібні структури), нормальний розвиток яких не відбувається.

Калюсні клітини в пересадочній культурі можуть спонтанно набути гормонезалежності. Природа такої незалежності до ауксину та цитокініну, що найчастіше застосовуються при вирощуванні клітинних культур рослин, може бути *генетичною* (результат мутації) або *епігенетичною* (результат експресії генів, що визначають гормонезалежність клітини). При генетичній гормонезалежності калюсні клітини поведуться як пухлинні, при

епігенетичній вони втрачають ознаку в ряді перетворень клітина – рослина – клітина.

Калюсна клітина, в результаті поділу якої виникає калюсна тканина, або калюс, представляє один з типів клітинного диференціювання, властивого вищій рослині. Для рослини калюс є тканиною, що виникає за виняткових обставин (зазвичай при травмах) та функціонує нетривалий час. Ця тканина захищає травмоване місце, накопичує поживні речовини для анатомічної регенерації чи генерації втраченого органу.

Калюсна тканина *in vitro* в основному буває білого або жовтуватого, рідше світло-зеленого світла. Темно-коричнєве забарвлення виникає частіше при старінні калюсних клітин і пов'язане з накопиченням у них фенолів. Останні окислюються у хінони. Для позбавлення від них у поживні середовища вносять антиоксиданти.

Калюсна тканина аморфна і не має конкретної анатомічної структури, але в залежності від походження та умов вирощування вона може бути різної консистенції – пухкої, середньої густини, щільної.

Основною умовою перетворення рослин клітини на калюсну є присутність у живильному середовищі фітогормонів.

Ауксини викликають процес дедиференціювання клітини, що готують її до поділу, а цитокініни – проліферацію (розподіл) дедиференційованих клітин.

Якщо в живильне середовище без гормонів помістити шматочок стебла, листа, кореня (без верхівки) або будь-який інший експлант, що складається зі спеціалізованих (диференційованих) клітин, то поділ клітин не відбудеться і калюсна тканина не утворюється. Це пов'язано з нездатністю диференційованих клітин до розподілу.

Кожна клітина має три фази зростання: 1) розподіл; 2) розтяг; 3) диференціювання. Характерною рисою заключної фази зростання є потовщення вторинної клітинної оболонки та втрата клітиною здатності до поділу. А, щоб диференційовані клітини знову придбали здатність до поділу, потрібно, щоб відбулося їх дедиференціювання, тобто, перетворення клітин на клітини як у

меристематичному стані. Розмноження диференційованих клітин призводить до анархічного, неорганізованого зростання, внаслідок чого утворюється калюсна тканина. Таким чином, перетворення спеціалізованої тканини на калюсну пов'язане з індукцією клітинного поділу, здатність до якого вона втратила в процесі диференціювання.

Процес переходу до калюсного зростання в базальній частині апекса починається із зупинки клітинних поділів. Лаг-фаза триває 24-48 години, протягом яких клітини збільшуються в розмірах і тканина розпушується. Після лаг-фази клітини починають швидко ділитися, утворюючи калюсну тканину. Таким чином, якщо дедиференціювання спеціалізованої клітини пов'язане з індукцією поділу під впливом фітогормонів, то дедиференціювання меристематичної клітини, що ділиться, пов'язане зі зупинкою поділу, деспеціалізацією клітини і тільки після цього – з індукцією поділу, що призводить до калюсоутворення.

Перехід клітини *in vitro* з диференційованого стану до дедиференціювання та активних клітинних поділів обумовлений зміною активності генів. Активування одних генів та репресування інших призводить до зміни в білковому складі клітин. У калюсних клітинах з'являються специфічні білки і одночасно зникають білки, характерні для фотосинтезуючих клітин листа.

Для отримання культивованих калюсних клітин *in vitro* фрагменти тканин різних органів вищих рослин (*експланти*) поміщають на штучне живильне середовище в пробірки, колби, чашки Петрі. Процес отримання первинного калюсу та підтримка пересадкової культури потребує строго стерильних умов. Для цього за допомогою стерильних розчинів, що містять хлор або ртуть (гіпохлорити, сулема, діацид), до яких для кращого змочування додані детергенти, стерилізують експланти, ретельно відмиваючи їх від використовуваного розчину стерильною водою. Поживні середовища, розчини, інструменти, матеріали, необхідні для роботи, стерилізують в автоклавах або сухожарових шафах. Усі маніпуляції з культурами проводять у мікробіологічних боксах, що опромінюються перед роботою ультрафіолетом, або ламінар-боксах,

де стерильність досягається постійною подачею стерильного повітря в робочий об'єм.

Особливості дедиференціювання клітин експланту та калюсогенезу залежать від епігенетичних характеристик складових його тканин.

Клітини спеціалізованих тканин, експлантованих на живильне середовище, що містить мінеральні солі, джерела вуглецю, вітаміни і гормоноподібні речовини, повинні дедиференціюватися, тобто втратити структури, характерні для їх специфічної функції в рослині, і повернутися до стану клітини, що ділиться. Часто експлант, що використовується для отримання калюсу, є фрагментом органу і включає тканини, клітини яких по-різному диференційовані. Різне тканинне походження первинних калюсних клітин є однією з причин гетерогенності культури калюсної тканини, так як деякі функціональні особливості вихідних диференційованих клітин передаються в ряді клітинних поколінь як стійкі модифікації або епігенетично успадковані ознаки.

У клітинах експланту, що складається з спеціалізованих клітин, що не діляться, на самому початку культивування можуть спостерігатися зміни в метаболізмі, викликані і травматичними синтезами, і дедиференціюванням, і підготовкою до процесу поділу. Для розподілу цих процесів можна застосовувати передінкубацію експлантів на середовищі без гормонів протягом кількох діб (3-6). Це дозволяє виключити не тільки зміни, пов'язані з травмою, але й можливий неконтрольований вплив ендогенних гормонів експлантату на процеси, що вивчаються.

У клітині, що готується до поділу, стимулюється синтез всіх типів РНК, зникають тканеспецифічні білки-антигени і з'являються білки, специфічні для клітин, що діляться, і калюсної тканини. Це свідчить про зміну активності генів та білкового апарату клітин при дедиференціюванні.

Утворення калюсу не завжди пов'язане з травматичним впливом. Калюс може виникнути внаслідок проліферації внутрішніх тканин експланту без зв'язку з поверхнею зрізу. Зростаючий калюс розриває шари тканини і розвивається на

поверхні. Утворення калюсу при експлантуванні фрагмента тканини в умовах *in vitro* властиво дводольним і однодольним покритонасінним і голонасінним рослинам, папороті, мохам.

Первинний калюс, що виник на експлантах через 4-6 тижнів (залежно від швидкості росту клітин), переноситься на свіже живильне середовище (субкультивується). Розмір транспланта (перенесеного шматочка) при культивуванні на агаризованому поживному середовищі зазвичай становить від 60 до 100 мг маси тканини на 30-40 мл живильного середовища.

Таким чином, техніка культивування тканин рослин дозволяє отримати тривалу пересадкову калюсну культуру з будь-яких живих тканинних клітин інтактної рослини. Клітини по-різному диференційовані (у тому числі і меристематичні) переходять *in vitro* до складного процесу дедиференціації, втрачають властиву їм структурну організацію та специфічні функції та індукуються до поділу, утворюючи первинний калюс.

У процесі субкультивування формується штам, що характеризується індивідуальними генетичними та фізіологічними особливостями.

При культивуванні рослинних клітин та при вирощуванні культури тканин застосовуються середовища Мурасіге-Скуга, Нагата-Такебе, Хеллера, Ніча-Ніча, Кнудсона та інші в різних модифікаціях.

Основними компонентами поживних середовищ для культури клітин та тканин рослин є мінеральні солі (макро- та мікроелементи), джерело вуглецевого харчування (зазвичай сахароза чи глюкоза), вітаміни, регулятори росту. Іноді до складу поживних середовищ включають комплексні органічні добавки (гідролізат казеїну або суміш амінокислот, дріжджовий екстракт, екстракти різних органів рослин).

Методи вирощування культури калюсних тканин

Поверхнєве культивування

Культура калюсних тканин вирощується поверхневим способом на напіврідкому агаризованому середовищі (концентрація агару – 0,6-1,0%), середовищі із застосуванням інших желуючих полімерів або на містках з

фільтрувального паперу або дисках з пінополіуретану, занурених у рідке живильне середовище.

Калюсна тканина, що вирощується поверхневим способом, є аморфною масою тонкостінних паренхімних клітин, що не має строго певної анатомічної структури. Колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим чи червоним; пігментованим повністю чи зонально.

Залежно від походження та умов вирощування калюсні тканини бувають:

- 1) пухкими, сильно обводненими, що легко розпадаються на окремі клітини;
- 2) середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками;
- 3) щільними, із зонами редукованого камбію та судин.

Як правило, у тривалій пересадочній культурі, на середовищах, що включають ауксини, особливо синтетичний аналог ауксину – 2,4-дихлорфеноксиоцтову кислоту (2,4-Д), калюсні тканини втрачають пігментацію і стають більш пухкими.

У циклі вирощування калюсні клітини після низки поділів проходять звичайний для клітин рослин онтогенез: вони приступають до зростання розтягуванням, потім диференціюються як зрілі калюсні клітини і, нарешті, деградують.

Калюсні клітини, що вирощуються поверхневим способом, часто застосовують для збереження в зростаючому стані колекцій різних штамів, ліній, мутантів, для регенерації рослин, з них також отримують суспензії клітин, що культивуються в рідкому живильному середовищі.

Суспензійне культивування

Культури клітин рослин, що вирощуються в рідкому поживному середовищі, зазвичай називають суспензійними культурами. Термін цей перестав бути суворо науковим і точним, оскільки пояснює основні особливості поведінки клітин за такого вирощування.

Отримано порівняно мало культур клітин вищих рослин, які за своїми параметрами повністю задовольняють вимогам суспензійного (глибинного) культивування. Значною мірою це пояснюється труднощами отримання культури клітин, що складається переважно з окремих клітин або їх невеликих агрегатів. Тому доцільно спочатку розглянути методи отримання клітинної суспензії, а також обговорити саме поняття суспензійної (глибинної) культури стосовно рослинних клітин.

Безумовно, вирощування клітинних суспензій у рідкому живильному середовищі має ряд переваг перед вирощуванням калюсних клітин поверхневим способом. Тут легше і більш відтворено можна впливати на метаболізм і зростання клітинних популяцій екзогенними чинниками.

Суспензійні культури зручніші для проведення біохімічних та молекулярно-біологічних експериментів – вивчення індукції ферментів та їх зв'язок з подіями клітинного циклу, експресії та репресії певних генів, ізолювання та характеристик мутантів.

Суспензійну культуру можна отримати з фрагментів органу рослини (диски паренхіми м'ясистих коренів моркви, петрушки, бульб картоплі та ін.), проте цей шлях більш трудомісткий і потребує більшого часу. Клітини експланту повинні при цьому утворювати первинний калюс, і тільки після цього поверхневі калюсні клітини, що потрапили в рідке середовище і розмножилися в ній, дадуть початок лінії, здатної зростати в суспензії.

Зазвичай для отримання культури клітин використовується культура калюсної тканини. Пухкі обводнені культури калюсних тканин більш придатні для переведення в суспензію, ніж структуровані щільні калюси.

Оптимальними підходами для одержання суспензії є:

- вирощування калюсів на середовищі з 2,4-Д,
- виключення із середовища іонів кальцію,
- обробка пектиназою транспланта, призначеного для вирощування суспензійної культури.

Для одержання культури клітин береться найбільш життєздатна (проліфелююча) частина калюсної тканини, а її кількість повинна бути в 15-20 разів більшою у розрахунку на об'єм живильного середовища, ніж при серійному культивуванні на агарі.

При цьому може використовуватися живильне середовище того ж складу, що і для поверхневого культивування, але в деяких випадках збільшують кількість ауксинів та (або) зменшують кількість цитокінінів. Режим перемішування та аерації при ініціації культури клітин зазвичай такий самий, як і при подальших серійних субкультивуваннях культур клітин на ролерах і гойдалках (кругова гойдалка – 10-12 оборотів/хв).

Утворення первинної суспензії рослинних клітин можна вважати результатом трьох процесів:

- 1) розпаду калюсної тканини на клітини та невеликі клітинні агрегати в момент внесення в рідке живильне середовище;
- 2) відділення клітин та клітинних агрегатів з поверхні шматочків тканини протягом перших субкультивувань;
- 3) поділу і зростання клітин, що утворилися за першими двома способами, і розпадання клітинних агрегатів, що розростаються, на більш дрібні агрегати і клітини.

Останній процес є типовим для зростання стабілізованої культури клітин вищих рослин, що перевивається.

Первинну суспензію перед субкультивуванням в спеціальному циліндрі поділяють на фракції за швидкістю седиментації (використовують верхню фракцію), або фільтрують через 1-2 шари марлі, нейлонові або металеві сита, щоб позбутися великих щільних шматків калюсної тканини, залишків експланту.

Фільтрування рекомендується і в наступних субкультивуваннях до придбання клітинної суспензією бажаних характеристик. Проте агрегованість суспензії залежить не тільки від характеристик початкової лінії, а й від умов культивування.

Для глибинного культивування рослинних клітин застосовують способи, розроблені для мікробіологічних цілей. Використовують закриті або відкриті системи у періодичному чи проточному режимах. Хоча при глибинному вирощуванні рослинних клітин принцип турбідостату практично не застосовується. Однією з причин є руйнування частини клітин при відведенні їх до оптичного приладу.

Вирощування суспензії клітин рослин в установках безперервного культивування за принципом хемостату застосовується як для вивчення метаболізму клітин, які стабільно підтримуються в різних фазах клітинного циклу, так і при промисловому вирощуванні клітинної біомаси з метою одержання економічно важливих продуктів.

Однак до теперішнього часу найбільш вивченим та поширеним режимом глибинного культивування клітинних суспензій є замкнута періодична система. У цьому випадку для аерації та перемішування суспензії використовують ролери, гойдалки (зазвичай кругові), ферментери з механічними та магнітними мішалками або ферментери барботажного типу, де аерація та перемішування здійснюється повітряним потоком.

Критеріями зростання в циклі вирощування є збільшення числа клітин, їх сирої та сухої маси. Модельна ростова крива має типову S-подібну форму. На ній розрізняють:

1) латентну (лаг) фазу, в якій видиме зростання інокуляту не спостерігається за жодним критерієм. У цьому спостерігається висока інтенсивність дихання, максимальні значення енергетичного рівня, інтенсивний синтез ДНК, РНК, білків та інших компонентів клітини, але низький мітотичний рівень. Тривалість періоду адаптації залежить від кількості та фізіологічного стану інокуляту та умов культивування;

2) експоненційну фазу, що характеризується зростанням із максимальною швидкістю, максимальними величинами мітотичної активності, а також переважанням дрібних клітин меристематичного типу;

3) лінійну, протягом якої швидкість зростання стала;

4) фазу уповільненого росту, пов'язаного з субстратним лімітуванням та інгібуванням продуктами обміну, що характеризується незбалансованим зростанням популяції за основними критеріями, зниженням рівня дихання, переходом частини клітин у диференційований стан, збільшенням частки великих вакуолізованих клітин, збільшенням синтезу вторинних метаболітів (серцевих глікозидів, антрахінону, діосгеніну);

5) стаціонарну фазу, що характеризується ще малою швидкістю деградації клітин, яка врівноважується розподілом клітин, високими біосинтетичними та біотрансформуючими потенціями життєздатних диференційованих клітин, низьким рівнем дихання та появою надзвичайно великих вакуолізованих клітин;

6) фазу деградації клітин із питомою швидкістю зростання, що приймає негативне значення.

Форма реальних ростових кривих може значно відрізнитись тривалістю фаз від модельної. Процеси ростового циклу залежать від виду рослини, кількості внесеного матеріалу та умов культивування (склад живильного середовища, температура, початкове значення рН, склад газової фази, швидкість перемішування). Первинний і вторинний метаболізм клітин рослин, що культивуються, видоспецифічний, залежить від типу диференціювання вихідних клітин рослини і регулюється умовами вирощування. Генетична мінливість клітин як наслідок їх культивування поза організмом, зникнення одних і поява інших стійких ознак, що передаються в ряді клітинних поколінь, призводить до виникнення з первинної калюсної тканини ліній клітин, що різняться генетично та фенотипово. Це дозволяє відібрати або створити експериментально лінії, що зберігають біосинтетичні системи, характерні для вихідної рослини, та лінії, що синтезують принципово нові речовини.

Культивування окремих клітин

Джерелом окремих (одиноких) клітин є клітинні суспензії в рідкому живильному середовищі, мацерація тканин рослин (*розмочування рослинних або тваринних тканин, що спричиняє їх розбухання, розм'якшення або розпад на окремі*

структурні елементи), ізольовані протопласти після відновлення ними клітинної стінки. При цьому ізольовані протопласти є ідеальними окремими клітинами.

Культивування окремих клітин дозволяє отримувати клони та досліджувати генетичну та фізіологічну стабільність або мінливість при вирощуванні клонового матеріалу. Окремі клітини є важливими для клонової селекції мутантних, гібридних, трансформованих ліній. Зазвичай у ці клітини вводять маркерні гени або створюють маркерні ознаки для забезпечення селективних умов відбору.

Індукція поділів окремих клітин можлива при застосуванні дуже багатого живильного середовища, причому обсяг середовища повинен бути мінімальним. Однак навіть при дотриманні всіх цих умов відсоток клітин, що розділилися, залишається дуже низьким. Більш ефективні методи «годуєного шару» або «тканини-няньки». Для створення «годуєного шару» беруть суспензію клітин того ж виду рослини. Клітинна суспензія повинна знаходитися в ранній стадії ростового циклу зростання. При досягненні колонією, що виросла з окремої клітини, розміру 0,5-1 мм, вона може бути перенесена для подальшого вирощування на агаризоване живильне середовище безпосередньо або на фільтр, поміщений на поверхню живильного агару. Використання «годуєного шару», «тканини-няньки» або мінімального обсягу середовища, в якому міститься окрема клітина, пов'язане з явищем, званім «дія фактора кондиціонування». Незважаючи на численні спроби визначити природу речовин, що індукують поділ окремої клітини, та механізм дії фактора кондиціонування, дане питання остаточно не вирішено.

Культивування рослинних протопластів

Для культивування протопластів можна використовувати метод *рідких крапель* (К. Као та ін., 1971). У цьому випадку суспензія протопластів у вигляді крапель у рідкому середовищі поміщається у пластикові чашки Петрі. Метод забезпечує хороший газообмін через повітряну фазу і дифузії в розчин продуктів, що екскретуються. Крім того, легко можна додавати свіжий розчин у потрібній концентрації. Однак при культивуванні цим способом протопласти

агрегуються у центрі кожної краплі. Нагромаджуючись, вони утворюють значну кількість фенольних або інших токсичних сполук, що перешкоджає подальшому успішному культивуванню. Цей метод також незручний, якщо потрібно дослідити розвиток індивідуальної колонії протопластів.

Інший поширений метод – *агарова культура* (Т. Нагата, І. Такебе, 1971). У цьому випадку певний обсяг суспензії протопластів в рідкому поживному середовищі наливають у пластикові чашки Петрі, додають рівний обсяг того ж середовища, що містить 1% агар-агару. Температура має перевищувати 45°C. Чашки заклеюють парафілюмом та культивують при температурі близько 28°C. Протопласти фіксовані в одному положенні та фізично віддалені один від одного. Цей метод має важливу перевагу: можна спостерігати для одного конкретного протопласту всі етапи його розвитку – формування клітинної стінки, поділ клітин, зростання та розвиток рослини. Недоліком цього методу є те, що можливе деяке пошкодження протопластів при змішуванні з теплим агар-агаром (рис. 4).

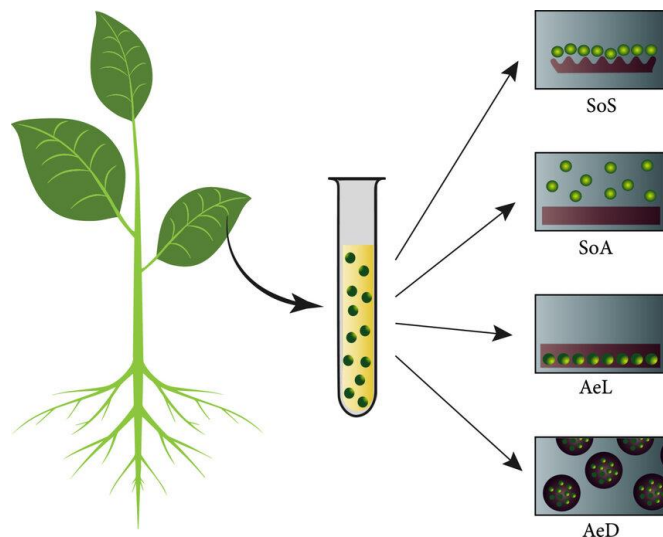


Рис. 4. Графічне представлення чотирьох різних режимів культивування протопластів: SoS: суспензія на жорсткому субстраті; SoA: суспензія на шарі агарози; AeL: протопласти, вбудовані в один шар агарозного гідрогелю; AeD: протопласти, інкапсульовані в краплі агарози.

Одним з варіантів даної методики є використання «*годуючих*» протопластів або клітин, підданих впливу рентгенівського або гамма-випромінювання (доза опромінення вибирається такою, щоб клітини втратили здатність до клітинного

поділу, але підтримували і стимулювали зростання інших клітин). Вони поєднуються з життєздатними протопластами і проліферують. Цей метод дозволяє культивувати суспензію протопластів нижчої концентрації, ніж та, що зазвичай необхідна їхнього зростання.

Подібним із цим методом є *метод спільних культур*. Він використовується для ефективного культивування протопластів, що важко культивуються. Такі протопласти культивуються разом із протопластами, відмінними швидким зростанням. Успіх такого культивування заснований на активних речовинах, що виділяються видами, що швидко ростуть.

Зручним варіантом методу рідких крапель є культивування в малому обсязі (до 1 мкл) поодиноких протопластів (мікроізоляція). У мікрокраплях, навіть якщо в них знаходиться тільки одна клітина, співвідношення об'єму клітини до об'єму живильного середовища таке ж, як у культурі щільністю близько 1000 клітин/мл.

За поживними потребами ізолювані протопласти подібні до цілих клітин. Тому живильні середовища подібні до клітинних культур. Найчастіше використовують середовища Мурасиге-Скуга, модифіковане середовище Нагата-Такебе, середовище В5 Гамборга-Евелейта, і середовище 8Р Као-Мічайлук, що є збагаченим вітамінами, амінокислотами і цукрами середовище В5 Гамборга. Усі ці середовища містять мінеральні речовини, що є джерелами макро- та мікроелементів, джерела вуглецю, стабілізатори осмотичного тиску, вітаміни, фітогормони.

Таким чином, використовуючи різноманітні методи, враховуючи характерні особливості вихідного матеріалу та дотримуючись всіх умов, можна успішно здійснити культивування рослинних протопластів, домагаючись в окремих випадках отримання цілої рослини з одиничних протопластів.

Детальна розробка техніки культивування рослинних клітин, отримання та культивування рослинних протопластів послужила основою для створення методів біологічного конструювання рослин із заданими властивостями.

Лекція 7

Особливості культивування клітинних суспензій

Суспензійні культури – окремі клітини або групи клітин, що вирощуються у вигляді суспензії в рідкому середовищі. Представляють собою відносно гомогенну популяцію клітин, яку легко піддати впливу хімічних речовин.

Суспензійні культури широко використовуються як модельні системи для вивчення шляхів вторинного метаболізму, індукції ферментів та експресії генів, деградації чужорідних сполук, цитологічних досліджень та ін.

Суспензійні культури використовують для промислового отримання вторинних метаболітів. Речовини, які продукують рослинними клітинами використовуються в медицині, парфумерній промисловості, рослинництві та інших галузях промисловості. До них відносяться: алкалоїди, терпеноїди, глікозиди, поліфеноли, полісахариди, ефірні масла, пігменти, антиканцерогени (птотецін, харрингтонін), пептиди (інгібітори фітовірусів). В даний час в різних країнах близько ста видів рослин використовується в біосинтетичній промисловості для одержання економічно важливих речовин, серед них – женьшень, раувольфія зміїна, наперстянка шерстиста і пурпурна, діоскорея дельтовидна, беладонна, паслін часточковий, дурман звичайний, конвалія травнева, рицина, агава, мак снотворний та ін.

Отримання вторинних метаболітів має свої особливості. Ділення клітин, що приводить до збільшення клітинної біомаси, і синтез вторинних метаболітів роз'єднані в часі. Накопичення вторинних метаболітів зростає у фазі

уповільненого росту клітинної популяції і досягає максимуму в стаціонарній фазі. Деякі алкалоїди активно синтезуються у фазі максимальної мітотичної активності (експонентний ріст), що є винятком. Знання таких закономірностей дозволяє регулювати процеси одержання цінних речовин. Механізми і умови, що блокують активний ріст клітин і клітинну проліферацію, одночасно активують ферменти вторинного метаболізму. Неспецифічні стресові умови, які впливають на клітини в кінці експоненційної фази, можуть стимулювати перехід до синтезу вторинних метаболітів і збільшувати їх вихід.

Ознакою «гарної» лінії служить здатність клітин до перебудови метаболізму і висока швидкість розмноження в конкретних умовах культивування. Морфологічні характеристики такої лінії: висока ступінь дезагрегації (5-10 клітин в групі); морфологічна вирівнюваність клітин (невеликі розміри, сферична або овальна форма, щільна цитоплазма).

Клітинну суспензію отримують, поміщаючи калюсну тканину в колбу з рідким поживним середовищем. Суспензія перемішується в колбі на гойдалці, що має швидкість перемішування 100-120 об/хв. При першому перенесенні на свіже середовище видаляють великі шматочки вихідного калюсу і великі агрегати, фільтруючи через 1-2 шари марлі, нейлонові сита, шприц з відповідним отвором. Для ініціалізації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої маси калюсної культури перенести на 60-100 мл рідкого поживного середовища. Частина суспензійної культури, яка використовується для пересадки на свіже середовище, називається *інокулюм*. Для кожної лінії культури клітин існує мінімальний обсяг інокуляту, при меншому розмірі якого культура не росте.

Тривалість першого циклу вирощування суспензії зазвичай дорівнює 15-20 діб в залежності від виду рослини, з якої вона була отримана, складу середовища, швидкості перемішування. Протягом цього часу відбувається дезагрегація калюсу та інтенсивний поділ клітин. Наступні цикли скорочуються до 10-14 діб. Для пересадки використовують культуру наприкінці фази уповільнення зростання.

Важливо оптимізувати обсяг інокулюму та початкову щільність культури.

Об'єм інокулюму зазвичай становить 10-20% від загального обсягу суспензії на початку культивування. При цьому початкова щільність культури знаходиться в межах 1-2 г/л сухою біомасою і підбирається таким чином, щоб лаг-фаза становила 1-3 діб. Підвищені кількості інокулюму призводять до пригнічення зростання клітинної популяції внаслідок нестачі кисню та накопичення серед токсичних продуктів метаболізму.

Ріст суспензійних культур клітин можна оцінювати за одним або кількома такими параметрами:

1. Обсяг осаджених клітин (ООК). Переносять невеликий обсяг суспензійної культури в мірну пробірку об'ємом 15 мл, краще всього конічну. Центрифугують 5 хвилин при 200 g. ООК – величина, яку складає обсяг осаду від об'єму суспензії, зазвичай, у %.

2. Число клітин. Підраховується в камері Фукса-Розенталя.

3. Сира й суха маса. Суспензія клітин фільтрується через змочений і зважений фільтр, вкладений у воронку Бухнера під слабким вакуумом. Клітини промивають дистильованою водою, відтягують воду під вакуумом і зважують знову разом з фільтром. Суха маса – визначається аналогічно, але зважується сухий фільтр, а клітини сушать разом з фільтром в термостаті при 60°C до постійної маси.

4. Вміст білка. Для визначення білка клітини збирають на фільтрі зі скловолокна, двічі промивають киплячим розчином 70% етанолу, сушать ацетоном, гідролізують 1M NaOH при температурі 85°C півтори години. Потім фільтрують і визначають білок за методом Лоурі.

5. Провідність середовища. Визначають за допомогою кондуктометра. Як правило, вона обернено пропорційна свіжій масі клітин.

6. Життєздатність культури визначають співвідношенням кількості життєздатних клітин до загальної кількості в мл суспензії. Життєздатні або живі культури характеризуються наявністю клітин з ядрами та рухом цитоплазми при фарбуванні препаратів барвниками: 0,5%-ним розчином синьої Евансу або 0,01%-ним розчином флуоресцеїн-ацетату.

У багатьох випадках вивчення особливостей розмноження та зростання клітин пов'язані з необхідністю використання синхронізованих клітинних популяцій. Як правило, клітинна популяція суспензійних культур не тільки гетерогенна, а й асинхронна, оскільки містить клітини, що відрізняються за часом входження до мітозу. Для синхронізації клітинних культур використовують методи індукції, коли перебіг клітинного циклу блокується в певному періоді під впливом або фізичних факторів, наприклад, зниженою температурою або хімічних сполук.

Так, індукторами синхронізації в системі клітин, що культивуються, можуть бути інгібітори синтезу ДНК – тимідин, 5-аміноурацил, оксисечовина. В результаті обробки клітин цими речовинами клітинний цикл триває лише до G1-періоду, і клітини накопичуються перед синтетичним періодом. Видалення з середовища інгібітора призводить до синхронізованого переходу клітин до синтезу ДНК, а потім і поділу.

Інший спосіб синхронізації полягає у створенні умов «голодування» по одному з компонентів культурального середовища, наприклад, ауксину, цитокініну, вуглеводів, азоту. Клітини накопичуються в G1 або S2-період клітинного циклу. Потім пасерування суспензії на середовище з відсутнім компонентом призводить до синхронізації клітинного поділу.

За допомогою індукції синхронізації клітинних поділів вдається підвищити мітотичний індекс із 2-3% до 30-35%. За отриманими даними будують ростові криві, які мають S-подібну форму і складаються з декількох ділянок: 1 – латентна, або лаг-фаза, де видимий ріст не спостерігається ні по одному з критеріїв, 2 – експонентна, ріст з прискоренням; 3 – лінійна, де швидкість росту постійна; 4 – фаза уповільненого зростання; 5 – стаціонарна фаза; 6 – фаза деградації клітин (рис. 5).

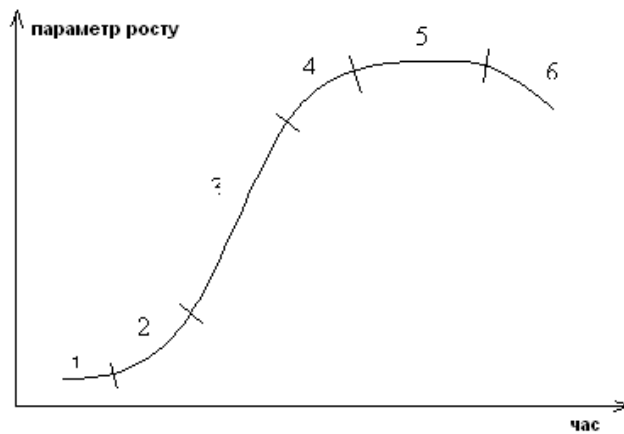


Рис. 5. Ростова крива

Реальна ростова крива може дещо відрізнятися від модельної. На форму ростових кривих впливають і генетична характеристика популяції (вид рослини), і кількість інокуляту, і умови вирощування (склад середовища, початкове значення рН, складу газової фази, швидкість перемішування).

Необхідно відзначити, що ростові криві для різних критеріїв не ідентичні. Дисбаланс між швидкостями клітинного розмноження (число клітин), синтезу структурних елементів клітини (суха маса) і збільшення обсягу та змісту вакуоль (сира маса) відображає специфіку онтогенезу вищої рослини.

Для глибинного культивування рослинних клітин застосовуються способи, розроблені в мікробіології. Розрізняють два види систем культивування: відкриту і закриту.

Для *закритої системи* характерний періодичний режим вирощування. Клітинна маса (інокулят) поміщається в певний об'єм середовища. Система закрита за всіма параметрами, крім газів, до кінця вирощування. Періодично подається свіже поживне середовище, а старе видаляється в тому ж обсязі. Клітини залишаються в системі протягом усього циклу вирощування.

Відкриті (проточні) культури характеризуються надходженням свіжого поживного середовища, при якому відбирається не тільки старе поживне середовище, але і частина врожаю клітинної маси.

Найбільш вивчено та розповсюджено закрите глибинне культивування. Для аерації і перемішування використовують різну апаратуру: ролери, гойдалки, магнітні мішалки і т.д. Дуже велике значення для росту і біосинтезу клітин in

vitro мають технічні характеристики систем культивування. При масштабуванні від невеликих за обсягом культур у колбах до великих багатолітрових ферментерів змінюються більшість параметрів культивування, зокрема аерація і перемішувальність.

Для культивування суспензій у виробничих масштабах застосовується апаратура, розроблена для мікробіологічної промисловості, проте дослідження останніх років показали, що рослинні клітини в силу своїх специфічних особливостей вимагають особливих посудин для культивування. Клітини рослин в десятки, сотні разів більше клітин бактерій і грибів, крім того, їх розміри змінюються в процесі онтогенезу. Якщо на початку експоненційної фази росту вони дрібні і щільні, то в стаціонарній фазі росту вони сильно збільшуються в розмірах і вакуолізуються. Чим більшою стає клітина, тим більше зростає небезпека її механічного пошкодження в процесі перемішування. У той же час клітини рослин, великі і важкі, вимагають ефективного перемішування. Осідання їх приводить до появи «мертвих» зон в посудинах, в яких відбувається швидке накопичення і старіння клітин. Наприклад, для культури клітин женьшеню негативний вплив механічного стресу при вирощуванні в ферментері з турбінними мішалками позначалося на життєздатності клітин вже при швидкостях мішалок понад 100-350 об/хв, це негативно впливало на синтез ними антрахінонів. Стійкість штаму до механічного стресу є важливою вимогою до культури і важким завданням для дослідників.

М'яке перемішування і аерацію забезпечує пневматичний спосіб перемішування потоком стисненого стерильного повітря, що подається в ферментер з висхідним потоком повітря. На жаль, і цей спосіб має свій недолік, тому що в культуральному середовищі виникає надлишок повітря, що призводить до кисневого голодування. Від концентрації кисню в середовищі залежать ріст і вторинний метаболізм клітин. У мікробіологічних системах вивчена взаємозалежність росту біомаси, виходу шуканого продукту і постачання киснем. Для рослин таких даних немає.

На ріст клітин, крім кисню, можуть впливати і інші гази. Наприклад,

вуглекислий газ може істотно впливати на довжину лаг-фази. Високий ступінь аерації може надавати негативну дію на ріст і синтез продуктів вторинного метаболізму, оскільки видаляються вуглекислий газ і леткі сполуки. Клітини рослин *in vitro* в порівнянні з мікроорганізмами мають низьку інтенсивність дихання, що теж повинно враховуватися при конструюванні посудини для культивування. Порівнювали ріст та освіта метаболітів клітинами в ферментерах різних типів. Клітини морінди лимонолистної, культивовані в ферментерах з продуванням повітря, містили антрахінону на 30% більше, ніж у колбах, і в два рази більше, ніж у ферментерах інших систем. Вихід біомаси клітин не змінювався залежно від типу біореактора. Клітини барвінку рожевого (*Catharantus roseus*) також синтезували більше індольних алкалоїдів при культивуванні в ферментері з продуванням повітря, ніж в біореакторах з механічним перемішуванням.

Відмінна особливість суспензійних культур клітин рослин – висока густина, необхідна для росту. Тому іншим ускладненням при культивуванні клітин рослин є збільшення в'язкості, яке супроводжує ріст біомаси. Це веде до адгезії. Адгезія (прилипання) клітин одна до одної, на поверхні культуральної судини і занурених у нього мішалок і датчиків викликає труднощі. У верхній частині судини поступово може утворюватися піна, що складається з білків і полісахаридів, які виділяються клітинами. У процесі культивування клітини злипаються і частина з них накопичується в цій піні, утворюючи «кірку». Зі збільшенням біомаси клітин збільшується і ця «кірка», знижуючи інтенсивність перемішування, що врешті-решт може призвести культуру до загибелі.

Клітини рослин мають меншу фізіологічну та метаболічну активність у порівнянні з мікроорганізмами. Час генерації (інтервал часу між двома послідовними клітинними поділами) рослинної клітини в 60-100 разів перевершує час генерації мікробної клітини. Пул проліферуючих клітин не перевищує 50- 60%, багато клітини швидко припиняють ділення і переходять у фазу спокою.

Всі ці обставини визначають тривале зростання популяції клітин при

накопичувальному, або періодичному, вирощуванні.

Підтримання стерильності тривалий час також є однією з технічних проблем, особливо при безперервному культивуванні.

Періодичне, або накопичувальне, культивування – це найпростіший спосіб вирощування клітин, що є поки традиційним.

Безперервне культивування

Інший метод вирощування клітинних культур – безперервне культивування – заснований на підтримці балансу між розведенням живильного середовища та видаленням частини суспензії.

Встановлено, що якщо за періодичного культивування клітинних суспензій в експоненційній фазі зростання в культуральну систему додавати свіже середовище, то поділ клітин може підтримуватися необмежено довго. Це стало основою створення систем, що дозволяють здійснювати безперервне культивування.

Культуральні системи, що функціонують безперервно, поділяють на напівпроточні та проточні.

При *напівпроточному режимі* вирощування через визначені інтервали часу проводиться відбір частини суспензії і розведення суспензії, що залишилася, свіжим середовищем. Через суспензію пропускають стерильне повітря. Культуру перемішують за допомогою магнітної мішалки. Культивування може тривати кілька місяців.

Проточний режим культивування дозволяє здійснювати безперервне забезпечення культуральної системи свіжим середовищем з видаленням рівного обсягу клітинної суспензії. У цьому режимі автоматизовані ферментери (культуральні судини) можуть функціонувати протягом кількох років. Ферментери, що використовуються для великих клітинних біомас, можуть досягати об'єму до 1500 л. Для здійснення багатостадійних процесів при промисловому культивуванні клітин-продуцентів речовин вторинного обміну використовують конструкції, що складаються із системи кількох ферментерів.

В основі *промислового виробництва БАВ* (лікарських субстанцій та ін.) з

культури клітин рослин лежить ряд послідовних стадій та операцій:

- отримання високопродуктивних продуцентів,
- розробка оптимальних умов культивування продуцента БАВ з максимальним біосинтезом цільового продукту,
- розробка та впровадження у практику відповідних методів та умов виділення та очищення БАВ,
- створення готових препаратів
- контроль якості.

Підготовка середовища для культивування продуцента та посівного матеріалу (перша стадія).

Для кожного продуцента БАВ, для кожного новоствореного калюсу та суспензійної культури рослин розробляється своє оптимальне середовище, яке має відповідати наступним основним вимогам:

- 1) забезпечувати хороше зростання біомаси та максимально можливе утворення цільового продукту – алкалоїдів, глікозидів, полісахаридів та ін. продуктів вторинного синтезу;
- 2) містити доступні за вартістю компоненти;
- 3) забезпечувати застосування найбільш економічних та ефективних прийомів виділення та очищення БАВ.

Середовища Мурасіге-Скуча (МС) і Шенке-Хільдебрандта (ШХ) відносяться до найбільш уживаних у роботі з культурами клітин рослин і виявилися ефективними для росту різних одно- і дводольних рослин. Середовище ШХ від інших середовищ відрізняється дуже високим, десятикратним вмістом мезоїнозинату. Середовища МС та ШХ містять залізо у хелатованій формі в комплексі з ЕДТА. Це забезпечує його доступність при рН до 8,0 протягом усього періоду зростання культури, тоді як за відсутності хелатируючого агента нестача заліза може виявитися дуже швидко.

Компоненти середовища для вирощування калюсних та суспензійних культур можна розділити на шість груп, що зазвичай відображає порядок приготування концентрованих розчинів:

- 1) основні неорганічні поживні речовини (макроелементи);
- 2) мікроелементи
- 3) джерела заліза;
- 4) органічні добавки (вітаміни);
- 5) джерела вуглецю;
- 6) регулятори росту рослин.

У реактор з мішалкою за допомогою вакууму вносять розчини, що почергово готуються, дотримуючись наступного порядку:

- розчин макросолей;
- агарований розчин;
- розчин хелату заліза;
- розчин мікроелементів;
- розчин кальцію, нітрату;
- розчин цукру.

Суміш ретельно перемішують протягом 5 хв., потім 1-2 хв ведуть вертикальне перемішування шляхом барботажу при включеній мішалці. Обов'язково відбирають контрольні проби для визначення рН середовища (рН має бути в межах 5,0-6,2; температура розчину ($22 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$)).

У промислових умовах стерилізація поживних середовищ здійснюється двома основними методами: періодичним та безперервним.

Періодичний метод стерилізації застосовують під час використання невеликих обсягів середовища. Він полягає в тому, що середовище, нагріте до певної температури ($120-125^{\circ}\text{C}$) безпосередньо в ферментаторах або спеціальних парових стерилізаторах ГПСД-1700, витримується при цій температурі протягом 30-60 хв (залежно від об'єму середовища або від її складу, після чого охолоджується до $27-30^{\circ}\text{C}$).

Безперервний метод стерилізації доцільно застосовувати під час використання великих обсягів середовища. Приготоване середовище із спеціальної судини за допомогою насоса подається в стерилізаційну колону, через яку пропускається гостра пара (тиск пари близько 5 атм.). Пара подається

зверху внутрішньою трубою, що має щілинні прорізи, завдяки чому пара надходить у середу і швидко її нагріває. Середовище в колону подається знизу і рухається спіралью навколо внутрішньої труби.

Нагріта в колоні до необхідної для стерилізації температури (близько 125°C), середовище надходить у спеціальний апарат – витримувач, де воно витримується при температурі 120-125°C. час витримування залежить від складу середовища та становить 5-10 хв. З витримувача стерильне середовище надходить у змійниковий холодильник. Тут воно охолоджується до 30-35°C (на виході) і надходить у ферментатор. Безперервний метод стерилізації має ряд переваг перед періодичним методом: можливість автоматичного регулювання процесу, швидке та рівномірне нагрівання середовища, забезпечення більш повної стерильності середовища.

Підготовка посівного матеріалу – одна з відповідальних операцій у циклі біологічного методи отримання БАВ із культури тканин.

Культуру тканини (колекцію культури) заводи отримують з академій та університетів. Кожна культура має паспорт із докладним описом морфології, фізіології, характеристики середовища для культивування та зберігання.

Для глибинного (суспензійного) методу культуру тканини попередньо вирощують на агаризованому стерильному середовищі в пробірках, потім з пробірок висіють у колби з рідким живильним середовищем і проводять дві генерації глибинного вирощування на гойдалках протягом 38-46 діб. для кожної генерації. З другої генерації культури (в колбі) роблять посів у невеликий (10 л) інокулятор, а потім культуру, що добре розвивається, переносять в основний ферментатор. Для посіву в основному ферментатор використовують від 5 до 10 об'ємних процесів посівного матеріалу (інокулята).

Біосинтез БАВ (друга стадія, основна ферментація).

Стадія біосинтезу, головна ферментація – основна біологічна стадія процесу одержання БАВ із культури тканин.

Завдання цієї стадії – забезпечення для продуцента БАВ таких умов розвитку, які сприяли б максимальному рівню біосинтезу БАВ. Ефективність

стадії біосинтезу залежить від рівня утворення БАВ із культури тканини та визначається генетичними особливостями організму, складом живильного середовища, режимом розвитку продуцента. Вона також залежить від часу максимального утворення БАВ, вартості компонентів середовища, піногасників та енергетичних витрат, пов'язаних із процесом розвитку організму – продуцента БАВ.

В даний час виробництво БАВ із культури тканин здійснюють двома способами ферментації: суспензійне культивування (занурення глибинне культивування) та культивування на поверхні твердого середовища (твердофазна ферментація).

Суспензійне культивування для біосинтезу БАВ.

Для великомасштабного культивування рослинних клітин для препаративного одержання речовини вторинного синтезу використовують спеціальні металеві та скляні ферментатори (біореактори) різної конструкції (з мішалкою або барботажного типу) (рис. 6).

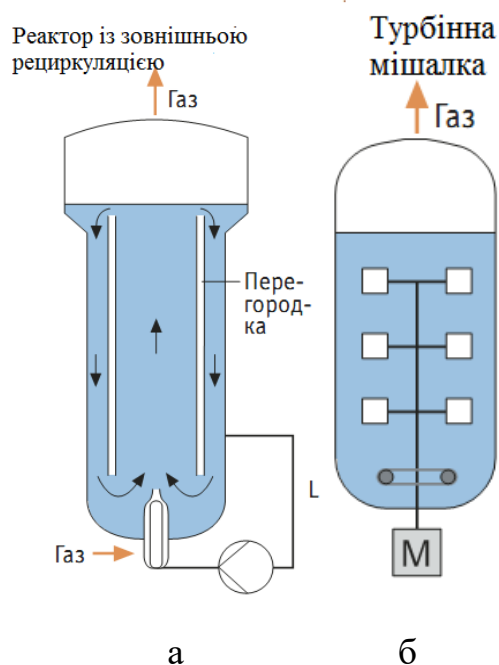


Рис. 6. Ферментери барботажного типу (а) та з механічним перемішуванням (б)

Режим ферментації періодичний (накопичувальний) чи безперервний,

головним чином хемостатний. Біосинтез продуктів вторинного синтезу проводять у ферментерах обсягом від 0,1 до 63 м³ та більше.

Аерацію культуральної біомаси здійснюють стерильним повітрям через барботер. Повітря стерилізують, зазвичай, шляхом фільтрації на двох-трьох послідовно встановлених фільтратах. У ході культивування клітин рослин регулюють температуру (25-37°C), рН і окислювально-відновний потенціал.

Процес культивування ведуть до того часу, поки триває інтенсивний синтез цільового продукту й у середовищі нічого очікувати вичерпані поживні речовини. При визначенні кінця культивування необхідно враховувати дані мікроскопічного контролю за станом культури, відсутність постійної мікрофлори, концентрацію основних поживних речовин, біомаси, цільового продукту, рН.

Процес розвитку – продуцента БАВ у ферментаторах проходить при строгому контролі всіх стадій, дуже точному виконанні розробленого регламенту умов накопичення БАВ Велика увага приділяється підтримці заданої температури культивування, активного кислотного середовища рН, ступеня аерації та швидкості роботи мішалки. З огляду на споживання організмом основних поживних компонентів субстрату (джерел вуглецю, азоту, калію, магнію, фосфору, амінокислот, вітамінів) контролюється утворення БАВ.

Особливу увагу при розвитку продуцента у ферментаторах звертають на процес піногашення. При продуванні повітря через організм-продуцент БАВ часто відбувається рясне утворення піни, яка суттєво порушує перебіг всього процесу розвитку штаму-продуцента БАВ у ферментаторі. Основна причина появи великої кількості піни – висока в'язкість живильного середовища, обумовлена рясним накопиченням біомаси.

Для боротьби з піною в ферментаторах при отриманні біомаси використовують різні поверхнево-активні речовини: рослинні олії (соєва, соняшникова), мінеральні олії (вазелінове, парафінове), спирти жирні кислоти. Нерідко як піногасники використовують спеціальні синтезовані речовини (силікони, діазобуталкарбоміл та інші сполуки).

Вирощування проводять протягом близько 70 діб. у період ростового циклу здійснюють мікробіологічний, біохімічний та візуальний контроль. Візуальний контроль проводять не рідше одного рази на 10 днів – відбраковують інфіковані тканини.

Лекція 8

Методи клонального розмноження рослин

Метод клонального мікророзмноження рослин — одержання в умовах *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному екземпляру. В його основу покладено унікальну здатність рослинної клітини до реалізації властивої їй тотипотентності, тобто під впливом екзогенних факторів давати початок цілому рослинному організму.

Порівняно із традиційними способами вегетативного розмноження, метод клонального мікророзмноження має ряд переваг, а саме:

- забезпечує одержання генетично однорідного посадкового матеріалу, одержання безвірусних рослин;
- високий коефіцієнт розмноження (10^5 - 10^6 — для трав'янистих і квіткових рослин, 10^4 - 10^5 — для чагарникових, деревних, 10^4 — для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які не дають життєздатного насіння;
- можливість проведення робіт протягом року та економію площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу;
- автоматизацію процесу вирощування.

Вперше застосування методу клонального мікророзмноження було запропоновано наприкінці 1950-х рр. французьким ученим Ж. Морелем, якому вдалося одержати перші рослини-регенеранти орхідей. Досягненню успіху

передувало розроблення техніки культивування апікальної меристеми рослин в умовах *in vitro*.

В області застосування клонального мікророзмноження спостерігається тенденція до постійного розширення, що в першу чергу стосується розмноження *in vitro* дорослих деревних порід, особливо хвойних і використання техніки *in vitro* для збереження рідкісних видів і лікарських рослин, занесених в Червону книгу.

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на чотири етапи (рис. 7):

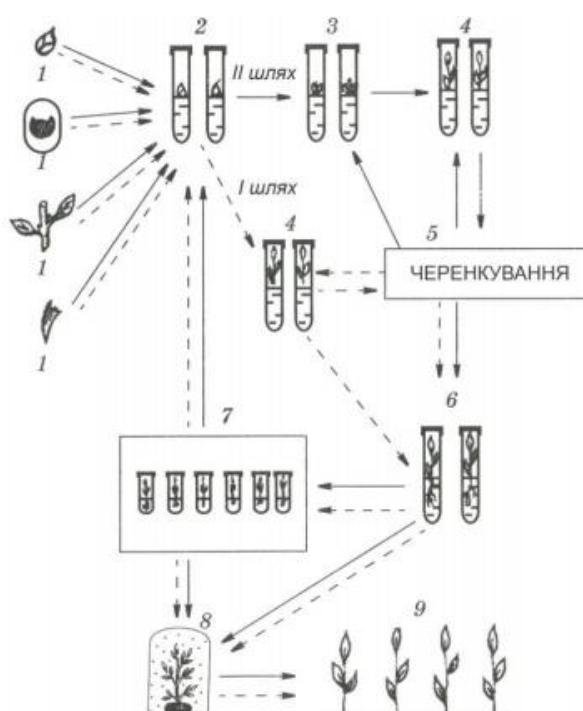


Рис. 7. Схема клонального мікророзмноження рослин методом активування розвитку меристемних тканин (І шлях) та індукція утворення адвентивних бруньок на первинному експлантаті (ІІ шлях). 1 – вибір вихідного експлантату; 2 – одержання стерильної культури; 3 – утворення адвентивних бруньок безпосередньо на первинному експлантаті; 4 – ріст бруньок і формування мікропагонів; 5 – розмноження мікропагонів (мікроживцювання); 6 – укорінення мікропагонів; 7 – депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+2 °C); 8 – переведення рослин у тепличні умови; 9 – висадження рослин-регенерантів у польові умови.

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантатів та одержання активно ростучої стерильної культури;

2. Власне мікророзмноження, в результаті чого досягається одержання максимальної кількості мікропагонів;

3. Укорінення розмножених пагонів і наступна їх адаптація до ґрунтових умов, а за необхідності – депонування рослин-регенерантів при знижених температурах (+4-2°C, +10°C);

4. Вирощування рослин-регенерантів в умовах теплиці і підготовка їх до реалізації або висадження в польові умови.

Мікроклональне розмноження рослин і може бути здійснене наступними методами:

- активуванням розвитку меристемних тканин рослин (апекс стебла, пазушні і сплячі бруньки та інтеркалярні зони стебла) (рис. 8);
- індукцією виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату;
- індукцією соматичного ембріогенезу;
- диференціацією адвентивних бруньок у первинної перепасированої калюсної тканини.

Серед методів клонального мікророзмноження рослин основним є *метод активування розвитку меристемних тканин рослини*, що базується на інгібуванні апікального домінування досягається двома шляхами:

- видаленням верхівкової меристеми стебла з подальшим мікроживцюванням пагона *in vitro* на безгормональному середовищі;
- додаванням у живильні середовища речовин цитокінінового типу дії, завдяки чому індукується розвиток численних пазушних пагонів.

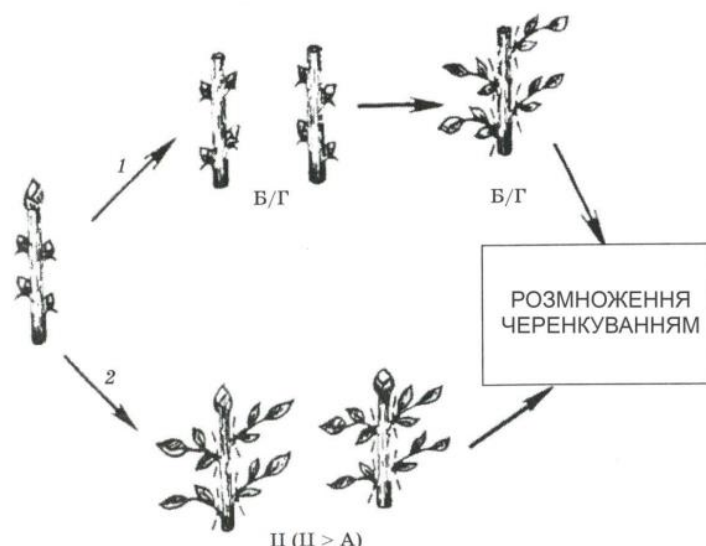


Рис. 8. Схема розмноження рослин методом активування меристемних тканин: 1 – видалення верхівкової меристеми; 2 – додавання в живильне середовище цитокінінів (Б/Г – безгормональне середовище; Ц – цитокініни; А – ауксини)

Як цитокініни зазвичай використовують 6-бензиламінопурин (БАП) або 6-фурфуриламинопурин (кінетин), а також 2-ізопентениладенін і зеатин.

Отримані таким способом пагони відокремлюють від первинного материнського експлантату і культивують на свіжоприготовленому живильному середовищі, стимулюючи проліферацію пазушних меристем і виникнення пагонів більш високих порядків.

Наразі цей метод широко застосовують у виробництві безвірусного посадкового матеріалу різних сільськогосподарських культур – технічних (цукровий буряк, хміль, тютюн, топінамбур, стахис); овочевих (томати, картопля, огірок, перець, гарбуз, спаржа та ін.); культур промислового квітникарства (гвоздика, хризантема, троянда, гербера); тропічних і субтропічних рослин (рододендрон, азалія, камелія, чай та ін.); плодових та ягідних культур (яблуна, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, агрус та ін.); деревних порід (тополя, верба, вільха, береза, горобина, секвоя, туя, ялівець та ін.). Для деяких сільськогосподарських культур, зокрема картоплі, технологія клонального мікророзмноження поставлена на промислову основу. Застосування методу активування розвитку меристемних тканин рослин дозволяє одержувати з однієї меристеми картоплі більше 10^5 рослин на рік.

Технологія передбачає також одержання в пробірках мікробульб – цінного безвірусного насіннєвого матеріалу.

Другий метод – індукція виникнення адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантату – заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах живильного середовища відновлювати органи і регенерувати цілі рослини. За допомогою цього методу можна досягти регенерації майже будь-яких органів і тканин рослини (ізольованих зародків, листків, стебел, сім'ядоль, лусочок і денця цибулин, сегментів коренів та зачатків суцвіть) за умов одержання безвірусного матеріалу. Цей процес, як правило, відбувається на живильних середовищах, що містять один із цитокінінів або при його поєднанні з речовиною групи ауксинів. Як ауксин у цьому випадку найчастіше використовують (3-індоліл оцтову кислоту (ІОК) або α -нафтилоцтову кислоту (НОК) у співвідношенні 10:1 або 100 : 1.

Індукція виникнення адвентивних бруньок – один із найбільш поширених методів мікроклонального розмноження вищих рослин. Так, багато цибулинних квіткових рослин (нарциси, лілії, гіацинти, гладіолуси, тюльпани) були розмножені з цибулинних лусочок, сегментів базальної частини денця цибулин, експлантатів листків; представники роду *Brassica* (капуста кольорова, ачанна, брюссельська, листовая, брокколі) – із сегментів гіпокотилля, сім'ядоль, листків; цибуля та часник – з верхівкової меристеми, тканини дінця цибулини; томати – з апікальних або пазушних меристем; петунія – із сегментів корінців; глоксинія, фіалки – із сегментів листових пластинок; деякі представники деревних порід – з ізольованих зрілих і незрілих зародків.

Третій метод – одержав назву соматичного ембріогенезу і ґрунтується на диференціації із соматичних клітин зародкоподібних структур, які за зовнішнім виглядом нагадують зиготичні зародки. Основна відмінність утворення зародків *in vitro* від *in vivo* (у природних умовах) полягає в тому, що соматичні зародки розвиваються асексуально поза зародковим мішком і є біполярними структурами, в яких одночасно спостерігається розвиток апікальних меристем стебла і кореня. Метод використовується для розмноження більшості рослин із

родин Orchidaceae та Rutaceae, деяких представників злакових (пшениця, ячмінь), люцерни, редису, винограду, а також деяких видів деревних порід (осика, евкالیпт, дуб, ялина звичайна). Формування ембріоїдів в культурі тканин відбувається в дві стадії. На першій стадії клітини експлантату диференціюються за рахунок додавання в живильні середовища ауксинів (зазвичай 2,4 Д) і перетворюються в ембріональні. На другій – клітини розвиваються в ембріоїди, що досягається шляхом зменшенням концентрації або повного видалення ауксину зі складу живильного середовища. Соматичний ембріогенез можна спостерігати безпосередньо в тканинах первинного експлантату, а також у калюсній культурі. Однак останній спосіб вважається менш придатним для використання при клональному мікророзмноженні, оскільки отриманий посадковий матеріал буде генетично нестабільним відносно рослини-донора. Зазвичай соматичний ембріогенез відбувається при культивуванні калюсних клітин у рідкому живильному середовищі (суспензії) і є найбільш трудомістким, тому що не дає можливості реалізувати властиву клітинам тотипотентність. Разом з тим, цей метод розмноження має свої переваги, не вимагаючи підбору спеціальних умов для укорінення і адаптації пробіркових рослин, оскільки соматичні зародки є повністю сформованими рослинками. При використанні відповідної техніки їх капсулювання з цих ембріоїдів можливо одержувати штучне насіння.

Четвертий метод клонального мікророзмноження – диференціація адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині. Обмеженою мірою застосовується для одержання посадкового матеріалу *in vitro*, що пов'язано з виникненням небажаних змін при періодичному пересаджуванні калюсних тканин на свіже живильне середовище в разі тривалого культивування. Вони полягають у зміні плоїдності культивованих клітин, структурних перебудовах хромосом, виникненні генних мутацій, втраті морфогенетичного потенціалу. Поряд з генетичними спостерігаються і морфологічні зміни рослин: низькорослість, неправильність жилкування листків і їх розміщення на стеблі, утворення вкорочених, потовщених міжвузлів,

химерність, знижена стійкість до ураження хворобами і шкідниками. Тому період неорганізованого росту при мікроклональному розмноженні повинен бути зведений до мінімуму.

Метод диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині має низку переваг. По-перше, він ефективний та економічно вигідний, тому що в процесі розмноження з кожної індивідуальної калюсної клітини при сприятливих умовах культивування може сформуватись адвентивна брунька, яка дає початок новій рослині. Крім того, для деяких рослин він є єдиним можливим методом розмноження рослин в культурі тканин, а також представляє великий інтерес для селекції. Рослини-регенеранти, отримані методом диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині, відрізняються за генетичними та морфофізіологічними ознаками, що дає можливість селекціонерам проводити добір рослин за господарсько важливими ознаками та оцінювати їх інтродукцію в польових умовах.

Слід наголосити, що метод диференціації адвентивних бруньок у первинній і перепасированій калюсній тканині доцільно застосовувати тільки до тих рослин, яким властива генетична стабільність калюсної тканини, а варіабельність між рослинами-регенерантами не перевищує рівня природної мінливості. До таких рослин можна віднести амаріліс, томати, спаржу, деякі деревні породи та інші культури. Шляхом калюсної культур були розмножені цукровий буряк, деякі представники роду *Brassica*, кукурудза, рис, пшениця та інші злакові, соняшник, льон. Підібрані оптимальні умови *in vitro*, сприйнятливі для регенерації рослин з калюсу огірка, картоплі, томатів.

Основна перевага клонального мікророзмноження полягає в можливості одержання генетично однорідного, безвірусного посадкового матеріалу. Цього досягають, використовуючи меристематичні тканини апексів і пазушних бруньок органів стеблового походження. Як відомо апікальна меристема складається з конуса наростання, одного або двох листових зачатків (примордіїв) і є вільною від інфекцій.

Англійським вченим Ф. Уайтом в 1943 р. було вперше висловлено припущення про можливість відсутності вірусів у меристематичних тканинах, уражених патогенами рослин. В 1950-х рр. були успішно проведені досліді з одержання з точки росту безвірусних рослин жоржин. На думку авторів цього методу у інфікованій рослині вірус поширюється з відставанням від швидко ростучих молодих органів, особливо в недиференційованих тканинах, де концентрація вірусу може знижуватись до його повної відсутності. Теоретичні концепції, покладені в основу цього методу, знайшли практичне підтвердження в сучасних наукових дослідженнях.

Однак слід відмітити, що зона, вільна від вірусів, істотно відрізняється для різних видів і сортів рослин, а також залежить від їх виду. Наприклад, у колеоптилі злаків, розміри ділянки верхівки можуть досягати до 250 мкм, що виключає проникнення в неї вірусів шляхом швидкого транспортування по провідній системі, проте допускається можливість його повільного поширення через плазмодесми, які з'єднують меристематичні клітини. При культивуванні апікальної меристеми картоплі розміром 200 мкм на живильному середовищі і подальшому одержанні рослин-регенерантів було показано, що серед отриманих рослин тільки 10% було не інфіковані Х-вірусом, тоді як ураженість Y-вірусом досягала 70%. Це свідчить про низьку ефективність застосування культивування апікальної меристеми, як методу оздоровлення інфікованих вірусами рослин, що було підтверджено результатами, отриманими низкою зарубіжних і вітчизняних меристемних лабораторій. При дослідженні апікальних меристем рослин гвоздики, цимбідіума, уражених вірусами CarMV та CarVMV, в умовах *in vitro* були одержані інфіковані мериклони.

Одержання безвірусної апікальної меристеми від інфікованих патогенами рослин можна досягти шляхом застосування методів попередньої термо- або хемотерапії вихідних рослин.

Метод термотерапії – використання сухого гарячого повітря.

Застосовують як в умовах *in vivo*, так і в *in vitro*. Існують різні гіпотези щодо дії механізму звільнення рослин від вірусів у процесі термотерапії. Згідно

однієї з них, високі температури впливають безпосередньо на рибонуклеїнову кислоту та білкову оболонку вірусних частинок і спричинюють їх фізичне руйнування, позбавляючи вірулентності. Друга гіпотеза полягає в тому, що висока температура проявляє вплив на віруси через метаболічні процеси рослин. Так, під дією високих температур порушується рівновага між синтезом і деградацією вірусних частинок. В разі переваги синтезу – концентрація вірусу в уражених тканинах зростає, і навпаки.

Для проведення термотерапії рослини поміщають у спеціальні термокамери (термостати) і поступово підвищують температуру протягом першого тижня від 25 до 37°C, збільшуючи щодобово параметри температур на 2°C. Не менш важливим при термотерапії є створення і підтримання протягом усього процесу оптимального режиму фізичних параметрів: температури +37°C, освітленості лампами денного світла – 5000 лк та 14-16 годинного фотоперіоду залежно від культури, відносної вологості повітря в термокамері 90 %. Тривалість термотерапії залежить від складу вірусів та їх термостійкості.

Однак існують рослини (наприклад, цибулинні культури, цимбідіум, троянди та ін.), ріст яких пригнічується в результаті тривалої термотерапії *in vivo*. Тому для таких рослин доцільно проводити термотерапію рослин-регенерантів *in vitro*.

Крім позитивного впливу термотерапії на звільнення рослин від вірусів, виявлено, також ефективність дії високих температур на точку росту і процеси морфогенезу деяких квіткових культур (гвоздика, хризантема, фрезія) в умовах *in vitro*. Застосування термотерапії дозволяє збільшити коефіцієнт розмноження рослин на 50-60%, підвищити адаптацію пробіркових рослин-регенерантів до ґрунтових умов, а також одержати більш високий відсоток безвірусних маточних рослин. Перевірку рослин-регенерантів на наявність вірусів проводять за допомогою імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії та рослин-індикаторів.

Хемотерапія – полягає у додаванні в живильне середовище, на якому культивують апікальні меристеми аналогу гуанозину – 1β-Д-рибофуранозил-

1,2,4-триазол карбоскиміду (комерційна назва – вірозол) у концентрації 20-50 мг/л. Це противірусний препарат широкого спектра дії. При використанні вірозолу в культуральних середовищах відсоток безвірусних меристем рослин збільшується до 80-100%. Позитивні результати хемотерапії були отримані для сливи, черешні, малини, деяких квіткових та інших рослин. Слід наголосити, що термо- і хемотерапевтичні методи оздоровлення посадкового матеріалу від вірусів економічно є малоефективними. Тому, наразі, створюють форми рослин з генетичною стійкістю до вірусів за допомогою методу трансгенезу.

Фактори, які впливають на процес мікроклонального розмноження. На ефективність мікроклонального розмноження впливають фізіологічні особливості рослини-донора, хімічні та фізичні умови культивування. Найбільш важливими факторами є вибір материнської рослини та експлантату.

При виборі материнської рослини необхідно враховувати фізіологічні, сортові і видові особливості. Рослини-донори повинні бути здоровими, не уражені грибними, бактеріальними та вірусними хворобами і знаходитись у стані інтенсивного росту (вихід із фази спокою і перехід до активного росту). При виборі експлантату необхідно враховувати його вік, будову і походження. Для забезпечення максимальної стабільності клонованого матеріалу і запобігання появи аномальних рослин, як експлантат використовують молоді, слабо диференційовані тканини. Оскільки, експлантати від ювенільних рослин набагато краще укорінюються, порівняно із зрілими. Особливо це стосується деревних порід. Тривалість культивування впливає на ефективність клонального мікророзмноження рослин. При тривалому культивуванні протягом декількох пасажів змінюється фізіологічний стан пагонів і зростає частота їх укорінення, а експлантат набуває ознак ювенільності (*період від появи проростків до цвітіння*), що впливає на підвищення морфогенетичного потенціалу.

Успіх введення в культуру *in vitro* рослинних тканин часто визначається ефективністю стерилізації і вибором стериліанту, який залежить від особливостей експлантату (ніжних, легко ушкоджуваних рослин і таких тканин, що мають більш щільну оболонку). Дуже часто внутрішнє ураження вихідних

експлантатів патогенами буває набагато сильнішим поверхневого, тому їх попередньо обробляють фунгіцидами і антибіотиками для знищення грибних і бактеріальних інфекцій.

Залежно від виду рослин необхідно проводити дослідження для визначення оптимального складу та консистенції живильних середовищ. На клональне мікророзмноження впливають регулятори росту, біологічно активні речовини, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи. До фізичних факторів вирощування відносяться температура і умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 лк при фотоперіоді 14-16 годин, відносній вологості повітря – 65-70%, але величини цих параметрів залежать від конкретної культивованої культури. Висока інтенсивність світла може спричинювати хлорози і затримувати розвиток рослин-регенерантів.

Однак при перенесенні в ґрунт, у них відмічається краща приживлюваність і більша активність росту. Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22-26⁰С в денний період доби і 18-22⁰С – в нічний. В деяких випадках зниження температури супроводжується підвищенням ефективності розмноження рослин. Для підвищення коефіцієнта розмноження необхідно для рослин кожного виду підбирати індивідуальні умови культивування з урахуванням його природного ареалу.

Адаптація рослин-регенерантів

Пересадження рослин-регенерантів в субстрат – відповідальний етап, який завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливим періодом для пересадження пробіркових рослин є весна або початок літа. Рослини з двома – трьома листками і добре розвинутою кореневою системою обережно виймають із колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним крючком. Корені ретельно відмивають від залишків агару і висаджують в ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований при +85⁰С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрат використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1).

Виключення складає сімейство орхідних, для яких використовують субстрат із сфагнового моху, суміші торфу, листків бука або дуба, соснової кори (1:1:1).

Підготовленим ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горщечки, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горщечки з рослинами поміщають в теплиці з регульованим температурним режимом (+20-22°C), освітленістю не більше 5000 лк і вологістю 65-90%. Для кращого росту рослин створюють умови штучного туману. За неможливості створення таких умов, горщечки з рослинами накривають скляними банками або поліетиленовими пакетами, які поступово відкривають до повної адаптації рослин. Через 20-30 днів після посадки, добре укорінені рослини підживлюють розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасіге і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. По мірі росту рослин їх періодично пересаджують у більші ємності зі свіжим субстратом. В подальшому акліматизовані рослини вирощують відповідно до прийнятої агротехніки для кожного індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов – найбільш дорога і трудомістка операція. Нерідко після пересаджування рослин в ґрунт спостерігається призупинення їх росту, опадання листків і загибель рослин. Ці явища пов'язані, в першу чергу, з порушеннями діяльності продихового апарату листків пробіркових рослин, внаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не утворюються кореневі волоски, що призводить до порушення поглинання кореневою системою води і мінеральних солей із ґрунту. Тому доцільно на третьому або четвертому етапах процесу клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікоризацію рослин (*процес утворення симбіотичних відносин між грибами та кореневою системою рослин*) (для мікотрофних), яка відіграє позитивну роль у їх забезпеченні мінеральними і органічними поживними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також в захисті рослин від патогенів.

Індійськими вченими було запропоновано простий метод запобігання швидкого зневоднення листків рослин, вирощених *in vitro* під час їх

пересаджування в польові умови. Метод полягає в тому, що листки протягом всього акліматизаційного періоду необхідно зрошувати 50% водним розчином гліцерину або суміші парафіну чи жиру в діетиловому ефірі (1:1). Застосування цього методу допомагає запобігти проведенню довгих і утруднених процесів загартування пробіркових рослин і забезпечує 100% їх приживлюваність.

Лекція 9

Історія культивування тваринних клітин

На початку 20 століття виникає низка напрямів у наукових дослідженнях, пов'язаних із можливістю виділення з організму тварин ряду клітин, з метою їхнього подальшого культивування в умовах *in vitro*.

Біотехнологія культур клітин заснована:

1 – на здатності виділених з організму клітин рости та розмножуватися поза організмом (*in vitro*);

2 – на можливості змінювати функціональні властивості клітин у культурі завдяки зміні умов культивування або їх часткової генетичної модифікації.

Проте розробка клітинних технологій, для отримання цінних продуктів – метаболітів клітин, стикається з низкою труднощів, зумовлених особливостями поведінки клітин у культурі. Найважливіші їх пов'язані з тим, що у культурі дуже важко зберегти спеціалізовані властивості клітин, оскільки після переведення в нові умови (*in vitro*) вони швидко адаптуються і можуть змінювати свої властивості. Крім того, в культурі клітини схильні до дегенерації (переродження) і трансформації. Деякі фахівці вважають, що це пов'язано із старінням архітектури клітини. Основні властивості всіх живих систем – здатність розмножуватися, видозмінюватися та реагувати на подразнення.

Функціонально клітина являє собою набір органел, що забезпечують обмін речовиною та енергією із зовнішнім середовищем обмежених плазматичною мембраною.

Зростання клітини – це збільшення її біомаси. Зростання біомаси може бути забезпечене за рахунок збільшення середньої маси клітин (*гіпертрофія*) або числа клітин (*гіперплазія*). Оскільки гіпертрофія у нормі перебуває під жорстким контролем, то поняття «зростання» переважно вкладають збільшення кількості клітин у культурі.

Проліферація клітин одна із фундаментальних властивостей клітини. Процес розмноження клітин складається із сукупності послідовних, пов'язаних між собою подій. Послідовний ряд сукупності молекулярних подій між мітотичним поділом клітин називають клітинним циклом.

Визнання ідеї про те, що клітки тканин вищих тварин можна виділити з організму і потім створити умови для зростання і відтворення їх *in vitro*, датується першим десятиліттям XX століття.

Після того, як стало відомо, що подібні процеси реальні, наступив *другий етап* робіт, початок якому поклала демонстрація можливості вирощування і репродукції в таких клітинах інфекційних агентів-вірусів, що фільтруються.

Третій етап історії починається з часу, коли була показана практична можливість отримання в тваринних клітинах великих кількостей вірусного матеріалу для застосування у вакцинних препаратах, і тягнеться до часу, коли:

- 1) стало можливим вставити в клітини специфічні екзогенне одержані гени і одержати їх експресію;
- 2) підтверджена можливість вирощування в культурі з одиночної клітини цілої популяції.

Коли такі популяції одержували з клітини, що виділяла в навколишнє середовище антитіла, то всі молекули антитіл у надосадної рідині були однаковими. Причини і сліdstва цих двох феноменів в даний час інтенсивно досліджуються, і вони знаменують собою початок *четвертого етапу* робіт в даній області.

Щоб показати здатність клітин тварин рости і ділитися в культурі, потрібно було оволодіти рядом підходів і методик.

1. Методики отримання кліток, вільних від екзогенних прокаріотів і грибів.
2. Методики розробки середовища, в яких зростання «вирізаних з тканини» або ізолюваних клітин не пригнічується.
3. Методики спостереження за клітинами в динаміці їх розвитку.
4. Методики безперервного культивування культур клітин тварин *in vitro* і підтримки їх вільними від інших біологічних агентів.

Наукову основу для розробки цих методик складає уявлення про клітину як основний структурний елемент живих організмів тваринного і рослинного походження.

Ідея про те, що клітини тканин тварин можна виділити з організму і потім створити умови для зростання і відтворення їх *in vitro* виникла на базі концепції, що належить Клоду Бернару. Він припустив, що не тільки живі організми здатні зберігати постійність внутрішніх умов, незалежно від змін в навколишньому середовищі. Клітина поза організмом тварини теж прагнути підтримувати свої внутрішні умови. Якщо відмінності між внутрішніми і зовнішніми умовами будуть незначними, то висока вірогідність зростання і розподілу клітини. Таке розуміння явища приводить до необхідності розробки середовищ, здатних підтримувати і стимулювати зростання кліток поза організмом.

Трохи пізніше, в 1885 році, У. Ру (W. Roux) показав можливість збереження поза організмом живих тканин на практиці. Він зберігав в життєздатному стані оболонку курячого ембріона в теплому фізіологічному розчині. Згодом він став автором великої кількості робіт із проблем ембріології *in vitro*. Для того щоб показати що клітини тварин мають можливість рости та ділитися в культурі розроблено методики:

- Отримання клітин, вільних від екзогенних прокаріотів та грибів;
- Методики по розробці середовищ, в яких ріст «вирізаних тканин» або ізолюваних клітин не подавляється;
- Методики спостережень за клітинами в динаміці їх росту;

- Методики безперевного культивування ін витро та підтримки їх вільними від інших біологічних об'єктів.

У 1837 році сформувалася концепція отримання уявлень про клітини тварин.

1878 році Бернарду вдалося відкрити теорію про те що клітини тварин мають можливість зберігати свої внутрішні умови, ділитися поза організмом.

1898 рік Лянгерн показав що клітини шкіри людини можна зберігати в життєздатному стані в кислому середовищі, зі збереженням здатності їх до реімплантації.

1912 рік інкубація клітин курячого серця ембріону протягом 34 років шляхом пересівів.

Продовжуючи роботи Ру Рос Харрісон удосконалив методику «висячої краплі». Він використовував невеликі шматочки тканини, вилучені з медулярної судини жаби і занурені в її лімфатичний тромб, і витримував їх у вигляді краплі на нижній стороні покривного скла, розташованого поверх поглиблення у предметному склі. У 1907 р. йому вдалося спостерігати за допомогою такої «камери» зростання нервових клітин протягом декількох тижнів; він встановив, що швидкість росту цих клітин складає 20 мкм за 25 мін. Тоді як експерименти Харрісона були направлені на те, щоб отримати відповіді на питання, що відносяться до фізіології нервових клітин жаби, методика, яку він використовував, була застосована Барроузом для клітин інших тканин теплокровних тварин. Цей дослідник в 1910 р. замість лімфатичного тромбу використовував тромб плазми курки.

У 1913 р. Алексис Каррель застосував плазму крові, збагачену екстрактом ембріона. Добавка такого екстракту прискорювала зростання тканин. Застосована методика забезпечувала значно більшу вірогідність успіху, ніж та, яку використовували Льовіс (1911) і Рід (1908 р.).

Рід готувала культури кліток з кісткового мозку морської свинки і намагалася вирощувати експланти на середовищі певного хімічного складу. Робота Карреля привернула велику увагу, оскільки вона була опублікована під

інтригуючою назвою – культивування «безсмертних» клітин. Інкубація клітин серця курячого ембріона була опублікована 17 січня 1912 р.

Пересівання клітин продовжил Еблінг, як він сам заявляв, працюючи з ними 34 роки. Оскільки Каррель був хірургом і вельми досвідченим в питаннях асептики, він зміг внести істотний внесок в культивування кліток тварин *in vitro*. В той же час організація і технічні умови експериментів, що проводилися, були дуже громіздкими. Асистенти Карреля були одягнені в довгополі гумові халати темного кольори з капюшонами для повного прикриття голови. Процедури були тривалими і обтяженими багатьма деталями. В результаті тих вимог, які висувалися автором відносно запобіжних складних засобів для запобігання контамінації, навколо даного предмету створилася атмосфера таємничості і винятковості, що швидше гальмувало прогрес, чим сприяло йому. Проте їм було досягнуто багато чого. Зокрема, навіть за відсутності антибіотиків він добився успіху в пересадці клітин, використовуючи хірургічну техніку для відокремлення окремих колоній і перенесення їх в нові умови зростання. Каррель також продемонстрував своїм колегам наукове значення тих спостережень, які можуть бути зроблені в процесі пересадки клітин. В ході виконаних робіт був внесений ряд поправок в рецептуру середовища культивування. Зокрема, Тірод модифікував розчин Рінгера і на додаток до курячої сироватки і ембріонального екстракту став використовувати коагулят фібрину.

Для спостереження за подвоєнням клітин тварин Канті у 1928 р. розробив метод кинофотомікрографії.

У цей же період був розроблений додатковий і дуже істотний підхід в техніці роботи з клітинами. Мається на увазі застосування трипсину для звільнення клітин з тканинної матриці, в якій вони знаходяться. Проте ця методика не знаходила визнання до тих пір, поки в 1937 р. Симмс і Стідлман використовували її для пасивування кліток між культурами плазми. Ця методика дає можливість успішно застосовувати в культурах індивідуальні клітини, а не тканини.

Вперше клони клітин в культурі з одиночної клітини були одержані Ерлом із співробітниками в 1948 році.

Ігл (1955) систематично досліджував поживні потреби клітин в умовах, доти поки в 1961 р. Хейфлік і Мурхед не виділили лінію диплоїдних клітинлюдини (ДКЛ) WI-38, вважалося, що один раз встановлена клітинна лінія має необмежений час життя. Щодо лінії WI-38 було показано, що період її існування в культурі обмежується приблизно 50 подвоєннями популяції. Перед відмиранням популяції для клітин цієї лінії характерний феномен старіння. Однак при відмиранні ці клітини залишалися диплоїдними й не мали ознак злоякісних змін. Клітини, виділені з ракових пухлин або трансформовані в ході культивування, характеризуються «безсмертністю» і корелюють із гетероплоїдністю. Перші суспензійні культури клітин тварин, як правило, ґрунтувалися на клітинах злоякісних тканин. Це – клітини HeLa, виділені з ракової пухлини шийки матки людини. Перевиваюча лінія карциноми шийки матки була виділена ще в 1952 році Джеєм зі співробітниками, вона використовується й у наш час у багатьох лабораторіях світу.

Наступний етап в історії культивування диплоїдних клітин людини пов'язаний зі встановленням факту, що вони є генетично стабільними і вільними від всіх відомих латентних і онкогенних вірусів. Тому лінії диплоїдних клітин людини дозволено застосовувати для отримання продуктів, що призначаються для людей. Ця догма залишається діючою і в даний час, хоча новітні відкриття виразно показали присутність в клітинах, виділених з нормальних тканин, потенційних онкогенів, ідентичних тим, які знайдені в таких відомих онкогенних вірусах, як вірус саркоми Рауса і вірус саркоми Молоні.

Раус ще в 1910 році індукував пухлину, використавши профільтрований екстракт курячої пухлини. Ця пухлина була індукована РНК-вірусом (вірус саркоми Рауса). Пізніше було встановлено, що ряд вірусів здатний індукувати виникнення пухлин, такі віруси були названі онкогенними.

Лекція 10

Введення клітин у культуру. Системи культивування клітин

Введення клітин у культуру, їхнє походження

Відповідно до мети і завдань експериментальної роботи можна виділити два напрямки культивування тваринних клітин: – культури клітин; – культури органів і тканин (органні культури).

Культури клітин позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістіотипову архітектуру й пов'язані з нею біохімічні ознаки й зазвичай не досягають рівноважного стану при відсутності спеціальних умов. Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує одержання великої маси клітин, потім їх ідентифікують (за фенотиповими ознаками, шляхом вирощування в селективному середовищі, генотипово), розділяють на ідентичні паралелі й, якщо це необхідно, зберігають. Динамічні властивості культивованих клітин часто важко контролювати, також важко реконструювати *in vitro* деякі клітинні взаємодії, що спостерігаються *in vivo*. У зв'язку із цим деякі дослідники віддають перевагу використанню клітинної системи, що зберігає структурну цілісність вихідної тканини.

Список типів клітин, які вже введені в культуру, досить великий. Це елементи сполучної тканини людини (фібробласти), кісткові тканини (кістка й хрящі), скелетні, серцеві й гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінка, легені, нирки та ін.), клітини нервової системи, ендокринні клітини (наднирники, гіпофіз, клітини острівців Лангерганса), меланоцити й різні пухлинні клітини.

Продукти, які отримують з клітин тварин:

- віруси вакцин (герпесу; поліомієліту, протикору, проти свинки, проти крастуни, проти бішенства, проти жовтої ліхорадки, проти грипу, проти герпесу, проти цитомегаловірусу, проти аденовірусу, проти кліщового інцефаліту);

- антитіла;
- інтерферони;
- ферменти;
- цільні клітини;
- інсектициди;
- імунорегулятори;
- гормони;
- фактори росту.

Віруси вакцин. Першою вакциною є вакцина проти поліомієліту. Для цього використано нирки мавпи. Після виділення лінії діплоїдних клітин людини стали використовувати клітини людини, як безпечніші. Треба враховувати онкогенність клітин для їх безпечності.

На теперішній час мало утворюють вакцин, це пов'язано:

- контроль якості дуже строгий;
- кошторис розробки дуже трудомісткий та дорогий особливо якщо вакцини випускають для країн, які не мають спроможності платити;
- вакцини готують в інактивованому вигляді або в субодиничній формі тобто витрачається в 10 разів більше антигену, ніж у живих вакцинах;
- продуктивність вірусів в клітинах низька.

Для спрощення механізму виготовлення вакцин необхідно уявити генерацію продуктів на молекулярно-біологічному рівні, тобто створення цільового продукту при використанні вірусного кодованого антигену на поверхні клітин, інфікованих вірусом герпес-симплекс. Такий антиген присутній у великій кількості, тобто добре продукується.

Ферменти. Клітина містить 2 тис. ферментів. Але найбільш популярними є тромболітичні ферменти. Тромбоемболія – складне захворювання. Тому необхідно рано діагностувати його та лічити фібрінолітичними ферментами – стрептокіназою, яка являє собою білок бактеріальний та урокіназою – білок виділений з сечі людини. Ці ферменти розкладають згусток крові а також фактори коагуляції крові.

Основні поняття та етапи культивування клітин

Після виділення клітин із тканин тварин та переведення їх у живильне середовище їх називають *первинною культурою* доти, доки не проведуть їх субкультивування. Субкультивування здійснюють після досягнення повного моношару первинними клітинами або виходом кількості клітин на стаціонарний рівень. При цьому первинну культуру пересаджують у 2 або 4 флакони з використанням нового живильного середовища. Надалі пересадки здійснюють, як правило, щотижня. Якщо при цьому клітини зберігають диплоїдність і властивості клітини не відрізняються від вихідного експлантату, їх називають *клітинною лінією*. У деяких випадках клітини виявляють високу генетичну нестабільність та їх властивості сильно змінюються аж до трансформації, утворення пухлинних клітин. Клітини в культурі можуть бути представлені різними типами. Такі клітини можуть бути використані для клонування, тобто для отримання клонів.

Клітинні штами мають специфічні властивості, які можуть зберігатися протягом тривалого культивування. Перехід клітин до невизначено тривалого зростання культури, зазвичай, пов'язані з формуванням анеуплоїдного каріотипу. Інші штами клітин, наприклад, культура клітин HeLa, отримані з пухлинних тканин, і їх трансформація відбулася *in vivo*. Крім того, первинні клітини культури можуть придбати здатність до швидкого росту не за рахунок трансформації, а за рахунок перехресного зараження іншими трансформованими клітинами, які можуть витіснити клітини первинної культури. Така здатність «взаємозабруднень» різними типами клітин потребує дотримання жорстких умов асептики під час ведення культур.

Необхідно враховувати, що живильне середовище для культивування є джерелом поживних речовин для клітин, і його склад у процесі культивування може швидко змінюватися. Клітини, що ростуть у культурі, постійно виділяють у середу продукти метаболізму, деякі з яких є необхідними компонентами для регуляції росту клітин.

Метаболічні процеси можуть бути умовно поділені на реакції первинного та вторинного обміну (первинні та вторинні метаболіти). До реакцій первинного обміну відносять синтез та розщеплення нуклеїнових кислот, білків та їх попередників, а також більшості вуглеводів, ліпідів, деяких карбонових кислот. До реакцій вторинного обміну відносять такі реакції, що супроводжуються утворенням алкалоїдів, антибіотиків, триспорових кислот, гіберелінів, пігментів. Не всі типи клітин утворюють вторинні метаболіти. Необхідно відзначити, що розподіл реакцій на первинні та вторинні досить умовний, тому що важко визначити суттєвість чи не суттєвість того чи іншого метаболіту для клітин у даний момент. У поняття *інтермедіати* або *прометаболіти* включають прості цукри, амінокислоти, азотисті основи та ін. У 1939 р. В.Н.Шапошников сформулював положення згідно з яким кожен продуцент у своєму розвитку проходить дві фази, які були названі Ж.Д.Бу' Локком (1961) трофофазою (від грецького *trofe* – харчування) та ідіофазою (від грецького *idios* – свій, специфічний).

Первинна культура клітин – це популяція клітин, виділена з тієї чи іншої тканини, органу або природного середовища та переведена в нові для неї умови зростання.

Клони – це потомство однієї клітини чи організму, мають повну генетичну подібність із батьківської клітиною чи організмом. Клони можуть бути отримані тільки при вегетативному розмноженні.

Анеуплоїдія – гетероплоїдія, явище, при якому клітини організму містять змінене число хромосом, кратне гаплоїдному набору.

Первинний обмін – метаболізм нуклеїнових кислот, білків, частини ліпідів та вуглеводів, тобто компонентів, що забезпечують життя клітини.

Вторинний обмін, як правило, метаболізм запасних речовин (вуглеводів, ліпідів, алкалоїдів та ін). Поділ на первинний та вторинний обмін відносний.

У період трофофази здійснюється інтенсивний синтез первинних та деяких вторинних метаболітів, у цей час відбувається інтенсивний ріст культури та низька швидкість утворення екзогенних вторинних метаболітів. У період

ідіофази знижується швидкість росту культури та здійснюється інтенсивне утворення вторинних метаболітів. Час проходження трофофази та настання ідіофази різний для різних культур і його можна регулювати шляхом внесення в середу культивування різних попередників метаболізму або антиметаболітів. Антиметаболіти мають структурну подібність до метаболітів.

Популяція клітин не завжди гомогенна й має фіксований фенотип. Деякі культури, наприклад, кератиноцити епідермісу, містять стовбурові клітини, клітини-попередники й кератинізовані лускаті клітини. У такій культурі відбувається постійне відновлення за рахунок стовбурових клітин, проліферація й дозрівання клітин-попередників, а також необоротна диференціація, що супроводжується «злущуванням» лускатих клітин у культуральне середовище.

Яку тканину краще брати для введення в культуру, дорослу або ембріональну, нормальну або пухлинну? Культури, отримані з ембріональних тканин, характеризуються кращою здатністю до виживання й більш активним ростом у порівнянні з відповідними зрілими тканинами. Причиною цього служить низький рівень спеціалізації й наявність реплікуючих клітин-попередників в ембріонах. Проліферативна здатність дорослих тканин нижча, вони містять більше спеціалізованих клітин, що не діляться. Одержання первинних культур клітин дорослих тканин і їхнє розмноження є більш складним завданням, тривалість життя таких культур, як правило, невелика. Нормальні тканини дають початок культурам з обмеженим часом життя, тоді як культури, отримані з пухлин, здатні проліферувати необмежено довгий час. Диференціація нормальних клітин у культурі супроводжується зазвичай повним припиненням проліферації клітин. У культурах пухлинних клітин можлива часткова диференціація при збереженні здатності до проліферації.

Свіжовиділені культури називаються первинними культурами до початку пасирування або субкультивування. Клітини первинної культури зазвичай гетерогенні й характеризуються низькою проліферацією. У них найбільш повно представлені типи клітин тієї тканини, звідки вони були отримані. Пасирування забезпечує можливість продовження існування культури, можливість

клонування, дослідження й збереження властивостей клітин. При цьому утворюються більш однорідні популяції, а також втрачаються спеціалізовані клітини. Після декількох пересівань лінія клітин або гине, або трансформується й стає постійною клітинною лінією.

Пасивування клітинної культури є важливим методом для продовження життя клітин та їхньої кінцевої трансформації в постійну клітинну культуру.

Утворення постійної клітинної культури відбивається на комплексі морфологічних особливостей клітин:

1. Зменшення розмірів клітин.
2. Падіння адгезивності клітин.
3. Округлення клітин.
4. Збільшення ядерно/цитоплазматичного відносини.
5. Зниження часу подвоєння клітин з 3 годин до 12 годин, і, як наслідок, збільшення швидкості росту клітин.
6. Зниження залежності клітин від сироватки.
7. Збільшення ефективності клонування.
8. Зниження залежності від субстрату.
9. Збільшення гетероплоїдності та анеуплоїдності.

Властивістю «безсмертності» володіють в основному клітини, отримані з пухлин. Поява постійної лінії клітин констатується за морфологічними змінами (зменшення розміру клітин, зниження їх адгезивності, округлення, збільшення ядерно/цитоплазматичного відношення, збільшенню швидкості росту (час подвоєння клітин у культурі знижується з 36-48 до 12-36 годин), за зниженням залежності від сироватки, за збільшенням ефективності клонування, за зниженням залежності від субстрату, за збільшенням гетероплоїдності (хромосомні відмінності між клітинами) і анеуплоїдності й за збільшенням до утворення пухлин. Нормальні клітини можуть трансформуватися в постійну лінію, не стаючи при цьому злоякісними.

Характеристика клітин, що культивуються in vitro

Клітини того самого типу в тканині взаємодіють один з одним і

погоджують швидкість розмноження, щоб підтримувати належну щільність популяції. «Соціальний» контроль такого роду чітко проявляється при реакціях на ушкодження. Наприклад, коли ушкоджений епітелій, клітини по краях рани стимулюються до поділу й наповзанню на оголену поверхню доти, поки вона знову не буде закрита; у цей момент швидка проліферація й рух клітин припиняються. Подібне явище можна спостерігати на дисоційованих клітинах у культурі. Епітеліальні клітини або фібробласти, поміщені в чашку, у присутності сироватки будуть «приклеюватися» до поверхні, розпластуватися й ділитися доти, поки не утвориться суцільний моношар, у якому сусідні клітини стикаються.

Адгезивні контакти забезпечуються утворенням комплексів з поверхневих рецепторів мембрани клітини. У результаті поперечного руху глікопротеїдів у мембрані утворюються електронощільні пляшки глікопротеїнових комплексів. Такі пляшки формуються у відповідь на вплив антитіл, аглютинуючих агентів (лектини) або сусідніх клітин. При адгезії субстрат діє як багатовалентне антитіло, а пляшки, які утворюються, називають «адгезивними плямами». Ці плями багаті «адгезивними білками» і завжди виділяють елементи цитоскелету, які містять глікопротеїди. Завдяки такій дії зменшується «розрідження» мембрани, і клітина захищається від округлення. Утворені на клітині адгезивні плями формують виступи, за допомогою яких і відбувається переміщення. Виступи цитоплазми (псевдоніжки, псевдоподії) при контакті із сусідньою мембраною гальмують рух. Клітини в цьому випадку направляють свої псевдоподії в іншому напрямку (феномен контактного гальмування). Коли культура стане моношаровою, активність псевдоніжок і рух клітин припиняється. Нормальні клітини перестають ділитися, це явище відомо як гальмування проліферації, залежить від густини клітин. Якщо такий моношар «поранити» голкою таким чином, щоб на чашці утворилася вільна від клітин смужка, клітини із країв цієї смужки починають просуватися на вільне місце й ділитися. Спочатку такі явища пояснювали тільки контактним гальмуванням клітинного ділення, але це, мабуть, не відбиває суті справи.

Густина клітинної популяції, при якій клітини в суцільному моношарі перестають ділитися, збільшується з підвищенням концентрації факторів росту в середовищі. Крім того, виявилось, що якщо культуральна рідина буде протікати по поверхні чашки з острівцями клітин, то клітини, що омиваються середовищем, яке щойно пройшло над іншими клітинами, будуть ділитися повільніше, ніж ті, які омиваються середовищем, що пройшло над вільними від клітин ділянками. У середовищі, що протікало над клітинами, не вистачає якихось важливих поживних речовин або факторів росту.

Фактор росту зазвичай присутній у середовищі в концентрації близько 10^{-10} М (приблизно одна молекула в об'ємі сфери діаметром 3 мкм). Один фібробласт має близько 10^5 рецепторів фактора росту, кожний з яких має дуже високу спорідненість до нього. Таким чином, у кожної клітини досить рецепторів, щоб зв'язати всі молекули ростових факторів в об'ємі сфери діаметром близько 150 мкм.

Крім того, вважають, що значна частина фактора росту, зв'язаного рецепторами клітинної поверхні, швидко поглинається шляхом ендоцитозу й руйнується. Із цього ясно, що сусідні клітини конкурують між собою за найменші кількості факторів росту. Такого роду конкуренція важлива як для клітин у тканині, так і для культивованих клітин, вона запобігає росту популяції вище деякого рівня її густини.

Конкуренція за фактори росту й поживні речовини не єдиний фактор, що впливає на швидкість поділу в клітинній культурі. Форма клітин під час їх розшарування й руху по поверхні субстрату на вільні місця теж сильно впливає на їхню здатність ділитися. При культивуванні нормальних клітин у суспензії, коли вони не прикріплені до твердої поверхні й тому мають округлу форму, вони майже ніколи не діляться (залежність поділу від прикріплення). Вплив розшарування клітин на проліферацію можна продемонструвати при вирощуванні клітин на субстратах з різною адгезивністю поверхні або на таких субстратах, де є лише маленькі адгезивні ділянки, на яких клітина може прикріпитися, але не може розшаруватися. Частота поділу клітин зростає зі

збільшенням ступеня їх розшарування. Мабуть дуже розшаровані клітини можуть уловлювати більше молекул фактора росту й поглинати більше поживних речовин завдяки своїй більшій поверхні.

Однак деякі типи клітин, майже не здатні до проліферації в суспензії, активно діляться, як тільки їм вдається вступити в контакт із ділянкою субстрату, навіть якщо ця ділянка настільки мала, що клітина не може на ньому розшаруватися. Такі «фокальні» контакти є місцями з'єднання (хоча й непрямого) внутрішньоклітинних актинових філаментів з молекулами позаклітинного матрикса. Ці й інші спостереження наводять на думку, що контроль клітинного ділення якимось чином пов'язаний з організацією цитоскелету. Хоча механізм і функції цього зв'язку не з'ясовані, можна вважати, що залежність поділу клітин від їхнього прикріплення, ймовірно, дозволяє тканині зберігати цілісність і запобігає проліферації клітин, що відокремилися від нормального оточення. Цикл прикріплення й відкріплення, ймовірно, дозволяє перегрупувати адгезивні контакти як між клітинами, так і між клітинами й матриксом, щоб вмонтувати тільки що утворені дочірні клітини в тканину, перед тим як вони зможуть почати наступний цикл ділення. Ослаблення контактів, мабуть, є важливою особливістю проліферативної поведінки більшості типів клітин. Наприклад, у ранній стадії реакції фібробластів на ростовий фактор відзначається руйнування їхніх фокальних контактів. Втрата керованості росту в ракових клітин майже завжди пов'язана з необоротним зменшенням клітинної адгезивності, що проявляється також у втраті фокальних контактів при вирощуванні таких клітин у культурі.

Зміна ростових властивостей культивованих клітин називається трансформацією. Трансформація – процес необоротний й, мабуть, включає генетичні зміни в тій специфічній частині спадкової інформації, що контролює неопластичний фенотип, що додається до трансформованого геному хазяїна. Зміна ростових властивостей є однією з адаптивних особливостей, що дозволяє клітинам проліферувати в умовах, несприятливих для нетрансформованих клітин. У такий спосіб в умовах, які обмежують ріст нормальних клітин,

трансформовані клітини будуть рости до більш високої густини популяції, що, очевидно, буде пов'язано з їхньою зниженою потребою у факторах росту. Існують докази, що основна зміна при трансформації пов'язана зі зміною транспорту поживних речовин через клітинну мембрану, а це, у свою чергу, може зробити клітини менш залежними від «геометричних» факторів росту.

Трансформовані клітини здатні рости в умовах, у яких геометричні характеристики, а саме відношення площі поверхні до об'єму менш сприятливі. Отже, трансформовані клітини будуть рости в суспензійних культурах, утворюючи сферичні клони. Так, трансформовані клітини, будучи введені імунологічно толерантній тварині у відносно невеликих кількостях, можуть утворювати пухлини. Із цієї причини трансформація іноді прирівнюється до злоякісних змін. Трансформація може бути або вірусною, або «спонтанною». Більшість досліджень проведені з клітинами, що піддавалися вірусній трансформації. Коли при цьому використовували добре відомі трансформуючі віруси, такі, як віруси SV40 і поліоми, то властивості трансформованих клітин проявлялися дуже наочно й були описані докладно. Аналогічні зміни, що спостерігалися після спонтанної трансформації, привели до припущення, що така трансформація є результатом активації послідовностей генів (онкогенів), що вже були присутніми у геномі трансформованої до цього клітини, подібної з такими у вірусному геномі. Багато досліджень підтвердили, що спонтанно трансформовані клітини мають таку ж послідовність основ у ДНК, як і в клітинах, трансформованих вірусами. Але в одній з робіт було показано, що аналогічні (нерозрізнені) зміни викликаються також крапковими мутаціями в нормальних генах. Старіння характерне для клітин, що мають обмежений потенціал проліферації, тобто низьку густину насичення при ідеальних умовах культивування. Прикладом можуть служити лінії диплоїдних клітин людини. Підвищена здатність до росту трансформованих клітин означає, що трансформація переважає над процесом старіння.

Старіння, безумовно, залежить від генетичних факторів, тому що кожен вид має характерну тривалість життя, але варіабельність усередині популяцій за

цим показником свідчить також про вплив фенотипу. При адаптуванні диплоїдних клітин людини (лінія WI38) уже із самого початку було показано, що культивовані клітини можуть проявляти феномен старіння й мають обмежений час життя (50 ± 10 подвоєнь популяції). Залежні від віку зміни, які при цьому спостерігалися, включали подовження міжмітотичних інтервалів ($19 \pm 25\%$ - $31 \pm 41\%$ /годину), зміна метаболізму, рівнів ферментів й експресії продукту. Слід зазначити, що не встановлено чіткого зв'язку між тривалістю життя залежно від походження клітини (миша, людина) і потенціалом подвоєння їхніх клітин у культурі.

Обмежені за тривалістю життя клітинні лінії, наприклад лінії диплоїдних клітин фібробластів, не є ідеальними об'єктами для цілей виробництва, оскільки їх повинні використати до того, як у клітинах відбудуться серйозні зміни старіння. У практичних відносинах це означає, що період життя цих клітин, коли їх можна застосовувати з метою виробництва, становить між 12 й 30 пасажами (у першому випадку – для приготування посівного матеріалу). Трансформовані клітини не мають обмеженої тривалості життя, і це обумовлює таку їхню перевагу в біотехнології, як використання в якості субстрату для генерації різних продуктів у поєднанні з більш високою густиною популяції клітин, більш високими швидкостями росту й здатністю рости в суспензіях.

Поживні середовища й умови культивування

Після виділення клітин із тканини або організму й поміщення їх у культуру культуральне середовище повинно забезпечувати всі зовнішні умови, які клітини мали *in vivo*. Це забезпечує виживання клітин, їхню проліферацію й диференціацію. Позаклітинне середовище повинно забезпечувати клітини поживними й гормональними факторами, тобто мати все необхідне для росту й виживання клітин.

Культури клітин тварин і людини висувають певні вимоги до рідкої (поживне середовище), газоподібної (концентрація газів) і твердої (поверхня субстрату) фази. Поживне середовище представляє собою розчин певного складу, до якого додаються компоненти нез'ясованого біологічного походження

(добавки плазми, сироватки крові, тканинні екстракти й т.д.). Основу поживних середовищ складають сольові розчини. Мінеральні компоненти в цих розчинах підібрані так, що розчин виконує буферні функції, підтримуючи постійний кислотно-лужний баланс середовища в процесі культивування. Сталість рН середовища є однією з головних вимог щодо умов культивування.

Для приготування поживних середовищ зазвичай використовуються сольові розчини Ерла й Хенкса. Ці розчини, як і фосфатно-сольовий буфер Дульбеко й Фогта використовуються також для зрошення й промивання клітин при пасируванні культур, виділенні клітинних ліній й інших маніпуляцій з культурами клітин. Іншою важливою умовою культивування є осмотичний тиск. Він визначається числом молів осмотично активних часток (іонів і неіонізованих молекул) розчинених речовин на 1 кг розчинника (осмоляльність) або на 1 літр розчину (осмолярність). У розведених водних розчинах ці величини близькі. Діапазони рН й осмоляльності, при яких відбувається розмноження клітин, вузькі й варіюють залежно від типу клітин. Наприклад, для клонального росту диплоїдних фібробластів людини WI38 оптимальні $\text{pH}=7,30\pm0,15$ й осмоляльність 285 ± 40 мосмоль/кг, а для фібробластів з ембріона курчати $7,12\pm0,18$ й 300 ± 20 відповідно. Для підтримки рН у більшості середовищ використовується бікарбонатний буфер: $\text{HCO}_3^- = \text{CO}_2 + \text{OH}^-$, якщо виділяється вуглекислий газ, збільшується концентрація OH^- . Розчини можуть містити малу кількість бікарбонатного буфера (розчин Хенкса), вони призначені для підтримки рН у щільно закритих судинах. В інших (розчині Ерла) бікарбонату більше, вони використовуються в системах з підвищеним парціальним тиском CO_2 . Якщо культивування ведеться поза CO_2 інкубатором, де рН підтримувати важче, необхідні альтернативні буферні системи. Гарним буфером є HEPES 4-(2-оксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота. HEPES легко розчинний у воді, не зв'язує двовалентні катіони, не цитотоксичний до концентрації 0,05 Моль. Застосовується в концентраціях 0,01 – 0,03 М.

Стандартні середовища для ведення культивування тваринних клітин.
Середовища Ігла MEM (minimal essential medium) і BME (basal medium, Eagle).

Частіше використовується MEM. Воно містить мінеральні речовини, амінокислоти (13 незамінних), 6 водорозчинних вітамінів, холін й інозит, що виконують роль вуглеводного субстрату. MEM використовується тільки із сироваткою, тому що в ньому відсутні біотин, вітамін B₁₂, іони заліза й мікроелементи. Основа розчин Ерла.

Середовище Дульбекко DME або DMEM (подвійна модифікація середовища Ігла). Використовується при культивуванні клітин різних типів, у тому числі нетрансформованих клітин і гібридів. Є основою для безсироваткових середовищ. Містить подвійну концентрацію амінокислот, гліцин, серин, піруват, залізо. При використанні цього середовища необхідний інкубатор з 10% концентрацією CO₂.

Середовище Іскова IMDM – модифікація середовища Дульбекко. Додано незамінні амінокислоти, біотин, вітамін B₁₂, селеніт натрію. У середовище введений HEPES і зменшені концентрації NaCl й NaHCO₃. Середовище безсироваткове, звичайно використається для культивування лімфоцитів і кровотворних клітин.

Середовище Маккоя 5A та серія середовищ RPMI. Середовище Маккоя 5A розроблене в 1958 році для підтримки клонального росту клітин карциносаркоми Уолкера 256 у присутності сироватки, а потім уже інших первинних культур і різних клітинних ліній. Зазвичай виробляється в модифікації Івката й Грейса (RPMI) і призначена для культивування лейкоцитів у присутності сироватки, часто застосовується й для культивування гібридів. Концентрація CO₂ в атмосфері при культивуванні 5%.

Середовище 199 розроблене в 1950 році для культивування фрагментів серця з ембріона курчати. Для середовища характерний широкий спектр поживних речовин і невисока їхня концентрація. Використовується без добавок, як підтримуюче для первинних клітин, а із сироваткою як ростове середовище для клітин, що швидко розмножуються. Для оптимального росту клітин зазвичай додають 5-20% фетальної (ембріональної) сироватки.

Сироватка представляє собою надзвичайно складну суміш малих і великих

молекул, здатних як викликати, так і гальмувати ріст клітин. *До головних функцій сироватки відносяться:*

- забезпечення гормональними факторами, що стимулюють ріст клітин і їх функції;
- забезпечення факторами прикріплення й розшарування клітин;
- забезпечення транспортними білками, що переносять гормони, мінеральні речовини, ліпіди й т.д.

Білки сироватки, які прямо й специфічно беруть участь у стимуляції клітинного ділення, називаються факторами росту.

Більшість ростових факторів присутні в сироватці в концентрації декількох нанограмів на мілілітр і нижче. Деякі із цих факторів специфічні для клітин на певній стадії диференціації, дія інших не обмежена яким-небудь одним типом клітин. Той самий тип клітин може бути стимульований різними ростовими факторами. Наприклад, фібробласти розмножуються у відповідь на фактор росту фібробластів, фактор росту епідермісу, фактор росту, синтезований тромбоцитами й соматомедінами. Всі ці речовини є мітогенами (стимулюють мітоз). Іншим важливим фактором росту практично для всіх типів клітин є гормон інсулін. З інших гормонів найчастіше застосовуються глюкокортикоїди (гідрокортизон, дексаметазон), стероїди (естрадіол, тестостерон, прогестерон) і гормони щитовидної залози (трийодтиронін). Гормони стимулюють або пригнічують ріст залежно від типу клітин й їхньої густини. Глюкокортикоїди, наприклад, впливають на проліферацію клітин, змінюючи їхню чутливість до факторів росту.

Для переносу низькомолекулярних факторів (вітамінів, амінокислот, ліпідів й інших) необхідні транспортні білки. У цій ролі виступає альбумін. Транспорт заліза забезпечує трансферин, а поверхня більшості культивованих клітин містить рецептори для цього білка. До факторів прикріплення й розшарування клітин відносяться колаген і фібронектин, більш спеціалізовані хондронектин (адгезія хондроцитів) і ламінін (адгезія епітеліальних клітин).

В останні роки розроблені *безсироваткові середовища* для розмноження

клітин. Найчастіше ці середовища вузько спеціалізовані, тобто призначені для певного типу клітин. До базового середовища додається інсулін, трансферин, гідрокортизон або його аналог дексаметазон і т.д.

Безсироваткові середовища мають *певні переваги*:

- поліпшення відтворюваності результатів досліду внаслідок більшої стабільності складу середовища;
- зниження ризику зараження культури вірусами, грибами, мікоплазмою;
- полегшення очищення продуктів клітинного метаболізму;
- зниження впливу додаткових білків на результати біологічних досліджень;
- відсутність цитотоксичності сироватки.

Культитивування клітин у присутності сироватки має й *ряд недоліків*:

- для більшості тканин сироватка не є фізіологічною рідиною, з якою вони контактували у вихідній тканині, тому, наприклад, сироватка викликає ріст фібробластів, але гальмує ріст епідермальних кератиноцитів; сироватка може бути цитотоксичною, тому що містить поліаміноксидазу, яка діє на поліаміни (спермін, спермідин), що є продуктами секреції швидко проліферуючих клітин (ембріональна сироватка містить відносно багато такого ферменту);
- значна варіабельність складу сироваток різних партій;
- сироватки можуть містити недостатню кількість специфічних ростових факторів, що викликає необхідність додавання їх до культур клітин.

Багато клітин ссавців, перш ніж розпочати проліферацію й утворити клітинний моношар, повинні прикріпитися до субстрату й розшаруватися на ньому. У зв'язку із цим постає питання про відповідний матеріал.

Як субстрат у наш час використовують кілька матеріалів.

- Скло пірекс (алюмоборосилікатне скло) найкраще, тому що натрійсилікатне скло може підлужувати середовище і його необхідно кип'ятити в слабкій кислоті перед уживанням. З кожним використанням придатність такого скла падає.

- Пластик — найчастіше використовують полістирол, полікарбонат,

полівінілхлорид, тефлон й ін.

- Метали – підходить як нержавіюча сталь, так і титан, тому що ці речовини хімічно інертні й мають високий негативний поверхневий заряд.

Клітини прикріплюються за рахунок електростатичних взаємодій, тому поверхня культуральних судин повинна бути змочена й негативно заряджена. Цього можна досягти хімічною обробкою окислюючими агентами, або фізичними впливами (високовольтним розрядом, ультрафіолетовим світлом, бомбардуванням високоенергетичними електронами). Фірми, що виробляють пластиковий посуд, використовують ці методи. Деякі дослідники, незважаючи на цей, навіть новий посуд перед посадкою клітин обробляють сумішшю концентрованої сірчаної кислоти й біхромату калію (хромова суміш), після чого ретельно промивають. Іноді поверхню судини покривають речовиною, що полегшує прикріплення клітин. Найчастіше для цього використовують колаген і поліамінокислоти.

Системи культивування клітин

Існує 2 основні системи культивування клітин.

1. Непротічні культури – тип культур, у якому клітини вводять у фіксований об'єм середовища. У міру росту клітин відбувається використання поживних речовин і нагромадження метаболітів, тому середовище потрібно періодично змінювати, що приводить до зміни клітинного метаболізму, або фізіологічної диференціації. Згодом, у результаті виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Збільшити тривалість життя непротічних культур можна декількома способами:

- переривчастий (частина культури замінюється рівним об'ємом нового середовища);
- постійний (об'єм культури збільшується з постійною низькою швидкістю, а невеликі порції клітин періодично видаляються);
- перфузійний (здійснюється постійне надходження нового середовища в культуру й одночасне видалення рівного об'єму використаного

(безклітинного) середовища).

Перфузія може бути відкритою, коли із системи видаляється все середовище, і закритою, коли середовище, що видаляється проходить через додаткову судину, де відновлюється його рН і здійснюється аерування, і повертається в культуральну судину.

Всі системи непротічних культур характеризуються нагромадженням відходів у тій або іншій формі й мінливістю зовнішніх умов.

2. Протічні культури забезпечують справжні гомеостатичні умови без зміни концентрації поживних речовин і метаболітів, а також числа клітин. Гомеостаз обумовлений постійним надходженням середовища в культуру й одночасним видаленням рівного об'єму середовища із клітинами. Такі системи придатні для суспензійних культур і моношарових культур на мікроносіях.

Напрямки культивування тваринних клітин можна поділити на суспензійні й моношарові культури.

Суспензійні культури доцільні з погляду збільшення виходу клітин. Суспензійне культивування первинних і клітин, що перевиваються, проводять у ролерних установках, де створюються сприятливі для клітин умови постійного перемішування рідкої та газової фаз, загальний обсяг середовища при цьому знижується вдвічі в порівнянні зі стаціонарними умовами.

Суспензійне культивування клітин також можна проводити в ферментерах, призначених для суспензійного культивування мікроорганізмів, у яких постійне перемішування клітин у середовищі здійснюється магнітними або механічними мішалками в колбах з високою швидкістю обертання, що перешкоджає прикріпленню клітин до стінок судин.

Суспензійне культивування дає щонайменше 2-3-кратну економію поживних середовищ, у порівнянні з загальноприйнятим стаціонарним моношаровим культивуванням при повному виключенні дорогих протеолітичних ферментів і буферних розчинів. Крім того, суспензійні культури є кращими з точки зору отримання великих кількостей біомаси.

Моношарові культури також мають ряд *переваг*:

1. Легко провести повну заміну середовища та промити клітини перед додаванням свіжого живильного середовища. Це важливо в тих випадках, коли зростання клітин йде в одних умовах, а напрацювання продукту в інших умовах, наприклад при переносі клітин із середовища із сироваткою в безсироваткове середовище. Також можна повністю видаляти небажані компоненти.

2. Дозволяють забезпечити високу щільність клітин.

3. У багатьох клітинах експресія необхідного продукту йде ефективніше, якщо клітини прикріплені до субстрату.

4. Моношарові культури можуть бути використані для будь-якого типу клітин, що забезпечує найбільшу гнучкість досліджень.

5. У деяких випадках, наприклад, для поширення вірусів, потрібні тісні міжклітинні контакти.

Недоліками моношарових культур є:

- Вимоги великого простору;
- зростання вартості та трудомісткості зі збільшенням масштабу;
- недостатньо ефективний контроль, зумовлений труднощами відбору проби;
- складності у визначенні та контролюванні рН, концентрації кисню.

Слід зазначити, що застосування мікроносіїв усуває ці недоліки. Мікроносії повинні бути нетоксичними, не сорбувати компоненти живильних середовищ та продукти метаболізму клітин, а також мати поверхневий заряд або обмінну ємність, достатню для прикріплення клітин. Комерційні мікроносії мають діаметр 100-200 мкм і поділяються на 6 основних груп:

- 1) декстранові мікроносії, поперечно зшиті, типу Cytodex 1;
- 2) декстранові мікроносії типу Cytodex 2;
- 3) мікроносії, покриті колагеном або желатином типу Cytodex 3;
- 4) полістиренові мікроносії типу Biosilon, Cytospheres;
- 5) скляні мікроносії типу Bioglass;
- 6) целюлозні мікроносії типу ДЕ-53.

Мікроносії на основі мікропористого желатину або пористого боросилікатного скла, що використовуються в даний час, мають ємність близько 3000 клітин/мікроносій.

Існує багато різновидів способу культивування. Розглянемо три основних напрямки (рис. 10).

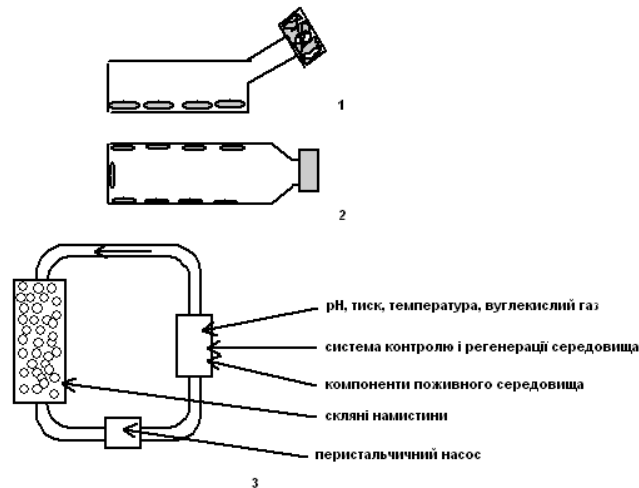


Рис. 10. Основні способи культивування клітин тваринного

походження: 1. Культивування в плоских флаконах (матрацах). Чашка Колле з клітинами на дні. 2. Культивування в суліях, які постійно обертаються, коли в кожен момент часу 15-20% поверхні сулії вкрито поживним середовищем, а клітини перебувають поперемінно те в середовищі, то в повітрі. 3. Культивування в колонках на мікроносіях, у якості яких виступають щільно упаковані скляні намистини діаметром 35 мм, що не зміщуються, стопка пластин й ін., а поживне середовище омиває їх, протікаючи зверху вниз.

Глибинне вирощування клітин у суспензійних культурах. Площу вирощуваних клітин можливо істотно збільшити при використанні мікроносіїв, що створюють суспензію у живильному середовищі, й на поверхні яких клітини закріплюються, а потім розростаються у вигляді моношару. Такі суспензійні мікроносії із клітинами моделюють глибинні культури, наприклад, мікроорганізмів. Отже, у таких системах сполучаються моношарові й суспензійні культури тваринних клітин.

Як мікроносії застосовують позитивно заряджені ДЕАЕ-сефадекси, сефадекс із колагеновим покриттям, негативно заряджений полістирол, порожні скляні сфери й ін. Так, наприклад, окремі фірми пропонують мікросфери з пористого жувільного скла, які можуть бути використані для іммобілізації клітин ссавців. Пори їх доступні для penetraції (від лат. *penetratio* –

проникнення) клітин усередину матрикса. Пористі сфери придатні для іммобілізації суспензійних клітин, що прилипають (наприклад, гібридом).

Необхідна кількість їх приблизно дорівнює 10^4 /мл, а для інокуляції необхідно порядку 10^5 клітин. При збільшенні кількості мікроносія зростає доза клітин в інокуляті.

Підхід до вибору середовищ і контрольованого параметра культивування залишається колишнім. Клітини після вирощування відокремлюють від мікроносіїв центрифугуванням (у тому числі – у градієнті щільності), фільтруванням, або, частіше, обробкою трипсином з наступним промиванням і сепаруванням.

Суспензійні клітини на мікроносіях застосовують із метою одержання вірусних вакцин (проти сказу, поліомієліту, ящура).

Лекція 11

Гібридизація тваринних клітин

Припущення про те, що соматичні клітини можуть зливатися одна з одною, було висловлено ще на початку XIX століття у зв'язку з відкриттям багатоядерних клітин. В історичному аспекті становить інтерес та обставина, що відкриття полікаріонів як би підтверджувало помилкове уявлення Шлейдена, який вважав, що нові клітини зароджуються у вигляді пухирців усередині цитоплазматичної мембрани батьківських клітин. Поділявши цю точку зору Рудольф Вірхов представив в 1851 р. малюнок багатоядерної пухлинної клітини будучи впевненим, що ядра є ендогенними зачатками нових клітин. Крім того, відкриття полікаріонів підлило масла у вогонь боротьби із клітинною теорією. Противники її висунули гіпотезу, відповідно до якої організм являє собою єдину тканинну масу з безперервною цитоплазмою, а існування полікаріонів розглядали як підтвердження цієї гіпотези. Згодом перемогла клітинна теорія, а існування полікаріонів віднесли до розряду цікавих виключень.

Гібриди соматичних клітин були відкриті лише в 60-х роках XX століття. У 1960 р. Панський зі співробітниками повідомили про виділення лінії гібридних клітин. Гібридні клітини були отримані шляхом змішування двох ліній, виділених раніше з 1 клітини мишачої саркоми. Вихідні лінії відрізнялися за числом й морфологією хромосом, а також за здатністю до утворення пухлини при введенні їх мишам. Гібридні клітини містили число хромосом, що відрізнялося від вихідних клітинних ліній, а також містили поверхневі антигени клітин обох батьківських ліній. Далі було встановлено, що клітинні гібриди можна одержати, використовуючи клітини різних видів тварин. Як агент, індукуючого злиття виступав інактивований вірус HVJ, названий також вірусом Сендай. Із цього часу вірус Сендай став широко використовуватися в експериментах по злиттю клітин.

При вивченні міжвидових гібридних клітин, здатних до проліферації було зроблено два дуже важливих спостереження:

- у гібридах можуть виявитися обидва геноми;
- у довгоживучих міжвидових гібридах елімінуються хромосоми одного виду.

Злиття клітин не обов'язково повинно чимось стимулюватися. Як *in vivo*, так й *in vitro* воно може проходити й без додавання спеціальних агентів. Незважаючи на те, що всі злиття такого роду можна вважати спонтанними, деякі з них постійно відбуваються в процесі онтогенезу, а отже, еволюційно запрограмовані. Дотепер невирішеною залишається одна із найважчих загадок біології, що полягає в тому, що мембрани, які перебувають усередині клітини зливаються часто, тоді як мембрани, що розмежовують клітини, зливаються рідко. Наприклад, пухирці апарата Гольджі зливаються один з одним, утворюючи клітинні пластинки при цитокінезі в рослин, мембрани ендоплазматичного ретикулуму – з елементами апарата Гольджі при переносі тільки що синтезованих білків і т.д.

У той же час нормальні клітини в природних умовах укривають рідко зливаються одна з одною. Виключення становить процес запліднення. Крім того, як подібне виключення виступає процес плазмогамії у вищих грибів, коли одноядерні гаплоїдні клітини зливаються, утворюючи двоядерні (дикаріони). Такі клітини розмножуються мітотично, залишаючись двоядерними, і в результаті утворюють всім добре відомі плодові тіла.

У природних умовах злиття клітин відбувається й у ссавців. Наприклад, клітини можуть зливатися при формуванні м'язових трубочок. Ще в XIX столітті було показано, що міофібрили поперечно-смугастих м'язів утворюються в полікаріонах – великих видовжених багатоядерних клітинах. Полікаріони – продукт злиття одноядерних міобластів. Злиття пухлинних клітин – досить звичайне явище, при цьому пухлинні клітини *in vivo* іноді зливаються й з нормальними. Експерименти по спонтанному злиттю клітин проводилися й *in vitro*. При проведенні подібних експериментів одержують так званих «химерних» або алофенних мишей – тварин, у тканинах яких містяться клітини різних генотипів (рис. 11).

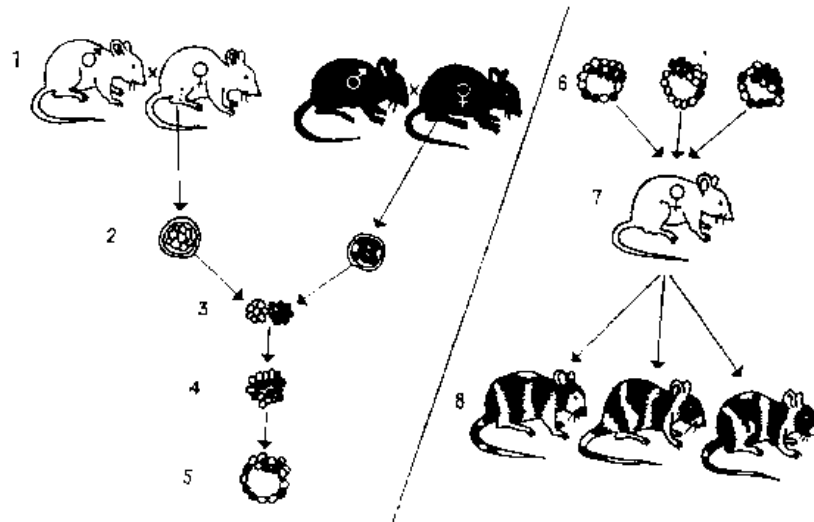


Рис. 11. Одержання алофенних мишей

Методи створення експериментальних химер

1. Агрегаційний – був запропонований практично одночасно й незалежно один від одного Тарковським у Варшаві та Мінц у Філадельфії (1961-1962 р.).

З матки вагітних самок одержують зародки, які досягли стадії 8 бластомерів. Бластомери, отримані від двох тварин з різними генотипами (наприклад, від мишей з білим і чорним забарвленням хутра) поміщають в умови, що сприяють їхній агрегації й утворенню 16-ти клітинного зародка. Такі складені зародки розвиваються *in vitro* до стадії бластоцисти, після чого їх вводять у матку прийомної матері, у якої попередньо викликають помилкову вагітність шляхом введення відповідних гормонів. У результаті отримують алофенних мишей. Коли в них з'являється хутро, його забарвлення не біле або чорне, як у батьків, а змішане, з почерговими чорними й білими плямами або смугами. Це доводить, що тканини тварин-химер мозаїчні, тобто складаються з «білих» й «чорних» клітин.

Внутрішні тканини таких тварин також мозаїчні, хоча це проявляється не так очевидно, як у випадку забарвлення хутра. Відмінності можуть стосуватися білків, що виконують ферментативну функцію: вони можуть каталізувати ті самі реакції в мишей-батьків, потребувати тих самих кофакторів, але при цьому бути не ідентичними, хоча й подібними. Такі білки називаються ізоферментами, і їх можна розділити за допомогою електрофорезу. Агрегаційні химери можна

одержувати не тільки між двома ембріонами, але й між різним числом ізольованих бластомерів або окремими частинами ембріонів. Маса химерних ембріонів не більше звичайної й піддається дії механізмів ембріональної регуляції. Перевага методу – не вимагає втручання мікрохірургічної техніки, тому широко використовується в ембріогенетиці.

2. Ін'єкційний – був розроблений Р. Гарднером у 1968 р.

Використовуються ембріони на стадії бластоцисти. Бластоцисту фіксують й, використовуючи мікроманіпулятори, вводять шляхом ін'єкції клітини внутрішньоклітинної маси бластоцисти донорів у бластоцисту ембріона-реципієнта. Цим методом можна ін'єктувати не тільки внутрішньоклітинну масу ранніх ембріонів, але й більш диференційовані клітини.

Ін'єкційний метод знайшов застосування при одержанні міжвидових химер. Перші міжвидові химери були отримані між двома найближчими видами мишей, які зазвичай не схрещуються: *M. musculus* й *M. caroli*. Причому було відзначено, що химерні ембріони, отримані ін'єкційним методом, нормально розвивалися тільки при пересадженні їх у матку того виду, чия бластоциста була використана в якості реципієнта. Наприклад, у бластоцисту *M. musculus* вводили внутрішньоклітинну масу ембріона *M. caroli*. Отримані химери імплантувались у матку *M. musculus* і добре розвивалися там, а в організмі *M. caroli* гинули через два тижні.

Міжвидові химерні зародки між мишею й пацюком шляхом агрегації були отримані в 70-х роках. Перші химерні тварини були отримані у 1973 році Р. Гарднером і М. Джонсоном. Успіх цих експериментів дозволив приступити у 80-х роках до створення химерних сільськогосподарських тварин. З'ясувалося, що агрегаційний метод неприйнятний для одержання химер великої рогатої худоби. Химери телят *Bos indicus* + *Bos taurus* вдалося одержати тільки ін'єкційним методом.

У 1984 році були отримані міжвидові химери між вівцею й козою – вівцекози, причому практично одночасно в Англії й Німеччині. Використовувалися обидва методи. Статевим шляхом вівці й кози не

схрещуються, тому що мають різний набір хромосом: коза $2n = 60$, вівця $2n = 54$. У Німеччині у 1985 році були отримані химерні теляти після агрегації половинок 32-клітинних ембріонів від корів швицької (бурої) і голштино-фризської порід. У фенотипі химер сполучалися обидві масті – бура й чорно-строката.

Химерні тварини не передають нащадкам генетичну мозаїчність. У них відбувається розщеплення, як у гетерозигот, тому цінні генетичні комбінації порушуються. Але протягом 1 покоління господарсько цінні ознаки підтримуються, тому можна, наприклад, сполучати як молочну, так і м'ясну продуктивність.

Химерність досить часто зустрічається й у рослин. Як правило, вона існує в прихованому вигляді, не проявляючись фенотипово. Однак пластидні мутації дозволяють побачити її безпосередньо на рослині. Найчастіше спонтанна химерність спостерігається в гетерозиготних рослин. Різні клітинні типи чітко розділені в просторі, утворюючи окремі шари при поділі апікальних меристем. Прикладом видимої мутації хлоропластів й утворення химерної рослини є строкатолистість або поява секторів тканини іншого кольору.

Механізм злиття клітин

Для індукції злиття клітин використовуються речовини різної природи. Іони Ca^{2+} , поліетиленгліколь, лізолецитин, моноолеат гліцерину, вірус Сендай.

Перевага вірусу Сендай як агрегуючого агенту, полягає в повній відсутності цитотоксичного ефекту. Вірус перед уживанням інактивують, опромінюючи ультрафіолетовою лампою протягом 5 хвилин, при цьому він втрачає здатність до розмноження, але зберігає здатність зливати клітини. Вірус Сендей має два недоліки:

- необхідність нарощувати, титрувати, концентрувати й інактивувати вірус;
- клітини рослин і грибів не мають рецепторів до цього вірусу, тому він не застосовується для їхньої гібридизації.

Етапи злиття клітин

- Перший етап злиття – зближення мембран сусідніх клітин і встановлення між ними тісного контакту. Мембрани повинні бути наближені один до одного

на відстані у декілька ангстрем так, щоб між ними були можливі взаємодії, подібні до гідрофобних зв'язків. Викликають подібне зближення агенти, які індукують аглютинацію клітин.

- На другому етапі глікопротеїди, розташовані на поверхні, починають вивільнятися з ділянок мембрани. Встановлено, що глікопротеїди визначають антигенну специфічність клітин, несуть негативний заряд, характерний для клітин при фізіологічно нейтральних рН, беруть участь у розпізнаванні й адгезії клітин, визначають рецепторні ділянки для вірусів, бактерій, аглютинуючих агентів, беруть участь у процесі регуляції проникності мембран для іонів. Ці властивості й визначають їхню участь у злитті клітин.

- Третій етап – міцелізація оголених ліпідів двох протилежних мембран. Міцели – ліпідні краплі, де молекули ліпідів гідрофільними голівками обернені до води, а гідрофобні “хвости” жирних кислот заховані всередину. Цей процес підсилюється при високих значеннях рН і високій концентрації іонів кальцію. В обох клітинах починається ендоцитоз вірусних часток.

- Четвертий етап – злиття мембран. Завдяки місткам, утвореним Ca^{2+} , розмір міцел зменшується. Під дією АТФ і Ca^{2+} , активізуються мікрофіламенти (*нитки білка актина не м'язової природи в цитоплазмі еукаріотичних клітин*). Виниклий цитоплазматичний місток стабілізується й розширюється завдяки функціонуванню мікрофіламентів.

На останніх етапах злиття клітин важливу роль відіграє наявність АТФ. АТФ утворюється завдяки діяльності мітохондрій. Полікаріони, що утворюються при злитті двох або трьох клітин, являють собою не безформні роздуті або дволопатеві кулі цитоплазми, а приймають форму, характерну для однієї з батьківських клітин або проміжну між ними. Форму клітини визначають мікротрубочки й мікрофіламенти. У процесі злиття клітин мікрофіламенти актиноміозинового типу, розташовані під цитоплазматичною мембраною, беруть безпосередню участь, тому що забезпечують з'єднання цитоплазм клітин, що злилися, і стабілізацію новоутвореної системи. Однак, формування цитоскелету – енергозалежний процес, який вимагає великої кількості АТФ.

Напевно, цим обумовлена присутність мітохондрій у місцях злиття клітинних мембран.

Моноклональні антитіла.

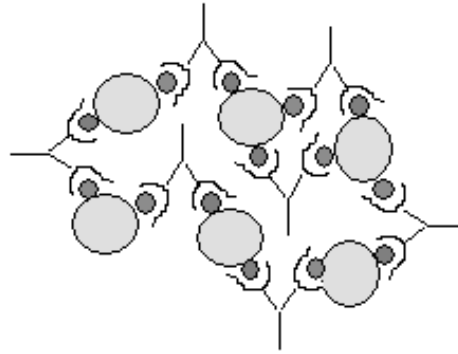
Злиття клітин лежить в основі одержання гібридних клітин, продукуючих антитіла. Антитіла – білки сироватки крові, які синтезуються в організмі як прояв захисної реакції при введенні в нього чужорідної речовини (антигену). Імунна система виробляє специфічні антитіла на величезну кількість антигенів. В основі такої здатності лежить наявність великого різноманіття клонів лімфоцитів, кожний з яких виробляє антитіла з вузькою специфічністю. Всі вони називаються імуноглобулінами (Ig), антитіла становлять один з головних білкових компонентів крові – близько 20% сумарного білка плазми.

Як антигени виступають різні речовини: клітини мікроорганізмів, віруси, білки, нуклеїнові кислоти, у деяких випадках низькомолекулярні речовини типу антибіотиків або пестицидів. Антитіла утворюються не проти всієї молекули білка або бактеріальної клітини, а тільки до невеликих ділянок на їхній поверхні, що отримали назву *антигенних детермінант*. У випадку білкової молекули антигенною детермінантою є ділянки поверхні, які містять близько 5 амінокислотних залишків.

Найпростіші молекули антитіл мають форму букви Y із двома ідентичними антиген-зв'язуючими ділянками – по одному на кінці кожної із двох «гілок». Зв'язування антигенних детермінант призводить до втрати певних функцій молекули або клітини, на чому й заснований захисний механізм дії антитіл. Оскільки ділянки дві, вони можуть зшивати антигени:



Якщо молекула антигену має три або більше антигенних детермінант, то антитіла можуть зшивати їх у велику сітку. Досягнувши певних розмірів, така сітка може випасти з розчину в осад:



Тенденція великих імунних комплексів до осадження (преципітації) зручна для виявлення антитіл й антигенів. Утворення таких комплексів може призводити до аглютинації (склеювання) молекул. Це явище лежить в основі визначення груп крові, коли еритроцити склеюються антитілами тієї або іншої специфічності – реакція гемаглютинації.

Одержання моноклональних антитіл

Як утворюються антитіла? Імунна відповідь – складний процес міжклітинних взаємодій різних типів лімфоїдних клітин за участю спеціальних гормонів, у результаті чого В-лімфоцити починають активно синтезувати й виділяти в кров специфічні антитіла проти даного антигену. На поверхні В-лімфоцитів існують рецептори, аналогічні антитілам, взаємодія яких з антигеном у складному міжклітинному комплексі служить стимулом для початку біосинтезу антитіл.

Одержання антитіл для потреб людини починається з імунізації тварин. Після декількох ін'єкцій антигену в присутності стимуляторів імунної відповіді в сироватці крові накопичуються специфічні антитіла. Антитіла виділяють із сироватки у вигляді γ -глобулінової фракції, осаджуючи сироватку крові сульфатом амонію, спиртом, ПЕГ й іншими речовинами. Отримані антитіла містять багато сумісних білків. Високоочищені антитіла виділяють за допомогою іонообмінної хроматографії.

Стандартні препарати одержати досить складно, тому що склад їх залежить від виду тварини, його індивідуальних особливостей, циклу імунізації, інших мало контрольованих факторів. У той же час, для сучасного біохімічного аналізу дуже важлива специфічність, тобто здатність виділити дану речовину в складних

багатокомпонентних середовищах, таких, як сироватки крові, сік рослин, ферментне середовище. Таке можливо при використанні імунохімічного методу, де використовуються антитіла, які вузько специфічно взаємодіють за принципом «антиген – антитіло». Для проведення такого аналізу необхідні абсолютно ідентичні антитіла, синтез яких звичайними способами не можливий.

Рішення проблеми було запропоновано в 1975 році англійськими вченими Георгом Келером і Цезарем Мільштейном. Вони розробили методику одержання клітинних гібридів – *гібридом*. Гібридами утворюються в результаті злиття лімфоцитів, узятих від іmunізованих тварин, із клітинами мієломи кісткового мозку, які культивуються *in vitro*.

Тварину іmunізують, у відповідь на введення антигену в організмі миші активізуються продукуючі антитіла В-лімфоцити. Ці клітини можуть жити тільки в організмі хазяїна, при переведенні на штучне поживне середовище вони гинуть. Якщо злити іmunну клітину з пухлинною, утворюються гібридні клітини, здатні необмежено довго жити в штучних середовищах. Одночасно вони зберігають здатність синтезувати антитіла.

Гібридами, що синтезують певні види антитіл, відбирають на селективних ростових середовищах. Потім їх поміщають у культуральну рідину, у якій вони розмножуються й утворюють багато споріднених клітин (клон). Такі клони можуть синтезувати антитіла, що одержали назву моноклональних (МКА). МКА – антитіла, однорідні за структурою й специфічністю, які можна виробляти в необмежених кількостях.

Інший метод одержання антитіл заснований на ін'єкції отриманої гібридами в черевну порожнину мишей. Там гібридома реплікується й викликає утворення асцитної пухлини (скупчення клітин плаваючих у рідині, яка заповнює черевну порожнину). Асцитна рідина, виділена із цієї миші, представляє суспензію, що містить антитіла. Клітини й білки, що не відносяться до МКА, видаляються. Матеріал, що залишився, представлений переважно антитілами. Цей метод дозволяє одержувати висококонцентровані препарати антитіл. Але масове виробництво вимагає одночасного використання декількох тисяч мишей. Крім

того, одержаний матеріал вимагає доочищення. Це дорого й трудомістко, тому в наш час перевага віддається першому способу, з використанням культури клітин.

Висока специфічність антитіл відносно антигену перетворює їх у потужний інструмент для ідентифікації різних речовин, будь то макромолекули, клітинні фрагменти або цілі клітини.

Початок широкому використанню антитіл у діагностичних цілях поклав в 1955 році американський імунолог А. Кунс. Він приєднав до антитіл барвник, що світиться. Флуоресцентні антитіла зробили видимими місця розташування молекул, які його цікавили, у клітині. Цей метод отримав назву імуофлуоресцентного. Чутливість методу можна підвищити декількома шляхами.

У першому випадку імунна відповідь підсилюється за рахунок застосування антитіл декількох порядків:



Антиген іммобілізується на підкладці, до нього додаються антитіла 1-го порядку, що зв'язуються безпосередньо з антигеном. У досліджуваний зразок додаються антитіла 2-го порядку, що зв'язуються з антигенними детермінантами антитіл 1-го порядку. Антитіла 2-го порядку мають флуоресцентну (або іншу) мітку. Оскільки ділянок зв'язування може бути декілька, то реакція проявляється більш чітко.

Застосування антитіл другого й третього порядків дозволяє також спрощувати процедуру визначення мікроорганізмів у мазку. При цьому не обов'язково мати мічені антитіла проти всіх бактерій. Досить мати звичайні антитіла кролика або миші проти мікроорганізму, що цікавить, і мічені МКА проти цих імуноглобулінів. Якщо мікроорганізм у мазку присутній, то до нього «приклеюються» специфічні антитіла, а до них уже – мічені. У результаті мазок

буде світитися при люмінесцентній мікроскопії. Фотометричні або флуоресцентні методи можуть бути використані не у всіх випадках, наприклад, якщо вимірювання проводять в дуже мутному середовищі.

Крім барвника в якості мітки можна використати фермент (імуноферментний аналіз) або радіоактивний ізотоп (імунорадіологічний). Від чутливості детекції маркера залежить чутливість методу аналізу.

Вибір маркера й способу його «прив'язки» до антигену є одним з важливих етапів у проведенні аналізу. Спочатку широко застосовувалися радіоізотопні мітки (радіоімуний аналіз – RIA), запропоновані американськими дослідниками (С. А. Берсон, Р. С. Ялоу, 1959). Однак в останні роки усе більше використовуються як маркери ферменти. Це обумовлено рядом принципових труднощів, пов'язаних із застосуванням ізотопних маркерів.

При імуноферментному аналізі антиген зв'язується з поверхнею лунки полістирольного планшета. У лунку додають антитіла, що несуть фермент у якості мітки, інкубують і відмивають. Далі доливають субстрат, що змінює забарвлення при взаємодії із цим ферментом. Зміну забарвлення можна виміряти за допомогою спектрофотометрії. Таким способом проводиться індикація й кількісна оцінка біоорганічних сполук із чутливістю до 10^{-12} г/літр.

У наш час відомо більше 2000 різних ферментів, однак тільки деякі знаходять застосування в імуноферментному аналізі. Це пояснюється високими вимогами, що висуваються до властивостей ферментів.

- Фермент повинен бути високо активний, а продукти його реакції детектуватися з високою чутливістю,

- повинен бути стабільним, так щоб його активність зберігалася не менше одного року.

- Вміст фермента-маркера в певному зразку повинно бути мінімальним. Саме через це для різних об'єктів використовують різні ферменти. У багатьох випадках, коли необхідний якісний результат, оцінка імунохімічної реакції може бути проведена візуально.

Гібридомна технологія відкриває принципово новий шлях одержання

гібридних антитіл, що полягає в тому, що зливаються моноклональні клітини, специфічні проти даного антигену й ферменту-маркера, у результаті чого утворюються гібридами другого покоління, які синтезують антитіла, з двома специфічностями.

Інший шлях полягає в тому, що одержують антитіла того самого виду тварини (наприклад, кролика) проти антигену, що визначається й ферменту, які з'єднують між собою через антитіла іншого виду тварин (антитіла барана проти кролика). Додавання ферменту до такої потрійної молекули також призводить до утворення комплексу антитіло-фермент. У наш час розробляються підходи одержання гібридних антитіл методами клітинної й генної інженерії, що дозволить істотно спростити спосіб їхнього одержання.

Крім ферментів як маркери можуть бути використані субстрати. Зокрема, в імунокофакторному аналізі застосовуються як мітки АТФ і НАД (*Нікотинамідаденіндинуклеотид* — складна органічна сполука, кофермент, наявний у всіх живих клітинах), які можуть бути «пришиті» до молекули антигену через аденіновий залишок таким чином, що зберігається їхня здатність взаємодіяти з ферментом. Аналогічно були використані субстрати пероксидази (люмінол, ізолумінол), які можуть бути окислені пероксидом водню в реакції хемілюмінесценції, що каталізується пероксидазою.

Застосування моноклональних антитіл

Найбільш широко використовуються моноклональні антитіла в медичній діагностиці. Розроблено сумки-укладання для постановки діагнозів. Якщо до антитіл приєднати радіоактивні або магнітоактивні матеріали й ввести їх у живий організм, то можна виявити в ньому патологічні зони. Такі МКА приєднуються до уражених хворобою клітин організму, а відповідні індикаторні матеріали дозволяють з'ясувати їхнє місцезнаходження.

МКА використовуються й у процесах очищення речовин. Сучасні технології засновані на приєднанні антитіл до твердої матриці носія. До них додають суміш молекул, що містить шуканий антиген. Потім комплекси антиген — антитіло відмиваються від домішок, не зв'язаних з матрицею. Після

руйнування ковалентних зв'язків антиген – антитіло в розчині залишаються вільні антигени.

Якщо одержати антитіла певного типу й імунізувати ними тварину, то утворюються анти-антитіла (анти-ідіотипні антитіла). Вони діють на імунну систему як псевдоантиген і тому можуть бути використані для її стимуляції. На цьому принципі засноване одержання вакцин нового типу. Набори МКА можуть бути також призначені для боротьби з алергенами.

Моноклональні антитіла й «мічена» лікарська терапія. Передбачається, що велика різноманітність ракових захворювань зумовлена активацією ендогенних генів, викликана хімічними агентами, внутрішніми хромосомними перебудовами. Ці гени кодують певні білки, і тому ракові клітини можуть містити унікальні білки на поверхні клітини. Можливо, саме ці білки беруть участь у супресії росту здорових клітин. Інактивуючи ці білки, можна гальмувати ріст ракових клітин.

Завдяки високій специфічності МКА широко використовуються як зонди для точного визначення природи молекул поверхні клітин і клітинних органел. З їхньою допомогою також можна проводити детекцію активності ферментів.

Методи імуноферментного аналізу застосовують у діагностиці вірусних захворювань рослин. Це дозволяє скоротити час одержання безвірусного посадкового матеріалу, відбирати нові вірусостійкі сорти. При генно-інженерних експериментах можна швидко відбирати клони-продуценти.

Лекція 12

Кріоконсервація. Отримання клітинних ліній для кріоконсервації

Термін «кріозбереження» (cryopreservation), тобто зберігання об'єктів при дуже низькій температурі (зазвичай при температурі рідкого азоту, яка становить

-196°C), характеризує складний багатоетапний процес, що забезпечує необмежено довге зберігання живих клітин, тканин і органів у стані анабіозу.

Основою кріозбереження слугує зворотне інгібування процесів життєдіяльності. Тільки в стані глибокого анабіозу, в разі повного призупинення метаболічних процесів та відсутності рідкої фази, створюються умови для тривалого зберігання біологічної системи і повне повернення її до вихідного стану в умовах нормотермії. Єдиним надійним засобом для рішення цього завдання є глибокий холод (-140°C та нижче), що забезпечується застосуванням рідкого азоту.

Найважливіший етап процесу кріозбереження – заморожування. Натеper відомо два методи кріозбереження: програмне (повільне) і надшвидке заморожування.

Програмне заморожування досить широко застосовують при збереженні тваринних і рослинних клітин. Надшвидке заморожування розроблено порівняно недавно і є методом майбутнього.

При культивуванні клітинних ліній перед дослідниками часто виникає завдання збереження клітин протягом тривалого часу. При тривалому культивуванні клітинної лінії в клітинах виникають різноманітні мутації, які призводять, зрештою, або до загибелі клітин, або їх перетворення на злоякісні. При цьому втрачаються характерні для клітин біохімічні властивості, здатність до продукції вторинних метаболітів і т. і. При дослідженні сукупності морфофізіологічних та біохімічних особливостей клітин необхідні стандартні клітинні лінії. Для тривалого зберігання клітин активно використовується кріоконсервація. Як правило, кріоконсервування клітин проводять у рідкому азоті (-196°C) в присутності кріопротекторів для попередження руйнування внутрішньоклітинних структур кристалами льоду. За таких умов біологічний матеріал можна зберігати роками і навіть десятиліттями.

Кріозбереження – заморожування біологічного матеріалу при наднизьких температурах. Успіх кріозбереження залежить від багатьох факторів:

1. Типу клітин, що заморожуються

2. Особливостей біохімічного метаболізму клітин.
3. Складу середовища при культивуванні клітин та кріоконсервації.
4. Виду клітинної культури: суспензійна чи моношарова.
5. Якості, концентрації та виду кріопротектора.
6. Особливостей охолодження.
7. Режим зберігання клітин.
8. Способу та швидкості відтавання замороженої клітинної культури.

Основні принципи кріоконсервації, зберігання та розморожування:

1. Кріоконсервуванню піддають клітини, що знаходяться у вигляді суспензії, в концентрації $10^5 - 10^6$ клітин/1 мл.

2. Клітини тварин для заморожування відбирають у середині експоненційної фази ростової кривої, так як клітини в стаціонарній фазі менш стійкі до пошкоджуючої дії кріоконсервації.

3. Процес заморожування тваринних клітин відрізняється від процесу заморожування рослинних клітин. Так, у разі рослинних клітин застосовується попереднє культивування в спеціальних умовах, з додаванням різних добавок.

4. В обов'язковому порядку застосовуються кріопротектори.

5. Процес заморожування культури клітин здійснюється за певною програмою. Внаслідок заморожування виникають дві суперечливі проблеми: з одного боку повільне заморожування призводить до утворення позаклітинного льоду і, як результат, до зневоднення та загибелі клітини, з іншого боку, швидке заморожування призводить до утворення кристалів льоду всередині клітини та до масованого пошкодження внутрішньоклітинних структур. Як правило, заморожування проводять у два етапи: на першому етапі проводять охолодження від $+37^{\circ}\text{C}$ до -28°C , $v = 10^{\circ}\text{C} / \text{хв}$, потім проводять занурення в рідкий азот -196°C (миттєве заморожування).

6. При температурі рідкого азоту (-196°C) клітини можна зберігати протягом ряду років без істотної втрати життєздатності.

7. При розморожуванні слідує дотримуватися принципу якнайшвидшого розморожування клітинної культури при температурі $+37^{\circ}\text{C}$ у культуральному середовищі для зростання.

Ефективність низькотемпературного зберігання залежить від

- виду і типу клітин;
- їх концентрації в суспензії;
- складу консерваційного середовища.

Важливе значення мають вид і концентрація кріопротектора (речовина, яка дозволить знизити шкідливий вплив фізико-хімічних чинників при кріоконсервуванні). Клітини піддаються заморожуванню не в простих дво- чи трикомпонентних розчинах, а в складних сумішах, які містять у собі солі, цукри, колігативні кріопротектори з позаклітинними кріопротекторами чи без них, а також білки плазми крові.

Покращення життєздатності клітин при збільшенні концентрації білка і, можливо, при комбінованому використанні проникаючих та позаклітинних кріопротекторів може пояснюватись теоріями замерзання і вітрифікації та їх впливом на живу клітину.

При зниженні температури нижче температури вітрифікації (склування рідини) збільшення утворених раніше кристалів льоду за рахунок рекристалізації незамерзлої води не може відбуватись, і клітини захищені від прогресуючого механічного пошкодження. Рекристалізація може відбуватись у будь-який час (включаючи час нагрівання), коли температура продукту вища, ніж температура вітрифікації.

Оптимальна температура зберігання – це температура нижче точки вітрифікації для кріопротекторного розчину, який використовується. Можуть використовуватись і більш високі температури, але при цьому існує ризик пошкодження клітин, який залежить від температури зберігання і стабільності (в'язкості) розчину за цієї температури.

Окрім механічного та дегідратаційного пошкодження, охолодження саме по собі може призвести до негативних наслідків для клітини. Хімічна структура

кріопротекторів важлива для виживання клітин при заморожуванні, і для оптимальної кріоконсервації велике значення має молекулярна взаємодія між кріопротекторами та білковими чи ліпідними молекулами плазмалеми клітин.

При проведенні робіт із кріозбереження клітин, особливо тих, що культивуються в умовах *in vitro*, варто відбирати дрібні клітини з зниженим вмістом води. Необхідно розробляти в кожному окремому випадку умови заморожування і їх наступного відтаювання. Це обумовлено двома факторами ушкодження, що проявляються при заморожуванні:

перший з них – лід, який виникає спочатку в розчині навколо клітин;

другий – дегідратація клітин, що спричинена формуванням кристалів утвореного позаклітинного льоду.

Тому необхідно з найменшою втратою життєздатності оминати при заморожуванні-відтаюванні зону між температурою захисного розчину і температурою -40°C (у виняткових випадках – до -70°C). Саме в цій температурній зоні проявляється дія обох ушкоджуючих факторів заморожування, кожний з яких є небезпечним, оскільки проявляє здатність до деструкції зовнішньої клітинної мембрани – плазмалеми а, отже, загибели клітин.

Перше завдання кріозбереження – запобігання утворенню кристалів льоду всередині клітин. В разі клітин рослинного організму вона вирішується більш складним способом, ніж у інших об'єктів, внаслідок наявності в них вільної води. Ці труднощі можна подолати за рахунок зниження швидкості охолодження або попереднім зневодненням клітин. Відомо, що чим більше води в клітині, тим менше повинна бути швидкість заморожування. З іншого боку, попереднє зневоднення клітин може призвести до їх ушкодження, пов'язаного з дегідратацією.

Друге завдання кріозбереження – послаблення впливу стресів, спричинених неминуchoю дегідратацією. Для цього необхідно застосовувати певний склад суміші протекторів і оптимальну швидкість заморожування, а також оптимізація всієї програми процесу кріозбереження.

При проведенні планомірних фундаментальних і прикладних досліджень з'ясовують механізми кріоушкоджень та кріозахисту біологічних систем різних рівнів організації.

1. Запобігання утворення внутрішньоклітинного льоду. Загибель клітин відбувається в основному при утворенні льоду в середині клітини, оскільки для її структурних компонентів безпечними є лише кристали льоду розміром не більше 0,1 мкм. При швидкому зниженні температури (20°C/хв) у клітині утворюються дуже дрібні кристали льоду, які є центрами кристалізації. Вони швидко наростають, приєднуючи молекули води із клітини, утворюючи великі кристали льоду, здатні до механічного ушкодження клітини, в основному мембран та клітинних структур.

При повільному заморожуванні (у парах рідкого азоту або в спеціальних програмних заморожувачах) лід першочергово утворюється в міжклітинниках. Відомо, що менш концентровані розчини в них, замерзають швидше. По мірі охолодження кристали льоду, які виникають в клітині, наростають за рахунок води. Лід формує градієнт водного потенціалу, спрямований із клітин у міжклітинники, що поступово призводить до дегідратації клітин і, як наслідок, – денатурації білків, порушення функціонування мембран, збільшення концентрації іонів до токсичних величин, порушення синтезу нормальних клітинних білків.

2. Біологічні антифризи. У клітинах деяких рослин та риб відбувається синтез високомолекулярних сполук, які гальмують процеси нуклеації та наростання кристалів льоду і носять назву біологічних антифризів. Вони перешкоджають позаклітинному утворенню льоду, особливо в тих органах і тканинах, для клітин яких характерним є збереження максимальної кількості води й здатність перебувати в переохолодженому стані. Відомо антифризи білкової, глікопротеїнової і полісахаридної природи. Отже, за допомогою антифризів можна здійснювати блокаду наростання кристалів льоду.

3. Нагромадження цукрів та інших сумісних осмолітів. Зниження вмісту води в клітинах при утворенні позаклітинного льоду, що супроводжується

дегідратацією, збільшення концентрації іонів у цитоплазмі спричинює різного роду порушення структури та функцій біополімерів. Зокрема відбувається денатурація білків і пригнічення їх ферментативної активності, змінюється структура ліпідного біошару мембран і порушується їх цілісність. Деструктивні зміни в мембранах, у свою чергу, зумовлюють порушення внутрішньоклітинної компартментації речовин (*compartmentation – відділення*) – просторове роз'єднання за допомогою біомембран ферментів та субстратів у клітині або внаслідок метаболічних процесів, які взаємно несумісні).

Регуляція осмотичного тиску в клітинах при холодовій дегідратації здійснюється переважно за рахунок біосинтезу низькомолекулярних органічних сполук, які одержали назву осмолітів. Вони добре розчиняються у воді, нетоксичні, не викликають змін в процесах метаболізму і тому одержали другу назву – *сумісні речовини*. До них відносяться моно- і олігоцукри, багатоатомні спирти, амінокислоти, бетаїни, аміни та білки.

Поряд з осморегулюванням, вони виконують захисну (протекторну) функцію стосовно біополімерів цитоплазми. Враховуючи подвійну роль осмолітів, їх часто називають кріопротекторами (*від грецьк. kryos – холод і лат. protector – заступник, захисник*).

Найбільш відомі такі кріопротектори, як диметилсульфоксид (ДМСО), різні цукри, гліцерин, етиленгліколь, пролін. Їх умовно підрозділяють на дві групи – проникні та не проникні в клітини. Так, гліцерин проникає в клітину при кімнатній температурі і стає непроникною сполукою при 0°C.

Кріопротектори синтезуються у клітинах при знижених температурах і можуть запобігати або різко сповільнювати ріст кристалів льоду. Чим вище концентрація розчину, тим нижче точка його замерзання. Наприклад, при нагромадженні розчинних цукрів у клітині знижується водний потенціал цитоплазми і точка її замерзання, що перешкоджає утворенню внутрішньоклітинного льоду. Крім того, цукри підвищують осмотичну концентрацію клітинного соку, що сприяє збільшенню водоутримуючої здатності клітин і захищає їх від зневоднення при утворенні позаклітинного

льоду. Цукри захищають білки від денатурації, яка настає внаслідок зближення макромолекул при дегідратації, а також від підвищеної концентрації токсичних речовин.

Таким чином, гідрофільні білки, моно- і олігоцукри, яким властива кріопротекторна дія, здатні зв'язувати значну кількість води в міжклітинниках і протидіють її транспортуванню і замерзанню. Вважається, що білки і вуглеводи, які мають кріопротекторним ефектом, здатні при дегідратації клітин стабілізувати інші білки і клітинні мембрани.

4. Зміна складу мембранних ліпідів і текучості мембран. Дегідратація клітин впливає на структурний стан ліпідів мембран, які за нормального функціонування зв'язують до 30-50% води клітин. При взаємодії із зарядженими та полярними групами білків і фосфоліпідів, вода стабілізує структуру мембрани.

Основною причиною ушкоджуючої дії низьких температур на клітини є порушення функціонування клітинних мембран внаслідок їх затвердіння, пов'язаного з фазовими переходами (вода-лід), оскільки при досить низьких температурах ліпідні біошари набувають властивостей твердих тіл. При температурі, вищій за фазовий перехід структура біошару зберігається. Жирні кислоти при цьому «плавляться», в результаті чого обертання і скручування молекул відбувається значно легше, ніж при низьких температурах.

Різноманітність реакцій клітини на дію низьких температур обумовлюється, в першу чергу, відмінностями в складі жирних кислот, що входять до мембранних фосфоліпідів. В разі наявності у фосфоліпідах підвищеного вмісту насичених жирних кислот (таких, як пальмітинова і стеаринова), мембрани характеризуються більш високими температурами фазового переходу. При цьому зменшується текучість мембран, що призводить до порушення функціонування багатьох білків (каналів, переносників, рецепторів, ферментів тощо). Виявлено, що збільшення кількості ненасичених жирних кислот (таких, як ліноленова та лінолева) у складі мембран спричинює зниження температури фазового переходу мембранних ліпідів і, як результат, збільшення їх текучості. При сильній дегідратації порушуються зв'язки між ліпідами і білками мембран.

При позаклітинному утворенні льоду в мембранах з'являються ділянки, які не містять білків.

Важливим фактором стійкості клітин до низькотемпературного впливу є функціонування потужної антиоксидантної системи. До неї входять високомолекулярні (ферменти супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатіонредуктаза), а також низькомолекулярні (аскорбат, токоферол, глутатіон, фенольні сполуки) антиоксиданти. За умов низькотемпературного стресу активність антиоксидантних ферментів значно зростає і збільшується вміст низькомолекулярних антиоксидантів, що сприяє зниженню ушкодження клітин.

Способи підготовки до глибокого заморожування.

Стійкість клітин *in vitro* до заморожування залежить від їх вихідного морфологічного стану, який визначається особливостями культивування, фазою росту і т.д. Відомо, що клітини рослин характеризуються найвищою стійкістю до заморожування в стаціонарній фазі росту. Можна заморожувати клітини і у логарифмічній фазі росту, підбравши оптимальну швидкість охолодження. Іноді при цьому виникає необхідність у застосуванні кріопротекторів. При проведенні робіт з кріозбереження необхідно насамперед враховувати специфіку рослинних клітин, відбираючи дрібні клітини з невеликими вакуолями і зниженим вмістом води.

Фізіологічні підходи до процесу кріоконсервації відрізняються різноманітністю. Один з них – стадія культивування перед кріоконсервуванням.

В ряді випадків кріостійкість організмів залежить від складу культурального середовища. При зміні величини співвідношення вуглецю і азоту в живильному середовищі, доповненні його жирними кислотами, солями кальцію або іншими компонентами змінюється кріочутливість організмів, вирощених в цих умовах.

У зв'язку з цим було запропоновано попереднє культивування клітин рослин у відповідних умовах. Встановлено позитивний вплив на кріостійкість як короткої інкубації клітин при зниженій температурі, так і загартування –

природної підготовки морозостійких клітин. Загартування суспензій клітин в культурі *in vitro* проводять при поступовому зниженні температури культивування і одночасному збільшенні концентрації сахарози в середовищі, а також додаванні різних кріопротекторів. Однак, слід наголосити, що здатність клітин до загартування є генетично детермінованою ознакою.

Інший фізіологічний підхід підготовки до кріозбереження, заснований на зниженні водного потенціалу середовища при додаванні до нього осмотичне активних речовин – кріопротекторів. Серед відомих кріопротекторів виділяються такі легко проникаючі в клітини речовини, як диметилсульфоксид (ДМСО, 5-10%), гліцерин (10-20%), а також непроникаючі високомолекулярні сполуки – полівінілпіролідон (ПВП), декстран, поліетиленгліколь (ПЕГ) з молекулярною масою 6000.

Кріопротекторами можуть також слугувати сахароза, трегалоза та суміші цих розчинів. Крім того, попереднє культивування з маннітом та сорбітом (у концентрації 2-6%) сприяє значному зменшенню розтягнення клітин за рахунок зниження їх оводненості.

Наступний спосіб підготовки пов'язаний з фізіологічною роллю деяких ендогенних амінокислот при стресах, обумовлених водним дефіцитом. Це в першу чергу пролін, а також аланін, аспарагін, серин, гліцин, γ -аміномасляна кислота.

При спостереженні за клітинами під кріомікроскопом можна простежити за процесом утворення внутрішньоклітинного льоду, що перебуває в прямій залежності від ступеня переохолодження, швидкості заморожування, наявності чи відсутності центру ініціації кристалізації розчину, який оточує клітину.

Важливу роль при кріозбереженні має режим підбору заморожування.

Так, для кріозбереження клітин, тканин рослин і мікроорганізмів доцільно застосовувати програмне заморожування з ініціацією кристалізації та швидкістю охолодження. На першому етапі швидкість заморожування становить 0,25-1,0°C/хв (і температура -40°C), на другому – швидкість збільшують до 9-10°C/хв і при досягненні температури біля -60°C матеріал занурюють у рідкий

азот. Цей процес проводять на спеціальному устаткуванні, яке забезпечує програмне заморожування.

Етап видалення кріопротекторів і рекультивування вимагає особливої обережності, оскільки клітини, що вижили зазнають сильного стресу і частково ушкоджуються. Для їх збереження необхідно мінімізувати всі фактори для запобігання ушкодження плазмалеми клітині, зокрема повинні бути видалені кріопротектори. Для інтенсифікації процесу рекультивування запропоновано фізіологічний спосіб, заснований на дифузії кріопротекторів з клітин в рідке середовище після висіву суспензії клітин на фільтри, розміщені на поверхні розчину. Це дозволяє замінити розчин, не впливаючи на клітини та уникнути додаткового стресу.

Для визначення життєздатності клітин після відтаювання застосовують простий спосіб – забарвлення вітальним барвником (0,1%-м розчином феносафраніну або 0,25%-м розчином синьки Еванса). При цьому мертві клітини набувають синього кольору. Остаточним критерієм життєздатності клітин після розморожування слугує відновлення їх росту і поділу при рекультивації на штучні живильних середовищах.

Таким чином, якщо до моменту глибокого заморожування клітинні штами зберігають здатність до регенерації, то після кріозбереження є можливість регенерувати клітини незалежно від строків їхнього зберігання в рідкому азоті. Відновлювати ріст клітинних культур можна через роки. Слід наголосити, що ембріогенні та морфогенетичні потенції клітин при кріозбереженні не змінюються за умови, що не порушується режим зберігання.

Тобто температура не повинна перевищувати -140°C , а всі етапи кріоконсервування були оптимізовані. Отже, кріозбереження за своєю сутністю є консервацією в стані анабіозу (кріобіозу), коли всі процеси життєдіяльності призупинені, але при відповідному розморожуванні та рекультивуванні їх можна відновити і «оживити» біологічні об'єкти.

Необхідно враховувати морфофізіологічні та генетичні особливості клітин, їх здатність до загартування, ступінь проникності клітинних мембран,

підбір суміші кріопротекторів, швидкість зниження температури при заморожуванні і, відповідно, умови розморожування.

Незвичайні умови, в яких виявляється тканинна система при холодовій консервації, дозволяють побачити неоднозначність взаємовідносин між окремими клітинами та тканиною. Саме за цих умов можна побачити, що життєздатні клітини далеко не завжди забезпечують життєздатність тканини.

Неоднозначність взаємовідносин між окремими клітинами та тканинною системою можна побачити на прикладі консервації органів та тканин. Отже, немає сумнівів, що з нормального функціонування тканини необхідна наявність у ній життєздатних клітин. У той же час умови збереження трупних тканин та органів для трансплантації дозволяють побачити, як іноді при життєздатних клітинах тканина виявляється нежиттєздатною.

При кріоконсервації (тобто при температурі рідкого азоту) добре зберігаються ембріональні, стовбурові та пухлинні клітини. Цей метод давно зарекомендував себе у регенеративній медицині. Справді, запліднена яйцеклітина може роками зберігатися в умовах кріоконсервації, даючи потім нормальний розвиток зародка. Проте кріоконсервація не є ефективною для збереження органів для трансплантації.

Чому неможливо ефективно зберегти окремі клітини тканин або органів, що трансплантуються, у тих же умовах? Проте проблема у окремих клітинах. Про це свідчить той факт, що окремі клітини рогівки також добре зберігаються в умовах кріоконсервації. Іншими словами, суть справи в тому, що в тих самих умовах (тобто при кріоконсервації) виживають окремі клітини, але життєздатна тканина як цільна структура зберігається далеко не завжди. Наприклад, клінічна практика не передбачає використання для кератопластики з оптичними цілями донорської рогівки, що зберігалася в холодильнику більше 7 днів, тому що з погляду клініки такий трансплантат вже нежиттєздатний.

Проте втрату життєздатності рогівки не можна пояснити патологічними змінами клітин. Якщо приготувати зразки тканинної культури з такої нежиттєздатної рогівки, то клітини демонструють нормальне зростання *in vitro*.

Більше того, клітини рогівки зберігають здатність рости *in vitro* навіть через 2-3 тижні після зберігання на холоді.

Іншими словами, коли рогівка вже зовсім непридатна для трансплантації (тобто нежиттєздатна як тканинний трансплантат), її клітини цілком життєздатні – вони можуть ділитися, утворюючи тканинну культуру.

Розбіжність клінічних поглядів на життєздатності рогівки з біологічними можна пояснити тим, що у кожному разі оцінюються різні об'єкти. Дійсно, у клінічному плані важлива життєздатність рогівки як цілісної тканини, а при експерименті *in vitro* життєздатність клітин рогівки розглядається поза зв'язком із тканинною системою.

Виживання клітин недостатня задля забезпечення життєздатності тканини як функціонально цілісної системи. Це підводить нас розуміння найважливішої біологічної та медичної закономірності: біологічна смерть тканинної системи може відбуватися без ушкодження клітин.

Аналіз цієї проблеми дозволив звернути увагу на особливу роль взаємин клітин із позаклітинним матриксом у підтримці життєздатності тканин. Клітини не гинуть за умов тривалого консервування, оскільки, на відміну самої клітини, позаклітинний матрикс перестав бути компартменталізованим. У тканинній системі збереження контактів між клітиною та матриксом забезпечується клітинним метаболізмом, який припиняється в умовах холодового зберігання та кріоконсервації. Отже, можна нескінченно довго зберігати окремі клітини, але неможливо забезпечити життєздатність тканин та органів у тих самих умовах, оскільки в цьому випадку не вдається зберегти в нативному стані зв'язок між біомолекулами матриксу та клітинною мембраною. Клітина, будучи учасницею патологічного процесу, не завжди стає його безпосередньої мішенню, тобто патологічний процес, наприклад, переживання тканини в умовах консервації може протікати без патологічних змін у клітині. За низьких температур процеси деградації в клітині припиняються, що дозволяє зберігати її в умовах низькохолодової консервації нескінченно довгий час. Однак у цьому випадку клітина перестає забезпечувати метаболізм позаклітинного матриксу, що

призводить до втрати міжмолекулярних зв'язків між клітиною та матриксом. Лабільність клітинно-матриксних відносин визначається такими фізико-хімічними процесами, як, наприклад, водневий обмін між білковими молекулами, який не припиняється навіть за низьких температур, коли обмінні процеси відсутні. В результаті після виходу з холодової консервації клітини, що окремо вижили, втрачають контакти всередині тканинної системи.

Вивчення незвичайних взаємин між клітинами та тканиною при консервації дозволило поглянути на вікові зміни ендотелію рогівки з іншого боку. Ці спостереження ставлять під сумнів той принцип, що патологію тканин завжди можна розглядати як суму патологій окремих клітин, а старий організм неминуче повинен складатися із старих клітин. Таким чином, ця обставина відіграла важливу роль у руйнуванні цього стереотипу мислення про старіння тканинної системи.

Лекція 13

Культури клітин людини

Практично будь-які клітини людини можуть бути введені в культуру й служити засобом й об'єктом у багатьох медико-біологічних дослідженнях. Одна

з найважливіших переваг клітин у культурі – можливість прижиттєвого спостереження за ними за допомогою мікроскопа. Немало важно й те, що культури клітин у ряді випадків можуть бути рівноцінною заміною клінічних експериментів, для яких потрібна була б участь добровольців. Експерименти, що вимагають для з'ясування того або іншого питання використання 1000 чоловік, можуть бути з рівною статистичною вірогідністю поставлені на 100 культурах на покривних скельцях.

Завдяки культивуванню клітин можливості дослідження й діагностики розширюються майже безмежно, тому що є можливість оцінки не тільки морфологічних і біохімічних змін, але й змін у поведженні клітин, їхньої реакції на різні агенти, у тому числі й на вплив ліків. Оскільки клітини в культурі легко доступні для різних біохімічних маніпуляцій, то при роботі з ними радіоактивні попередники, отрути, гормони й інші агенти можуть бути введені в заданій концентрації й протягом заданого періоду. Зникає небезпека того, що досліджувана сполука метаболізується печінкою, запасається м'язами або екскретується нирками. При використанні клітинних культур, як правило, легко встановити час контакту досліджуваної речовини із клітинами, зміну його концентрації протягом даного періоду часу. Це забезпечує одержання реальних значень швидкості включення або метаболізму досліджуваних сполук.

Клітинні лінії застосовують для тестування й вивчення механізму дії різних речовин, які можуть бути використані як лікарські препарати, детергентів, косметичні засоби, інсектициди, консерванти. Результати, отримані на клітинних культурах, не можна екстраполювати на цілий організм, але якщо досліджувана речовина має пошкоджуючу дію у декількох лініях культивованих клітин, то варто очікувати й несприятливого ефекту на організм людини.

Крім того, якщо в ряді поколінь відтворюється дефект, властивий клітинам *in vivo*, значить це дефект спадковий. Завдяки можливостям генної інженерії зміна генотипу клітин стала реальністю. Ми можемо виділити з організму мутантні клітини, замінити *in vitro* дефектні гени, одержати лінію здорових генно-модифікованих клітин й ввести їх знову в організм.

Найбільше поширення одержали культури фібробластів. Широке використання фібробластів для вивчення патогенезу й діагностики спадкових хвороб зумовлено не тільки легкістю їхнього культивування, але й тим, що сполучна тканина, головним клітинним елементом якої є фібробласти, становить значну частину маси тіла. Крім того, фібробласти становлять строму багатьох органів, є важливими учасниками їхнього морфогенезу й створюють умови мікрооточення, необхідного для диференціації й функціонування спеціалізованих клітин. У фібробластах є фермент моноаміноксидаза, зміни активності якої характерні для деяких нервових і психічних захворювань. Фібробласти містять рецептори до глюкокортикоїдних гормонів, інсуліну, деяких нейромедіаторів.

Грінбергом у 1978 році була доведена можливість екстраполяції даних, отриманих на культивованих фібробластах, на умови *in vivo*.

Фібробласти мають комплекс особливостей, що дозволяють застосовувати їхню культуру, як зручний об'єкт дослідження:

1. Легкість культивування.
2. Фібробласти є клітинним елементом сполучної тканини, що становить значну частину маси тіла людини.
3. Фібробласти становлять строму багатьох органів, є важливим учасником їхнього морфогенезу.
4. Фібробласти створюють всі умови для мікрооточення, необхідного для диференціювання та функціонування спеціалізованих клітин.
5. У фібробластах є фермент моноаміноксидаз.
6. Фібробласти містять рецептори до глюкокортикоїдних гормонів, інсуліну, нейромедіаторів.
7. Усі зміни, що виникають при веденні культури фібробластів, легко контролюються і зводяться до мінімуму, при створенні відповідних умов культивування.
8. Фібробласти *in vitro* зберігають найважливіші риси, властиві клітинам в організмі людини.

На початку XX століття Олександр Максимов виявив, що клітини походять від єдиного предка – стовбурової клітини (СК). З того часу вчені постійно шукали СК, сподіваючись навчитися керувати їх диференціюванням і отримувати певні тканини, а якщо пощастить, то й органи. Шукали такі клітини на ранніх стадіях розвитку організму. Так, Хейфлік використовував абортівний матеріал, у якому, проте, клітини вже придбали спеціалізацію та пішли кожна своїм шляхом розвитку. Інші ж брали ембріони тварин і людини на більш ранніх стадіях, сподіваючись отримати стовбурові клітини, які ще не визначилися з напрямком розвитку.

70-і роки: Отримані клітини, що підтримувалися в культурі мінімум рік. Але вони відрізнялися від вихідних клітин зародка, не мали бажане диференціювання і мали хромосомні аномалії.

1998 р.: Отримані перші лінії ембріональних стовбурових клітин людини, які могли підтримувати у недиференційованому стані. Для цього їх вирощували на фідері – шар з ембріональних фібробластів, убитих радіацією. На фідері ЕСК утворюють характерні колонії, які називаються ембріодними тільцями (рис. 12), а за його відсутності – починають спонтанно диференціюватися, причому цей процес важко піддається контролю.

Основною метою отримання диференційованих клітин із ЕСК є їх використання для репарації ушкоджених тканин. ЕСК також знайшли широке застосування у фармакології як джерело нормальних людських клітин різних типів для тестування ліків. Ще одна важлива місія ЕСК – внесок у розуміння процесів диференціювання, регенерації та репарації, що може бути використане для активації власного регенеративного потенціалу організму.



Рис.12. Схема отримання та мікрофотографія колонії ЕСК. Ембріональні клітини (~100 шт) отримують на 5-9 день після екстракорпорального запліднення із внутрішньої клітинної маси бластоцисти. Ці клітини висаджують на фідер із умертвлених фібробластів. Приблизно через тиждень можна виявити утворені ними колонії - ембріодні тільця (праворуч).

Проблеми:

- Введення недиференційованих ЕСК в організм викликає утворення тератом (пухлин із усіх типів тканини).
- Ембріональні стовбурові клітини імунологічно не ідентичні реципієнту, а значить, їхнє підсаджування викликає імунну відповідь.
- У культурі ЕСК часто присутні недодиференційовані клітини, які при виведенні можуть спричинити утворення пухлин.
- Просте введення клітин не забезпечує їх правильної локалізації у тканині, формування повноцінного позаклітинного матриксу та набуття потрібної активності.
- Терапевтичний ефект від введення, безумовно, є, але повного відновлення пошкодженої тканини або втраченої функції досягти поки що не вдається.

У 1999 році журнал «Science» визнав відкриття ембріональних *стовбурових клітин* третьою за значимістю подією в біології після розшифрування подвійної спіралі ДНК та програми «Геном людини». Стівурові клітини – це

ієрархія особливих клітин живих організмів, кожна з яких здатна згодом диференціюватися особливим чином (тобто отримувати спеціалізацію і надалі розвиватися як звичайна клітина). Стовбурові клітини здатні асиметрично ділитися, через що при розподілі утворюється клітина, подібна до материнської (самостворення), а також нова клітина, яка здатна диференціюватися. У 1908 році термін «ствбурова клітина» було введено у науковий побут російським гістологом Олександром Максимовим (1874-1928) на з'їзді гематологічного суспільства на Берліні. Він постулював існування стовбурової кровотворної клітини. 1981 року американський біолог Мартін Еванс вперше виділив недиференційовані плюрипотентні лінії стовбурових клітин – бластоцисти миші. В 1998 Д. Томпсон і Д. Герхарт виявили безсмертну лінію ембріональних стовбурових клітин (ЕСК).

Коренем ієрархії стовбурових клітин є тотипотентна зигота. Перші кілька поділів зиготи зберігають тотипотентність і при втраті цілісності зародка може призводити до появи монозиготних близнюків. До гілок ієрархії відносяться плюрипотентні (омніпотентні) та мультипотентні (бластні) стовбурові клітини. Кінцевими елементами ієрархії є зрілі уніпотентні клітини тканин організму. Нішами стовбурових клітин називаються місця в тканині, де постійно залягають стовбурові клітини, що діляться при необхідності для подальшої диференціації. Стовбурові клітини розмножуються шляхом поділу, як і всі інші клітини. Відмінність стовбурових клітин у тому, що можуть ділитися необмежено, а зрілі клітини зазвичай мають обмежену кількість циклів поділу. В організмі є ряд популяцій стовбурових клітин різного ступеня зрілості. У нормальному стані, чим більш зрілою є клітина, тим менша ймовірність того, що вона зможе перетворитися на клітину іншого типу. Але все ж таки це можливо завдяки феномену трансдиференціювання клітин. У різних органах і тканинах дорослого організму існують стовбурові клітини, що частково дозріли, готові швидко дозріти і перетворитися на клітини потрібного типу. Вони називаються *бластними клітинами*. Наприклад, клітини мозку, що частково дозріли, – це нейробласти, кістки – остеобласти і так далі.

Диференціювання можуть запускати як внутрішні причини, і зовнішні.

Стовбурові клітини таять у собі небачені можливості: від регенерації пошкоджених органів прокуратури та тканин до лікування захворювань, які піддаються лікарської терапії. Найбільш універсальні ембріональні стовбурові (ES – *embrionic stem*) клітини. Вони були взяті на ранній стадії розвитку плода з тієї його частини, яка в нормі дає початок трьом різним шарам (зародковим листкам) пізнішого ембріона і, зрештою, – всім органам та тканинам. Більшість ES-клітинних ліній людини, що знаходяться сьогодні у розпорядженні вчених, отримані від незвичайних ембріонів – вони були створені внаслідок штучного запліднення *in vitro*. Однак не всі вони ідентичні. Для перевірки плюрипотентності запропоновано два тести, давно апробованих на ES-клітинах тварин.

- Перший тест заснований на введенні передбачуваних ES-клітин в організм якоїсь тварини. Якщо утворюється тератома (пухлина, що містить клітини всіх трьох зародкових листків), то плюрипотентність можна вважати доведеною.

- Другий тест полягає в маркуванні клітин-кандидатів і введенні їх у ембріон, що розвивається. Якщо клітини виявляються у всіх тканинах дитинчати, що народилося, то вони швидше за все плюрипотентні. Однак застосування подібної методики може призвести до появи тварини-химери, у всіх тканинах якої присутня людська ДНК, що з етичної точки зору є неприйнятним.

Щоб отримати лінію ES-клітин, з бластоцисти відбирають внутрішню клітинну масу і поміщають її в чашку Петрі з клітинами-годувальницями. Через кілька днів у чашці утворюється колонія клітин, які можна віднести до ембріональних стовбурових, якщо вони відповідають двом умовам: дають позитивний результат на стандартні тести і мають здатність до самопідтримання.

Характеристика ембріональних стовбурових клітин:

1. Тотипотентність – здатність утворювати будь-яку із 350 тканин організму.
2. Хоумінг – здатність стовбурових клітин, при введенні їх в організм, знаходити зону пошкодження і фіксуватися там, виконуючи втрачену функцію.
3. Тіломірна активність.

4. Наявність у цитоплазмі мРНК всіх 3 тисяч генів, які відповідають за ранній розвиток зародка.

Показано, що сховищем стовбурових клітин організму служить кістковий мозок, де стовбурові клітини знаходяться у своєрідної ніше в оточенні стромальних клітин, які беруть участь у передачі регуляторних сигналів.

Індуковані плюрипотентні стовбурові клітини

Грандіозним проривом у галузі клітинних технологій після відкриття ЕСК стала можливість перепрограмування зрілих диференційованих клітин організму в плюрипотентні стовбурові клітини, названі індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами (ІПСК, або iPSC) (рис. 13).

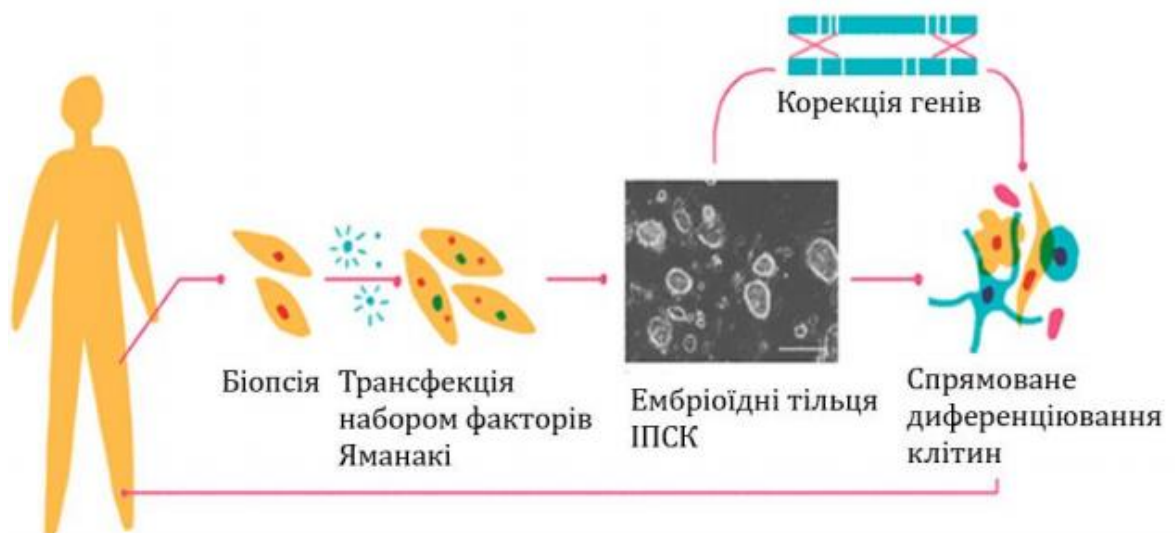


Рис.13. Схема отримання та зображення ембріїдних тілець ІПСК.

Клітини дорослого організму одержують шляхом біопсії, після чого їх трансфецирують набором транскрипційних факторів (факторів Яманаки) та висаджують на фідер. Для репрограмування клітин та формування ембріїдних тілець необхідно 16 днів. Після цього ІПСК можна отримувати клітини заданого типу шляхом спрямованого диференціювання і за необхідності коригувати несправні гени. Отримані клітини можуть бути використані для введення пацієнту для відновлення функцій тканини.

Основні особливості:

1) ІПСК отримують без використання ембріонів, що знімає безліч етичних обмежень.

2) ІПСК можна отримати від самого пацієнта, що дозволяє забезпечити повну імуносумісність.

3) Існують протоколи отримання ІПСК, у яких фактори перепрограмування експресуються тимчасово (не вбудовуючись у геном), що знижує ризик виникнення онкогенних мутацій.

4) ІПСК генетично ідентичні донору і можуть бути використані як *in vitro* моделі для вивчення індивідуальних молекулярних механізмів патології та для персоналізованого підбору ліків.

Перспективи та проблеми використання стовбурових клітин.

Перспективи

- Можливість регенерації пошкодженої тканини та органу, при введенні в осередок ураження ES стовбурових клітин.

- "Омолодження" організму на клітинному рівні.

- Терапія нейродегенеративних захворювань, інфаркту міокарда, дистрофії різного генезу.

- Відкриття механізмів утворення ракових стовбурових клітин та суттєвий прогрес у галузі онкології.

Проблеми

- Плюрипотентність ES-клітин таїть у собі багато несподіванок. Введені клітини можуть ініціювати утворення тератоми або тканин зовсім іншого типу ніж потрібно.

- Клітини-попередники можуть спричинити імунну реакцію з боку організму-господаря. Подібно до клітин трансплантованих органів, вони несуть на своїй поверхні антигени, що сприймаються імунною системою як сигнал до атаки.

- Для створення банку клітин, в якому знайшлися б сумісні з організмом хворого, знадобляться мільйони ембріонів, відбракованих у клініках зі штучного запліднення.

- Можливість виникнення мутації в ES-клітинах, внаслідок чого вони перетворюються на ракові.

- Дуже повільне зростання стовбурових клітин у культурі та складності їх культивування.

- Кількість стовбурових клітин у ембріона становить 1 клітина на 10 тисяч, у людини в 60-80 років – 1 клітина на 5-8 мільйонів.

Таким чином, поки що вивчення стовбурових клітин породило більше питань, ніж дало відповідей. Однак, результати перших тестів на можливість застосування дорослих стовбурових клітин для лікування, зокрема серцево-судинних захворювань, дуже обнадіюють. Проведено успішні експерименти на тваринах щодо застосування похідних ES-клітин для лікування нейродегенеративних розладів, що, можливо, підштовхне відповідні клінічні випробування на людині.

Лекція 14

Технологія «орган-на-чипі»

Останні п'ять-шість десятиліть стали свідками значних науково-технічних досягнень у біотехнології та біомедичних дослідженнях. Цей прогрес поглибив

наше розуміння механізмів захворювання, призвів до ідентифікації нових мішеней для ліків і полегшив відкриття біомаркерів. Первинна оцінка ефективності ліків, токсичності та клітинних механізмів у біомедичних дослідженнях є важливою перед клінічними випробуваннями. Проте традиційним моделям клітинної культури *in vitro* бракує фізіологічної складності, тоді як моделі тварин *in vivo* стикаються з етичними проблемами, міжвидовими відмінностями та обмеженою перекладальністю. Нещодавні прориви в біомедичних дослідженнях, мікрівиробництві та мікрофлюїдці проклали шлях для розробки мікроінженерних моделей функціональних одиниць органів людини, відомих як органи на чіпах (Organ-on-a-chip – OOC). Технологія «орган-на-чіпі» з'явилася на початку 21 століття як революційний підхід до моделювання функцій органів людини *in vitro*.

Ця інноваційна технологія охоплює спектр типів органів, включаючи печінку, легені, кишечник, нирки, мозок, серце та шкіру. Відтворюючи основні фізіологічні властивості людських органів, OOC мають здатність трансформувати ландшафт відкриття ліків та персоналізованої медицини.

Традиційні моделі, такі як моделі на тваринах і системи клітинних культур, відіграли важливу роль у біомедичних дослідженнях і розробці ліків. У сфері розробки ліків, вивчення захворювань і оцінки безпеки OOC пропонують переконливі переваги перед традиційними 2D/3D моделями культур клітин.

У 2D клітинних культурах клітини вирощують на плоскій поверхні, тоді як у 3D клітинних культурах клітини вирощують у тривимірному просторі, як правило, вбудованому в гелеподібну матрицю або міцний каркас. Незважаючи на те, що 2D-моделі культури надають достатньо даних за відносно низьку вартість, вони не можуть відтворити складну патофізіологію, що спостерігається у пацієнтів-людей. Це обмеження вимагає комп'ютерного моделювання та

системної біології для прогнозування реакції на ліки *in vivo* (рис.9).

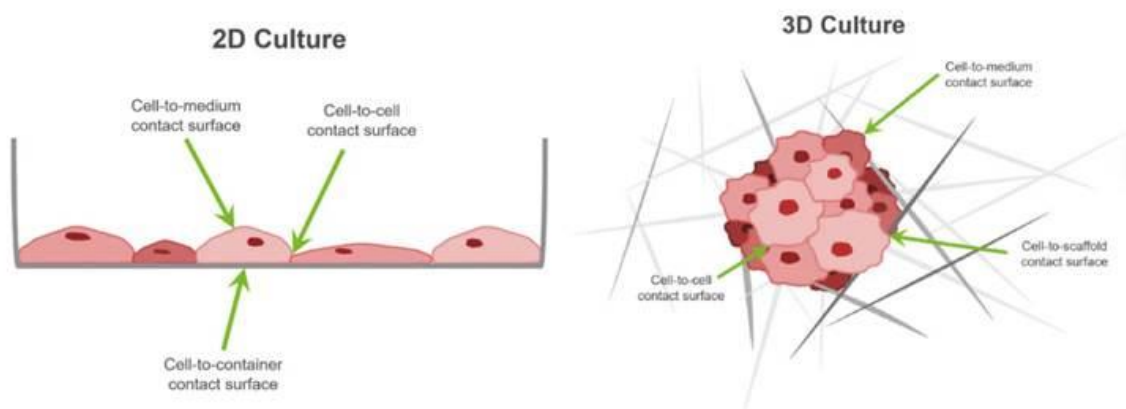


Рис.9. 2D та 3D моделі клітинних культур

Біоміметичні (використання біологічних методів і структур для розробки інженерних рішень та технологічних методів). тривимірні тканинні структури, обладнані фізіологічними бар'єрами, точно імітують доставку та проникнення ліків *in vivo* порівняно з двовимірними моношарами клітин у звичайних культуральних моделях (табл. 5).

Таблиця 5

Переваги 2D та 3D клітинних культур

Переваги 2D клітинних технологій	Переваги 3D клітинних технологій
Швидка проліферація та утворення колоній (від декількох хвилин до декількох годин)	Моделює <i>in vivo</i> міжклітинні взаємодії та взаємодію між клітинами та клітинним середовищем
Більш низька коштовність реагентів	Збережена морфологія
	Імітує жорсткість тканин
	Добра відтворюваність результатів

Однак 3D-моделі культури обмежені у своїй здатності відтворювати складні фізіологічні функції на рівні органів і клінічно значущі прояви захворювання, що включають різні типи тканин, проблеми, які можна подолати за допомогою ООС (рис. 10). Крім того, ООС пропонують можливість регулювати рухи рідини, дозволяючи відтворювати різноманітні механічні стимули, такі як викликані фізіологічним потоком (наприклад, циркуляція крові та інтерстиціальний потік). Такий потік рідини неможливий у 3D моделях

культури. Цей відмітний атрибут ООС дозволяє більш повно і точно прогнозувати складні реакції на ліки в живих організмах.

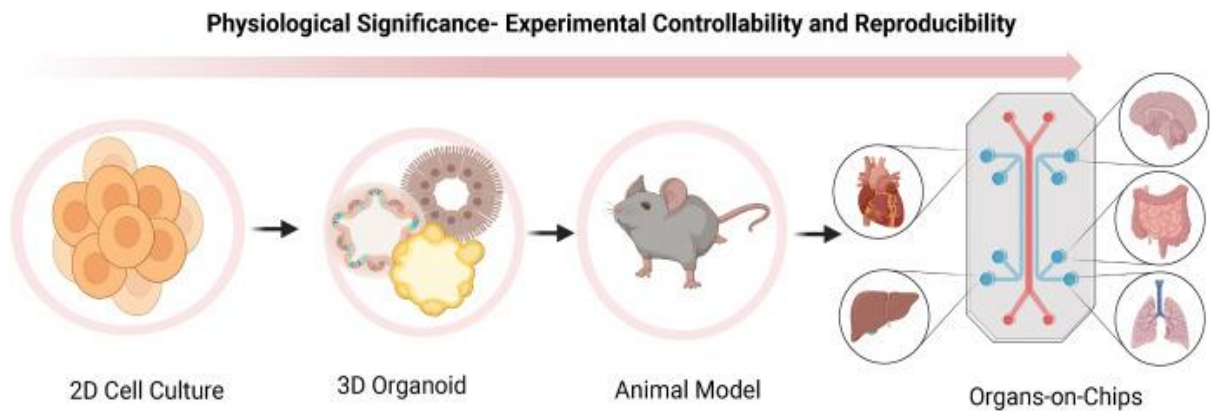


Рис. 10 . Ілюстрація із зображенням доклінічних моделей, які використовуються в біомедичних дослідженнях

Звичайні 2D/3D клітинні культури забезпечують швидку та надійну реакцію на ліки, але їх здатність повністю відтворювати фізіологію та патологію живих органів обмежена. Тваринні моделі точно імітують фізіологічні аспекти, але не сумісні з людиною. Мікрофлюїдні ООС платформи пропонують експериментально керовану клітинну культуру в органотиповому мікроархітектурному середовищі, забезпечуючи більш фізіологічно значущу платформу.

ООС також мають помітні переваги в порівнянні з існуючими моделями тварин. Незважаючи на те, що дослідження на тваринах можуть імітувати фізіологічну складність на рівні всього організму, їх достовірність і можливість передачі на людину все частіше ставляться під сумнів. Останні систематичні оцінки їх прогностичної цінності показали обмежену кореляцію між даними, отриманими в результаті досліджень на тваринах, і результатами на людях. Це пов'язано зі значними міжвидовими відмінностями в ключових шляхах розвитку захворювання та профілях експресії генів. Це підкреслює нагальну потребу в інноваційних підходах до моделювання складних умов, пов'язаних з людиною. Системи ООС надають фундаментальну перевагу перед моделями тварин, забезпечуючи візуалізацію в реальному часі та кількісний аналіз із високою

роздільною здатністю спектру біологічних процесів людини. Завдяки цим унікальним перевагам OOCs мають потенціал перевершити звичайні моделі *in vitro* та *in vivo* у забезпеченні надійних біомедичних досліджень і розробки ліків.

Основною проблемою *in vitro* методів є те, що клітини знаходяться у нетиповому середовищі, що негативно впливає на репрезентативність результатів досліджень, тому одним з головних напрямків розвитку даних методів є наближення умов культивування клітин до умов живого організму. Органи на чипах є новітнім *in vitro* методом, покликаним наближувати умови культивування клітин до умов *in vivo*. Вже сьогодні ці моделі застосовуються для пошуку та тестування нових лікарських засобів, моделювання захворювань, а в майбутньому можливе їх масове застосування для персоналізованої медицини, оскільки є можливість дослідження клітин кожного окремого пацієнта, високопродуктивного скринінгу, що є одним із способів пошуку нових ліків та відслідковування різних біологічних процесів (рис. 11).

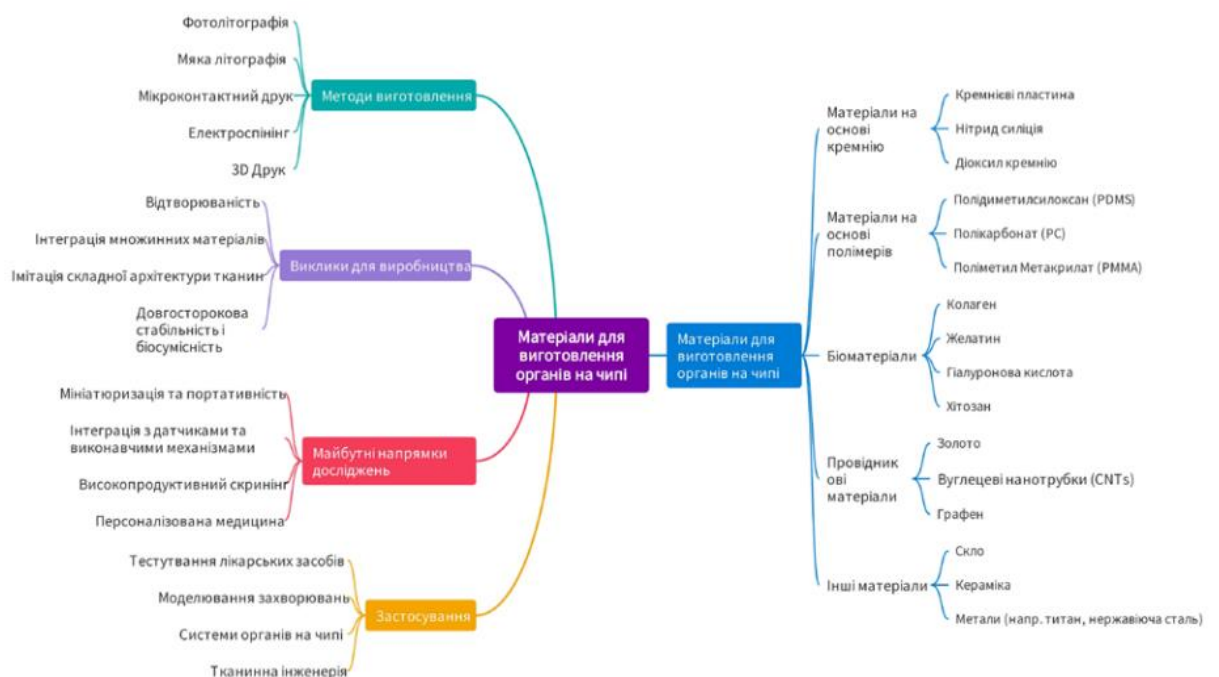


Рис. 11. Основні матеріали для виготовлення органів на чипі

Незважаючи на вдосконалення технології 3D-культур, нині культури підтримуються лише у статичному стані, що відрізняється від фізіологічної реальності. У ході спостережень з'ясувалося, що вплив на клітинні культури фізіологічних сил (перистальтика кишечника, розтягування легень), які діють на

ці клітини в організмі, призводить до посилення диференціації клітин. Логічним результатом цього спостереження стала розробка системи, яка зможе створювати ці сили та підтримувати життєздатність клітин. Так з'явилися органи-на-чипі (ООС). Теоретично такі пристрої допоможуть полегшити і прискорити розробку ліків, завдяки високій схожості моделі з реальним організмом людини.

Мікрофлюїдика або мікрогідродинаміка – наука і однойменна технологія, де використовується оперування маленькими об'ємами рідин ($10^{-9} \dots 10^{-18}$ л) у каналцях з розміром від десятків до сотень мікрометрів. При створенні мікрофлюїдних систем використовуються напрацювання у сферах мікрогідродинаміки, мікроелектроніки та матеріалознавства. Орган на чипі (ООС) – система культивування клітин, заснована на мікрофлюїдиці, у яких невеликі камери та каналці, заселені клітинами, постійно перфузуються, чим досягається наближення умов культивування до фізіологічних умов організму. Органи на чипі дають змогу регулювати швидкість потоку рідин/повітря, градієнти концентрації, розташування клітин, взаємодію тканина-тканина, та навіть взаємодію між органами, оскільки вже існують «системи на чипі». У майбутньому очікуються моделі «тварина на чипі» та «людина на чипі», тобто по-суті моделювання цілого живого організму.

Для виготовлення ООС використовуються скло, кремній, натуральні та синтетичні полімери, метали, і застосовують найновітніші технології, такі як м'яка літографія, 3D друк.

Найбільш поширеним матеріалом для виготовлення ООС є полідиметилсилоксан (PDMS). PDMS це полімер, а конкретно еластомер, що є біоінертним, хімічно стабільним, газопроникним, прозорим та має відповідні механічні властивості. Також розповсюдженню цього матеріалу сприяв розвиток м'якої літографії – технології, що дозволяє створювати та копіювати мікро- та наноструктури на еластомерах, особливо саме на PDMS. Основним недоліком PDMS є гідрофобність (кут змочування близько 108°), а для адгезії клітин потрібна гідрофільна поверхня. Для того, щоб зробити поверхню гідрофільною, використовуються різні методи. Найбільш розповсюдженим є обробка плазмою,

але ефект пропадає вже через кілька хвилин після обробки і може відбуватися пошкодження поверхні, також часто застосовується коронний заряд, але від нього ефект також довго не тримається.

Також може застосовуватися обробка ультрафіолетовим світлом та озоном. На даний момент активно розробляються нові методи, що допомагають утримувати поверхню PDMS гідрофільною протягом більш тривалого часу.

Окрім еластомерів, можуть застосовуватися і термопласти. Серед них полістирол (PS), поліметилметакрилат (PMMA), полікарбонат (PC), циклічний олефіновий полімер (COP), циклічний олефіновий кополімер (COC). Серед неорганічних матеріалів у органах на чипах може використовуватися скло та кремній, причому перші органи на чипах були зроблені саме на основі кремнію. Основна проблема – кремній не є прозорим, тому з цієї точки зору скло є більш виграним варіантом. Однак, не зважаючи на те, що на склі гарно адгезують клітини та не притягуються гідрофобні молекули, цей матеріал не є газопроникним, що ускладнює аерацію клітин. Папір використовується для створення мембран. Це дешевий та доступний матеріал. Целюозна матриця може бути використана для вирощування 3D культур через свою пористість. Окрім цього можуть застосовуватись нітроцелюлозні мембрани, що схожі на паперові.

Гідрогелі – зшиті полімери, що здатні утримувати в собі рідину, найчастіше воду, при чому не розчинаючись. У ООС можуть застосовуватись для створення мембран, скафолдів, полімерних мікрокраплин для культивування сфероїдів, тощо. Колаген – найбільш поширений матеріал для отримання гідрогелів і має дуже широке застосування в ООС і застосовується для моделювання багатьох тканин. Фібриновий гідрогель може забезпечувати постачання кисню та поживних речовин, що дозволяє його використовувати для моделювання васкуляризованих тканин. Колаген може застосовуватись для моделювання серцевої тканини, гематоенцефалічного бар'єру, шкіри.

Для розвитку методик тестування ліків та створення пристроїв, які називаються «органи-на-чіпі», потрібно було поєднати безліч наукових знань. У

цій технології зливаються біологія, хімія, математика, матеріалознавство, інженерія, мікротехнологія, комп'ютерне моделювання, програмування та ін.

Орган-на-чипі – це прозора платівка, на якій витравлені або надруковані каналці та комірки. У комірки висаджують 3D-культуру клітин потрібного органу, а каналцями подають ті середовища, які необхідні клітин. Пластина оснащена різними датчиками за допомогою яких можливий моніторинг стану клітинної системи.

Більш точно ООС були описані як «придатні для використання мікрофлюїдні системи, що містять живі субкультури органу в контрольованому середовищі, які відтворюють один або кілька аспектів динаміки, функціональності та (пато)фізіологічної реакції органу *in vivo* при моніторингу в реальному часі» – визначення Е.Томассен із Медичного центру Лейденського університету (рис. 12).

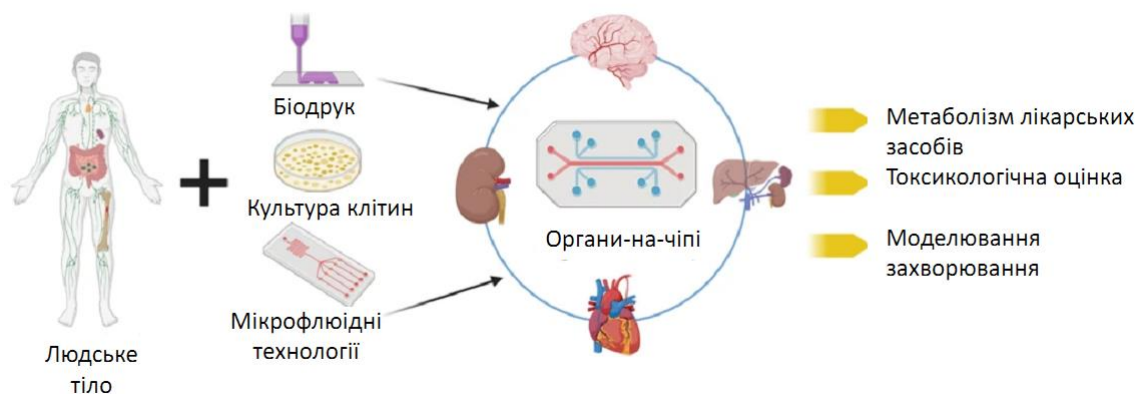


Рис. 12. Схема створення технології орган-на-чипе

Сам чіп, а точніше прозора пластинка, до недавнього часу створювався з використанням полідиметилсилоксану (PDMS). Головними плюсами, завдяки чому стали використовувати для органів-на-чипі саме його, є те, що він не токсичний, не шкодить культурі клітин, прозорий, проникливий для газів, має низьку автофлуоресценцію і досить дешевий. Він дозволяє створювати різні дизайни чіпа, тому що на нього можна нанести рисунок за допомогою м'якої літографії. Але головним недоліком PDMS є його здатність поглинати невеликі гідрофобні сполуки, через що фактична концентрація знижується. В якості

альтернативи в таких випадках використовують полістирол, полікарбонат та поліметилметакрилат. Однак вони менш довговічні, ніж PDMS, і дорожчі. Технологія тривимірного друку теж може бути альтернативою при створенні пристрою. Завдяки тому, що друк проводиться пошарово, датчики, які були обрані для даного чіпа, можуть бути розміщені в ньому в будь-якому місці та положенні. Як клітинний матеріал для чіпа можуть використовуватися ті ж клітинні лінії, що і для 3D-культур, наприклад, клітинна лінія Caco-2 (*лінія клітин аденокарциноми товстої кишки людини, яка широко використовується як модель in vitro для дослідження процесів абсорбції, транспорту та метаболізму речовин у тонкому кишечнику*).

У світі існує безліч видів ООС. Вченим вдалося створити аналоги печінки, нирок, легенів, серця, кісток, шкіри, кишечника, мозку та інших органів.

«Легені на чіпі» Ключовий елемент легень – це тришарова мембрана в альвеолах. Вона забезпечує не тільки газообмін, а й низку інших функцій на кшталт активації імунної системи. Складається така мембрана з клітин легеневого епітелію, проникного позаклітинного матриці та клітин кровоносних капілярів. Саме цей «інтерфейс» і відтворюватиметься усередині мікроканального чіпа (рис. 13).

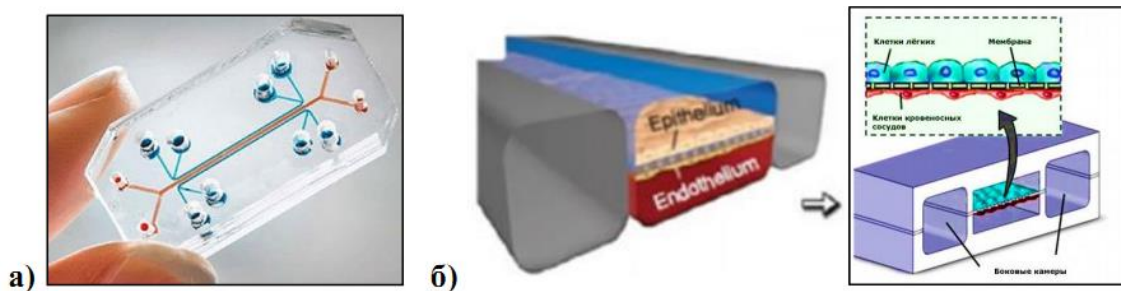


Рис. 13. «Легені на чіпі» (а) і схематичне зображення (б)

У ролі матриці виступає найтонша гумова мембрана з безліччю мікроскопічних отворів. По обидва боки від неї розташовані живі людські клітини, відповідно капілярні та клітини легеневого епітелію. З боку останніх вакуумний насос імітує цикл дихання, а з протилежного боку чіпа пропускається рідина, що імітує кровотік. У блакитні лунки можна додавати те, що надходить у систему з повітря, а червоні – те, що має потрапити у кров (наприклад, клітини імунної системи, щоб вивчати її реакцію на легеневу інфекцію).

«Серце на чіпі» Технологія «серце на чіпі» полягає у використанні тонкої м'язової плівки для оцінки структур та функцій міокарда. Ця система дозволяє в реальному часі вимірювати скорочення тканини серцевого м'яза у відповідь на патофізіологічні умови, поєднуючи механічні, електричні та хімічні стимули. Просування даної технології продемонструвала не лише мікроконтактний друк фібронектину на тонких гнучких плівках PDMS, але й електричну стимуляцію анізотропно-організованих кардіоміоцитів, а також безліч сконструйованих серцевих тканин на чіпі для тестування ліків з використанням технології 3D-друку. На рис. 14 надано 3D надруковане «серце-на-чіпі».

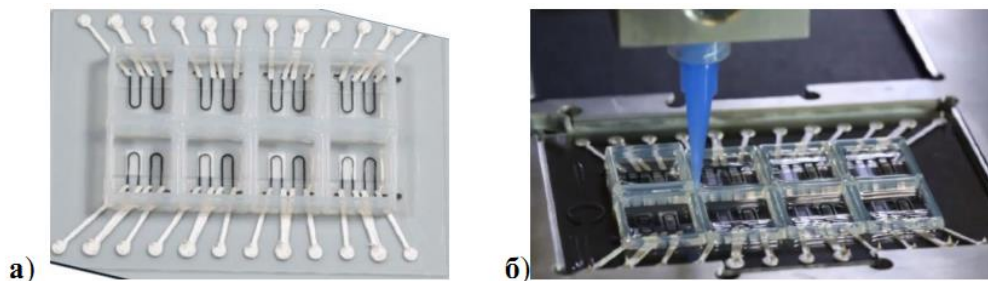


Рис. 14. «Серце на чіпі» (а) та друк чіпа на 3D принтері в (б)

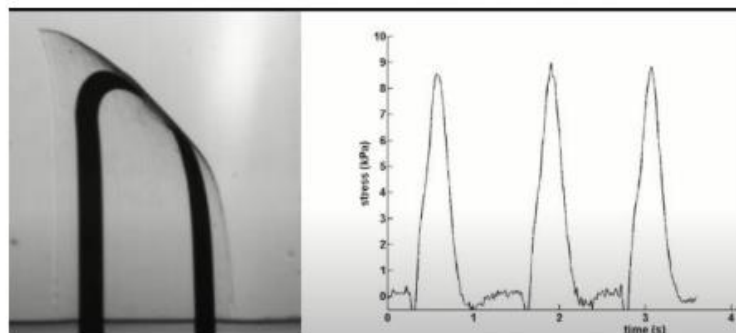


Рис. 15. Графічне зображення відповіді тканини на ліки та токсини
За допомогою мікрофлюїдики був виготовлений масив реакційних камер PDMS, пов'язаних з датчиками та стимулюючими електродами, як пристрій, який електрохімічно та оптично може контролювати метаболізм кардіоміоцитів, отриманих з індукованих людиною плюрипотентних стовбурових клітин.

«Кишечник на чіпі» Пристрій дозволяє вирощувати клітинну культуру кишечника людини та бактерії, що населяють кишечник. З її допомогою, можливо, відтворити і вивчити процеси, що відбуваються в тілі людини, недоступні іншим методам дослідження. Склад кишкових бактерій впливає на здоров'я людини: деякі захворювання, наприклад, цукровий діабет або ожиріння,

пов'язані саме з дисбалансом мікрофлори. Однак сучасні методи в цій галузі обмежені експериментами на тваринах, результати яких не можна однозначно перенести на людину. У статті, опублікованій у журналі *Nature Communications*, вчені зі США та Люксембургу представили систему, яка розширить можливості досліджень, – мікропроточний чіп HuMiX (Human-Microbial Crosstalk). HuMiX імітує анаеробні безповітряні умови, в яких існують мікроорганізми і клітини епітелію кишечника. Система складається з трьох осередків: у верхній частині містяться поживні речовини, у середній камері на тонкій мембрані ростуть людські клітини, а в самому низу – бактеріальна культура з одного або кількох штамів (рис. 16).

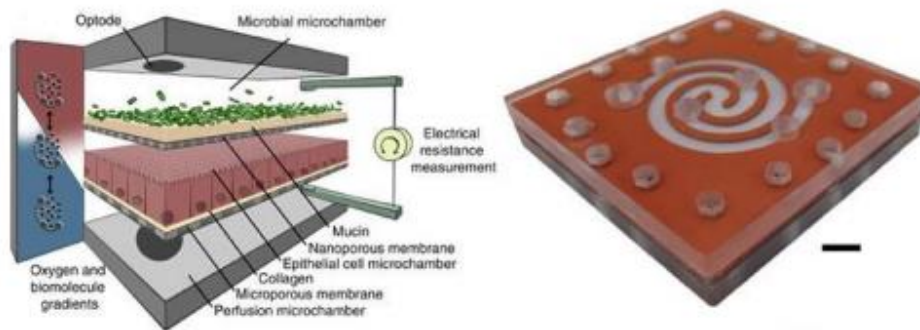


Рис. 16. Концептуальна схема моделі HuMiX для репрезентативної спільної культури епітеліальних клітин людини з мікробіотою шлунково-кишкового тракту

«Печень-на-чіпі» Першу мікрофлюїдну систему печінки розробив Філіп Лі з його колегами. Вона складалася з клітин печінки щура та фібробластів миші. Гепатоцити щурів культивувалися в чіпі, стабільно синтезуючи та метаболізуючи альбумін. Чіп імітував інтерстиціальний простір між ендотеліальними клітинами печінки та гепатоцитами, як показано на рис. 17, відкриваючи нові можливості для досліджень обміну речовин.

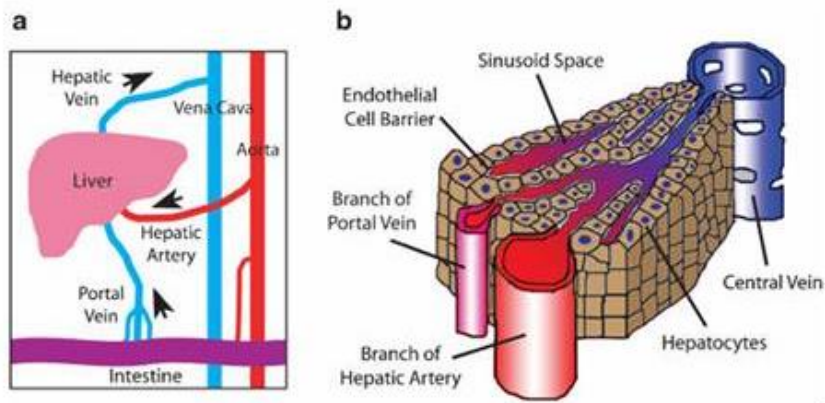


Рис. 17. «Печінка на чіпі» (а) і схематичне зображення (б)

Від органу-на-чіпі до тіла-на-чіпі Технологія «орган на чіпі» дозволяє вченим бачити біологічні механізми та фізіологічну поведінку певного людського органу, що раніше було неможливо. «Орган на чіпі» дозволяє проводити реалістичні та точні випробування нових ліків => перспективи створення людини на чіпі та можливості інтеграції моделі «тіла на чіпі» з індивідуальними клітинами людини для їхньої подальшої трансплантації. Це дозволить уникнути проблеми з відторгненням імунної системи пересадженого органу.

Об'єднавши кілька систем «орган-на-чіпі», можна почати створювати частини всього тіла та належним чином розглянути біологічний процес, який ліки виконували б у реальному пацієнті.

Це може означати такі різноманітні біологічні механізми, як імунна відповідь, всмоктування ліків у кишечнику, легенях чи кровоносних судинах, скорочення м'язів, метаболізм у печінці тощо (рис. 18).

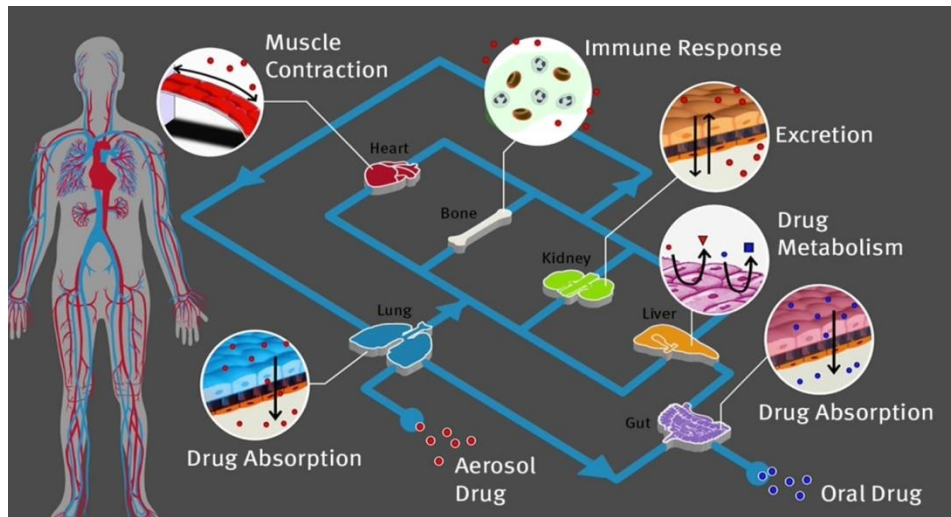


Рис. 18. Технологія тіла-на-чипі

Знову ж таки, це має вирішальне значення, оскільки більшість ефектів ліків (позитивних і негативних) можна зрозуміти, лише беручи до уваги реакцію різних органів на них.

Органи на чипах є надзвичайно перспективним методом досліджень і в наступні роки слід очікувати поширення їхнього використання. Завдяки можливості регулювати велику кількість параметрів, можна значно наблизити умови культивування до фізіологічних умов організму, що значно підвищує репрезентативність результатів. Разом із цим, можна створити середовище, що моделює певне захворювання. Такі моделі є необхідними для пошуку нових ліків та методів лікування.

Перелік літератури

Основна:

1. Артёмов О.В., Литвиненко М.В., Чеботарьова С.О., Кацап О.В. Клітини і тканини в умовах консервації: дві стратегії виживання. *Sectoral research XXI: characteristics and features. SCIENTIA*. 2023. September 8. P.156-159.
2. Ботаніка : короткий конспект лекцій для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти ОПП «Агрономія» спеціальності 201 «Агрономія» заочної форми здобуття вищої освіти / уклад. В. Г. Миколайчук. Миколаїв : МНАУ, 2021. 60 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/21894>
3. Голембіовська О. Біобезпека технологій біомедичних продуктів на прикладі мікрофлюїдних чіпів. *Біобезпека та сучасні реабілітаційні технології. Теорія, практика, перспективи* : матеріали IV науково-практичної міжнародної конференції (м. Київ, 24-25 жовтня 2024 р.). Київ : НТУУ «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», 2024.
4. Загальна цитологія : підручник / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, А. Пустовалов та ін. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2020. 640 с. URL: <https://biomed.knu.ua/institute-activity/educational/kafedry/kafedra-cytology/library-cytology/3451-zagalna-tsitologiya-pidruchnik.html>
5. Капрельянц, Л. В. Теоретичні основи біотехнології : навчальний посібник. Харків : Факт, 2020. 291 с.
6. Карлаш Ю.В., Красінько В.О. Основи проєктування біотехнологічних виробництв : навчальний посібник. Київ : НУХТ, 2022. 373 с. URL: <https://dspace.nuft.edu.ua/items/8feec337-f1e3-4ec3-976b-641b40d835b5>
7. Кравченко О. О., Савчук О. М., Остапченко Л. І. Загальна біотехнологія : навчальний посібник. Київ : ВПЦ "Київський університет", 2019. 269 с. URL: https://biomed.knu.ua/images/stories/Kafedry/Biochimiya/Biblioteka/Osnovy_biotehnologiji_posibnyk.pdf

8. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей. Харків : НТУ ХПІ : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. 151 с.
9. Кунах В. А. 185-річчя клітинної теорії та клітинні технології сьогодні. *Фактори експериментальної еволюції організмів* 2024. Т. 34. С. 8-14. URL: http://jnas.nbuu.gov.ua/j-pdf/feco_2024_34_3.pdf
10. Кучменко О. Б., Марченкова А. І. Молекулярна біологія клітини : навчальний посібник. Ніжин: НДУ ім. М. Гоголя, 2021. 135 с. URL: <http://lib.ndu.edu.ua/dspace/bitstream/123456789/2144/1/макет.pdf>
11. Новак В. П., Бевз О. С., Мельниченко А. П. Цитологія, гістологія, ембріологія : підручник. Львів : Магнолія 2006, 2024. 436 с.
12. Новак В.П., Ільніцький М.Г., Бевз О.С., Мельниченко А. П. Атлас гістологічних препаратів : навчальний посібник. Ч. 1: Цитологія, загальна ембріологія, загальна гістологія. Біла Церква : БНАУ, 2023. 42 с. URL: https://rep.btsau.edu.ua/bitstream/BNAU/12943/1/atlas_gistologichnyh.pdf
13. Ружицька Б., Голембіовська О. Матеріали для органів на чипі. *Modern technologies of biomedical engineering : proceedings of the II international scientific and technical conference* (Odesa, Ukraine, May 17-19, 2023), Odesa, 2023. С.59-63.
14. Krasnopolsky Y. M., Pylypenko D. M. Biotechnological research in the creation and production of antirabic vaccines. *Biotechnologia acta*. 2021. Vol. 14, no. 4. P. 28–37. URL: <https://doi.org/10.15407/biotech14.04.028>.

Додаткова

1. Загальна цитологія і гістологія : підручник / за ред. М. Е. Держинського ; упоряд. Н. В. Скрипник Київ : Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2010. 575 с.
2. Карпов О. В., Демидов С. В., Кир'яченко С. С. Клітинна та генна інженерія : підручник. Київ : Фітосоціоцентр, 2010. 208 с. URL:

<https://dspace.nuft.edu.ua/bitstreams/a7b498b4-1574-44b9-9dda-063a8a3962d2/download>

3. Манушкіна Т. М. Біотехнологія в рослинництві : курс лекцій. Миколаїв : МНАУ, 2014. 51 с. URL: <https://dspace.mnau.edu.ua/jspui/handle/123456789/3181>
4. Мельничук М. Д., Кляченко О. Л. Біотехнологія а агросфері : уавчальний посібник. Київ Національний університет біоресурсів і природокористування України, 2014. 245 с. URL: https://nubip.edu.ua/sites/default/files/biotehnologiya_v_agrosferi.pdf
5. Пирог Т. П., Ігнатова О. А. Загальна біотехнологія : підручник. Київ : НУХТ, 2009. 336 с.
6. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А. А. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. Біла Церква : БНАУ, 2018. 209 с.

Навчальне видання

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Курс лекцій

Укладачі: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 5,4.
Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02. 2013р.